王慧东,姜 浩,蔡佳琪,等.系统转录组分析揭示三种典型全氟化合物毒性差异 [J]. 中国环境科学, 2025,45(12):7008-7016.
Wang H D, Jiang H, Cai J Q, et al. Systematic transcriptomic analysis reveals differential toxicity of three typical perfluoroalkyl substances [J]. China Environmental Science, 2025,45(12):7008-7016.

系统转录组分析揭示三种典型全氟化合物毒性差异

王慧东[1,2],姜 浩[1],蔡佳琪[1],陈 璐[2],丁立健[1],倪安煜[3],闫 瑾[4],丁春明[1],金胜男[1*] (1.温州医科大学检验医学院生命科学学院,浙江 温州 325000；2.嘉兴市南湖区疾病预防控制中心,浙江 嘉兴 314000；3.复旦大学附属肿瘤医院病理科,上海 200030；4.苏州科技大学环境科学与工程学院,江苏 苏州 215009)

摘要：本研究整合分析了公开数据库中斑马鱼暴露于三种代表性 PFAS(PFHxS、PFOA、PFOS)后的转录组测序数据,并结合行为学实验系统比较其综合毒性强度与神经毒性机制.转录组学起始点(tPOD)分析显示,PFOS 毒性最强(120h tPOD=0.3241μmol/L),其次为 PFHxS(0.3735μmol/L)与 PFOA(0.4506μmol/L),且斑马鱼对 PFAS 的耐受性随发育进程提升.行为学结果再分析显示,三种 PFAS 均可诱导“兴奋-抑制”型双相反应,即在低剂量下促进斑马鱼的游动行为,而在高剂量下表现出抑制效应.进一步通过行为驱动转录组分析发现,PFAS 暴露普遍干扰代谢稳态与神经通路调控,其中 PFOS 在信号转导和免疫反应上展现更强扰动效应.单细胞转录组结果显示 PFOS 可显著影响神经元亚群组成,提示其可能通过增强兴奋性突触活动介导行为表型变化.

关键词：全氟和多氟烷基物质；转录组学；神经毒性；毒性差异；斑马鱼
中图分类号：X174 **文献标识码**：A **文章编号**：1000-6923(2025)12-7008-09

Systematic transcriptomic analysis reveals differential toxicity of three typical perfluoroalkyl substances.

WANG Hui-dong[1,2], JIANG Hao[1], CAI Jia-qi[1], CHEN Lu[2], DING Li-jian[1], NI An-yu[3], YAN Jin[4], DING Chun-ming[1], JIN Sheng-nan[1*] (1.School of Laboratory Medicine and Life Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China；2.Centre for Disease Control and prevention, Nanhu District, Jiaxing 314000, China；3.Department of Pathology, Fudan University Shanghai Cancer Center, Shanghai 200030, China；4.School of Environmental Science and Engineering, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou 215009, China). *China Environmental Science*, 2025,45(12)：7008~7016

Abstract：Publicly available transcriptomic datasets from zebrafish exposed to three representative per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS)—PFHxS, PFOA, and PFOS—were systematically integrated with behavioral data to elucidate comparative toxic potencies and neurotoxic mechanisms. Transcriptomic point-of-departure (tPOD) modeling identified PFOS as the most potent compound (120-h tPOD = 0.3241μmol/L), followed by PFHxS (0.3735μmol/L) and PFOA (0.4506μmol/L). Developmental stage–dependent increases in PFAS tolerance were observed. Behavioral meta-analysis revealed a characteristic biphasic “stimulation-inhibition” response pattern across all three PFAS, with enhanced locomotor activity at low concentrations and suppression at higher doses. Behavior-anchored transcriptomic profiling demonstrated that PFAS exposure broadly perturbed metabolic homeostasis and neural signaling pathways, with PFOS eliciting more pronounced disruptions in signal transduction and immune regulatory networks. Single-cell transcriptomic analysis further indicated that PFOS substantially altered neuronal subtype composition, suggesting that augmented excitatory synaptic activity may underlie the observed behavioral phenotypes.

Key words：per- and polyfluoroalkyl substances；transcriptomics；neurotoxicity；differential toxicity；zebrafish

全氟和多氟烷基化合物(PFAS)是一大类包含逾12000种成员的合成两亲性化合物,通常由全氟或部分氟化的脂肪链与末端的羧酸基或磺酸基构成[1-2].因其优异的阻燃、防水和表面活性特性,PFAS 被广泛应用于工业与日用产品中[3].然而,强碳-氟键赋予其高度稳定性,难以降解,现已在全球多种环境介质中被广泛检出[3-5].例如,地表水中全氟己烷磺酸(PFHxS)、全氟辛(PFOA)和全氟辛烷磺酸(PFOS)的最大检出浓度分别达 1410.2,156.8 和 598.7ng/L[6];污水出水中可达 922,15.9 和 2.1 μg/L[7].尽管 PFAS 急性毒性较低,但其易在水生生物中富集,通过食物链在人体内长期积累,血液或组织中常检出μg/L~mg/L 浓度,如2018年美国北卡罗来纳州成人血液中

收稿日期：2025-05-21
基金项目：国家自然科学基金资助项目(22106118)
* 责任作者, 研究员, snjin1997@qq.com

PFHxS、PFOA 与 PFOS 的中值浓度分别为 3.5、4.8 与 9.4μg/L[8-10].

当前关于 PFAS 的毒性机制研究主要集中于两类代表性化合物:全氟磺酸(如 PFOS)和全氟羧酸(如 PFOA),其已被证实可通过诱导氧化应激[11]、干扰脂肪酸代谢[12]及扰乱甲状腺激素信号等多种机制发挥毒性效应[13-15].为降低生物蓄积性,短链 PFAS(如 PFHxS、氟丁烷磺酸 PFBS)被设计为替代物,但部分

替代品仍表现出较强的持久性、迁移性与毒性,其环境检出率也随应用扩大而持续上升,构成新兴生态风险[16].既有的研究表明,结构相似的 PFAS 常共享分子靶点而引发共性毒性,然而官能团差异又可能导致特异性响应,使结构−毒性关系复杂,限制了替代物的理性设计与风险预测[17].

传统哺乳动物模型成本高、通量低,难以支持多化合物、多剂量及多时间点筛查.斑马鱼因其高通量和发育透明性优势,已成为发育毒性与神经行为研究的重要模型[18-19].结合自动化成像与行为分析平台,可显著提升毒性筛查效率[18].然而,现有研究多聚焦于单一化合物或固定时间点,缺乏系统比较.随着二代测序技术发展,转录组学为揭示早期分子事件及剂量−效应关系提供了新手段,但传统 DEG 分析易忽略亚阈值调控与非线性效应.

