

湖南农业大学

全日制普通本科生毕业论文

W (VI) 暴露对斑马鱼的毒性效应研究

TOXICOLOGICAL EFFECTS OF W (VI) EXPOSURE TO
ZEBRAFISH

学生姓名：方文易

学 号：201942063102

年级专业及班级：2019 级 GJ 环境科学（1）班

指导老师及职称：杜辉辉 副教授

学 院：环境与生态学院

湖南·长沙

提交日期：2023 年 5 月

湖南农业大学全日制普通本科生毕业论文

诚信声明

本人郑重声明：所提交的本科毕业论文是本人在指导老师的指导下，进行研究工作所取得的成果，成果不存在知识产权争议。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体在文中均作了明确的说明并表示了谢意。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

毕业论文作者签名：



2023年5月15日

目 录

摘 要	1
关键词	1
1 前言	2
1.1 研究背景	2
1.2 钨的毒理学研究现状	3
1.3 斑马鱼在毒理学研究的应用	4
1.4 生物的氧化应激和抗氧化系统	4
1.5 技术路线	5
2 材料与方法	5
2.1 试验材料	5
2.2 实验设计	5
2.3 样品采集	6
2.4 测定方法	6
2.4.1 鱼组织中钨含量的测定	6
2.4.2 过氧化氢酶 (CAT) 的测定	6
2.4.3 还原性谷胱甘肽 (GSH) 的测定	7
2.4.4 丙二醇 (MDA) 的测定	7
2.4.5 超氧化物歧化酶 (SOD) 的测定	7
2.4.6 活性氧 (ROS) 的测定	7
2.5 数据处理	7
3 数据分析与讨论	8
3.1 钨酸钠对斑马鱼的毒性实验	8
3.2 钨酸钠胁迫下斑马鱼活性氧 (ROS) 含量变化	9
3.3 钨酸钠胁迫下斑马鱼 SOD 酶活性变化	10

3.4 钨酸钠胁迫下斑马鱼 CAT 酶活性变化	11
3.5 钨酸钠胁迫下斑马鱼 GSH 含量变化	12
3.6 钨酸钠胁迫下斑马鱼丙二醛 (MDA) 含量变化	13
4 讨论	14
5 结论	15
参考文献	17
致 谢	20

W (VI) 对斑马鱼的亚急性毒性机理

学 生：方文易

指导老师：杜辉辉

(湖南农业大学环境与生态学院，长沙 410128)

摘要：本课题以斑马鱼为受试生物，根据 OECD 203 和 204 进行毒性试验，研究钨对斑马鱼存活率及其肌肉组织酶活性的影响。结果表明，钨酸钠 14 天的 LC_{50} 为 (1.79-5.85 g W L⁻¹ 或 9.73-31.63 ×10⁻³ mol Na₂WO₄ L⁻¹)，可将其归类为对鱼类低毒的物质。高浓度组 (500 mg L⁻¹ 和 1000 mg L⁻¹) 和低浓度组 (10 mg L⁻¹ 和 50 mg L⁻¹) 的 SOD 活性都被显著抑制，CAT 和 GSH 活性除 10 mg L⁻¹ 外也都被显著抑制。相反，所有浓度组的 ROS 水平显著增加且与浓度成正比关系，表明发生了氧化应激。同时，MDA 含量与 GSH 活性呈负相关性，且在 500 mg L⁻¹ 暴露时升高水平尤为明显 (为对照组水平的 177.34%)，出现了脂质过氧化现象，抗氧化能力减弱。我们的研究表明长期暴露于钨酸钠浓度 >10 mg L⁻¹ 会对斑马鱼产生氧化应激和损伤。这些结果对评价的钨毒理作用和探索钨对水生生物的毒性机制具有重要意义。

关键词：斑马鱼；钨；重金属；酶活性；毒理学

Subacute Toxicity of W (VI) to Zebrafish

Student: Fang Wenyi

Tutor: Du Huihui

(College of Resources and Environment, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: In this study, zebrafish was used as the test organism, and the toxicity test was carried out according to OECD 203 and 204 to study the effect of tungsten on the survival rate of zebrafish and the enzyme activity of muscle tissue. The results showed that the 14-day LC_{50} of Na₂WO₄ was 1.79-5.85 g W L⁻¹ or 9.73-31.63 ×10⁻³ mol Na₂WO₄ L⁻¹, which could be classified as a low toxic substance to fish. SOD activity was significantly inhibited in both high (500 mg L⁻¹ and 1000 mg L⁻¹) and low (10 mg L⁻¹ and 50 mg L⁻¹) concentration groups, and CAT and GSH activities were also significantly inhibited in all

but 10 mg L⁻¹ groups. In contrast, ROS levels were significantly increased and proportional to concentration in all concentration groups, indicating that oxidative stress occurred. At the same time, the content of MDA was negatively correlated with the activity of GSH, and the level of MDA increased especially when exposed to 500 mg L⁻¹ (177.34% of the control level), and the phenomenon of mass peroxidation occurred, and the antioxidant capacity was weakened. Our study shows that Long-term exposure to more than 10 mg L⁻¹ Na₂WO₄ could induce oxidative stress and damage in zebrafish. These results are important for evaluating the toxicological effects of tungsten and exploring the toxic mechanisms of tungsten to aquatic organisms.

Key words: Zebrafish; tungsten; heavy metals; enzyme activity; toxicology

1 前言

1.1 研究背景

钨金属已成为全球广泛应用于工业和生活的重金属，随着新合成化合物的制造工艺和开发不断增加以跟上不断扩大的全球需求，环境健康和接触有毒物质的影响正在成为关键的公共卫生问题。在先前的研究中金属钨被认为是无毒无害对人体和生态系统危害性低的物质。它是一种天然存在的过渡金属，是一种灰白色有光泽的金属，常温下为固体。具有多种有利特性，包括高熔化温度、强度和柔韧性。运用十分广泛，常见于各种制成品中，包括灯泡灯丝、弹药和爆炸装置。此外，钨还被广泛运用于医疗器械，例如：整形外科的假体、牙科植入、血液馆内栓塞线圈和机械心脏瓣膜。钨甚至被研究作为治疗糖尿病的一种可能的药理学药物，因为它已被证明可以降低胰岛素缺乏患者的血糖^[1,2]。

当含钨材料暴露在水和土壤中时，可能会转化为可溶性钨盐并通过口服、吸入和皮肤途径被人体或生物吸收，从而引发毒理效应^[3]。此外，钨还被怀疑与美国三个社区（内华达州法伦；亚利桑那州谢尔克维斯塔；加利福尼亚州埃尔克格罗夫）的急性淋巴细胞性白血病集群有关，并且对鱼类也有害。但有关钨的毒理学概况，以及其对活体生物潜在危害和暴露途径的潜在影响，目前还尚不明确。Koutsospyros 等人^[4]得出的结论是，迄今为止，钨及其化合物仍然是管制和研究最少的金属物质。2008 年，美国环境保护署 (EPA) 和美国国家毒物计画 (NTP) 将钨归类为新兴毒物，但我们对钨暴露相关的潜在健康风险的了解仍然有限，需要进行更多调查。

