

铀尾矿浸出液成分分析及其对斑马鱼的氧化应激损伤

赵婷婷, 郑济芳, 胡南, 田鹤锋, 丁德馨

摘要: [目的] 观察铀尾矿浸出液对斑马鱼[zebrafish(*Danio rerio*)]的毒性影响,为评价铀尾矿对机体的危害性及潜在环境风险提供科学依据。[方法] 采用火焰原子吸收法测定铀尾矿浸出液中重金属的含量,TRPO-环己烷/2-(5-溴代-2-吡啶基偶氮)-5-间苯二酚分光光度法测定铀含量,其他成分的分析参照国际标准进行;标准稀释水将铀尾矿浸出液稀释为0.05%、0.25%、0.5%及1% 4个浓度组染毒斑马鱼,暴露7d后,测定斑马鱼肌肉、鳃和肝脏三种组织中超氧化物歧化酶(SOD),过氧化氢酶(CAT),钠、钾离子三磷酸腺苷酶($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶)活性和丙二醛(MDA)含量的变化情况。[结果] 铀尾矿浸出液中的铀含量为0.0628mg/L,超过WHO规定的饮用水中铀浓度限值约4倍。斑马鱼在设计染毒液中暴露7d后,三种组织中SOD活性显著降低($P<0.05$),而肌肉及肝脏的SOD活性在低浓度组出现升高($P<0.05$),SOD活性可能存在暴露时间与浓度效应关系。鳃CAT活性在暴露7d后出现了下降($P<0.05$),且随暴露浓度的升高而降低,最高抑制率为84.8%,表明鳃内出现了早期的氧化应激反应。三种组织中,随着铀尾矿浸出液染毒浓度增大, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性下降($P<0.05$),而MDA含量呈上升趋势。[结论] 铀尾矿浸出液对机体危害可能主要是铀的毒性所致。降低氧化应激损伤水平可能是预防和保护机体免受铀尾矿浸出液毒害的有效靶点之一。

关键词: 斑马鱼; 铀尾矿; 抗氧化系统; 活性氧

Uranium Tailings Leaching Liquid's Component Analysis and Effects on Oxidative Stress Injury of Zebrafish ZHAO Ting-ting, ZHENG Ji-fang, HU Nan, TIAN He-feng, DING De-xin (Key Discipline Laboratory for National Defense for Biotechnology in Uranium Mining and Hydrometallurgy, University of South China, Hunan 421001, China). Address correspondence to ZHENG Ji-fang, E-mail: jifangzh@126.com; DING De-xin, E-mail: dingdxzz@163.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To evaluate the toxicity of uranium tailings leaching liquid (UTLL) on zebrafish (*Danio rerio*) and provide scientific basis for assessment on uranium tailings hazard and potential environmental risk. [Methods] Flame atomic absorption was used to measure the concentrations of heavy metals in UTLL. Uranium was determined by spectrophotometry using TRPO-cyclohexane/2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethyl-amino phenol. Other compositions of UTLL were analyzed according to the relevant international standards. Zebrafish were treated with 0.05%, 0.25%, 0.50%, and 1.00% UTLL for 7 d. Changes in the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ and content of malondialdehyde (MDA) in the tissues of muscle, gill, liver of zebrafish samples were analyzed, respectively. [Results] The concentration of uranium in the UTLL was 0.0628 mg/L, which was nearly four times of the limits prescribed in World Health Organization's provisional drinking water guideline. After exposure for 7 d, the activity of SOD was decreased significantly in the three sampled tissues at the designed concentrations ($P<0.05$); however, it increased at the low concentrations in the tissue samples of muscle and liver ($P<0.05$), indicating that the activity of SOD may exhibit both time-response and concentration-response relationships. The CAT activity was reduced in the gill samples after exposure in a dose-dependent manner ($P<0.05$), and the highest inhibition rate was 84.8%, which suggested early oxidative stress in the gill tissue. The activity of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ was decreased along with the concentration of UTLL increased ($P<0.05$), while the MDA concentrations displayed an increasing tendency. [Conclusion] The hazard of UTLL to organism may be mainly caused by the toxicity of uranium. Decreasing the level of oxidative stress injury may be one of the effective targets for preventing poisoning from UTLL.