本研究整合公开转录组数据库并结合斑马鱼行为学数据,利用时序聚类识别早期响应基因簇,捕捉低剂量补偿性调节与非线性响应信号.以三种结构差异显著的 PFAS(PFHxS、PFOA、PFOS)为对象,系统比较其毒性特征,并结合单细胞转录组(scRNA−seq)解析 PFAS 对神经系统细胞亚群的异质性效应.

1　材料与方法

1.1　动物实验

1.1.1　化学试剂　PFHxS(CAS: 355−46−4;纯度>98.0%),PFOA(CAS: 335−67−1;纯度>98.0%), PFOS (CAS: 1763−23−1;纯度>98.0%),二甲基亚砜(DMSO, CAS: 67−68−5,纯度≥99.0%)均购自 Sigma− Aldrich.

1.1.2　动物饲养及暴露实验　本研究所使用斑马鱼均为 AB 株,按照国家指南进行维护和繁育,选取受精后 6h(6hpf)胚胎进行暴露实验,实验在 96 孔板中进行,每组设 12 孔,每孔 1 胚胎.在药物剂量选择上,本研究参考美国环保署于 2022 年开展的一项典型 PFAS 对斑马鱼幼鱼毒性评估研究[20],设定 PFOS、PFOA 和 PFHxS 的暴露浓度为标称值 0.032,0.1,0.317,1,3.17, 10.01,31.67 和 100μmol/L,暴露液每 24h 更换 1 次,以维持药物稳定性与水质,暴露持续至 120hpf.

1.1.3　行为分析　将 120hpf 的幼鱼置于 DanioVision 的观察室进行行为分析,每组 12 条幼鱼,通过高清相机采集黑暗环境下 20min 内幼鱼的自发运动轨迹,利用 ethoVision XT 软件进行行为数据分析.

1.2　数据获取

本研究从 Gene Expression Omnibus 数据库下载以下公开数据集:GSE242402,斑马鱼胚胎在 3 个发育窗口期(6~24hpf、6~48hpf、6~120hpf)分别暴露于浓度梯度 0~100μmol/L 的三种 PFAS(PFOS、PFOA、PFHxS)和 0.33% DMSO 对照,包含 390 个样本的批量 RNA−seq 数据.GSE275163,包含斑马鱼胚胎(3~72hpf)暴露于 16μmol/L PFOS 和 0.01% DMSO 对照后整鱼的 scRNA−seq 数据.

1.3　tPOD 计算

本研究采用转录组学起始点(tPoD)分析方法比较三种 PFAS 的毒性强度.首先过滤低表达基因(TPM<0.5),基于 Exp2、Exp3、线性和 Hill 模型拟合剂量−效应曲线,筛选 R^2 前 500 位的基因.应用“drc”包(R 4.2.0),通过四参数逻辑回归计算各基因表达变化达到 10%效应水平(ED_{10})对应的 tPOD 值,最终以第 10 百分位 tPOD、前 20 敏感基因 tPOD 及 tPOD 密度曲线首峰位置作为毒性强度评价指标.

1.4　差异表达分析

对于每种 PFAS 的不同剂量下的基因表达矩阵,在进行过滤(count<1)和标准化后,采用“limma”包(R 4.2.0)中的 limma−voom 方法进行差异表达分析,筛选调整后的 P 值<0.05 且|log2FC|>1 的基因为差异表达基因,分析结果使用“ggplot2”包(R 4.2.0)进行可视化.

1.5　时间序列聚类分析

为构建斑马鱼行为变化与基因表达变化的关联模式,本研究采用行为驱动的基因筛选策略.具体方法为:将标准化后的三种 PFAS 暴露条件下的基因表达矩阵与各剂量组的行为学均值进行 Pearson 相关性分析,计算每个基因与行为表型之间的相关系

数(r 值).为保证筛选结果的生物学相关性与统计稳健性,设定相关性阈值为$|r|>0.5$,以识别中等及以上强度的线性关系.基于行为分析结果,选取最具毒理学意义的暴露剂量为 PFHxS(31.67μmol/L)、PFOA(31.67μmol/L),PFOS(10.01μmol/L),对于该剂量下的显著相关基因,按照暴露时间序列:6~24hpf、6~48hpf、6~120hpf,采用“Mfuzz”包(R 4.2.0)进行模糊 C 均值聚类(c=4),通过 mestimate()函数自动优化模糊参数,识别出 4 种特征性表达模式.进一步将这些基因模块映射至对照组表达矩阵,筛选出表达趋势显著相反的基因集;对于趋势不明确的基因集,则运用动态时间规整算法定量评估暴露组与对照组的时序表达差异.对于所得与对照组存在时序表达差异的基因集,使用“clusterProfiler”包(R 4.2.0)进行功能分析.

1.6 scRNA-seq 数据质控

为提高下游分析的准确性,使用 Seurat (v4) 对数据进行严格质控,依次评估转录本数量、检测基因数、线粒体与血红蛋白基因占比,并设定过滤标准(基因数:300~5000、线粒体<10%、血红蛋白<1%).此外,结合“DoubletFinder”工具,基于 25%的预期双细胞率并修正同型双细胞比例,识别并剔除双细胞,最终筛选高质量单细胞用于后续分析.

1.7 细胞注释

为整合多样本的 scRNA-seq 数据并识别细胞亚群,本研究基于 Seurat 框架开展标准数据处理流程.首先在标准化基础上计算高变基因并执行 PCA 降维,随后利用 Harmony 算法对多个样本间的批次效应进行校正.基于 Harmony 降维结果执行邻近图构建、分辨率范围聚类,并使用 clustree 可视化不同分辨率下的聚类稳定性.聚类完成后参考 ZFIN 斑马鱼数据库及近期高通量单细胞研究成果,并结合经典文献手动注释主要细胞类型,并进行亚型细分.

1.8 拟时序分析

为探究神经元类细胞在发育过程中的分化轨迹,本研究基于 Monocle v2 对已注释的神经细胞子集进行拟时序分析.首先从 Seurat 对象中提取 count 矩阵及细胞表型信息,随后计算 size factors 和基因离散度,筛选出动态变化较大的高变基因作为排序基因,用于后续轨迹构建.采用 DDRTree 算法进行非线性降维,然后基于不同维度上细胞的状态、拟时间、类型及样本来源等参数来可视化轨迹结构.最终将 Monocle 分析结果合并回 Seurat 元数据,用于后续联合分析与细胞分化命运判定.

