张浩雷,宾雯锦,李晓婧,等.聚乳酸微塑料和三氯生复合暴露致斑马鱼发育和神经毒性 [J]. 中国环境科学, 2026,46(2):1028-1037.
Zhang H L, Bin W J, Li X J, et al. Developmental and neurotoxicity of zebrafish induced by combined exposure to polylactic acid microplastics and triclosan [J]. China Environmental Science, 2026,46(2):1028-1037.

聚乳酸微塑料和三氯生复合暴露致斑马鱼发育和神经毒性

张浩雷,宾雯锦,李晓婧,康歆妤,邓智慧,胡苏阳,王慧利,钱秋慧* (苏州科技大学环境科学与工程学院,江苏 苏州 215009)

摘要：以斑马鱼为模式生物,探究聚乳酸微塑料(PLA MPs)与典型内分泌干扰物三氯生(TCS)联合暴露对神经系统发育的毒性效应.结果表明,PLA MPs可作为 TCS 的有效载体,其吸附动力学符合准二级动力学模型.联合暴露显著诱导斑马鱼幼鱼出现脊椎弯曲、卵黄囊水肿、心率减缓及孵化率降低等畸形表型,且致畸效应较 TCS 单独暴露更为显著.此外,联合暴露引发机体氧化应激水平升高,自主运动活力下降 56.5%,光暗节律紊乱,并伴随神经元数量减少、血管发育异常,乙酰胆碱酯酶(AChE)活性显著降低 37.4%,多巴胺(DA)含量略有下降.RT-qPCR 分析进一步揭示,TCS 单独暴露能够抑制神经发育相关基因表达并干扰细胞凋亡通路,而联合暴露进一步加剧上述效应,导致更显著的神经毒性.上述发现为生物可降解微塑料与有机污染物的复合污染风险评估提供了早期预警依据.

关键词：聚乳酸微塑料；三氯生；复合暴露；斑马鱼；神经毒性
中图分类号：X503 **文献标识码**：A **文章编号**：1000-6923(2026)02-1028-10

Developmental and neurotoxicity of zebrafish induced by combined exposure to polylactic acid microplastics and triclosan.

ZHANG Hao-lei, BIN Wen-jin, LI Xiao-jing, KANG Xin-yu, DENG Zhi-hui, HU Su-yang, WANG Hui-li, QIAN Qiu-hui* (The School of Environmental Science and Engineering, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou 215009, China). *China Environmental Science*, 2026,46(2)：1028~1037

Abstract：This study employed zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism to investigate the neurodevelopmental toxicity induced by combined exposure to polylactic acid microplastics (PLA MPs) and triclosan (TCS), a representative endocrine-disrupting chemical. The results demonstrated that PLA MPs can serve as efficient carriers for TCS, with adsorption kinetics well described by a pseudo-second-order model. Co-exposure significantly induced developmental malformations in zebrafish larvae, including spinal curvature, yolk sac edema, reduced heart rate, and decreased hatching success, with markedly more severe teratogenic effects compared to TCS exposure alone. Furthermore, combined exposure substantially elevated oxidative stress levels, reduced spontaneous locomotor activity by 56.5%, and disrupted light-dark locomotor rhythms. These behavioral impairments were accompanied by decreased neuronal abundance, abnormal vascular development, a significant reduction in acetylcholinesterase (AChE) activity (37.4%), and a slight decrease in dopamine (DA) levels. RT-qPCR analysis further revealed that TCS alone suppressed the expression of genes associated with neurodevelopment and apoptosis regulation, whereas co-exposure with PLA MPs exacerbated these molecular disruptions, leading to more pronounced neurotoxicity. Collectively, these findings highlight the potential neurodevelopmental risks posed by the combined exposure to biodegradable MPs and organic endocrine disruptors, providing early warning evidence for ecological risk assessment of emerging composite pollutants in aquatic environments.

Key words：polylactic acid microplastics；triclosan；combined exposure；zebrafish；neurotoxicity

三氯生(TCS)是一种广谱抗菌的酚类化学物质,被广泛应用个人护理产品中[1-2].在地表水、沉积物及生物介质中频繁检出,浓度范围为 1.4~40000ng/L,被列为是地表水体的七大污染物之一[3].此外,南非北部污水处理厂进水中的 TCS 浓度为 78.4~127.7μg/L[4].TCS 通过皮肤粘膜渗透进入生物体内,可长期蓄积于脂肪组织[5-6].已在藻类、野生鱼类和甲壳虫等水生生物中被检出[3,7-8].尽管在人体组织蓄积数据尚不充分,但尿液、血清及血浆中 TCS 的检出率持续升高,提示其具有潜在的人体生物蓄积性[9].此外,TCS 极易直接暴露于胚胎发育阶段,在羊水(0~19.4μg/L)、脐带血(ND~127.6μg/L)、母乳(ND~2.1μg/L)等处均被检测到[10-12],这种发育期高暴露可能触发氧化应激、抗氧化酶系统紊乱、细胞凋亡及 DNA 损伤等分子毒性效应,并进一步导致生长抑

收稿日期：2025-07-06
基金项目：国家自然科学基金资助项目(22305167)
* 责任作者, 副教授, qhqian@usts.edu.cn

制、器官畸形、孵化率下降等表型异常,甚至引发寿命缩短与行为功能障碍[1].本团队前期研究证实,TCS 可通过结合 GPER 激活下游 PKC/MAPK 信号通路,进而抑制斑马鱼毛细胞发育并导致其运动行为异常[13].然而,TCS 与其他环境污染物复合暴露的毒性效应仍尚不清楚.

微塑料(MPs)为粒径介于 1~5μm 的塑料颗粒,已经成为一种新型污染物,在环境中广泛分布[14].MPs 环境渗透性强,在全球各类水体与沉积物中广泛存在,如中国珠江口(0.468g/L)、英国凯尔文河(0.26685g/L)及青藏高原偏远湖泊(0.5067g/L)[15];同时也可在生物体内检出,加纳海岸受污染鱼类体内含量达 8.35~20.95 个/g[16-17].相较于大尺寸塑料,MPs 对水生生物毒性更强,可导致细胞损伤、胚胎发育异常和神经系统损伤等问题[18-19].

为缓解传统塑料污染,可生物降解塑料聚乳酸(PLA)作为替代品被广泛应用.PLA 在自然环境中的降解周期较长(半衰期约 3~5 年)[20].在澳大利亚东南部,某一污水处理厂进水废水中的 PLA 浓度为 0.15mg/L[21].随着 PLA 使用量不断增加,未来环境中的 PLA MPs 浓度也可能持续升高.研究表明,肠道酶可催化 PLA MPs 分解释放低聚物纳米颗粒,诱发急性炎症反应[22].PLA MPs 对无脊椎动物、斑马鱼等低等生物具有毒性效应[23-24],亦可通过干扰肠-脑轴诱导斑马鱼神经行为异常及神经递质紊乱[25].