Key Words: zebrafish; uranium tailings; antioxidant system; reactive oxygen species

[基金项目] 国家自然科学基金项目(编号: 50774047); 湖南省科技厅重点项目(编号: 2010GK2025); 湖南省教育厅重点项目(编号: 10A103); 湖南省教育厅项目(编号: 10C1134); 湖南省自然科学基金项目(编号: 14JJ2087)

[作者简介] 赵婷婷(1988—), 女, 硕士生; 研究方向: 环境污染对生物遗传损伤及修复机制; E-mail: ztt.1029@163.com

[通信作者] 郑济芳教授, E-mail: jifangzh@126.com; 丁德馨教授, E-mail: dingdxzz@163.com

[作者单位] 南华大学铀矿冶生物技术国防重点学科实验室, 湖南 421001

铀是一种危害性很大的环境风险因子,有多种同位素,天然铀经²³⁵U富集后剩余的成分称为贫铀。近年来,由于铀矿开采、核试验、核电工程泄露等造成的铀污染,使环境中铀含量逐渐升高,增加了普通人群的接触机会,据WHO报道,有些铀矿地区的水环境中铀浓度范围处于0.06~1.00 mg/L,极大地超过WHO规定的饮用水中铀浓度的限值(15 μg/L)^[1]。铀作用于机体时,会导致细胞内氧化应激水平的提高,产生过量活性氧,使超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)等抗氧化酶活力降低,引起细胞脂质过氧化反应,对细胞造成损伤^[2]。已有文献报道,长期铀暴露有致肺癌风险,铀中毒还能使患者出现肾炎、蛋白尿、甚至肾衰竭^[3]。此外,在职业环境中,某些接触铀的作业还可能导致急性铀中毒,给工作人员的生命造成极大的威胁。

铀尾矿是铀冶炼厂提炼出铀后排出的废渣,含有少量铀及其他有毒有害物质。在长期风化淋溶作用下,铀尾矿中铀等有害物质会迁移至周围露天水体及地下水中,对当地的饮水安全、居民健康、生态环境等产生危害^[4]。斑马鱼[zebrafish (*Danio rerio*)]是室内标准毒理学实验最常用的动物,也是国际标准体系(ISO)推荐的河水毒性试验鱼种。本研究拟采用斑马鱼为实验对象,以铀尾矿浸出液为受试污染物,SOD,CAT,钠、钾离子三磷酸腺苷酶(Na⁺-K⁺-ATP酶)活性和丙二醛(MDA)含量为测定指标,研究铀尾矿浸出液对斑马鱼肌氧化应激损伤的影响,为评价铀尾矿对机体的危害性及潜在环境风险提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

BCA法蛋白定量试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司,SOD、CAT、MDA和Na⁺-K⁺-ATP酶测试试剂盒购自南京建成生物工程研究所。722可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);火焰原子吸收分光光度计AA7003(北京东西电子技术研究所);25 cm×25 cm×30 cm的水族箱购于衡阳市花鸟市场(每箱可投放20条斑马鱼)。

1.2 实验动物

斑马鱼购自衡阳市花鸟市场,体长(30±5)mm,体质量(0.3±0.1)g,在实验室驯养2周,驯养期间活动正常,无病,死亡率低于3%,实验前24h停止投饵,挑选身体健壮,反应灵敏,大小基本一致的个体随机分组。

1.3 铀尾矿采集及成分分析

采用梅花型布点法^[5],从中国南方某一尾矿处采集铀尾矿,该铀尾矿渣体松散,粗细不一,黄色,粒度较大,有些胶结呈团块状,粒径从0.1 mm到5 mm不等。参照文献^[6]制备铀尾矿浸出液:称取100 g置于2 L具广口塞聚乙烯瓶中,加入1 L去离子水,固液比为1:10,盖紧瓶盖后垂直固定在振荡器上,调节振荡频率为(110±10)次/min,在室温下振荡12 h后,静置24 h。最后用玻璃漏斗和0.45 μm滤膜过滤,锥形瓶收集全部过滤液,即为浸出液。铀尾矿成分分析根据文献^[5]进行:

采用火焰原子吸收分光光度法测定各金属元素的含量;采用三正辛基氧膦(C₂₄H₅₁OP)萃取分离,2-(5-溴-2-吡啶偶氮)-5-乙氨基苯酚(C₁₅H₁₇BrN₃O)分光光度法测定浸出液中的铀含量;硫氰酸盐比色法测定Mo的含量;使用硝酸银滴定法测定Cl⁻;火焰原子吸收分光光度计测定SO₄²⁻的量;应用紫外分光光度计法NO₃⁻;离子选择性电极测F;分光光度计测定硫化物含量。