1.9 统计分析

本研究所有数据均采用 R 4.2.0 软件进行处理分析,结果以均值±标准差(Mean±SD)表示.对于符合正态分布和方差齐性假设的数据,采用单因素方差分析进行组间比较,并通过 Dunnett 检验进行多重比较.统计学显著性阈值设为 P<0.05.

2 结果与讨论

2.1 tPOD 分析揭示三种 PFAS 的毒性强度差异

三种 PFAS(PFHxS、PFOA、PFOS)的化学结构如图 1(a)所示:PFHxS(C6−SO_3H)和 PFOS(C8−SO_3H)均属于全氟烷基磺酸盐,其中 PFHxS 具有较短的六碳链(C6),而 PFOS 为八碳链(C8);PFOA(C8−COOH)与 PFOS 碳链长度相同,但其末端官能团为羧酸基(−COOH)而非磺酸基(−SO_3H).为了比较 PFHxS、PFOA 和 PFOS 对斑马鱼发育的毒性差异,本研究对斑马鱼器官快速形成的 48hpf 阶段和器官基本发育成熟的 120hpf 阶段的转录组数据进行分析,通过 tPOD 方法计算 PFAS 毒性阈值.结果显示,无论是暴露至 48hpf 还是 120hpf,三种 PFAS 的强度均表现为 PFOS>PFHxS>PFOA(图 1b,c).值得注意的是,120hpf 时三种 PFAS 的 tPOD 值较 48hpf 均有所升高(图 1C),提示随着发育进程推进,斑马鱼对 PFAS 的耐受性增强.这一现象可能与器官发育成熟后解毒酶系统功能完善、组织屏障形成等保护机制增强有关[21-22].尤其是 PFOS 在两个时间点的 tPOD 分布特征差异最为显著,提示其基因表达响应可能呈现非常规剂量效应,暗示其具备独特的毒性机制.

2.2 三种 PFAS 的神经毒性机制比较

斑马鱼在 120hpf 时已具备自发游泳能力,本研究通过分析 6~120hpf 暴露期间的行为变化评估三种 PFAS 的神经毒性.结果显示,PFHxS 和 PFOA 在 3.17μmol/L(P=0.009 和 P=0.003)及 31.67μmol/L(P=0.002 和 P=0.003)剂量下均显著提高斑马鱼的游泳速度,提示存在剂量依赖性的兴奋性神经毒性(图 2a,b).PFOS 在 3.17μmol/L 和 10.01μmol/L 剂量下也诱导类似的行为增强效应(图 2c),而在更高剂量时表现不同:100μmol/L 条件下 PFHxS 和 PFOA 组的

游泳速度出现下降趋势;PFOS 则因 100μmol/L 诱导显著致死率,因此最高暴露剂量调整为 31.67μmol/L,在此剂量下斑马鱼游泳能力显著下降(P=0.001),表现为神经抑制型行为反应.

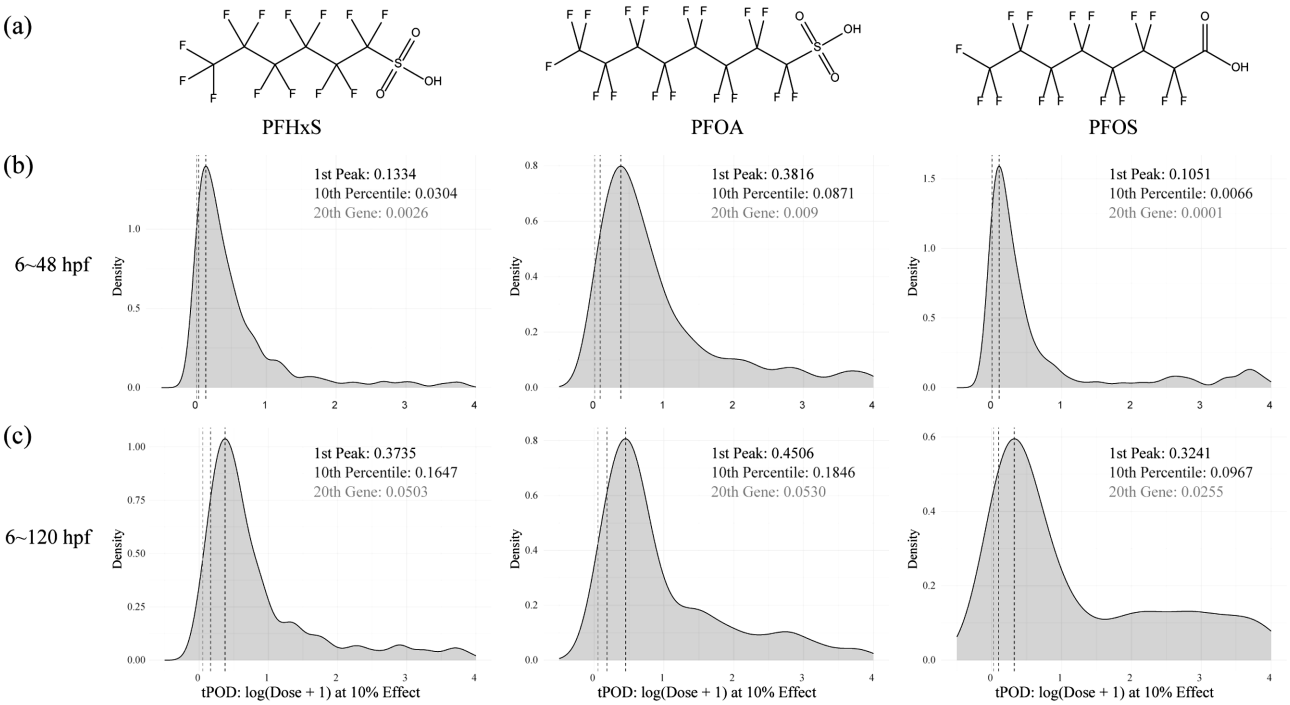


图 1　三种 PFAS 的化学结构特征及其毒性阈值比较

Fig.1　Chemical structures and toxicity thresholds comparison of three PFAS

(a) PFHxS、PFOA 和 PFOS 的化学结构图. (b)斑马鱼幼鱼在 6~48hpf 暴露于三种 PFAS 后的 tPOD 分析.(c)斑马鱼幼鱼在 6~120hpf 暴露于三种 PFAS 后的 tPOD 分析.其中,纵轴表示在各暴露浓度下被扰动基因数量的统计分布密度,横轴为对应暴露浓度