我国是钨精矿生产大国，但对于钨污染的重视却远远不够，因此研究钨对生态的

影响是十分重要的。同时关于可溶性钨水生生态的毒理研究仍然较为匮乏^[5,6]。因此，研究可溶性钨盐对水生生物的影响机制对评估钨对水生态系统的风险和制定相关环保政策具有重要意义。

1.2 钨的毒理学研究现状

国内外现有研究表明钨酸盐、氧化钨等对小鼠和植物都存在不同程度的毒性效应。金属钨的存在导致土壤群落中大部分细菌成分的死亡和真菌生物量的增加^[7]。对于人类健康，通常与长期呼吸或皮肤病相关，研究表明钨可以通过摄取、吸入或注射的方式进入生物体的血液，但能够通过尿液被迅速排出体外。在慢性摄取的情况下，人体软组织中的钨的水平需要长达 3 年才能达到稳定水平，骨骼中的钨含量将会被持续富集^[8]。

Miller K.等人^[1]研究了急性吸入金属钨微粒后小鼠肺部和骨骼微环境的变化。小鼠在 7 天中每天 4 小时分别暴露于低钨浓度 (0.6 mg/m^3) 和高浓度钨 (1.7 mg/m^3) 中，结果表明钨浓度在小鼠肺组织的浓度为没有明显变化，表明钨颗粒并未从肺部被清除，但钨颗粒不会引起肺部持续性的氧化应激，此外巨噬细胞、嗜中性粒细胞的数量和促炎细胞因子分泌的增加，表明钨微粒对肺生态位微环境的改变可能导致肿瘤和肺部纤维化。此外，一些研究表明人为活动导致的地表水和地下水资源中的钨富集是显而易见的，在高度工业和农业的盆地河流中，钨的富集是其他地区的 1~3 个数量级。钨似乎不仅以氧阴离子可溶性形式（主要是 WO_4^{2-} ）存在，而且还作为与小无机胶体相关的物质存在。法国维希等地瓶装矿泉水的地下水水源检测到平均钨含量为 $62.73 \text{ } \mu\text{g/L}$ 。美国内华达州的一组急性淋巴细胞白血病的调查显示，饮用水的钨含量高达 $(0.25\text{-}742 \text{ } \mu\text{g/L})$ 。但目前尚不清楚可溶性钨对生态系统或营养链的影响程度^[9]。Strigul N^[10,11]和 Clements L N^[6] 等人分别进行了可溶性钨的急性毒性试验和慢性毒性试验。结果表明钨酸钠对于斑马鱼是低毒的，但并未详细研究钨暴露对斑马鱼的毒性机制。

Gustavo S.^[2]等研究了小鼠口服钨酸钠后钨在体内的分布状况。表明钨主要在骨骼和脾脏中积累，但也在结肠、肾脏、肝脏和大脑中观察到保留。Sachdeva S.^[12]等研究了大鼠在饮用水中慢性暴露（120 天）于钨酸钠观察其氧化应激、组织变化、钨分布。结果表明在 100 ppm 剂量下肾小管细胞发生退行性变化，在 200 ppm 发生显著退行性变化，包括肾小球系膜增生、细胞坏死、肾小球空泡形成、肾小球和血管充血等，同时还伴随淋巴细胞衰竭、巨核细胞出现以及纤维蛋白物质在脾脏中积累。并导致活性氧 (ROS) 和 TBARS 水平升高（氧化应激），还原型谷胱甘肽 (GSH) 耗尽（抗氧化反应下降）。揭示了钨酸钠对大鼠的主要中毒机理即通过氧化应激、钨积累和凋亡细胞增

加从而导致组织结构的变化。

1.3 斑马鱼在毒理学研究的应用

斑马鱼(*Danio rerio*)作为受试生物,已被用于研究各种化合物,从天然存在的金属和类金属,到消费品的合成成分,农药,以及工业加工和废物焚烧的副产品。它是预测化学毒物毒性的有效工具,拥有许多优势,例如体积小、繁殖周期短、胚胎透明、成本低等优点。作为一个毒理学模型,斑马鱼可以暴露发育毒性机制,其和哺乳动物暴露于毒物后的毒性效应与信号通路基本一致^[13]。此外,斑马鱼与人类基因组具有高度同源性。近二十年来,斑马鱼正在成为遗传学、环境毒理学、药理学的强大模式生物。。

使用斑马鱼监测有毒重金属的最常用方法是对胚胎和成年斑马鱼进行毒性实验。一些重金属可以抑制酶的活性或影响基因表达。通过观察毒素在斑马鱼体内的影响,我们可以直接评估毒性,以及测定吸收、分布、代谢和消除^[14]。同时,还可以采用检测胚胎或成年斑马鱼中的酶活性和生物标志物的基因表达,从而对水生环境中的有毒重金属进行间接检测。研究发现,斑马鱼体内的 SOD 酶、CAT 酶和乙酰胆碱酯酶,在暴露于 Cd、Zn 或甲基时会对其硫磷造成影响,这三种酶也可以作为联合污染检测的生物标志物^[15]。

1.4 生物的氧化应激和抗氧化系统

生物系统的氧化应激是一个复杂的过程,其特征在于自由基(FR)的产生和机体通过内源性和外源性抗氧化剂消除这些活性物质的能力之间的不平衡。ROS 是自由基(FR)或自由基前体,过多的自由基能够对直接的代谢产生造成影响,这可能是细胞损伤的起源。还会引起脂质过氧化而产生流动性损失和细胞裂解。此外,还会导致蛋白质失活和变性,在核酸中,通过修饰碱基产生诱变和致癌作用^[16]。

生物体的抗氧化系统可分为酶系统和非酶系统。酶的抗氧化物质包括 SOD、CAT、GPx 等,和一些维生素(A、C、E)、Se 和各种多酚类化合物,能够清除一部分 ROS^[17]。通过酶系统和非酶系统产生的一些氧自由基,会攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸。从而造成脂质的过氧化的现象,形成脂质过氧化物,比如 MDA 和酮类物质。为了防止这些物质的累积,生物体内会开始清除多余的 ROS。主要是通过 SOD 将氧自由基转化为过氧化氢分子,同时, SOD 又能够被 CAT 和 GPx 降解为 H₂O。此外, CAT 和 SOD 还是参与生物体氧化应激的两种重要酶。其活性和含量的变化能够反映生物体内氧化/抗氧化系统的平衡,从而间接反映机体内氧化损伤的情况,如酶失活、DNA 断