MPs 的疏水性和高比表面积使其极易吸附 TCS 等污染物[14,26-27].例如,地中海沿岸泻湖区域的研究表明,TCS 可显著富集于 MPs 表面.当 MPs 与 TCS 共存时,二者对水生生物表现出协同毒性效应,研究发现 MPs 可显著增强 TCS 对海洋桡足类动物的毒性[28],推测其与 MPs 促进 TCS 生物蓄积并加剧氧化应激有关[1].本团队也发现 MPs 会加剧 TCS 诱导的脂质代谢紊乱[29].然而,目前关于 TCS 与 MPs 联合神经毒性的研究仍较有限,其毒理学效应及作用机制尚不明确,亟需开展针对性研究以阐明其潜在健康风险.

斑马鱼因体外发育周期短、产卵量大、胚胎透明且行为学特征(如捕食、攻击、焦虑等)易于观测,成为研究神经毒性的理想模式生物[30].其基因组与人类高度同源,且具备易饲养、便于观察以及实验可控性强的特点,被广泛应用于脊椎动物毒理学研究[31].本研究以斑马鱼为模型,评估 PLA MPs 与 TCS 联合暴露对神经系统的毒性效应,旨在为 MPs 与持久性有机污染物复合暴露的环境风险提供早期预警依据.

1　材料与方法

1.1　实验试剂

PLA MPs(粒径 1~20μm)购自广东科信达高分子材料公司.丙酮购自国药化学试剂有限公司.TCS 购于浙江中星化工试剂有限公司.活性氧(ROS)染色试剂盒、AO 染色液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、乙酰胆碱酯酶(AChE)试剂盒和多巴胺(DA)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所.

1.2　动物实验

野生型斑马鱼均由斑马鱼资源中心提供,饲养方式按照先前研究所述[32].具体而言,选取 3 月龄成年斑马鱼 4~6 对,于实验前夜按雌雄 1:1 比例置于产卵器内过夜.次日晨开启光照后移除隔板诱导产卵,收集胚胎并筛选优质受精卵用于后续实验.

1.3　实验方法

1.3.1　PLA MPs 对 TCS 的吸附行为　称取 10mg PLA MPs 加入 100mL 棕色玻璃瓶中,并加入 50mL 超纯水,混合均匀后加入 1mLTCS 母液,吸附体系中 MPs 和 TCS 的终浓度分别为 200mg/L 和 200μg/L.将棕色玻璃瓶放置于恒温振荡器中,在 25℃、180r/min 的条件下振荡.分别在 1/3,1,2,4,6,8,10,12,24,48,72,96,120,144,168h 共 15 个时间点取 2mL 水样,使用 0.22μm 滤膜过滤后收集于玻璃瓶中,置于 4℃冰箱保存.吸附动力学实验中,TCS 浓度分别设置为 50,100,150,200,250,300,350,400,450,500μg/L,吸附 168h 后取样用 0.22μm 滤膜过滤后收集,用高效液相色谱仪测定 TCS 浓度.

1.3.2　扫描电子显微镜(SEM)观察　为探究吸附 TCS 前后 PLA MPs 的表面形态差异,将其样品粉末置于样品台,将待检测的 PLA MPs 样品粉末置于样品台上,使用导电胶带固定后进行喷金处理.在检测时,将检测器与样品保持 2mm 的工作距离,并以 2.0kV 的加速电压进行扫描分析.

1.3.3　急性暴露下斑马鱼幼鱼发育形态观察　根据 TCS 的环境浓度[33]和 LC_{50} 值(420μg/L)[34]以及 PLA MPs 的环境浓度[21]和相关毒理学研究[25],设置

两者的浓度均为 200μg/L,具体实验分组如下:对照组、TCS 组(200μg/L)、PLA 组(200μg/L)和 TCS (200μg/L)+PLA(200μg/L).暴露后,对胚胎和幼鱼(每组 30 条)进行拍照观察,每 24h 记录胚胎孵化情况,同时对幼鱼表型发育情况进行评估.每 24h 更换一次暴毒液,持续至实验结束.

1.3.4 转基因斑马鱼观察 使用转基因品系斑马鱼 Tg(*flk1*:mCherry)和 Tg(*elavl3*:EGFP),每组 30 条,分别观察各暴露组斑马鱼的血管和神经元的发育情况,使用 Image J 对 96h 的斑马鱼进行量化.

1.3.5 ROS 染色实验 将收集好的斑马鱼胚胎随机分配至六孔板,每 24h 更换一次暴露液,暴露至第 3d.加入 DCFH-DA 染色液,避光染色 15min 后,用 PBS 清洗 3 次,置于显微镜下拍摄,每组拍 10 尾.

1.3.6 吖啶橙(AO)染色 经暴露至 96hpf,将收集好的胚胎(每组 30 个),用吖啶橙(5mg/mL)染色 10min.在 PBS 中再次洗涤后,在倒置荧光显微镜下观察幼鱼细胞凋亡情况.

1.3.7 神经递质的测定 根据 BCA 蛋白试剂盒测定蛋白浓度,紧接着根据相应试剂盒说明书测定各组 AChE 活性和 DA 水平(每组 50 条).

1.3.8 行为学测试 在 5dpf 时,将幼鱼(每组 30 条)放入 96 孔板中进行幼鱼自主运动测试.记录 15min 内每条幼鱼尾部交替摆动频率.明暗交替运动测试中,幼鱼经 5min 暗适应后,通过两次重复的明暗循环(10min 光照/10min 黑暗)预处理后,使用 EthoVision XT 软件(Noldus IT)分析明暗周期内的运动行为.

1.3.9 RT-qPCR 分析 按照总 RNA 提取试剂盒的标准方法提取各组斑马鱼幼鱼(120hpf,每组 60 条)的总 RNA.随后,通过 Takara 逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA 稀释 5 倍作为模板.配置体系加入八连管,按以下程序检测:94℃预变性 30s,使模板 DNA 完全变性;94℃变性 5s,56℃退火 15s,引物与模板 DNA 互补配对结合;72℃延伸 10s,DNA 聚合酶合成新链,循环 35~40 次.

1.4 分析方法

1.4.1 斑马鱼体内 TCS 的测定 斑马鱼胚胎(6~120hpf,每组 60 个)经暴露后,于 7:3 乙酸乙酯/三氯甲烷混合液中匀浆,10000r/min 离心 5min,上清液经氮吹后用甲醇复溶,过滤后通过液相色谱-质谱联用仪(LC-MS)测定 TCS 含量.

1.4.2 统计分析 实验结果采用单因素方差分析(ANOVA)进行统计,以平均值(Mean)±标准差(SD)表示.对照组与各暴露组的比较表示为 *P<0.05, **P<0.01,***P<0.001,暴露组间的比较表示为 #P<0.05,##P<0.01,###P<0.001.各实验设 3 个生物学重复,每个生物学重复含 3 个技术重复.所有数据分析及图形绘制均采用 GraphPadPrism 9.5.0 和 Origin2024 软件.

1.4.3 联合效应评估 为评估 TCS 和 PLA MPs 的联合效应,采用公式 1 分析二者相互作用[35].

$$比率=\frac{效应(TCS+PLAMPs)}{效应(TCS)+效应(PLAMPs)-效应(Control)} \quad (1)$$

通过 Mann-Whitney 检验比较联合暴露组实测生物标志物水平与 TCS、PLA 单独暴露效应总和的差异,据此将二者相互作用分为 3 类:(1)抑制效应:P<0.05,比值<1;(2)加和效应:P >0.05;(3)协同效应:P<0.05,比值>1.