1.4 样品的制备

根据预试验的结果,用标准稀释水[GB/T 13267291]将制备的铀尾矿浸出液母液稀释为4个试验组浓度,即低浓度组(0.05%)、中浓度组(0.25%)、高浓度组(0.50%)和极高浓度组(1.00%),设一个空白对照组(不加铀尾矿浸出液,用标准稀释液进行实验),每个浓度做一个平行实验组。每组20尾斑马鱼,雌雄各半,实验在一个25 cm×25 cm×30 cm的水族箱中进行,调节溶液pH为7.8±0.2,溶解氧为(7.20±0.35)mg/L,硬度为250 mg/L左右(以CaCO₃计),每24 h更换一次溶液。实验期间持续充气,每天保持12~16 h光照,水温恒定在(23±1)℃,整个试验期间不喂食。暴露7 d后,解剖斑马鱼肌肉、肝脏、鳃3种组织,用双重去离子水充分洗净,吸水纸吸去表面水分。称取0.05 g组织加入4℃的生理盐水0.1 mL,用玻璃匀浆器匀浆,以6 000 r/min离心10 min,取上清液,用生理盐水定容至1 mL,进行总蛋白、SOD、CAT、Na⁺-K⁺-ATP酶活性及MDA含量的测定。

1.5 生化指标测定

用BCA蛋白定量法测定样品上清液中蛋白质含量。用羟胺法测定SOD活性,分光光度法测定CAT和Na⁺-K⁺-ATP酶活性,用硫代巴比妥酸(TBA)法测定MDA含量。SOD活性单位定义为:每毫克组织蛋白在1 mL反应液中,SOD抑制率达50%时所对应的SOD量为一个活性单位(U)。CAT活性单位定义为:每毫克组织蛋白每秒分解1 μmol H₂O₂量为一个活性单位。MDA的含量单位定义为:纳摩尔/毫克蛋白(nmol/mg prot)。Na⁺-K⁺-ATP酶活力单位定义为:每小时每毫克蛋白分解ATP产生1 μmol无机磷的量为1个ATP酶活力单位{微摩尔分子磷/(蛋白质·时间)[μmol Pi/(mg·h)]}。测试步骤严格按各试剂盒步骤说明进行。

1.6 统计学分析

采用SPSS 15.0软件统计数据,各实验组与对照组之间用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行统计分析。检验水准α=0.05。

2 结果

2.1 铀尾矿浸出液的成分

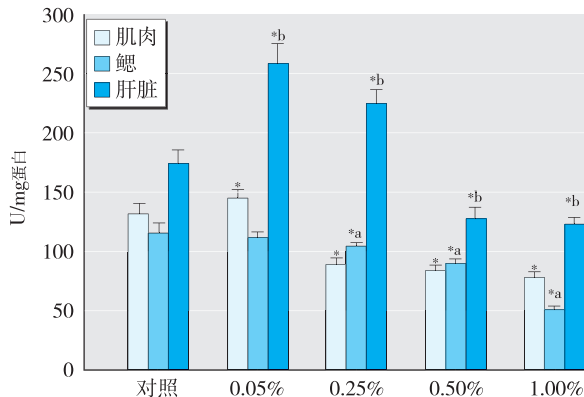
铀尾矿浸出液含有3类不同的成分:2种放射性元素(铀和钍),9种重金属元素和5种非金属物质(表1)。其中,铀的含量为0.062 8 mg/L,超过WHO规定的饮用水中铀浓度限值大约4倍。在9种重金属元素中,锰浓度最高,镉浓度最低。但是,重金属和非金属物质的浓度均没有超过WHO推荐的饮用水的基准值和我国大陆生活饮用水水质常规标准及限值。

表1 铀尾矿浸出液主要成分含量与分析结果(mg/L)

元素	铀	钍	镉	铝	铜	钙	镁	铁	锌	镍	锰	硫化物	氟	氯	硫酸根	硝酸根
含量	0.0628	0.0066	0.0010	0.0600	0.0210	0.1600	0.0820	0.0520	0.0800	0.0160	0.4800	0.0350	0.0013	4.5000	3.4000	0.3000

2.2 SOD 活性的变化

由图 1 可知,暴露 7 d 后,与对照组相比,斑马鱼肌肉 SOD 活性在低浓度组升高,中浓度组开始显著性降低,但随着暴露浓度的升高其活性没有发生显著性变化;鳃 SOD 活性在中浓度组开始显著性降低,且随着浓度的升高有降低趋势;肝脏 SOD 活性在低、中浓度组显著性升高,高浓度组才开始显著降低。