裂等^[18]。

1.5 技术路线

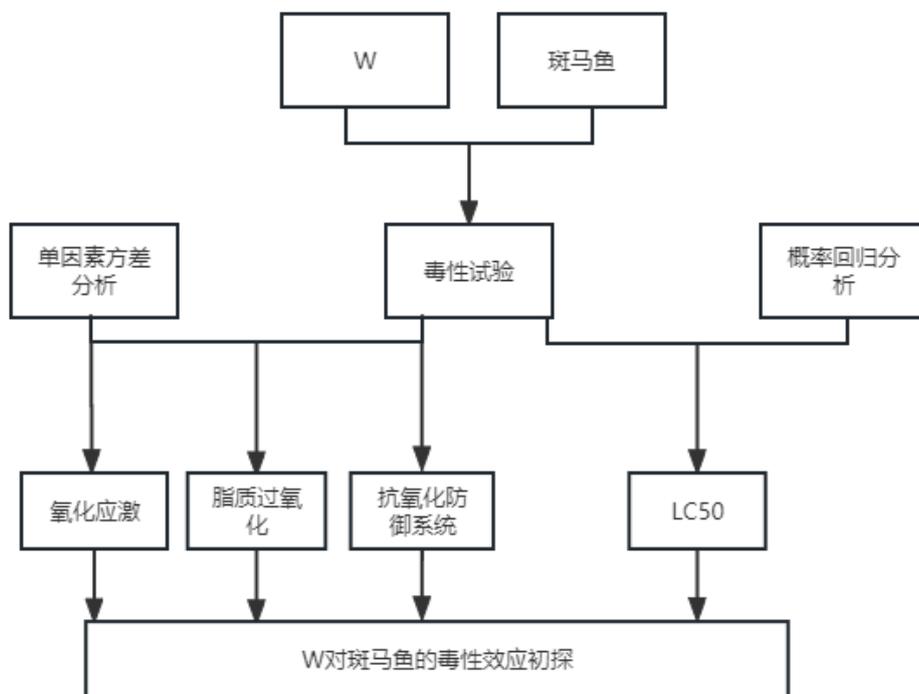


图 1 技术线路图

Fig.1 Technical wiring diagram

2 材料与方法

2.1 试验材料

斑马鱼(Danio rerio), 购自山东一溪月生物科技有限公司。为 AB/TU 品系 2~3 月龄的蓝斑马鱼, 雌雄各半体长 (25 ± 5) mm, 质量为 (0.1 ± 0.05) g, 用 48h 曝气脱氯自来水在实验室驯养 7d 用于实验。实验用水的水质符合《渔业水质标准》(GB11607-1989), 斑马鱼再驯养过程的死亡率 $< 5\%$ 。

2.2 实验设计

设计急性毒性试验, 在每个浓度放置 6 条鱼, 对在 96h 存活的鱼进行 14 天延长毒性试验。在前四天鱼不吃任何食物, 之后每天喂食 2 次, 每天将鱼移到相同浓度的预充气钨溶液中。取同一天同一浓度死亡的鱼在超纯水中洗净, 称量, 烘干后, 进行消

化。最后通过 ICP-OES 测量样品体内的钨富集含量^[11]。

根据急性毒性实验结果，计算其半致死剂量 LC_{50} ，设置亚急性毒性浓度组，暴露浓度分别为 1000、500、50、10 mg ($Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$) L^{-1} ，持续暴露 21d，试验液用 48h 脱氯自来水进行稀释。每个实验组设 3 个重复，在 7d、14d、21d 从每个浓度中取出 6 条鱼，并在冰上解剖，组织立即在预冷的 PBS 缓冲液中漂洗，称重，在冰浴条件下，进行样品采集并根据试剂盒的说明进行超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 活性和丙二醛 (MDA)、活性氧 (ROS) 和蛋白质含量的测定。

2.3 样品采集

每部分的组织标本被分成三部分。第一部分在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 50 mM pH (7.4) 中匀浆，用于估计蛋白质含量、CAT 酶活性和 GSH 水平^[19]。第二部分在 10 mM pH (7.4) 磷酸钾缓冲液中用于估计 MDA 水平和 SOD 活性。将粗制组织匀浆在离心 15 分钟 ($4^{\circ}C$, 10,000g)。第三部分在磷酸盐缓冲盐水 (PBS, 0.1M) 中匀浆，将匀浆离心 10 分钟 ($4^{\circ}C$, 1,000g)，并将上清液离心 20 分钟 ($4^{\circ}C$, 20,000g)。将沉淀重悬于一定体积的均质缓冲液中，然后取悬浮液以检测 ROS 水平。所得上清液用于不同的评估。使用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒 (Solarbio, 中国)，对组织匀浆中蛋白质的含量进行检测。

2.4 测定方法

2.4.1 鱼组织中钨含量的测定

死鱼用超纯水进行清洗，称重，在 $80^{\circ}C$ 的烘箱中干燥 12 小时。将干鱼称重、切碎并与 HNO_3 (5 mL)、 HCl (1 mL)、 H_3PO_4 (0.5 mL) 和 H_2O_2 (3 mL) 一起放入 50 mL 消化瓶中。将小瓶在罩下的加热块中在 $180^{\circ}C$ 下打开加热 2 小时，在消解过程中额外添加 3 mL H_2O_2 以补偿蒸发损失。冷却样品，通过 Whatman 42 滤纸过滤，并用去离子水稀释至 50 mL。最后，通过电感耦合等离子体发射光谱 (ICP-OES) 技术，对样品中的钨含量进行测定^[11]

2.4.2 过氧化氢酶 (CAT) 的测定

使用钼酸铵法进行测定，该方法基于 H_2O_2 可与钼酸铵反应形成稳定的黄色复合物，在 405nm 处有强烈吸收峰，吸光值大小与过氧化氢浓度成正比，通过测量反应体系中剩余的 H_2O_2 的量，得出被 CAT 催化分解的 H_2O_2 的量，从而反应 CAT 的活性。其吸光度可通过使用商业试剂盒 (Solarbio, 中国) 在 405nm 处测量。

2.4.3 还原性谷胱甘肽 (GSH) 的测定

该方法基于用还原型谷胱甘肽 (GSH) 还原 5,5 二硫代双 (2-硝基苯甲酸) (DTNB) 生成黄色化合物 2-硝基-5-巯基苯甲酸和谷胱甘肽二硫化物(GSSG)^[20]还原色与 GSH 浓度成正比其吸光度可通过使用商业试剂盒 (Solarbio, 中国) 在 412 nm 处测量。

2.4.4 丙二醇 (MDA) 的测定

该方法依赖于脂质过氧化最终产物 MDA 的形成, 它与硫代巴比妥酸 (TBA) 反应产生硫代巴比妥酸活性物质 (TBARS), 一种粉红色的色原体, 可以在 532 nm 处用分光光度法测量, 使用商业试剂盒 (南京建成, 中国) 进行测定。

2.4.5 超氧化物歧化酶 (SOD) 的测定

采用 WST-1 法进行测量, 该方法的原理基于 WST-1 能够与黄嘌呤氧化酶 (Xanthine Oxidase) 催化产生的超氧化物阴离子 ($O_2^{\cdot-}$) 反应生成水溶性的甲臞染料。因为 SOD 能够催化超氧化物的阴离子发生歧化反应, 所以该过程可以被超氧化物歧化酶所抑制。因此 SOD 的活性与甲臞染料的生成量呈负相关, 根据对 WST-1 产物的比色分析, 就能计算出 SOD 的活力^[21]。通过商业试剂盒 (南京建成, 中国), 在 532nm 处测量吸光度。

2.4.6 活性氧 (ROS) 的测定

根据 Li W 等人的方法使用二氯荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) 进行 ROS 的测定^[22]。DCFH-DA 本身没有荧光, 但能够和生物体内的活性氧发生氧化反应, 生产带有荧光的 DCF。通过 DCF 的荧光值可以得到样本内 ROS 的水平浓度。将 190 μ L 悬浮液与 DCFH-DA (10 μ L) 混合, 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 30 分钟, 并使用荧光分光光度计 (岛津 RF-6000, 日本), 在 525nm 处以 485nm 的激发波长测量荧光强度以获得 ROS 的浓度。