2 结果与讨论

2.1 PLA MPs 通过吸附 TCS 增加其在斑马鱼体内的蓄积

使用 SEM 观察了 PLA 吸附 TCS 前后表面形貌变化(图 1),PLA 表面光滑且呈现层状结构,而吸附后的 PLA 呈团状,同时观察到表面粗糙伴有碎片生成.

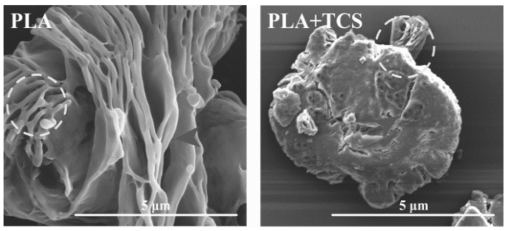


图 1 PLA 及 PLA+TCS 复合物的表面形貌

Fig.1 The surface morphologies of PLA and PLA+TCS composites

为表征 PLA 对 TCS 的吸附能力,采用 HPLC 测定溶液中 TCS 残留浓度并计算去除率(图 2(a)).吸附于 48h 时接近平衡(去除率 85.23%),168h 时达到最大吸附量(去除率 87.64%).图 2(b)和图 2(c)显示,准一阶模型相关系数(R^2=0.8636)显著低于准二阶模型(R^2=0.9119),表明准二阶模型更精准地描述 PLA 对 TCS 的吸附过程,揭示该吸附以化学吸附为主导机制.

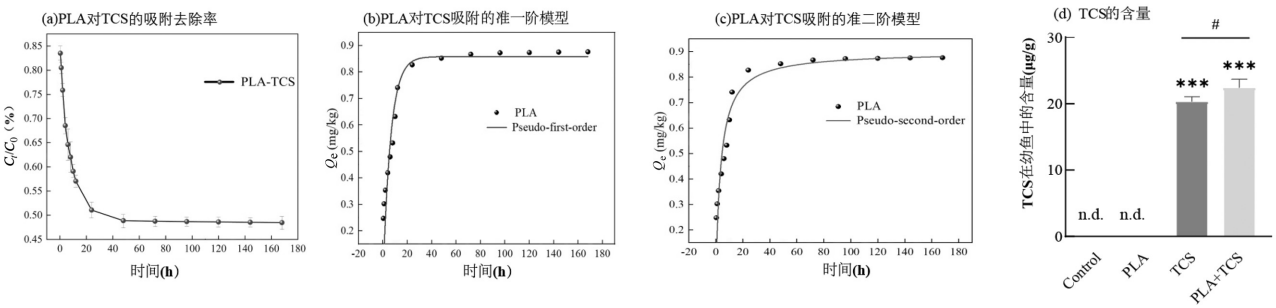


图 2　PLA 对 TCS 的吸附和幼鱼体内的蓄积

Fig.2　Adsorption of TCS by PLA and its accumulation in larval zebrafish

n.d.表示未检出

如图 2(d)所示,联合暴露组中的 TCS 浓度显著高于 TCS 单独暴露组(P<0.05),约增加 1.10 倍.表明联合暴露显著增加了 TCS 在斑马鱼中的蓄积,而这种蓄积量的增加可能会进一步改变 TCS 在生物体内的代谢动力学,进而对其毒性效应的强度与作用机制产生潜在影响.

2.2　PLA MPs 和 TCS 的复合暴露诱导斑马鱼发育毒性

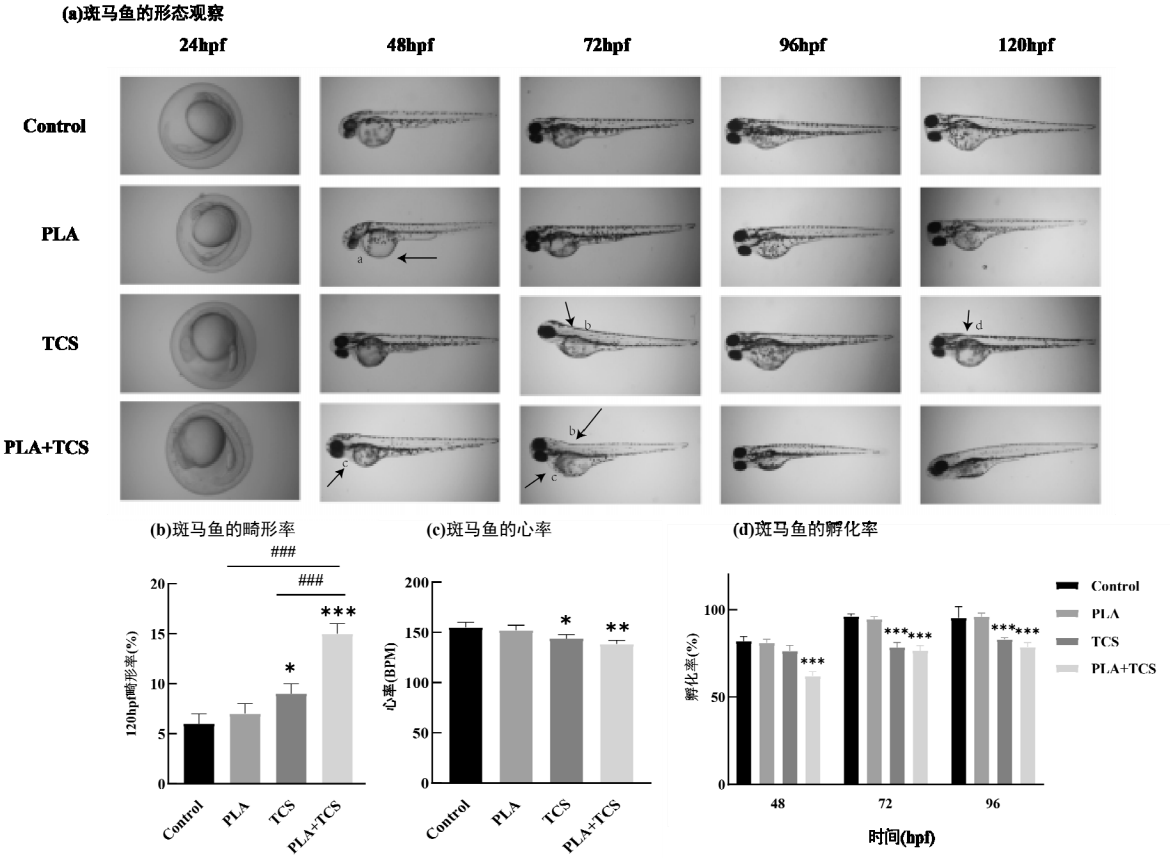


图 3　斑马鱼在不同暴露条件下的发育毒性

Fig.3　Developmental toxicity of zebrafish under different exposure conditions

发育畸形包括 a 卵黄囊肿;b 脊柱弯曲 c 心包水肿;d 游囊发育迟缓

经 6~120hpf 暴露后,图 3(a)显示,PLA 与 TCS 联合暴露导致幼鱼出现脊椎弯曲、卵黄囊水肿等畸形表型.定量分析斑马鱼 120hpf 畸形率(图 3(b))显示,相较于对照组,PLA 单一暴露致畸效应不显著,而 TCS 组畸形率显著升高(P<0.05),且 PLA 作为载体时 TCS 的致畸效应进一步加剧(P<0.001).心率检测结果(图 3(c))显示,PLA 组心率降幅较小,TCS 组心率显著下降(P<0.05),而复合暴露组降幅最为明显(P<0.01),表明 TCS 对心率具有抑制作用且联合暴露增强该效应.孵化率分析(图 3(d))显示,复合暴露组

孵化率较单一暴露组显著降低,提示 TCS 与 PLA 联合暴露增强胚胎发育毒性.