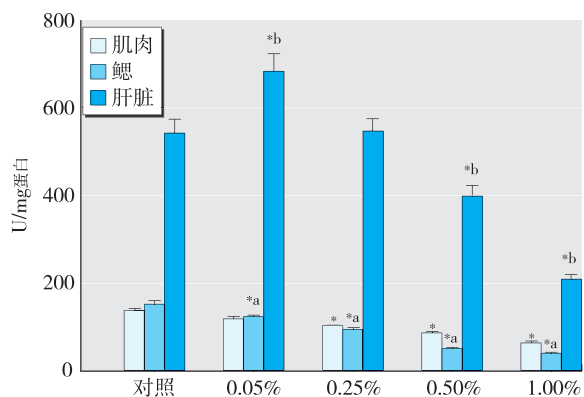


[注]*: 分别与肌肉、鳃、肝脏的对照组比较, $P < 0.05$; a: $P < 0.05$; b: $P < 0.05$ 。

图 1 铊尾矿浸出液对斑马鱼肌肉、鳃、肝脏 SOD 活性的影响

2.3 CAT 活性的变化

由图 2 可知,与对照组相比,斑马鱼肌肉 CAT 在中浓度组开始受到抑制,且随着浓度的升高而降低;鳃 CAT 活性在低浓度组开始出现显著性降低,此后随着暴露浓度的升高而降低;肝脏 CAT 活性在低浓度和中浓度组升高,在高浓度组开始出现显著性下降。



[注]*: 分别与肌肉、鳃、肝脏的对照组比较, $P < 0.05$; a: $P < 0.05$; b: $P < 0.05$ 。

图 2 铊尾矿浸出液对斑马鱼肌肉、鳃、肝脏 CAT 活性的影响

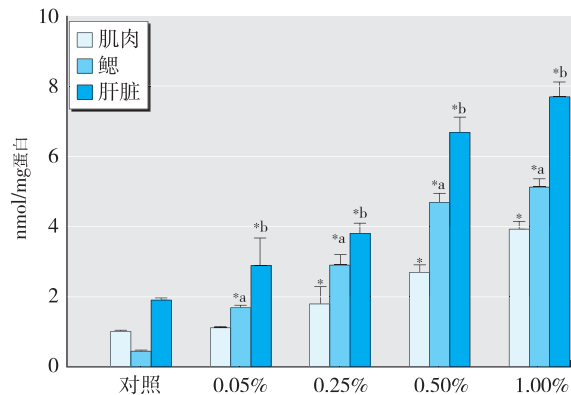
2.4 MDA 含量的变化

由图 3 可知,暴露 7 d 后,与对照组相比,斑马鱼肌肉 MDA 含量在中、高、极高浓度组中出现显著性升高;鳃和肝脏中的 MDA 含量在低浓度组即出现显著性升高,且随着暴露浓度的升高而升高,MDA 含量显著增加。

2.5 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性的变化

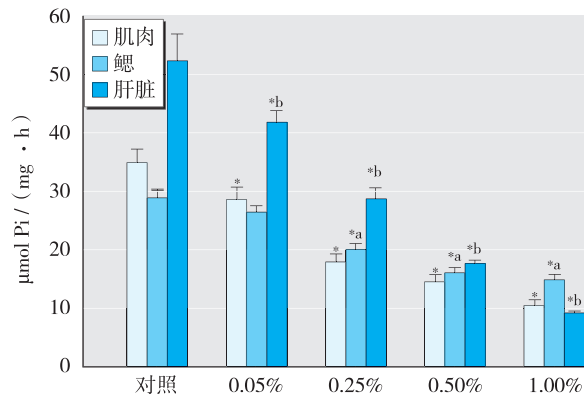
由图 4 可知,斑马鱼暴露 7 d 后,与对照组相比,在 4 个实验组中,肌肉和肝脏的 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 活性均出现显著性降低,且随着暴露浓度的升高而降低;鳃 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性在中、高和