这些结果提示,三种 PFAS 均可诱发典型的“兴奋−抑制”型双相神经毒性,其作用模式与有机磷农药等经典神经毒素高度相似.已有研究指出,此类神经毒素在中低剂量下可通过干扰乙酰胆碱、谷氨酸及 γ−氨基丁酸等神经递质系统,改变神经信号传导过程,从而引发运动亢进等兴奋性表现[23-25].然而,在更高剂量(如 100μmol/L)暴露条件下,PFHxS 与 PFOA 诱导斑马鱼活动水平显著下降,PFOS 则在该浓度下表现出较高的致死率,提示三种 PFAS 在高剂量下可能引发抑制性神经毒性甚至全身性毒性反应.这种剂量依赖的双相行为反应模式符合某些环境污染物所呈现的双相神经毒性特征[25-26].其潜在机制可能包括高剂量或长时间暴露引起的线粒体功能障碍、氧化应激增强或细胞膜完整性受损,进而引发不可逆的神经损伤,例如神经元凋亡或轴突变性,影响正常的神经活动[22-27].

为了进一步比较三种 PFAS 的潜在毒性机制,我们对各剂量组与对照组分别进行了基因差异表达分析.结果显示,三种 PFAS 均在极低剂量(0.032 μmol/L)和高剂量(>10.01μmol/L)条件下诱导了少量差异表达基因(DEGs),而在中等浓度区间几乎未检测到显著 DEGs(图 2d,f).这一现象表明,PFAS 诱导的分子反应并不符合传统的线性或 S 型剂量−反应关系,而更倾向于呈现 U 型剂量效应曲线.因此,常规基于 DEG 阈值筛选的毒理分析方法在此类剂量−效应关系中表现有限,难以捕捉 PFAS 在关键剂量区间的转录响应特征.

为克服上述分析局限,我们在数据处理策略上进行了方法学优化.通过整合剂量序列转录组表达谱、时间序列表达谱与行为表型数据,我们构建了一种行为驱动的基因筛选方法.考虑到斑马鱼游泳速度随 PFAS 剂量呈特定趋势变化,将各剂量下的表达矩阵视为由基因表达向量构成,逐一与游泳速度的剂量响应趋势进行 Pearson 相关性分析,以筛选与行为变化显著正或负相关的基因集(图 2g~i).在此基础上,以关键毒理剂量 PFHxS、PFOA(31.67μmol/L),

PFOS(10.01μmol/L)为代表,对这两个基因集分别进行模糊 *C* 均值聚类,将其按照在时间维度上的表达动态划分为 4 个模块.随后,将 PFAS 处理组与对照组在各模块中的表达趋势进行比较(图 2j~l),其中实线表示 PFAS 组,虚线表示对照组,对于显著偏离对照组趋势的模块,我们进行了基因功能分析.

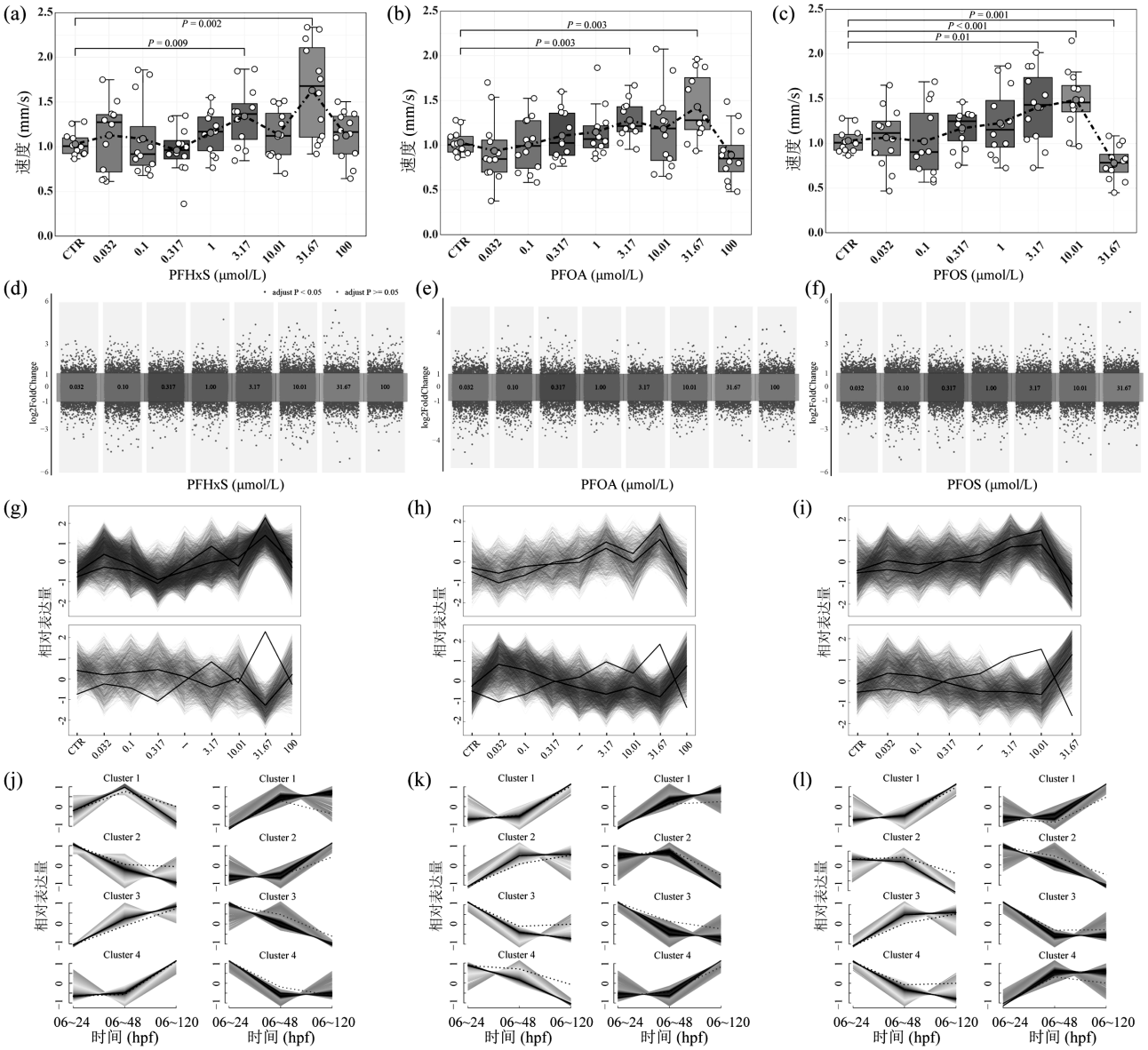


图 2 PFAS 诱导斑马鱼兴奋−抑制型行为反应及其相关基因表达动态分析

Fig.2 PFAS−induced biphasic behavioral responses and associated gene expression dynamics in zebrafish