2.3 PLA MPs 和 TCS 的复合暴露诱导斑马鱼氧化应激

如图 4 所示,对照组的绿色荧光强度较弱,而 PLA 与 TCS 单独暴露组的荧光强度均显著增强(P<0.01,P<0.001).与 TCS 组相比,PLA+TCS 联合暴露组的荧光强度显著升高(P<0.001),这表明单独暴露或联合暴露均能诱导斑马鱼体内 ROS 积累并加剧氧化应激.其中,联合暴露引发的氧化应激效应最为显著,提示 PLA 可显著增强 TCS 诱导的氧化应激反应,进一步说明二者联合暴露对氧化应激的影响存在协同作用.

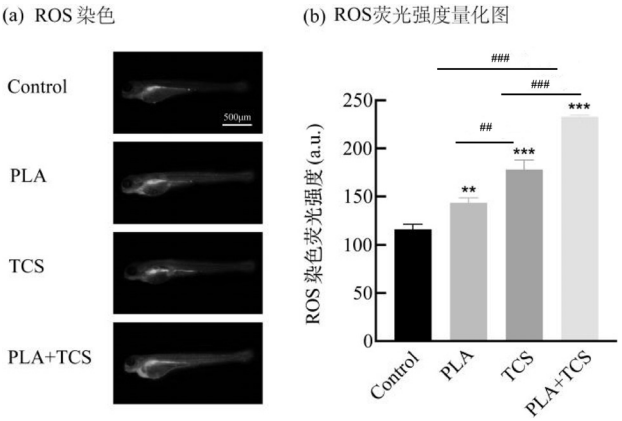


图 4 斑马鱼 ROS 染色荧光强度

Fig.4 Fluorescence intensity of ROS staining in zebrafish

2.4 PLA MPs 和 TCS 复合暴露诱导斑马鱼行为异常

行为是神经系统功能的综合体现,是毒性效应最易观察的宏观表型[36].为探究 TCS 与 PLA 复合暴露对斑马鱼幼鱼行为的影响,本研究开展自主运动测试(图 5(a)).结果显示,PLA 组和 TCS 组幼鱼自主运动能力分别较对照组下降 25.2%和 52.2%(P<0.05,P<0.01),而 PLA+TCS 复合暴露组运动活力降至最低,是对照组的 56.5%(P<0.01).移动速度分析(图 5(b))呈现相同趋势,表明复合暴露加剧 TCS 对自主运动的抑制效应.

光暗交替测试中(图 6),对照组幼鱼表现出正常的光暗节律(光照期运动减少,黑暗期活动增强),而 TCS 组黑暗期运动距离显著缩短,复合暴露组降幅最为明显.这表明 TCS 暴露可降低幼鱼光暗刺激的敏感性,复合暴露则进一步加剧该效应.由于光暗节律由视网膜神经回路调控,上述结果提示 PLA 与 TCS 复合暴露可能加重视网膜神经细胞的功能损伤.

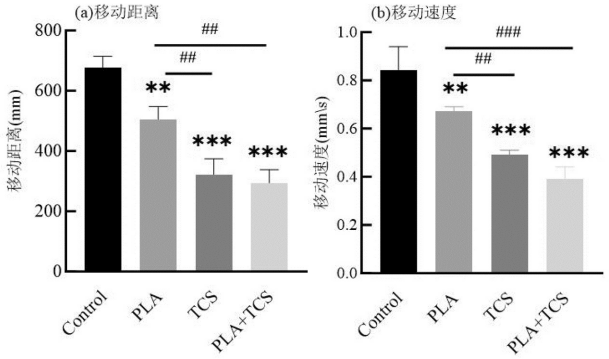


图 5 不同暴露下斑马鱼自主运动的移动距离及速度变化

Fig.5 Effects of different exposures on movement distance and speed in the zebrafish spontaneous locomotion test

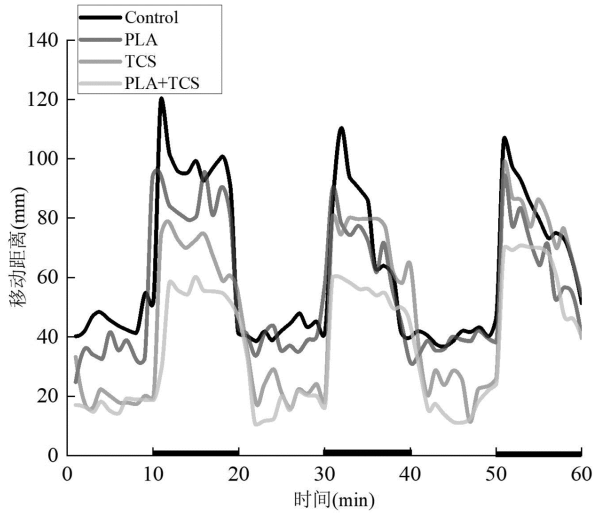


图 6 不同暴露下斑马鱼光暗交替测试的移动距离变化

Fig.6 Effects of different exposures on movement distance of zebrafish in the light-dark alternation test

2.5 PLA MPs 和 TCS 复合暴露诱导斑马鱼神经相关指标异常

行为表型异常源于神经递质调控失衡,是功能层面的核心中间环节[37].胆碱能系统由乙酰胆碱(ACh)及其水解酶(AChE)调控,是神经发育的关键通路[38].污染物抑制 AChE 活性可导致 ACh 积累,进而引发运动行为异常[39].如图 7(a)所示,PLA 单独暴露未显著影响 AChE 活性,而 TCS 暴露显著抑制 AChE 活性(较对照组降低 23.6%,P<0.01),且 PLA+TCS 联合暴露组的 AChE 活性较 TCS 组进一步降低(对照组的 37.4%,P<0.001),表明 PLA 加剧了 TCS 对 AChE 的抑制作用,提示乙酰胆碱蓄积可能是运动抑

制的直接原因.DA 作为关键神经递质调控运动、认知及奖赏等生理功能,其代谢异常与精神分裂症、注意缺陷多动障碍等神经精神疾病密切相关[40].如图 7(b)所示,与对照组相比,PLA 组 DA 水平显著升高(P<0.01),提示 PLA 可能诱导神经递质调控失衡.TCS 组和联合暴露组的 DA 含量略有下降,与自主运动活力降低趋势一致,表明 DA 代谢紊乱参与运动功能调控.