极高浓度组中出现显著性下降。



[注]*: 分别与肌肉、鳃、肝脏的对照组比较, $P < 0.05$; a: $P < 0.05$; b: $P < 0.05$ 。

图 3 铊尾矿浸出液对斑马鱼肌肉、鳃、肝脏 MDA 含量的影响



[注]*: 分别与肌肉、鳃、肝脏的对照组比较, $P < 0.05$; a: $P < 0.05$; b: $P < 0.05$ 。

图 4 铊尾矿浸出液对斑马鱼肌肉、鳃、肝脏 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性的影响

3 讨论

据不完全估计,目前世界上有 22 个国家从事铊冶炼,产生了大约 20 亿吨的铊尾矿废渣^[4]。本研究在分析铊尾矿浸出液成分后证实,铊的含量为 0.0628 mg/L ,超过 WHO 规定的饮用水中铊浓度限值约 4 倍,表明铊尾矿浸出液对环境及机体危害可能主要是因铊的毒性所致。然而,铊尾矿浸出液也含有其他多种重金属环境风险因子,其中,镉为 I 类致癌物,锰、铁、铜、锌属于 II 类环境污染物,过量锰会引起人支气管炎、肺炎及神经毒性,高浓度锌能够引起机体渗透失调,镍也有致癌作用^[7],尽管这几种重金属浓度没有超过 WHO 推荐的饮用水基准值,但本研究并没有排除金属之间的相互作用,及在铊尾矿浸出液的危害性中起作用。

SOD 是机体内最主要的抗氧化酶,能清除体内过量的自由基,使细胞内维持氧化还原状态平衡,保护细胞免受自由基伤害。已有研究表明,斑马鱼经 28 d 的贫铊 $[(23 \pm 6) \mu\text{g/L}]$ 暴露后,肝脏 SOD 基因即出现过表达^[8]。然而,斑马鱼经贫铊暴露 10 d 后,肝脏 SOD 活性没有发生显著性变化^[9]。又有研究显示,小鳌虾经贫铊暴露后,肝脏 SOD 活性随时间推移而降低^[10]。在本研究中,斑马鱼暴露在中、高、极高浓度组中 7 d 后,肌肉、鳃和肝脏中的 SOD 活性显著降低,说明铊尾矿浸出液致使活性氧生成并致机体损伤。此外,暴露 7 d 后,斑马鱼肌肉及肝脏

组织中SOD活性在低浓度组出现升高,造成这种结果可能是由于氧化损伤引起细胞反应,细胞为了平衡大量活性氧的产生而引起这些酶表达的增强,或者细胞受到低剂量浸出液刺激后,抗氧化能力代偿性增强。因此,SOD活性可能与暴露时间及浓度存在较好的相关性。

CAT是抗氧化系统中的关键酶,既可以被金属离子激活,也可以被其抑制^[11]。体外研究表明,在软体动物、蚯蚓和鱼类中,铀可以诱导CAT活性降低^[12]。BARILLET等^[9,13]对暴露在采样环境浓度的贫铀溶液下的斑马鱼分析后发现,CAT活性出现了显著性下降。小鳌虾暴露在30 µg/L的贫铀溶液中,腮CAT活性在4d后出现下降^[14]。本实验中,斑马鱼鳃CAT活性在暴露7d后即出现下降,且随暴露浓度的升高而降低。CAT活性的降低表明铀尾矿浸出液暴露对斑马鱼具有毒性效应,同时也说明腮内出现了早期的氧化应激反应。可见,CAT活性会随着暴露剂量、金属类型或暴露途径的不同而发生变化。本研究还显示,铀尾矿浸出液对CAT活性的效应在腮中比肝脏中明显,表明腮的抗氧化系统不如肝脏的抗氧化系统强,肝脏可以更好地调控活性氧。

Na⁺-K⁺-ATP酶是一类广泛存在于真核生物细胞膜中的跨膜蛋白,是细胞能量转换的重要系统,Na⁺-K⁺-ATP酶活性的高低能够反映细胞受活性氧攻击的损伤程度。AL KADDISSI等报道,贫铀溶液(30 µg/L)作用于小鳌虾30d后,鳃细胞中的线粒体 $atp6$ 基因表达下调了88倍,而60d后,其又上调了8倍^[14], $atp6$ 基因表达上调可能是细胞为活性氧引起线粒体损伤所致ATP含量的降低而产生的补偿效应。本实验结果表明,肌肉、肝脏组织在低浓度的铀尾矿浸出液暴露7d,Na⁺-K⁺-ATP酶的活性就显著性降低,提示铀尾矿浸出液引起了斑马鱼细胞内活性氧的生成,从而导致细胞能量代谢障碍。