2.5 数据处理

使用 Excel 进行数据整理, 根据急性毒性实验, 通过社会科学统计软件 (SPSS) 程序 (Standard Version 19.0, SPSS Inc., USA) 中的 Probit 回归计算 LC_{50} 值。酶活性的数据表示为平均值的平均 \pm 标准误差, 使用 SPSS 的单因素分析 (ANOVA)^[23]中的方差分析和 Duncan 检验, 显著性设置为 $P < 0.05$ 。用 Origin 2020 pro 进行绘图, 将生物响应进行比较。柱状图的值表示三种处理的平均值, 误差棒为标准偏差 (SD) 与控制组相比。
* 表示控制组和对照组在 $P < 0.05$ 时存在显著性差异。

3 数据分析与讨论

3.1 钨酸钠对斑马鱼的毒性实验

在毒性实验中，观察到了鱼类行为的变化。暴露于低浓度组的鱼出现异常行为，如不安和突然，快速，剧烈的运动。相反，暴露于高浓度组的鱼的运动变得迟缓，并且明显倾向于主要留在水箱底部，给予外界刺激后反应迟钝，随着暴露时间的增加出现了不进食行为和体重下降的现象（图 2）。而未暴露于钨的控制水箱中的鱼在整个水箱容积内积极正常的移动。



图 2 21 天后，1000 mgL⁻¹（上）和对照组（下）斑马鱼的体形对比

Fig.2 Body size comparison of 1000 mgL⁻¹ (top) and control (bottom) zebrafish after 21 days

钨酸钠的剂量-反应模式 (图 3)，钨酸钠的浓度范围 (2×10^{-3} — 54×10^{-3} mol L⁻¹)。在这些初步实验中，如果钨化合物的浓度低于上述限度，没有观察到鱼类死亡。设计实验主要是为了确定 LC₅₀ 值;这种设计通常不能精确测定无观察效应浓度 (NOEC) 和最低观察到的影响浓度 (LOEC) 的值。然而，除了这些参数之外，为了确定 NOEC 和 LOEC，将 Durrett's 法应用于 14 天实验后的死亡率数据 (表 1)。结果表明，钨酸钠的浓度与斑马鱼的死亡率有显著性差异 ($P < 0.05$)，所有浓度的钨酸钠中斑马鱼的死亡率与对照组的死亡率在统计学上有显著性差异 ($P < 0.05$)。

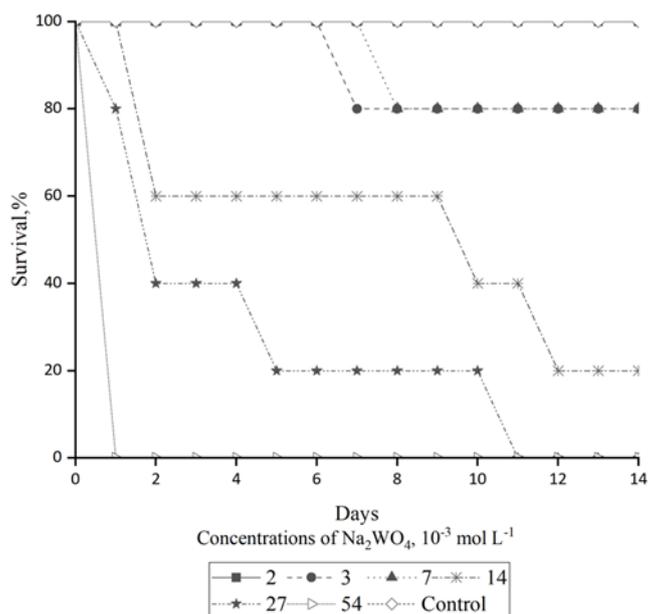


图 3 斑马鱼的存活率取决于长期毒性试验（14 天）期间的化学浓度

Fig.3 Zebrafish Survival depends on chemical concentration during long-term toxicity testing (14 days)

表 1 钨酸钠的 LC₅₀ 值

Table.1 LC₅₀ values of sodium tungstate

Time, days	Na ₂ WO ₄ , 10 ⁻³ mol L ⁻¹	W, g L ⁻¹	Na ₂ WO ₄ , g L ⁻¹	Confidence limits	
				Lower	Upper
1	31.63	5.85	9.35	-	-
3	22.16	4.10	6.56	4.55	12.13
5	19.01	3.52	5.62	3.90	8.76
7	16.84	3.11	4.98	3.00	10.07
10	15.12	2.80	4.47	2.55	8.72
14	9.73	1.79	2.86	1.84	5.50

使用 Probit 模型计算三种不同尺度下的 LC₅₀ 值和 95%置信区间:钨化合物浓度 (Na₂WO₄, g L⁻¹), 钨浓度 (W, g L⁻¹), 钨化合物的摩尔浓度 (Na₂WO₄, mol L⁻¹)。数据结果具有统计学的显著性, 但是无法仔细计算出更详细的 LC₅₀ 的 95%置信区间, 因为表格卡方值超过了计算的异质性卡方值。

在实验中测量了 6 条鱼对钨的摄取量, 包括来自对照组的 3 条鱼, 和暴露于钨的 3 条鱼。这三条鱼在暴露于 8g L⁻¹ 的钨酸钠溶液中在 48h 内死亡。钨酸钠和对照组的鱼体内平均的钨浓度分别为 410.375 和 35.1048 mg W/g (110580.9129 和 604771.7842 mg W/kg)。钨的生物富集因子 (BCF) 计算为鱼组织中的钨浓度 (以每千克湿组织或干组织的 mg W 表示) 与水中的钨浓度 (mg L⁻¹) 之间的比率, 为: 22.62 L kg⁻¹。

3.2 钨酸钠胁迫下斑马鱼活性氧 (ROS) 含量变化

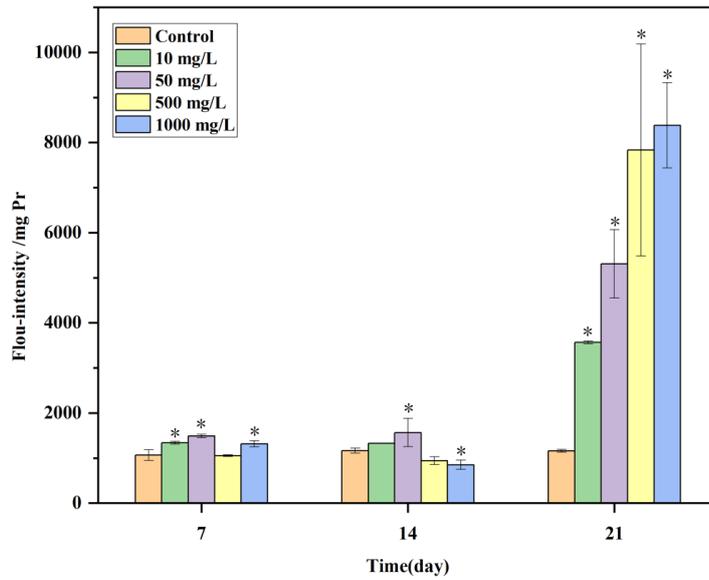


图 4 暴露于 Na_2WO_4 中斑马鱼的肌肉组织 ROS 含量

Fig.4 Muscle tissue ROS content of zebrafish exposed to Na_2WO_4

暴露于 Na_2WO_4 的斑马鱼 ROS 含量如 4 所示。根据图 4 表明，与对照组相比，在 Na_2WO_4 处理后第 7 天除了 500 mg L^{-1} ，ROS 的含量都显著性增加。第 14 天只有 50 mg L^{-1} 出现了显著性增加， 1000 mg L^{-1} 浓度组表现为显著性减少。在第 21 天，暴露组的 ROS 含量都显著增加并达到最大值，总体来说，所有浓度的 Na_2WO_4 都能够诱导斑马鱼 ROS 水平的增加。