(a~c)斑马鱼幼鱼在 6~120hpf 暴露于三种 PFAS 后的运动速度变化分析.每组共检测 12 条幼鱼. (d~e) 斑马鱼幼鱼在 6~120hpf 暴露于三种 PFAS 后转录组差异表达基因分析. (g~i)基于 Pearson 相关性算法筛选与行为变化显著相关的基因集. (j~l)对所筛选的基因集进行时序分析,将其划分为 4 个表达模块,展示 PFAS 处理组(实线)与对照组(虚线)在各模块中的表达动态

京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析结果显示,PFHxS 正相关模块的基因主要富集于代谢相关通路,如糖代谢(Carbohydrate metabolism)和脂质代谢(Lipid metabolism);而负相关模块则更偏向于细胞结构、信号传导、病原感染和细胞命运调控.PFOA 组的正相关模块的基因富集于碳代谢(Carbon metabolism)、糖酵解/糖异生(Glycolysis/Gluconeogenesis)等能量代谢和氨基酸合成相关通路,负相关模块则强调细胞命运决定、转录/翻译调控、蛋白质处理,可能代表发育调控、干细胞分化状态以及表观遗传变异或再编程(图 3A).从这些结果可以看出 PFHxS 和 PFOA 组的基因功能分析结果

部分类似,尤其在基础代谢和细胞凋亡调控方面有共性.

对于 PFOS,正相关模块的基因功能主要富集于 Ca^{2+}、Notch、细胞因子及激素等多种细胞间/胞内信号通路,而负相关模块则更侧重于能量代谢与免疫应答(图 3a).Notch 通路作为发育过程中的关键节律信号,其受扰可能会打破神经元生成的时间窗精确性,诱导异常神经元分布和突触发育异常[28].此外,钙信号的紊乱与免疫细胞活化和线粒体功能密切相关[29],提示 PFOS 可能通过“神经−免疫−代谢”协同破坏轴发挥毒性.整体来看,尽管三种 PFAS 在基础代谢层面存在一定共性,但在发育调控与免疫信号路径上表现出特异性分化.

基因本体论_细胞组分(GO_CC)分析进一步揭示三种 PFAS 相关基因表达在亚细胞结构定位上的异同(图 3b).PFHxS 和 PFOS 的正相关基因均富集于神经元相关结构,分别以突触前和突触后结构为主,突触定位差异可能由于 PFHxS 主要作用于神经信号发出端,而 PFOS 则干扰突触接受和可塑性调节,这种分布差异值得通过突触前/突触后蛋白表达谱进一步验证[30-31].相比之下,PFOA 的正相关基因更显著富集于血红蛋白复合物、线粒体内膜及细胞骨架,提示其毒性作用可能偏向结构维持与能量供给路径.在负相关模块中,PFHxS 主要抑制核糖体与黏附结构,PFOA 抑制表观遗传调控复合体及细胞周期相关结构,而 PFOS 则显著抑制线粒体呼吸链系统,提示三者在细胞功能损伤机制上存在明显差异.

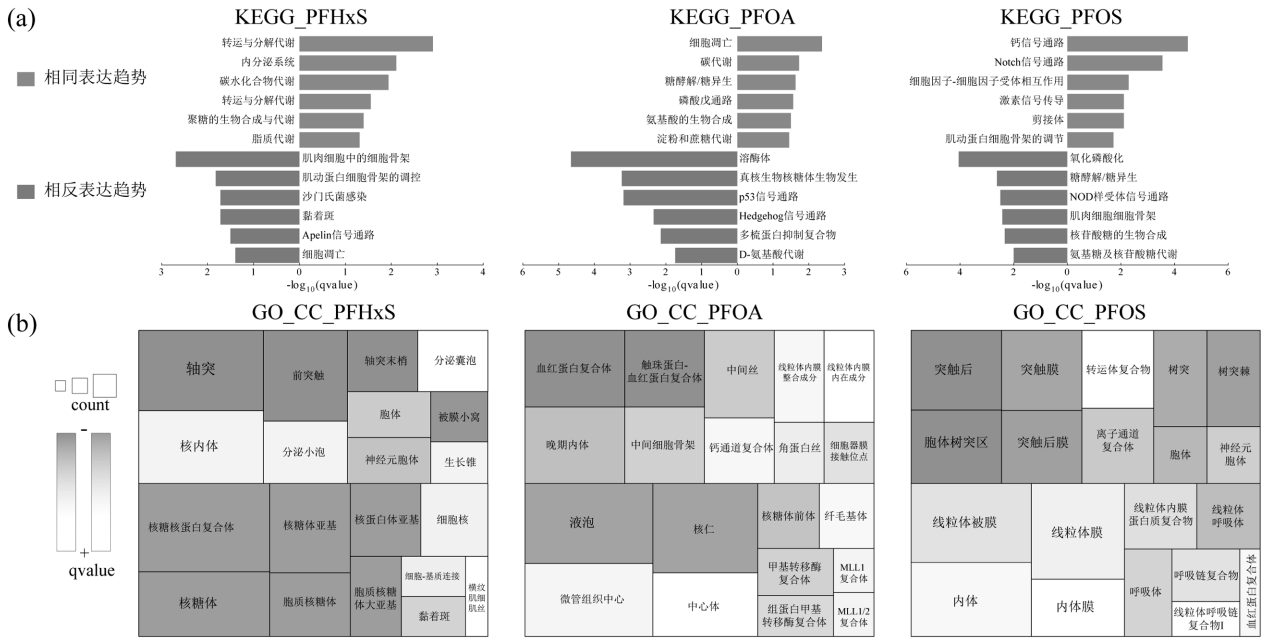


图 3　PFAS 暴露下行为相关基因的功能分析

Fig.3　Functional analysis of behavior−associated genes under PFAS exposures

(a) 三种 PFAS 处理组 DEGs 的 KEGG 富集分析结果; (b) GO 细胞组分富集分析结果

综上,三种 PFAS 均可影响细胞特定结构区域,其中,PFHxS 和 PFOA 均显著影响碳水化合物代谢、糖酵解/糖异生等能量代谢相关通路,同时干扰细胞命运决定等发育调控过程,表明这两类化合物主要通过扰乱能量代谢稳态来发挥毒性效.PFOS 表现出相对独特的神经和免疫干扰特性,通过协同干扰钙稳态、Notch 振荡和线粒体呼吸链,导致神经信号传导与免疫应答的跨尺度紊乱.