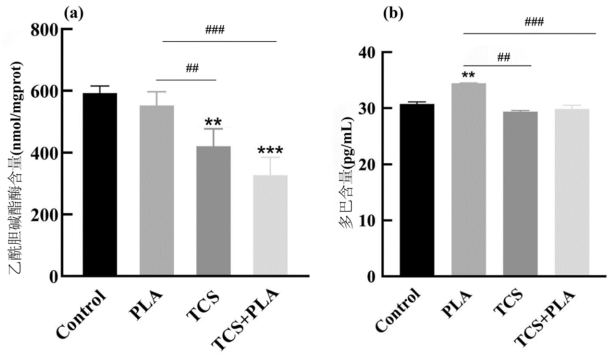


图 7　斑马鱼在不同暴露条件下神经递质变化

Fig.7　Changes in neurotransmitters of zebrafish under different exposure conditions

2.6　转基因斑马鱼观察

神经递质紊乱的本质是神经组织结构损伤,而血管异常会通过微环境破坏加重神经损伤[41].本文进一步通过转基因斑马鱼模型验证上述现象.

在 Tg(*elavl3*:EGFP)转基因斑马鱼中,*elavl3* 启动子驱动 EGFP 特异性标记神经系统发育.如图 8 所示,TCS 暴露组幼鱼脑部荧光强度较对照组降低 35.9%(P<0.001),神经元数量减少,间脑与后脑分界模糊.PLA 暴露组呈现小脑发育不全及边界模糊,而 TCS 与 PLA 联合暴露组荧光强度进一步下降,较 TCS 单独暴露组降低 16%(P<0.001),表明 PLA 可协同增强 TCS 对斑马鱼幼鱼神经系统的毒性损伤.

在 Tg(*flk*1:mCherry)血管转基因斑马鱼中,*flk1* 启动子特异性驱动 mCherry 表达于血管系统.图 9(a)显示,PLA 单独暴露导致局部血管发育不良.TCS 暴露引起眼部血管分支异常增多、径变细且分布紊乱.联合暴露组则出现明显的颅内血管结构破坏、血管网络排列紊乱及融合现象.荧光强度定量分析图 9(b)证实,PLA+TCS 组血管荧光信号显著弱于 TCS 组,提示 PLA 可加剧 TCS 对斑马鱼血管发育的毒性效应,而血管异常可通过减少营养供应进一步加重神经损伤.

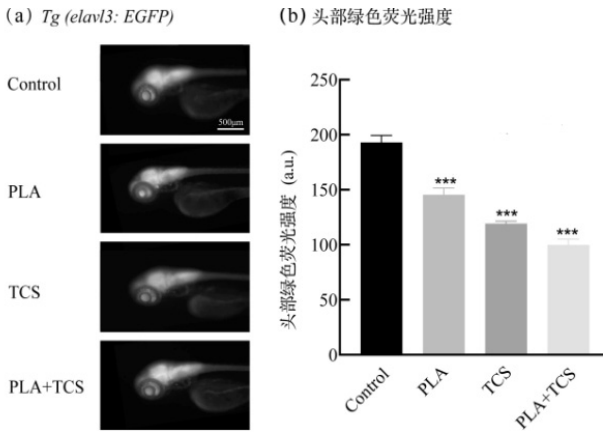


图 8　Tg(*elval3*:EGFP)转基因斑马鱼头部荧光强度变化

Fig.8　Changes in fluorescence intensity in the head region of Tg(*elval3*:EGFP) transgenic zebrafish

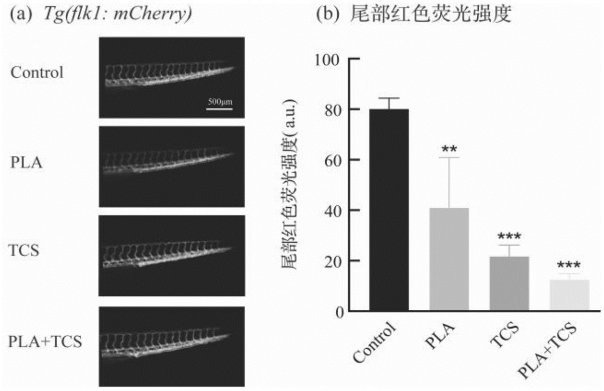


图 9　Tg(*flkl*:mCherry)转基因斑马鱼尾部荧光强度变化

Fig.9　Changes in the fluorescence intensity of the tail of Tg(*flkl*:mCherry) transgenic zebrafish

2.7　PLA MPs 和 TCS 复合暴露诱导斑马鱼神经元细胞凋亡

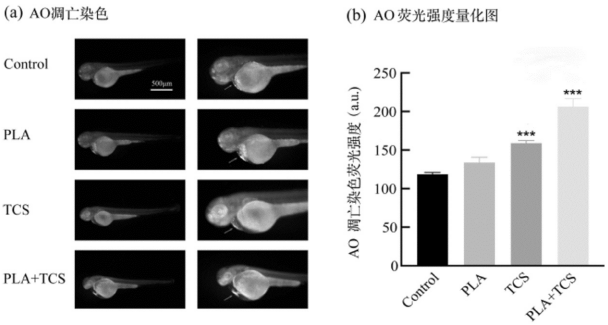


图 10　不同暴露条件下斑马鱼幼鱼的凋亡情况

Fig.10　The apoptosis of zebrafish larvae under different exposure conditions

细胞凋亡失衡是神经结构损伤的核心,也是连

接结构与分子机制的关键细胞事件.作为中枢神经系统发育及稳态维持的核心调控机制,细胞凋亡异常可直接导致神经元减少、突触紊乱,进而引发神经功能障碍[42].如图 10 所示,对照组呈现微弱荧光信号.与对照组相比,TCS 组和联合暴露组凋亡荧光强度均显著增强(分别是对照组的 27.2%和 66.2%,P<0.001),主要集中于脑部并呈现明显凋亡小体.进一步定量分析显示,PLA 显著增加 TCS 诱导的脑部凋亡细胞数量.上述结果表明,PLA 通过协同增强 TCS 诱导的神经元凋亡加剧中枢神经系统损伤.