3.3 钨酸钠胁迫下斑马鱼 SOD 酶活性变化

如图 5 所示，在整个实验中，暴露于 Na_2WO_4 的斑马鱼与对照组相比 SOD 都受到了显著抑制。高浓度暴露组（ 500 mg L^{-1} 和 1000 mg L^{-1} ）SOD 的活性在第 7 天达到最低，其在第 14 天 SOD 活性都出现了显著增加， 500 mg L^{-1} 的 SOD 活性的增加最为明显，并在第 14 天到达最大值。低浓度组（ 10 mg L^{-1} 和 50 mg L^{-1} ）的 SOD 活性变化不明显，但整体表明都显著低于对照组。结果表明，暴露于钨酸钠的浓度越高，SOD 酶活性的抑制程度越大。

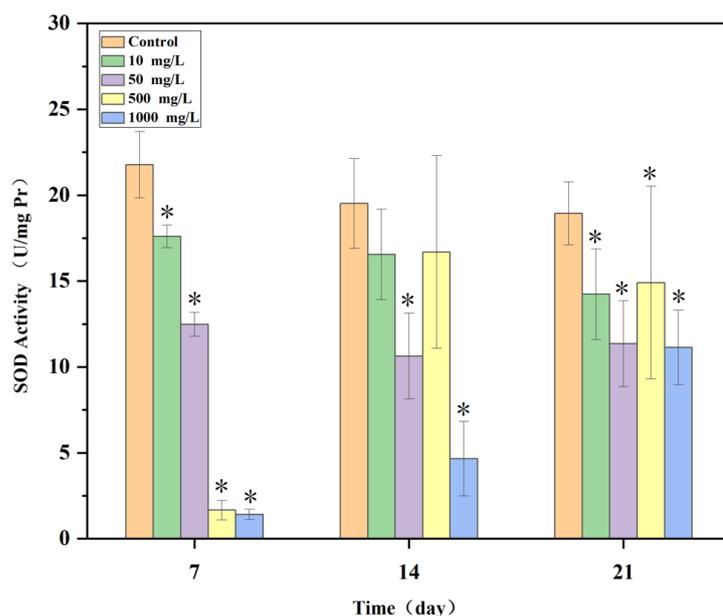


图 5 暴露于 Na_2WO_4 中斑马鱼的肌肉组织中 SOD 的活性
 Fig.5 SOD activity in muscle tissue of zebrafish exposed to Na_2WO_4

3.4 钨酸钠胁迫下斑马鱼 CAT 酶活性变化

根据图 5 表明，在暴露于 Na_2WO_4 后，低浓度暴露组（ 10 mg L^{-1} 和 50 mg L^{-1} ）的 CAT 水平仅在第 7 天显著减少，其中 10 mg L^{-1} 的实验组的 CAT 活性从第 14 天开始与对照组无显著差异。在第 7 天，高浓度暴露组（ 500 mg L^{-1} 和 1000 mg L^{-1} ）的酶活性显著增加，趋势是 CAT 活性先增加后减少，该趋势与 SOD 酶活性的变化有一定的相似性。在第 14 天， 500 mg L^{-1} 浓度下斑马鱼 CAT 的活性达到最大值时，但 1000 mg L^{-1} 斑马鱼 CAT 酶活性开始下降。在第 21 天，只有 10 mg L^{-1} 剂量的酶活性与对照组相似，其他三个实验组的酶活性都被显著抑制，尤其是 1000 mg L^{-1} 的条件下抑制最为明显。

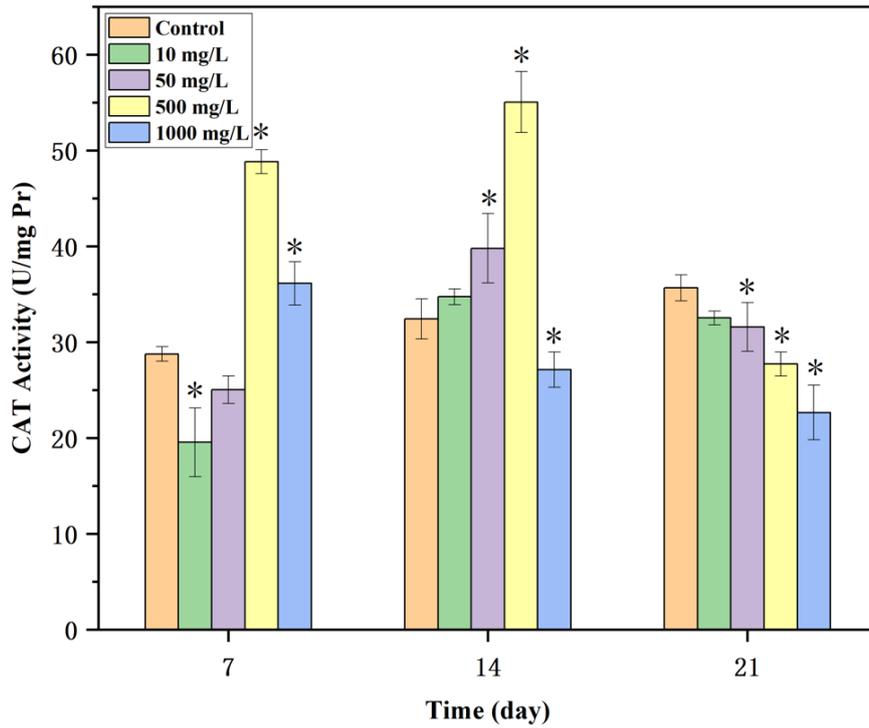


图 6 暴露于 Na_2WO_4 斑马鱼的肌肉组织中 CAT 的活性。柱状图的值表示三种处理
 Fig.6 CAT activity in muscle tissue of zebrafish exposed to Na_2WO_4 . The values of the bar graphs indicate the three treatments

3.5 钨酸钠胁迫下斑马鱼 GSH 含量变化

根据图 7 表明，在暴露于 Na_2WO_4 后，除 1000 mg L^{-1} 外，其他浓度组的 GSH 酶活性都出现了先降低后增长随后降低的趋势，而 1000 mg L^{-1} 的实验组 GSH 的酶活性则一直为被显著抑制。低浓度暴露组 (10 mg L^{-1}) 的 GSH 水平在第 14 天后达到对照组水平与其无显著性差异，其中 10 mg L^{-1} 的实验组的 CAT 水平从第 14 天开始与对照组无显著差异。该变化趋势与 CAT、SOD 酶的变化幅度较为相似。总体而言均表现为被显著抑制。