2.3　scRNA−seq 揭示 PFOS 神经毒性深层机制

由于 PFOS 展现出独特的神经毒性机制,为拓展研究维度,我们聚焦于 72hpf 这一斑马鱼神经系统进入高度分化和功能建立的关键阶段[18-32],进一步在单细胞分辨率下解析 PFOS 暴露诱导的神经元亚群转录调控异常及对发育轨迹的干扰.

基于 GSE275163 数据集,我们捕获了 14611 个细胞的转录组数据,质控后保留了 10839 个高质量细胞用于后续分析.随后,利用 2000 个高变基因,将所有细胞降维聚类为 30 个初始簇,并结合 ZFIN 数

据库以及已发表的经典文献[33-35],通过细胞类型特异性标记基因对这些簇进行了精细注释,最终划分出 13 种明确的细胞类型:神经元细胞(*scrt2*$^+$、*elavl4*$^+$)、红细胞(*hbae1.1*$^+$、*hbbe2*$^+$、*alas2*$^+$)、孵化腺细胞(*malb*$^+$、*he1.2*$^+$、*ctslb*$^+$)、心脏细胞(*tmem88a*$^+$、*rbpms2a*$^+$、*tmem88b*$^+$)、后脑细胞(*sox3*$^+$、*msi1*$^+$)、晶状体细胞(*crybb1*$^+$、*crybb1l2*$^+$、*cryba1b*$^+$)、巨噬细胞(*ptprc*$^+$、*mfap4*$^+$、*il1b*$^+$)、成骨细胞(*col11a1b*$^+$、*col5a2a*$^+$)、视杯细胞(*rx1*$^+$、*rx2*$^+$)、肌上皮细胞(*cldni*$^+$)、双极细胞(*nrn1lb*$^+$)、肝细胞(*ezra*$^+$、*lgals2b*$^+$)以及周皮细胞(*agr1*$^+$、*anxa1b*$^+$、*eppk1*$^+$)(图 4a, b).

神经元作为大脑中接收、整合和传递信息的基本功能单元,在斑马鱼运动行为的调控中发挥核心作用[36].基于其功能和分子标志物差异,我们进一步对神经元进行了亚型细分,包括:神经祖细胞(*sox2*$^+$)、未成熟神经元(*dcx*$^+$)、兴奋性神经元(*slc17a6b*$^+$)、抑制性神经元(*slc6a5*$^+$、*gad1b*$^+$),以及其他类型神经元,如多巴胺能、血清素能等调节型神经元,和感知光、声、触觉等外界刺激的感觉神经元(图 4c, d).

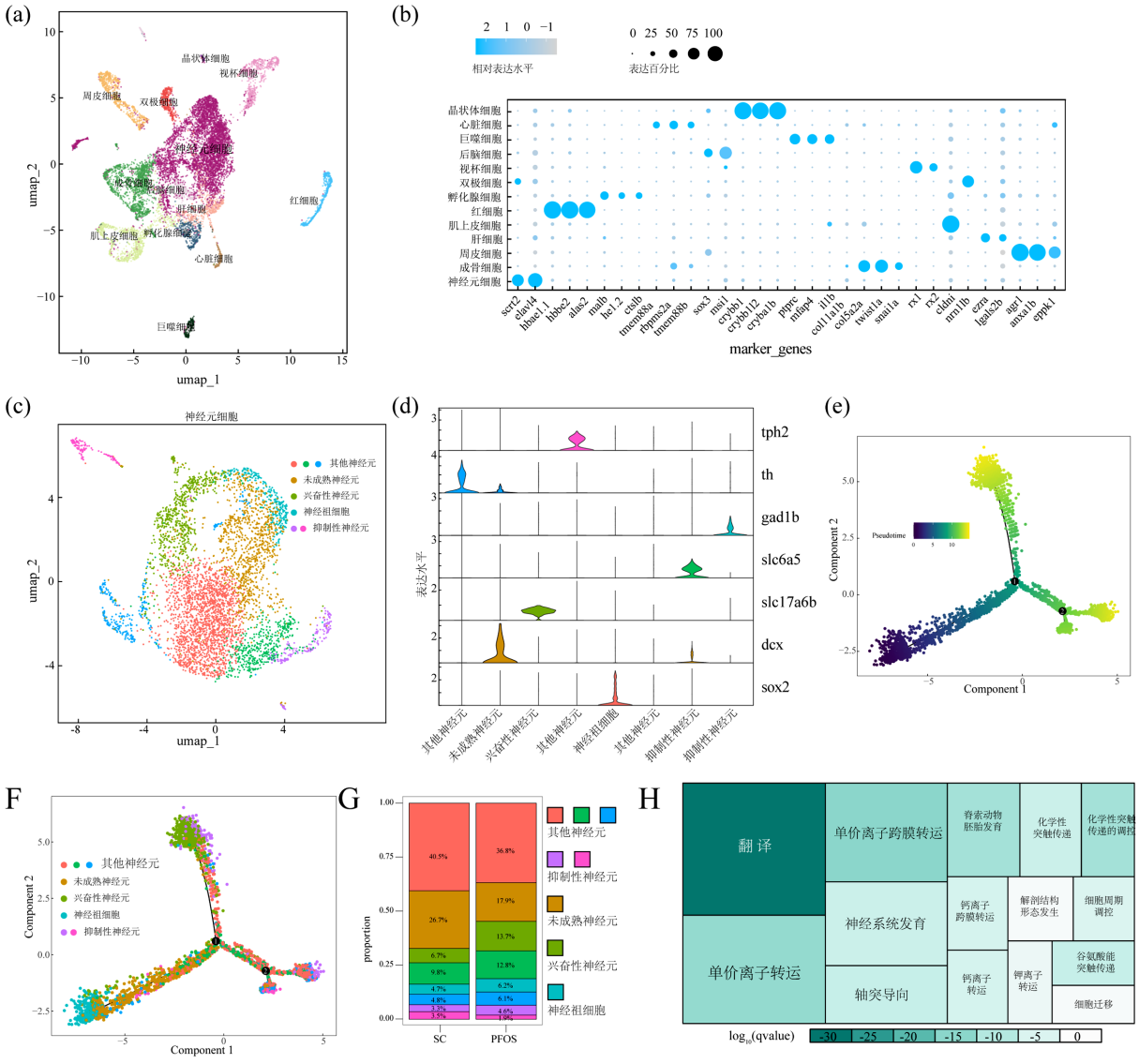


图 4 PFOS 暴露下神经元亚群发育轨迹及亚群分化分析

Fig.4 Neuronal trajectory and subtype differentiation analysis under PFOS exposure