2.8 PLA MPs 和 TCS 复合暴露诱导斑马鱼神经毒性机制

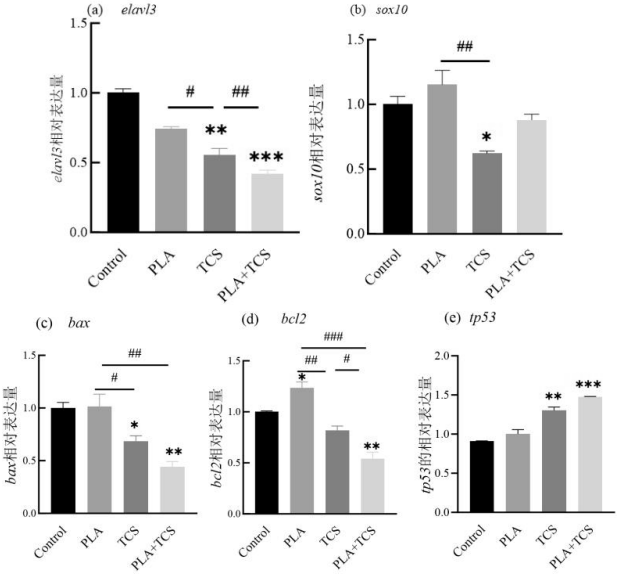


图 11 不同暴露下斑马鱼神经发育和凋亡基因表达变化

Fig.11 Differential expression of neurodevelopment- and apoptosis-related genes in zebrafish under different exposure conditions

细胞凋亡及神经发育异常的本质是基因表达紊乱,是毒性效应的最上游机制[43-44].利用 RT-qPCR 测定了斑马鱼幼鱼中神经元标记基因 *elavl3*、神经嵴发育基因 *sox10*,以及凋亡调控基因 *bcl-2*、*bax* 和 *tp53* 的表达水平.如图 11 所示,在 TCS 暴露下,*elavl3* 表达较对照组下调 44.6%(P<0.01),而联合暴露下调更为显著,为对照组的 58.3%(P<0.001),提示联合暴露诱导斑马鱼神经元数量减少或功能受损.相较于对照组,TCS 暴露组的 *sox10* 表达水平下调 37.9%(P<0.05),而其他组变化不明显,表明 TCS 暴露下神经嵴发育过程可能受到干扰.对于凋亡基因而言,相较于对照组,PLA 和 TCS 联合暴露组的 *bcl-2* 和 *bax* 的表达水平分别下调 45.8%和 55.8%(P<0.01, P<0.05), *tp53* 上调 62%(P<0.001),均较 TCS 单独暴露组变化明显.以上结果显示联合暴露以一种不依赖于半胱天冬酶的方式激活 *tp53* 诱导凋亡从而抑制神经发育,最终引发神经毒性.

2.9 联合效应评估

由表 1 可知,所有指标的联合效应比值均大于 1.其中,除了畸形率、ROS 染色、神经元发育和 *elavl3* 4 项指标呈加和效应,其余指标均表现为协同效应.上述结果表明,TCS 与 PLA MPs 联合暴露可产生显著协同效应,提示二者存在非线性累积相互作用,这凸显了在实际环境条件下评估 MPs 与污染物联合效应的重要性.

表 1 TCS 与 PLA MPs 联合效应类型的评估

Table 1 Evaluation of the combined effect types of TCS and PLA MPs

测试项目	比值	P	效应
畸形率	1.50±0.06	>0.05	加和
心率	1.00±0.05	<0.05	协同
ROS 染色	1.40±0.07	>0.05	加和
移动速度	1.42±0.10	<0.05	协同
移动距离	2.02±0.39	<0.05	协同
AChE	1.03±0.12	<0.05	协同
DA	1.02±0.02	<0.05	协同
Tg(*elavl3*:EGFP)	1.40±0.03	>0.05	加和
elavl3	1.38±0.11	>0.05	加和
sox10	1.10±0.04	<0.05	协同

3 讨论

本研究表明,MPs 与 TCS 的联合暴露显著加剧了 TCS 单独暴露诱导的神经毒性.本研究通过吸附动力学实验发现,MPs 在 24h 内对 TCS 的吸附接近饱和,且吸附过程符合准二级动力学模型,与盛诚等[45]报道的吸附机制一致.发育表型观察实验表明,MPs 与 TCS 协同作用显著加剧斑马鱼幼鱼畸形(卵黄囊肿、脊柱弯曲等),其发育毒性效应强于 TCS 单独暴露与成冠辰等[46]研究基本一致.行为学分析进一步揭示,PLA 与 TCS 复合暴露导致幼鱼运动活力显著下降,并削弱其对光暗刺激的感知能力.这些行为异常与 Ling 等[47]报道的 TCS 干扰昼夜节律及 Wang 等[48]发现的感光敏感性损伤相吻合,表明复合

暴露可能通过影响幼鱼神经发育诱导斑马鱼运动行为异常.

研究发现,TCS 和 PLA 单一暴露均对斑马鱼神经元发育产生负面影响,通过转基因 Tg(*elval3*:EGFP)斑马鱼观察到神经元数量显著减少、间脑与后脑间隙模糊的现象.而 PLA 与 TCS 复合暴露对斑马鱼神经系统发育的影响更为显著,揭示了复合暴露可能引发的复杂且严重的联合毒性作用.神经系统在生物体感知外界环境、调控行为反应中起着核心作用[49].因此联合暴露诱导的神经发育异常可能进一步影响斑马鱼的行为模式,与行为学实验的结果相一致.神经与血管作为生物体内紧密关联的系统,血管发育异常可通过影响脑部氧气及营养供应进而抑制神经发育[50].血管表型分析显示,联合暴露诱导颅内血管消融、排列紊乱及异常融合,与 Diao 等[51]报道的 TCS 诱导血管退化结果一致,提示复合污染可能通过干扰血管生成稳态加剧神经毒性.为进一步探究 PLA 和 TCS 暴露对神经递质系统的影响,本研究检测了 AChE 活性和 DA 含量.AChE 作为分解 ACh 的关键酶,其活性降低会导致 ACh 在突触间隙积聚,进而引发一系列神经毒性反应[52].DA 作为重要神经递质,参与运动控制、奖赏机制等多种重要生理功能[40].TCS 暴露导致 AChE 活性降低和 DA 含量减少,可能抑制神经递质传递,进而影响斑马鱼的行为和情绪状态.

研究发现复合暴露促使斑马鱼体内 ROS 水平大幅升高,过量 ROS 攻击细胞内生物大分子,打破细胞内氧化还原稳态,进而干扰神经发育相关基因 *elavl3* 和 *sox10* 的正常表达[53-54],这些基因在神经细胞的增殖、分化和迁移过程中起着关键作用,其表达受抑制直接阻碍神经细胞的正常发育进程,导致神经发育异常.细胞凋亡是中枢神经系统发育的核心调控机制,本文通过 AO 染色证实联合暴露显著增加神经细胞凋亡.进一步探究凋亡机制发现,复合暴露组中抗凋亡基因 *bcl-2* 与促凋亡基因 *bax* 表达均显著下调,且伴随 *tp53* 下调.该趋势与 Wang 等[55]研究一致,证实联合暴露通过不依赖半胱天冬酶的方式激活 *tp5*3,诱导神经元凋亡,引发神经毒性.

LC-MS 分析证实 MPs 对 TCS 的高效吸附可显著促进其在斑马鱼体内的蓄积,这是联合毒性协同增强的关键机制.这种蓄积增加提高了 TCS 的生物可利用性,为其干扰神经发育、扰乱神经递质系统等效应提供了物质基础,进而放大了对神经系统的损伤效应.本研究中 PLA MPs 与 TCS 的暴露浓度均为 200μg/L,略高于部分污水处理厂的检出水平.尽管实验浓度稍高于多数环境实测值,但作为潜在高暴露情景,仍具机制探索价值.然而,本研究的局限性在于尚未结合环境实测浓度开展低剂量、长期暴露研究,未来需补充此类实验以提升结果的环境适用性及生态风险评估意义.