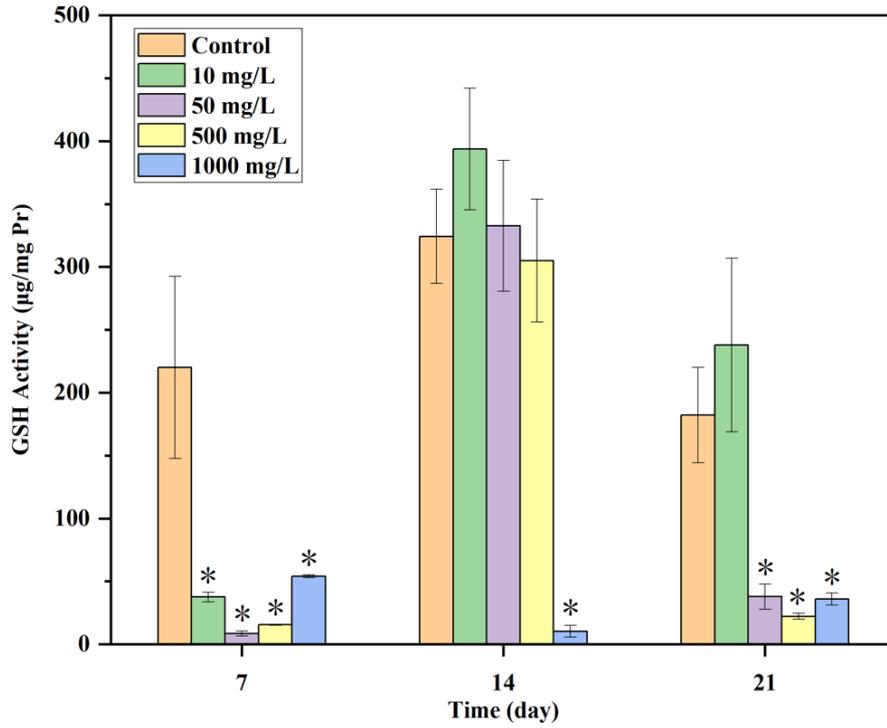


图 7 暴露于 Na_2WO_4 斑马鱼的肌肉组织中 GSH 的活性

Fig.7 GSH activity in muscle tissue of zebrafish exposed to Na_2WO_4

3.6 钨酸钠胁迫下斑马鱼丙二醛 (MDA) 含量变化

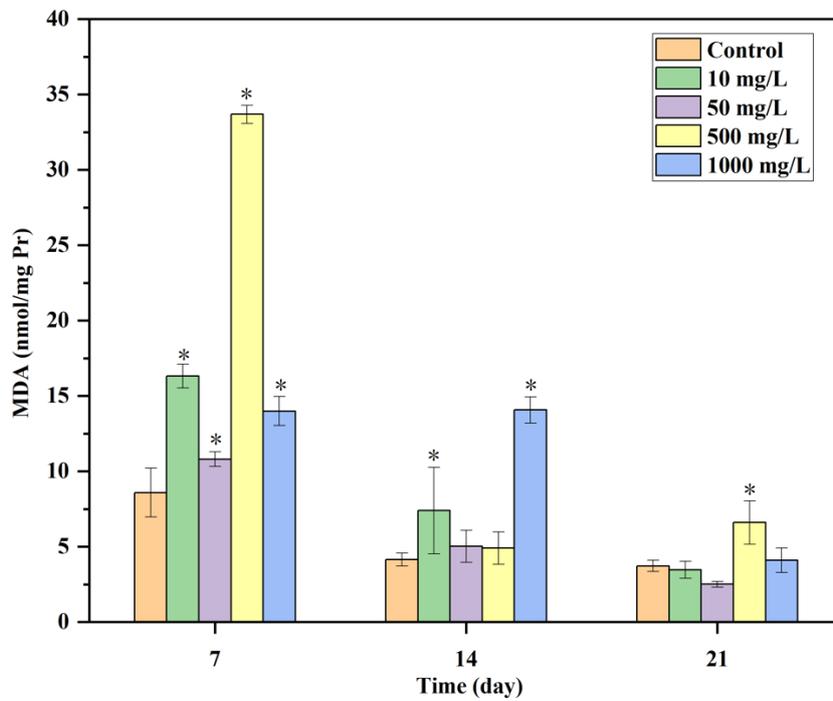


图 8 暴露于 Na_2WO_4 斑马鱼的肌肉组织中 MDA 的含量

Fig.8 MDA content in muscle tissue of zebrafish exposed to Na_2WO_4

经过 21 天暴露后, 斑马鱼 MDA 含量如图 8 所示, 在 Na_2WO_4 处理后, 总体来看所有浓度组的斑马鱼 MDA 水平都在第 7 天显著增加, 然后在第 14 天和第 21 天减少到对照组水平。其中 500 mg L^{-1} 暴露组 MDA 的变化最为明显, 在第 7 天远高于对照组水平, 第 14 天下降到正常水平, 在第 21 天再次增长并显著高于对照组水平。低浓度组 (10 mg L^{-1} 和 50 mg L^{-1}) MDA 的含量在第 7 天之后都较为稳定。

4 讨论

结合以往研究, 我们证明钨酸钠对斑马鱼来说是一种低毒物质, 其 LC_{50} 值为 $1.79\text{-}5.85 \text{ g W L}^{-1}$ 或 $9.73\text{-}31.63 \times 10^{-3} \text{ mol Na}_2\text{WO}_4 \text{ L}^{-1}$, 该结果与 Srigul N 等人^[11]探究的钨酸钠对孔雀鱼的 LC_{50} 值 ($0.86\text{-}3.88 \text{ g L}^{-1}$ 或 $4.67\text{-}21.1 \times 10^{-3} \text{ mol Na}_2\text{WO}_4 \text{ L}^{-1}$) 接近。与之前的研究工作相比, 除了致死毒性测试, 本研究进一步进行了钨酸钠对斑马鱼的亚急性毒性试验, 并对斑马鱼的分子生物标志物进行了测试, 这对钨酸钠亚致死毒性的研究至关重要。通过检测一些生物标志物在 21 天的变化, 包括: SOD、CAT、GSH、ROS 和 MDA 的活性和含量, 从而为钨酸钠对斑马鱼的毒性机制进行进一步说明。

ROS 是生理氧的代谢物。它们主要包括羟基自由基(OH^\cdot)、超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(H_2O_2)、单态氧、中间烷氧基自由基、烷氧基自由基和类似的脂质过氧化物。在生物体内他们会被一系列抗氧化酶和抗氧化剂去除或解毒, 从而维持 ROS 的正常水平^[24]。在氧化应激过程中, 活性氧的目标一般是 DNA、RNA、蛋白质和脂质等。当污染物进入生物体中, 产生大量的 ROS 但生物防御能力无法对它进行及时消除时, 就会导致氧化损伤。在 Na_2WO_4 暴露下, 尤其是在高浓度暴露下, 随着暴露时间和浓度的增加, 斑马鱼产生的 ROS 量超过了生物体消除 ROS 的能力, 使其过度积累, 从而对机体的酶活性造成影响。

SOD 是一种重要的氧自由基清除剂, 可以在生理条件下抵御体内的氧化应激, 清除超氧阴离子自由基^[25,26]。被认为是低于抗氧化损伤的第一道防线。当斑马鱼暴露于 Na_2WO_4 时, 体内的 SOD 活性受到明显抑制, 这种现象表明斑马鱼体内过量的 ROS 已经超过了其自卫范围。SOD 不足以清除多余的 ROS, 且暴露浓度越高, 抑制越明显。