(a)细胞簇注释. (b)各标志基因在每个细胞簇中的表达水平. (c)神经元细胞亚型细分. (d)各标志基因在每个亚型细胞簇中的表达水平. (e)拟时间轴轨迹. (f)在拟时间内排列细胞. (g) SC 和 PFOS 暴露组中神经元细胞类型丰度的百分比分布. (h)兴奋性神经元中 DEGs 的 GO 生物过程富集分析结果

为探究神经元亚群的发育动态,我们基于 Monocle 3 重构了斑马鱼神经系统的拟时序轨迹.结

果显示,神经祖细胞位于轨迹起点,未成熟神经元分布于中段,成熟神经元则沿各分支逐渐分化形成(图4e).其中,兴奋性神经元主要聚集于分支1末端,抑制性神经元则沿分支 2 分化,提示其发育路径存在分歧(图4f). PFOS暴露显著改变细胞亚型组成,兴奋性神经元占比由 6.7%升至 13.7%(图 4g),提示神经祖细胞向兴奋性命运偏移.GO_BP 富集分析显示,该亚群差异基因涉及离子转运、突触传递与轴突导向等过程(图4H).表明PFOS可能通过增强谷氨酸能神经递质释放或激活钠/钙通道,介导兴奋性突触传递,从而在神经环路中发挥兴奋驱动效应.这一机制与既往 PFOS 致大鼠小脑颗粒神经元兴奋毒性的报道一致[37],或可解释了在行为实验中观察到的运动亢进等兴奋性表型特征.综上,细胞命运扰动可能是 PFOS 神经毒性的关键机制之一.本研究进一步指出,神经毒性干预或起始于发育早期的分化路径改变,而非仅限于成熟神经元功能异常[38-39],具有更深远的生理与病理意义.未来应探讨该机制的跨物种保守性,并评估其在人类发育过程中的潜在风险.

然而,受限于当前公开数据的可用性,本研究中的scRNA-seq数据仅覆盖PFOS处理,尚不具备对其他PFAS种类及完整剂量梯度的分析能力,限制了行为-转录组关联研究的广度与系统性.此外,行为学与单细胞组学数据来源于不同实验体系,采集时间点和处理条件存在差异,尚需通过统一实验设计进一步验证二者之间的直接关联.

综上,尽管本研究在行为学与多组学数据整合方面进行了有益探索,仍存在以下局限性:其一,单细胞数据覆盖范围有限,难以建立跨化合物、跨剂量的泛化模型;其二,数据采集时间与实验条件不完全一致,可能影响关联分析的准确性;其三,部分机制推断仍需依赖后续实验验证.未来研究应通过标准化实验流程、统一时间节点以及多维数据整合,推动 PFAS 神经毒理机制的系统化与精确化研究.

3　结论

3.1　tPOD分析显示,三种典型PFAS的毒性强度依次为PFOS>PFHxS>PFOA,且斑马鱼对PFAS的耐受性随发育进程逐渐增强.

3.2　行为实验表明,三者均诱导典型的剂量依赖性双相反应:在 0.032~31.67μmol/L 范围内引起神经兴奋,而在高于 31.67μmol/L 时导致运动抑制或死亡,其中 PFOS 表现出最强抑制效应.

3.3　行为驱动的转录组分析显示,三种 PFAS 在代谢稳态、细胞命运与神经信号通路方面存在共性扰动,PFOS 在信号转导和免疫调控中表现出更显著的干扰作用.

3.4　scRNA-seq结果进一步揭示,PFOS显著改变神经元分化轨迹并增加兴奋性神经元比例,提示其可能通过增强谷氨酸能突触传递介导神经行为异常.

参考文献：

[1] Cousins I T, DeWitt J C, Glüge J, et al. The high persistence of PFAS is sufficient for their management as a chemical class [J]. Environmental Science: Processes & Impacts, 2020,22(12):2307-2312.

[2] Buck R C, Franklin J, Berger U, et al. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: terminology, classification, and origins [J]. Integrated environmental assessment and management, 2011,7(4):513-541.

[3] Dean W S, Adejumo H A, Caiati A, et al. A framework for regulation of new and existing PFAS by EPA [J]. Journal of Science Policy & Governance, 2020,16(1):1-14.

[4] Peritore A F, Gugliandolo E, Cuzzocrea S, et al. Current review of increasing animal health threat of per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS): harms, limitations, and alternatives to manage their toxicity [J]. International journal of molecular sciences, 2023,24(14):11707.

[5] 姜舒祺,毕宇杰,张　涛,等.盐度对全氟和多氟烷基物质(PFAS)在海水-沉积物界面吸附行为的影响 [J]. 中国环境科学, 2024,44(1):462-473.
Jiang S Q, Bi Y J, Zhang T, et al. Effects of salinity on the adsorption behavior of perfluorinated and polyfluoroalkyl substances(PFAS)at the seawater-sediment interface [J]. China Environmental Science, 2024, 44(1):462-473.

[6] An W K, Duan L, Zhang Y Z, et al. Occurrence, spatiotemporal distribution, seasonal and annual variation, and source apportionment of poly- and perfluoroalkyl substances (PFASs) in the northwest of Tai Lake Basin, China [J]. Journal of Hazardous Materials, 2021,416:125784.

[7] Robert L, Raquel C, Diana C A, et al. EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents [J]. Water research, 2013,47(17):6475-6487.

[8] Fan X, Tang S, Wang Y, et al. Global exposure to per-and polyfluoroalkyl substances and associated burden of low birthweight [J]. Environmental Science & Technology, 2022,56(7):4282-4294.

[9] Göckener B, Weber T, Rüdel H, et al. Human biomonitoring of per-and polyfluoroalkyl substances in German blood plasma samples from 1982 to 2019 [J]. Environment International, 2020,145:106123.