4　结论

4.1　TCS 对斑马鱼具有显著的致畸效应,心率和孵化率均显著降低,且当与 PLA 联合暴露时,其发育毒性进一步加剧.

4.2　TCS 与 PLA 联合暴露加剧斑马鱼氧化应激,使其运动活力显著下降 56.5%,光暗节律发生紊乱,且上述毒性效应显著强于 TCS 单独暴露组.

4.3　TCS 和 PLA 联合暴露下,斑马鱼幼鱼 AChE 活性显著降低 37.4%,DA 水平呈轻微下降趋势;同时,联合暴露可诱导斑马鱼神经元数量减少 51.9%,并造成血管发育损伤.

4.4　TCS 与 PLA 复合暴露可显著下调斑马鱼神经发育相关基因 *elavl3* 的表达水平,同时使凋亡基因 *tp53* 的表达量上调 62%.AO 染色结果进一步证实,联合暴露可加剧细胞凋亡进程,提示二者可能通过激活 *tp53* 通路诱导细胞凋亡,进而引发神经毒性.

参考文献:

[1] Lee J S, Lee J S, Kim H S. Toxic effects of triclosan in aquatic organisms: A review focusing on single and combined exposure of environmental conditions and pollutants [J]. Science of The Total Environment, 2024,920:170902.

[2] Chen X, Mou L, Qu J, et al. Adverse effects of triclosan exposure on health and potential molecular mechanisms [J]. Science of The Total Environment, 2023,879:163068.

[3] Montaseri H, Forbes P B C. A review of monitoring methods for triclosan and its occurrence in aquatic environments [J]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2016,85:221-231.

[4] Amdany R, Chimuka L, Cukrowska E. Determination of naproxen, ibuprofen and triclosan in wastewater using the polar organic chemical integrative sampler (POCIS): A laboratory calibration and field application [J]. Water sa, 2014,40(3):407-414.

[5] Weatherly L M, Gosse J A. Triclosan exposure, transformation, and human health effects [J]. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, 2017,20(8):447-469.

[6] García-Espiñeira M C, Tejeda-Benítez L P, Olivero-Verbel J. Toxic effects of bisphenol A, propyl paraben, and triclosan on Caenorhabditis elegans [J]. International journal of environmental research and public health, 2018,15(4):684.

[7] Rüdel H, Böhmer W, Müller M, et al. Retrospective study of triclosan and methyl-triclosan residues in fish and suspended particulate matter: results from the German Environmental Specimen Bank [J]. Chemosphere, 2013,91(11):1517-1524.

[8] Nassef M, Kim S G, Seki M, et al. In ovo nanoinjection of triclosan, diclofenac and carbamazepine affects embryonic development of medaka fish (Oryzias latipes) [J]. Chemosphere, 2010,79(9):966-973.

[9] Olaniyan L W B, Mkwetshana N, Okoh A I. Triclosan in water, implications for human and environmental health [J]. Springerplus, 2016,5(1):1639.

[10] Wei L, Qiao P, Shi Y, et al. Triclosan/triclocarban levels in maternal and umbilical blood samples and their association with fetal malformation [J]. Clinica Chimica Acta, 2017,466:133-137.

[11] Azzouz A, Rascón A J, Ballesteros E. Simultaneous determination of parabens, alkylphenols, phenylphenols, bisphenol A and triclosan in human urine, blood and breast milk by continuous solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry [J]. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2016,119:16-26.

[12] Trivedi A, Maske P, Mote C, et al. Gestational and lactational exposure to triclosan causes impaired fertility of F1male offspring and developmental defects in F2generation [J]. Environmental Pollution, 2020,257:113617.

[13] Diao W, Qian Q, Sheng G, et al. Triclosan targets miR-144abnormal expression to induce neurodevelopmental toxicity mediated by activating PKC/MAPK signaling pathway [J]. Journal of hazardous materials, 2022,431:128560.

[14] Padervand M, Lichtfouse E, Robert D, et al. Removal of microplastics from the environment. A review [J]. Environmental Chemistry Letters, 2020,18(3):807-828.

[15] Li C, Busquets R, Campos L C. Assessment of microplastics in freshwater systems: A review [J]. Science of the Total Environment, 2020,707:135578.

[16] Ding J, Li J, Sun C, et al. Detection of microplastics in local marine organisms using a multi-technology system [J]. Analytical Methods, 2019,11(1):78-87.

[17] Nuamah F, Tulashie S K, Debrah J S, et al. Microplastics in the gulf of guinea: an analysis of concentrations and distribution in sediments, gills, and guts of fish collected off the coast of Ghana [J]. Environmental Research, 2023,234:116567.

[18] Kögel T, Bjorøy Ø, Toto B, et al. Micro-and nanoplastic toxicity on aquatic life: Determining factors [J]. Science of the Total Environment, 2020,709:136050.

[19] Li R, Nie J, Qiu D, et al. Toxic effect of chronic exposure to polyethylene nano/microplastics on oxidative stress, neurotoxicity and gut microbiota of adult zebrafish (Danio rerio) [J]. Chemosphere, 2023, 339:139774.

[20] Zhao Q, Fang Z, Wang P, et al. Polylactic acid micro/nanoplastic exposure induces male reproductive toxicity by disrupting spermatogenesis and mitochondrial dysfunction in mice [J]. ACS nano, 2025,19(5):5589-5603.

[21] Okoffo E D, Chan C M, Rauert C, et al. Identification and quantification of micro-bioplastics in environmental samples by pyrolysis–gas chromatography–mass spectrometry [J]. Environmental Science & Technology, 2022,56(19):13774-13785.

[22] Wang M, Li Q, Shi C, et al. Oligomer nanoparticle release from polylactic acid plastics catalysed by gut enzymes triggers acute inflammation [J]. Nature nanotechnology, 2023,18(4):403-411.

[23] Zhang L, Luo Y, Zhang Z, et al. Enhanced reproductive toxicity of photodegraded polylactic acid microplastics in zebrafish [J]. Science of The Total Environment, 2024,912:168742.

[24] Shao Y, Hua X, Li Y, et al. Comparison of reproductive toxicity between pristine and aged polylactic acid microplastics in Caenorhabditis elegans [J]. Journal of Hazardous Materials, 2024,466: 133545.

[25] Qian Q, Pu Q, Li L, et al. Polylactic acid microplastics before and after aging induced neurotoxicity in zebrafish by disrupting the microbiota-gut-brain axis [J]. Journal of Hazardous Materials, 2025,488:137306.

[26] 周 鑫,万可维,倪安煜,等.聚丙烯纳米塑料(PP-NPs)联合暴露促进有机磷阻燃剂 EHDPP 对斑马鱼幼鱼的发育和神经毒性 [J]. 中国环境科学, 2024,44(11):6484-6494.
Zhou X, Wan K W, Ni A Y, et al. Combined exposure to polypropylene nanoplastics (PP-NPs) enhances the developmental and neurotoxicity of organophosphorus flame retardant EHDPP in zebrafish larvae [J]. China Environmental Science, 2024,44(11):6484-6494.