CAT 是生物体内常见的高活性酶, 直接催化 H_2O_2 的分解成无毒水和 O_2 , 以减轻 H_2O_2 对细胞的破坏^[27,18]。大量研究表明, 过表达的 CAT 能够增强植物和动物对非生物和生物胁迫的抵抗力, 是缓解氧化胁迫的重要酶^[28]。当斑马鱼暴露于 Na_2WO_4 , 在最初 14 天 CAT 的酶活性显著增加, 这可能是由于在暴露后, 斑马鱼体内产生的过多的 ROS 诱导了 SOD 活性的增加, 并产生了过多的 H_2O_2 , 导致了 CAT 活性的升高。但随着时间增加, ROS 增长迅猛, SOD 增长速率下降, 导致 CAT 的活性受到抑制。当抗

氧化防御不能阻止这些 ROS 时，ROS 的过度产生是酶失活的合理原因。

GSH 属于生物体内的非酶促抗氧化系统（谷胱甘肽系统），是最丰富的非蛋白质硫醇，可抵御氧化应激，被认为是抵御氧化损伤的第二道防线。其抗氧化功能主要通过过氧化物酶（GPx）催化将 GSH 氧化成谷胱甘肽二硫化物（GSSG），从而完成对过氧化氢和 ROS 的解毒。由于 GSH 与 GSSG 的比例在很多程度上决定了细胞内氧化还原电位，当氧化应激的产物超过了细胞将 GSSG 还原为 GSH 的能力时，为了防止氧化还原平衡发生巨大改变，GSSG 会主动输出到细胞外或与蛋白质巯基反应，导致混合二硫化物的形成。因此，严重的氧化应激会耗尽细胞的 GSH^[20]。在本次实验中，暴露组的 GSH 水平除了在第 14 天显著升高，除 10 mg L⁻¹ 都显著低于对照组（P < 0.05），且 1000 mg L⁻¹ 的 GSH 水平一直被显著抑制，其原因可解释为在暴露于高浓度 Na₂WO₄ 诱导产生的 ROS 过多，超过了斑马鱼自身的抗氧化系统能力，使得 GSH 无法在肌肉组织中再生以恢复其正常水平。

丙二醛 (MDA) 是自由基中间体和脂质过氧化的最终分解产物，可能严重损害细胞膜^[29]。因此，测定 MDA 含量可以间接反映脂质过氧化程度，在该研究中，在第 7 天和第 14 天的浓度组 MDA 的含量都出现了不同程度的增加，但在第 21 天只有 500 mg L⁻¹ 的处理组 MDA 含量显著增加，且有较大的波动，其他处理组 MDA 含量在第 21 天趋于正常水平。这种差异可能与 ROS 和 GSH 的水平含量有关，低浓度组的 ROS 含量不足以引起脂质过氧化，而脂质过氧化可以通过 GSH 来进行解毒^[30,31,29]。此外其他酶也可以加速 MDA 的分解代谢。随着暴露时间的延长，低浓度组的 GSH 含量增加从而减少了脂过氧化程度。而高浓度（500 mg L⁻¹）的 MDA 含量逐渐升高，且 GSH 水平被显著抑制，低于其他浓度组，这与 ROS 和 GSH 含量在同一时期的变化趋势一致。而 1000 mg L⁻¹ 的处理组虽然 ROS 含量积累最多，但是其 GSH 水平高于 500 mg L⁻¹ 的处理组，猜测这部分 GSH 消除了一部分多余 ROS 从而抑制 MDA 了的生成。

根据实验结果来看，抗氧化酶 SOD、CAT 和 GSH 除低浓度组（10 mg L⁻¹）其他浓度下都受到了不同程度的抑制，而与之相反的是 ROS 含量的过度产生，且与浓度呈现除一定的正相关。

5 结论

本实验研究中 Na₂WO₄ 对斑马鱼的毒性结论如下：14 天钨酸钠的 LC₅₀ 超过 1.76 g W L⁻¹ 或 9.73 × 10⁻³ mol Na₂WO₄ L⁻¹，是对鱼类毒性较低的化学物质。此外，证明了钨对斑马鱼肌肉组织中 SOD、CAT、GSH 的活性和 ROS 含量影响显著，可引起斑马鱼机体的氧化应激和脂质过氧化，抗氧化防御反应主要表现为被抑制。高低浓度的钨酸

钠均可显著增加 ROS 的水平和抑制 SOD 活性。中高浓度组 (50-100 mg L⁻¹)的 CAT 和 GSH 都为抑制作用，其中 500 mg L⁻¹的 MDA 诱导作用显著，破坏了机体的抗氧化平衡系统。长期暴露于钨酸钠浓度 >10 mg L⁻¹ 的环境中能够引起斑马鱼的氧化应激和损伤。本研究探究了钨对斑马鱼的亚急性毒性，为评价钨对水生生物的影响，制定我国钨的水质标准提供相关依据。

参考文献

- [1] MILLER K, MCVEIGH C M, BARR E B, et al. Inhalation of Tungsten Metal Particulates Alters the Lung and Bone Microenvironments Following Acute Exposure[J]. *Toxicological Sciences*, 2021, 184(2): 286-299. DOI:10.1093/toxsci/kfab109.
- [2] GUANDALINI G S, ZHANG L, FORNERO E, et al. Tissue Distribution of Tungsten in Mice Following Oral Exposure to Sodium Tungstate[J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2011, 24(4): 488-493. DOI:10.1021/tx200011k.
- [3] SACHDEVA S, CHATTERJEE S, FLORA S J S. Dose dependent changes in oxidative stress, hematological variables, tissue pathology, and apoptosis following chronic sodium tungstate exposure in rats[J]. *Medicine in Drug Discovery*, 2020, 6: 100045. DOI:10.1016/j.medidd.2020.100045.
- [4] WANG Y, LI X, YANG G, et al. Changes of enzyme activity and gene expression in embryonic zebrafish co-exposed to beta-cypermethrin and thiacloprid[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 256: 113437. DOI:10.1016/j.envpol.2019.113437.
- [5] 袁秀娟, 肖婷, 黄祈栋, 等. 钨的环境毒理性及其污染防治技术研究进展[Z]//*环境污染与防治*: 卷44. 2022: 1248-1253.
- [6] CLEMENTS L N, LEMUS R, BUTLER A D, et al. Acute and Chronic Effects of Sodium Tungstate on an Aquatic Invertebrate (*Daphnia magna*), Green Alga (*Pseudokirchneriella subcapitata*), and Zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2012, 63(3): 391-399. DOI:10.1007/s00244-012-9774-3.
- [7] STRIGUL N, KOUTSOSPYROS A, ARIENTI P, et al. Effects of tungsten on environmental systems[J]. *Chemosphere*, 2005, 61(2): 248-258. DOI:10.1016/j.chemosphere.2005.01.083.
- [8] VAN DER VOET G B, TODOROV T I, CENTENO J A, et al. Metals and Health: A Clinical Toxicological Perspective on Tungsten and Review of the Literature[J]. *Military Medicine*, 2007, 172(9): 1002-1005. DOI:10.7205/MILMED.172.9.1002.
- [9] KOUTSOSPYROS A D, KOUTSOSPYROS D A, STRIGUL N, et al. Tungsten: Environmental Pollution and Health Effects☆[M]//NRIAGU J. *Encyclopedia of Environmental Health* (Second Edition). Oxford: Elsevier, 2019: 161-169. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124095489111996>. DOI:10.1016/B978-0-12-409548-9.11199-6.
- [10] STRIGUL N, GALDUN C, VACCARI L, et al. Influence of speciation on tungsten toxicity[J/OL]. *Desalination*, 2009, 248(1): 869-879. DOI:10.1016/j.desal.2009.01.016.