[10] Mahoney H, Xie Y, Brinkmann M, et al. Next generation per-and poly-fluoroalkyl substances: status and trends, aquatic toxicity, and

risk assessment [J]. Eco-Environment & Health, 2022,1(2):117-131.
[11] Søderstrøm S, Lille-Langøy R, Yadetie F, et al. Agonistic and potentiating effects of perfluoroalkyl substances (PFAS) on the Atlantic cod (Gadus morhua) peroxisome proliferator-activated receptors (Ppars) [J]. Environment International, 2022,163:107203.
[12] Marques E, Pfohl M, Auclair A, et al. Perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) administration shifts the hepatic proteome and augments dietary outcomes related to hepatic steatosis in mice [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2020,408:115250.
[13] Fenton S E, Ducatman A, Boobis A, et al. Per‐ and polyfluoroalkyl substance toxicity and human health review: Current state of knowledge and strategies for informing future research [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2021,40(3):606-630.
[14] Rericha Y, Simonich M T, Truong L, et al. Review of the zebrafish as a model to investigate per-and polyfluoroalkyl substance toxicity [J]. Toxicological Sciences, 2023,194(2):138-152.
[15] 李登昙,卢成波,王晓乐,等. PFOS 及其三种替代品对蚯蚓的毒性效应及比较 [J]. 中国环境科学, 2024,44(3):1630-1637.
Li D T, Lu C B, Wang X L, et al. Toxic effects and comparison of PFOS and its three alternatives on earthworms [J]. China Environmental Science, 2024,44(3):1630-1637.
[16] Li J, He J, Niu Z, et al. Legacy per-and polyfluoroalkyl substances (PFASs) and alternatives (short-chain analogues, F-53B, GenX and FC-98) in residential soils of China: Present implications of replacing legacy PFASs [J]. Environment International, 2020,135:105419.
[17] Fromme H, Wöckner M, Roscher E, et al. ADONA and perfluoroalkylated substances in plasma samples of German blood donors living in South Germany [J]. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2017,220(2):455-460.
[18] Dubey A, Ghosh N S, Singh R. Zebrafish as an emerging model: an important testing platform for biomedical science [J]. Journal of Pharmaceutical Negative Results| Volume, 2022,13(3):2.
[19] Williams T D, Mirbahai L, Chipman J K. The toxicological application of transcriptomics and epigenomics in zebrafish and other teleosts [J]. Briefings in Functional Genomics, 2014,13(2):157-171.
[20] Shankar P, Cavallin J, Ellman M, et al. Comparison of zebrafish toxicity between different developmental windows of exposure to three environmentally relevant PFAS compounds [Z]. The United States Environmental Protection Agency's Center for Computational Toxicology and Exposure. 2022.10.23645/epacomptox.21554892.v1.
[21] Auclert L Z, Chhanda M S, Derome N. Interwoven processes in fish development: microbial community succession and immune maturation [J]. PeerJ, 2024,12:e17051.
[22] Yan J, Fang L, Ni A, et al. Long-term neurotoxic effects and alzheimer's disease risk of early EHDPP exposure in Zebrafish: Insights from molecular mechanisms to adult pathology [J]. Environmental Science & Technology, 2024,58(43):19152-19164.
[23] J C, S T, Y G, et al. Toxicity effects of pesticides based on zebrafish (Danio rerio) models: Advances and perspectives [J]. Chemosphere, 2023,340:139825.
[24] Q S, H Y, Y C, et al. Developmental neurotoxicity of trichlorfon in Zebrafish Larvae [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023,24(13):11099.
[25] Latchney S E, Majewska A K. Persistent organic pollutants at the synapse: Shared phenotypes and converging mechanisms of developmental neurotoxicity [J]. Developmental Neurobiology, 2021, 81(5):623-652.
[26] Pozdnyakova N, Krisanova N, Pastukhov A, et al. Multipollutant reciprocal neurological hazard from smoke particulate matter and heavy metals cadmium and lead in brain nerve terminals [J]. Food and Chemical Toxicology, 2024,185:114449.
[27] Stacpoole P W, Martyniuk C J, James M O, et al. Dichloroacetate-induced peripheral neuropathy [J]. International Review of neurobiology, 2019,145:211-238.
[28] Bray S J, Bigas A. Modes of Notch signalling in development and disease [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2025;26(7):522-537.
[29] Zhang Q, Song Q, Yu R, et al. Nano-brake halts mitochondrial dysfunction cascade to alleviate neuropathology and rescue alzheimer's cognitive deficits [J]. Advanced science, 2023,10(7): e2204596.
[30] Nordengen K, Morland C. From synaptic physiology to synaptic pathology: the enigma of α-synuclein [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024,25(2):986.
[31] Stockwell I, Watson J F, Greger I H. Tuning synaptic strength by regulation of AMPA glutamate receptor localization [J]. Bioessays, 2024,46(7):2400006.
[32] Sarich S C, Sreevidya V S, Udvadia A J, et al. The transcription factor Jun is necessary for optic nerve regeneration in larval zebrafish [J]. PloS one, 2025,20(3):e0313534.
[33] Bradford Y M, Van Slyke C E, Ruzicka L, et al. Zebrafish information network, the knowledgebase for Danio rerio research [J]. Genetics, 2022,220(4):iyac016.
[34] Satbhai K M, Marques E S, Ranjan R, et al. Single-cell RNA sequencing reveals tissue-specific transcriptomic changes induced by perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) in larval zebrafish (Danio rerio) [J]. Journal of Hazardous Materials, 2025:137515.
[35] Zhang H, Wang H, Shen X, et al. The landscape of regulatory genes in brain-wide neuronal phenotypes of a vertebrate brain [J]. Elife, 2021,10:e68224.
[36] Umeda K, Shoji W. From neuron to behavior: Sensory-motor coordination of zebrafish turning behavior [J]. Development, Growth & Differentiation, 2017,59(3):107-114.
[37] Berntsen H F, Moldes-Anaya A, Bjørklund C G, et al. Perfluoroalkyl acids potentiate glutamate excitotoxicity in rat cerebellar granule neurons [J]. Toxicology, 2020,445:152610.
[38] Ma C S, Li D L, Wang F, et al. Neurotoxicity from long-term exposure to 6-PPDQ: Recent advances [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2024,282:116689.
[39] Zhao H, Xie J, Wu S, et al. Elevated parkinsonism pathological markers in dopaminergic neurons with developmental exposure to atrazine [J]. Science of the Total Environment, 2024,908:168307.

作者简介：王慧东(1999-),男,江西萍乡人,温州医科大学硕士研究生,主要从事生物学与环境毒理学方面的研究.发表论文 1 篇. 1453165207@qq.com.