[27] León V M, García I, González E, et al. Potential transfer of organic pollutants from littoral plastics debris to the marine environment [J]. Environmental Pollution, 2018,236:442-453.

[28] Syberg K, Nielsen A, Khan F R, et al. Microplastic potentiates triclosan toxicity to the marine copepod Acartia tonsa (Dana) [J]. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 2017,80 (23/24):1369-1371.

[29] Liu X, Pu Q, Cheng Y, et al. Comparative impact of pristine and aged microplastics with triclosan on lipid metabolism in larval zebrafish: Unveiling the regulatory role of miR-217 [J]. Science of The Total Environment, 2024,929:172580.

[30] 王明亮,丁永芳,印 鑫,等.斑马鱼在毒理学中的应用研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2020,28(3):390-396.
Wang M L, Ding Y F, Yin X, et al. Research progress regarding the application of zebrafish in toxicology [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020,28(3):390-396.

[31] Horzmann K A, Freeman J L. Zebrafish get connected: investigating neurotransmission targets and alterations in chemical toxicity [J]. Toxics, 2016,4(3):19.

[32] 蒲 倩,张尚祎,陈 晨,等.阿奇霉素急性暴露对斑马鱼幼鱼的毒性效应 [J]. 中国环境科学, 2024,44(3):1671-1678.
Pu Q, Zhang S Y, Chen C, et al. Toxic effects of acute exposure to azithromycin in zebrafish larvae [J]. China Environmental Science, 2024,44(3):1671-1678.

[33] Jagini S, Konda S, Bhagawan D, et al. Emerging contaminant (triclosan) identification and its treatment: a review [J]. SN Applied Sciences, 2019,1:1-15.

[34] Yueh M F, Tukey R H. Triclosan: A widespread environmental

toxicant with many biological effects [J]. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2016,56(1):251−272.

[35] Qiao R, Lu K, Deng Y, et al. Combined effects of polystyrene microplastics and natural organic matter on the accumulation and toxicity of copper in zebrafish [J]. Science of the Total Environment, 2019,682:128−137.

[36] Yu F, Hou Z S, Luo H R, et al. Zinc alters behavioral phenotypes, neurotransmitter signatures, and immune homeostasis in male zebrafish (Danio rerio) [J]. Science of The Total Environment, 2022, 828:154099.

[37] Xia M, Wang X, Xu J, et al. Tris (1-chloro-2-propyl) phosphate exposure to zebrafish causes neurodevelopmental toxicity and abnormal locomotor behavior [J]. Science of the Total Environment, 2021,758:143694.

[38] Halder N, Yadav S, Lal G. Neuroimmune communication of the cholinergic system in gut inflammation and autoimmunity [J]. Autoimmunity Reviews, 2024,23(12):103678.

[39] Cheng R, Jia Y, Dai L, et al. Tris (1, 3-dichloro-2-propyl) phosphate disrupts axonal growth, cholinergic system and motor behavior in early life zebrafish [J]. Aquatic Toxicology, 2017,192:7−15.

[40] Leo D, Sukhanov I, Zoratto F, et al. Pronounced hyperactivity, cognitive dysfunctions, and BDNF dysregulation in dopamine transporter knock-out rats [J]. Journal of Neuroscience, 2018,38(8): 1959−1972.

[41] Chen C, Song J, Pu Q, et al. Azithromycin induces neurotoxicity in zebrafish by interfering with the VEGF/Notch signaling pathway [J]. Science of the Total Environment, 2023,903:166505.

[42] Luo C, Zhang Q, Wang D, et al. Tri-iso-butyl phosphate (TiBP) exposure induces neurotoxicity by triggering oxidative stress accompanied by neurotransmitter system disruptions and apoptosis in zebrafish larvae [J]. Environmental Pollution, 2024,363:125137.

[43] Yuan L, Qian L, Qian Y, et al. Bisphenol F-induced neurotoxicity toward zebrafish embryos [J]. Environmental science & technology, 2019,53(24):14638−14648.

[44] Fan C Y, Cowden J, Simmons S O, et al. Gene expression changes in developing zebrafish as potential markers for rapid developmental neurotoxicity screening [J]. Neurotoxicology and teratology, 2010, 32(1):91−98.

[45] 盛　诚,王馨颖,易　珍,等.不同材质微塑料对三氯生的吸附及其在斑马鱼体内累积分布的影响 [J]. 生态毒理学报, 2020,15(5):108−117.
Sheng C, Wang X Y, Yi Z, et al. Adsorption of triclosan by microplastics of different materials and their effects on accumulation and distribution in zebrafish [J]. Journals of Ecotoxicology, 2020, 15(5):108−117.

[46] 成冠辰,刘兴成,王慧利,等.微塑料和三氯生复合暴露致斑马鱼脂代谢紊乱 [J]. 中国环境科学, 2025,45(3):1636−1646.
Cheng G C, Liu X C, Wang H L, et al. The combined exposure to microplastics and triclosan disrupts lipid metabolism in zebrafish [J]. China Environmental Science, 2025,45(3):1636−1646.

[47] Ling Y, Sun L, Wang D, et al. Triclosan induces zebrafish neurotoxicity by abnormal expression of miR-219 targeting oligodendrocyte differentiation of central nervous system [J]. Archives of Toxicology, 2020,94(3):857−871.

[48] Wang W, Li X, Qian Q, et al. Mechanistic exploration on neurodevelopmental toxicity induced by upregulation of alkbh5targeted by triclosan exposure to larval zebrafish [J]. Journal of Hazardous Materials, 2023,457:131831.

[49] Wu K, Wang D, Wang Y, et al. Distinct circuits in anterior cingulate cortex encode safety assessment and mediate flexibility of fear reactions [J]. Neuron, 2023,111(22):3650−3667.

[50] Ishihara K, Takata K, Mizutani K. Involvement of an aberrant vascular system in neurodevelopmental, neuropsychiatric, and neuro-degenerative diseases [J]. Life, 2023,13(1):221.

[51] Diao W, Yan J, Wang X, et al. Mechanisms regarding cardiac toxicity triggered by up-regulation of miR-144in larval zebrafish upon exposure to triclosan [J]. Journal of Hazardous Materials, 2023,443: 130297.

[52] Ham Sembiring M, Nursanti O, Aisyah Rahmania T. Molecular docking and toxicity studies of nerve agents against acetylcholinesterase (AChE) [J]. Journal of Receptors and Signal Transduction, 2023,43(5):115−122.

[53] Zhang H, Liu Y, Huang Y, et al. Abamectin causes neurotoxicity in zebrafish embryos [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2025,26(1):349.

[54] Wang S, Han X, Yu T, et al. Isoprocarb causes neurotoxicity of zebrafish embryos through oxidative stress-induced apoptosis [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2022,242:113870.

[55] Wang L, Mao B, He H, et al. Comparison of hepatotoxicity and mechanisms induced by triclosan (TCS) and methyl-triclosan (MTCS) in human liver hepatocellular HepG2 cells [J]. Toxicology Research, 2019,8(1):38−45.

作者简介：张浩雷(2001−),男,安徽阜阳人,苏州科技大学硕士研究生,主要从事风险评价与生态安全方面的研究.17755852119@163.com.