- [11] STRIGUL N, KOUTSOSPYROS A, CHRISTODOULATOS C. Tungsten speciation and toxicity: Acute toxicity of mono- and poly-tungstates to fish[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2010, 73(2): 164-171. DOI:10.1016/j.ecoenv.2009.08.016.
- [12] SACHDEVA S, CHATTERJEE S, FLORA S J S. Dose dependent changes in oxidative stress, hematological variables, tissue pathology, and apoptosis following chronic sodium tungstate exposure in rats[J]. *Medicine in Drug Discovery*, 2020, 6: 100045. DOI:10.1016/j.medidd.2020.100045.
- [13] BAI C, TANG M. Toxicological study of metal and metal oxide nanoparticles in zebrafish[J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2020, 40(1): 37-63. DOI:10.1002/jat.3910.
- [14] BAMBINO K, CHU J. Chapter Nine - Zebrafish in Toxicology and Environmental Health[M]//SADLER K C. *Current Topics in Developmental Biology*: 卷 124. Academic Press, 2017: 331-367. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0070215316301867>. DOI:10.1016/bs.ctdb.2016.10.007.
- [15] DAI Y J, JIA Y F, CHEN N, et al. Zebrafish as a model system to study toxicology[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2014, 33(1): 11-17. DOI:10.1002/etc.2406.
- [16] NORMA FRANCENIA SANTOS-SÁNCHEZ, RAÚL SALAS-CORONADO, CLAUDIA VILLANUEVA-CAÑONGO, et al. Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism[M]//EMAD SHALABY. *Antioxidants*. Rijeka: IntechOpen, 2019: Ch. 2[2023-05-16]. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85270>. DOI:10.5772/intechopen.85270.
- [17] HE H, HUANG N, CAO R, et al. Structures, Antioxidation Mechanism, and Antioxidation Test of the Common Natural Antioxidants in Plants[C]. 2015.
- [18] TANG T, ZHANG Z, ZHU X. Toxic Effects of TiO₂ NPs on Zebrafish[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2019, 16(4). DOI:10.3390/ijerph16040523.
- [19] NOEMAN S A, HAMOODA H E, BAALASH A A. Biochemical Study of Oxidative Stress Markers in the Liver, Kidney and Heart of High Fat Diet Induced Obesity in Rats[J/OL]. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 2011, 3(1): 17. DOI:10.1186/1758-5996-3-17.
- [20] LU S C. Glutathione synthesis[J]. *Cellular functions of glutathione*, 2013, 1830(5): 3143-3153. DOI:10.1016/j.bbagen.2012.09.008.
- [21] PESKIN A V, WINTERBOURN C C. Assay of superoxide dismutase activity in a plate assay using WST-1[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2017, 103: 188-191. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.033.
- [22] LI W, ZHU L, DU Z, et al. Acute toxicity, oxidative stress and DNA damage of three task-specific ionic

- liquids ([C2NH2MIm]BF₄, [MOEMIm]BF₄, and [HOEMIm]BF₄) to zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Chemosphere*, 2020, 249: 126119. DOI:10.1016/j.chemosphere.2020.126119.
- [23] GYIMAH E, DONG X, QIU W, et al. Sublethal concentrations of triclosan elicited oxidative stress, DNA damage, and histological alterations in the liver and brain of adult zebrafish[J/OL]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020, 27(14): 17329-17338. DOI:10.1007/s11356-020-08232-2.
- [24] MITTLER R. ROS Are Good[J]. *Trends in Plant Science*, 2017, 22(1): 11-19. DOI:10.1016/j.tplants.2016.08.002.
- [25] YOUNUS H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase[J]. *International Journal of Health Sciences*, 2018, 12: 88-93.
- [26] XU K, ZHANG Y, HUANG Y, et al. Toxicological effects of microplastics and phenanthrene to zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Science of The Total Environment*, 2021, 757: 143730. DOI:10.1016/j.scitotenv.2020.143730.
- [27] ZHAO X, WANG S, WU Y, et al. Acute ZnO nanoparticles exposure induces developmental toxicity, oxidative stress and DNA damage in embryo-larval zebrafish[J]. *Aquatic Toxicology*, 2013, 136-137: 49-59. DOI:10.1016/j.aquatox.2013.03.019.
- [28] ZENG C Q, LIU W X, HAO J Y, et al. Measuring the expression and activity of the CAT enzyme to determine Al resistance in soybean[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019, 144: 254-263. DOI:10.1016/j.plaphy.2019.09.026.
- [29] 岳鑫. 镉对斑马鱼的急性毒性效应及抗性研究[J]. 2019.
- [30] GUO Z, ZHANG L, LIU X, et al. The enrichment and purification of hexabromocyclododecanes and its effects on thyroid in zebrafish[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 185: 109690. DOI:10.1016/j.ecoenv.2019.109690.
- [31] HSU S C, HSIEH H L, CHEN C P, et al. Tungsten and other heavy metal contamination in aquatic environments receiving wastewater from semiconductor manufacturing[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011, 189(1): 193-202. DOI:10.1016/j.jhazmat.2011.02.020.

致 谢

当论文落下最后一笔，我才发现我的本科生活就到这里结束了，我也步入了20开头的行列，人生的一个阶段落下了句号。这四年来，是魔幻的，一场疫情仿佛让我在学校的生活得到了加速，还没来得及好好感受就已落幕。

首先，诚挚的感谢我的论文指导老师杜辉辉老师，感谢他们在整个旅程中一直以来的支持和指导。他在忙碌的教学工作中挤出时间来一次又一次和我讨论我的实验方案，耐心审查、修改我的论文。还要感谢对我提供过帮助的所有老师们，你们一丝不苟、严谨细致的作风会一直是我学习、工作中的榜样。

同时也感谢我的师兄师姐以及我的好朋友们，他们在我做实验和写论文时的竭力相助，对我的问题一次又一次耐心的解答，亦师亦友的陪伴我成长。他们在愿意与我一起讨论想法并提供即时的反馈。与你们一起工作是一段难忘的经历，丰富了我的学术生涯和整个生活。

其次我还要感谢学院的实验室管理老师，为我的实验提供了必要的设备、材料和资源。没有她们的协助，这项实验是不可能完成的。

最后，我要感谢我的父母对我的关心和理解，如果没有他们在我的学习生涯中的无私奉献和默默支持，我将无法顺利完成今天的学业。家人的支持与鼓励是大学时光最大的温暖与保障，它就像细细的泉水默默地给我们以滋润。

我从心底感谢每一个曾经帮助过我的人。你们的支持和鼓励是无价的，我很荣幸有机会与这些鼓舞人心的人一起工作。