MDA是脂质过氧化反应产物,组织中的MDA含量高低可反映机体内脂质过氧化的程度,间接地反映机体组织或细胞受活性氧攻击的严重程度。一些研究表明,大鼠长期摄入硝酸双氧铀[UO₂(NO₃)₂]能导致自由基的产生^[15],以及大鼠肝细胞中活性氧的形成、脂质过氧化^[2]。MDA的含量随着铀尾矿浸出液的染毒浓度的增大呈上升趋势,也说明斑马鱼细胞的膜系统遭受到越来越严重的损伤。铀尾矿浸出液所致Na⁺-K⁺-ATP酶活性降低,可能是铀尾矿浸出液诱导细胞产生大量的活性氧,活性氧攻击线粒体,造成线粒体功能障碍,ATP合成减少,脂质过氧化产物大量产生,损害了膜脂质双分子层,最终造成依赖ATP的Na⁺-K⁺-ATP酶活性下降。

综上所述,铀尾矿浸出液使斑马鱼的SOD、CAT、Na⁺-K⁺-ATP酶活性降低,MDA含量升高,表明斑马鱼组织内产生了大量的活性氧,引起了早期的氧化应激反应。可见,活性氧介导了铀尾矿浸出液的毒性过程,细胞氧化应激损伤是铀尾矿浸出液对斑马鱼产生毒性的机制之一。因此,降低氧化应激损伤水平可能是避免或减轻铀尾矿浸出液中毒的有效靶点。

•作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for Drinking-water quality[S]. 3rd ed. Geneva: WHO, 2004.
- [2] POURAHMAD J, GHASHANG M, ETTEHADI H A, et al. A search for cellular and molecular mechanisms involved in depleted uranium (DU) toxicity[J]. Environ Toxicol, 2006, 21(4): 349-354.
- [3] 郭月凤, 张慧芳, 薛娟. 铀中毒对肾脏的损害[J]. 辐射防护通讯, 2009, 29(3): 18-22.
- [4] 李合莲, 陈家军, 顾志杰. 铀尾矿对地下水的环境影响研究[J]. 环境污染治理技术与设备, 2000, 1(3): 82-88.
- [5] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [6] 环境保护部. 中华人民共和国国家环境保护标准(HJ 557—2010): 固体废物 浸出毒性浸出方法水平振荡法[S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2010.
- [7] 史啸勇. 水体中重金属对人体健康影响的研究现状及对策[J]. 江苏环境科技, 2005, 18(3): 3-5.
- [8] LEREBOURS A, GONZALEZ P, ADAM C, et al. Comparative analysis of gene expression in brain, liver, skeletal muscles, and gills of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to environmentally relevant waterborne uranium concentrations[J]. Environ Toxicol Chem, 2009, 28(6): 1271-1278.
- [9] BARILLET S, ADAM C, PALLUEL O, et al. Bioaccumulation, oxidative stress, and neurotoxicity in *Danio rerio* exposed to different isotopic compositions of Uranium[J]. Environ Technol Chem, 2007, 26(3): 497-505.
- [10] AL KADDISSI S, LEGEAY A, ELIA C, et al. Effects of uranium on crayfish *Procambarus clarkii* mitochondria and antioxidants responses after chronic exposure: what have we learned?[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2012, 78: 218-224.
- [11] FARIA M, HUERTAS D, SOTO DX, et al. Contamination accumulation and multi-biomarker responses in field collected zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and crayfish (*Procambarus clarkii*), to evaluate toxicological effects of industrial hazardous dumps in the Ebro river (NE Spain)[J]. Chemosphere, 2010, 78(3): 232-240.
- [12] SIWELA A H, NYATHI C B, NAIK Y S. Metal accumulation and antioxidant enzyme activity in *C. gariepinus*, catfish, and *O. mossambicus*, tilapia, collected from Lower Mguza and Wright Dams, Zimbabwe[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2009, 83(5): 648-651.
- [13] BARILLET S, ADAM-GUILLETMIN C, PALLUEL O, et al. Uranium bioaccumulation and biological disorders induced in zebrafish (*Danio rerio*) after a depleted uranium waterborne exposure[J]. Environ Pollut, 2011, 159(2): 495-502.
- [14] AL KADDISSI S, FRELON S, ELI A C, et al. Are antioxidant and transcriptional responses useful for discriminating between chemo- and radiotoxicity of uranium in the crayfish *Procambarus clarkii*?[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2012, 80: 266-272.
- [15] TAULAN M, PAQUET F, MAUBERT C, et al. Renal toxicogenic response to chronic uranyl nitrate insult in mice[J]. Environ Health Perspect, 2004, 112(16): 1628-1635.

(收稿日期: 2013-04-12)

(英文编审: 金克峙; 编辑: 郑轻舟; 校对: 何蓉)