代卓雅,施 雨,孟令浩,等.三氯生及其环境衍生物对斑马鱼早期发育毒性机制 [J]. 中国环境科学, 2026,46(2):1061-1071.
Dai Z Y, Shi Y, Meng L H, et al. Toxicity mechanism of triclosan and its environmental derivatives on early development of zebrafish [J]. China Environmental Science, 2026,46(2):1061-1071.

三氯生及其环境衍生物对斑马鱼早期发育毒性机制

代卓雅,施 雨,孟令浩,孙 睿,沈 举,余祖康,王泽君,王慧利* (苏州科技大学环境科学与工程学院,江苏 苏州 215009)

摘要：聚焦三氯生(TCS)及其环境衍生物 2,4,6-三氯苯酚(2,4,6-TCP),以斑马鱼为脊椎模式生物,从形态学、生理生化、神经行为及分子机制等多个水平展开研究.结果表明,两种污染物经梯度浓度急性暴露斑马鱼胚胎后,均导致幼鱼出现体节缩短、卵黄囊水肿、脊椎弯曲及游囊发育延迟或闭合等畸形,且畸形程度具有显著剂量-效应依赖关系.基准剂量(BMD)测定分析显示,二者致畸作用存在差异,TCS 的最敏感指标为心包囊肿,且显著抑制体长和眼睛大小;2,4,6-TCP 的最敏感指标则为卵黄囊面积.形态致畸差异提示可能源于二者作用靶器官和机制不同.TCS 和 2,4,6-TCP 对 120hpf 斑马鱼幼鱼的 LC_{50} 分别为 0.591 和 1.137mg/L.ECOSAR 软件预测和测试结果均表明,对于鱼类、水蚤和绿藻这 3 种测试生物,TCS 的发育畸形和致死毒性显著高于 2,4,6-TCP.运动行为学研究表明,TCS 和 2,4,6-TCP 均能抑制斑马鱼幼鱼的自主运动活力,并破坏其对光暗刺激的感知功能,这预示着两种化合物都会导致神经系统损伤.神经毒性机制分析发现,TCS 和 2,4,6-TCP 都通过诱导氧化应激,导致活性氧(ROS)在脑部、心包和脊椎区域大量积累,进而造成新生神经元数量减少、脑细胞过度凋亡以及脑发育畸形.神经生化功能指标显示神经递质传递和胆碱能系统功能受损,5-羟色胺(5-HT)含量降低,乙酰胆碱酯酶(AChE)活性受抑制.采用靶基因预测和生物信息学分析技术,分别筛选出 441 个(TCS)和 173 个(2,4,6-TCP)潜在作用靶基因.对作用靶基因富集信号通路分析发现,TCS 主要通过激活氧化应激、炎症反应和内分泌干扰信号通路影响胚胎发育,而 2,4,6-TCP 则通过干扰神经递质转运,突触生长形成和结构分化调控胚胎发育畸形.筛选出作用通路枢纽的 Top 10 基因,除了 3 个共同 hub 基因 *hsp90aa1*、*esr1*、*egfra*,发现二者 70%的 hub 基因不同,构建 PPI 网络识别出 TCS 通过 *pparg*、*bcl2l1*、*casp3a*、*stat3*、*mmp9*、*src*、*stat1a* 富集在线粒体自噬通路、p53 信号通路、NOD 样受体信号通路、坏死性凋亡通路等.而 2,4,6-TCP 主要通过作用于 *cdc25b*、*top2a*、*cdk1*、*ptpn11a*、*pdgfrb*、*flt1*、*erbb2* 调控 MAPK 信号通路、细胞周期通路、孕酮介导的卵母细胞成熟通路等.筛选出 4 个神经相关 hub 基因 RT-qPCR 验证也证实了二者致毒机制的差异.

关键词：三氯生；2,4,6-三氯苯酚；斑马鱼；神经毒性；分子机制
中图分类号：X503.225 **文献标识码**：A **文章编号**：1000-6923(2026)02-1061-11

Toxicity mechanism of triclosan and its environmental derivatives on early development of zebrafish. DAI Zhuo-ya, SHI Yu, MENG Ling-hao, SUN Rui, SHEN Ju, YU Zu-kang, WANG Ze-jun, WANG Hui-li* (The school of Environmental Science and Engineering, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou 215009, China). *China Environmental Science*, 2026,46(2)：

Abstract：This study investigated triclosan (TCS) and its environmental derivative 2,4,6-trichlorophenol (2,4,6-TCP) using zebrafish as a vertebrate model for a comprehensive, multi-level assessment that included morphological, physiological, biochemical, neurobehavioral, and molecular endpoints. Acute exposure of zebrafish embryos to gradient concentrations of TCS and 2,4,6-TCP induced pronounced developmental malformations, including shortened somites, yolk sac edema, spinal curvature, and delayed or absent swim bladder inflation, with clear dose-response relationships. Benchmark dose (BMD) analysis revealed compound-specific teratogenic sensitivities: pericardial edema was the most sensitive endpoint for TCS, accompanied by significant inhibition of body length and eye size, whereas yolk sac area was the most sensitive indicator for 2,4,6-TCP. The differences in morphological teratogenicity may be attributed to distinct target organs and modes of action. The LC_{50} values for 120 hpf zebrafish larvae were 0.591mg/L for TCS and 1.137mg/L for 2,4,6-TCP, respectively. Both ECOSAR predictions and experimental results consistently indicated that TCS exhibited significantly higher developmental toxicity and lethality than 2,4,6-TCP for fish, Daphnia, and green algae. Behavioral analyses demonstrated that both TCS and 2,4,6-TCP significantly suppressed spontaneous locomotor activity of zebrafish larvae and disrupted light-dark response behaviors, indicating potential neurotoxic effects. Mechanistic investigations revealed that both TCS and 2,4,6-TCP induced oxidative stress, resulting in excessive accumulation of reactive oxygen species (ROS) in the brain, pericardium, and spine regions. This oxidative damage led to reduced neuronal proliferation, excessive neuronal apoptosis, and abnormal neurodevelopment. Neurobiochemical indicators further demonstrated impaired neurotransmitter

收稿日期：2025-07-03
基金项目：国家自然科学基金资助项目(32371705,22106118);江苏省研究生科研实践创新项目(SJCX24_1890)
* 责任作者, 教授, whuili@163.com

transmission and cholinergic system dysfunction, characterized by decreased serotonin (5-HT) levels and inhibited acetylcholinesterase (AChE) activity.Target gene prediction and bioinformatics analyses identified 441 and 173 potential target genes for TCS and 2,4,6-TCP, respectively.Pathway enrichment analysis revealed that TCS primarily affected embryonic development by activating oxidative stress, inflammatory response, and endocrine disruption-related signaling pathways, whereas 2,4,6-TCP regulated developmental abnormalities by interfering with neurotransmitter transport, synaptic formation, and structural differentiation. Further analysis identified the top ten hub genes involved in the associated regulatory pathways, among which only three genes (*hsp90aa1*, *esr1*, and *gfra*) were shared between the two compounds. Approximately 70% of the identified hub genes were compound-specific. Protein-protein interaction (PPI) network analysis revealed that TCS was primarily enriched in the mitophagy, p53signaling, NOD-like receptor signaling, and necroptosis pathways, mediated by key regulators such as *pparg*, *bcl2l1, casp3a, stat3, mmp9, src,* and *stat1a*. In contrast, 2,4,6-TCP predominantly regulated the MAPK signaling pathway, cell cycle pathway, and progesterone mediated oocyte maturation pathway through *cdc25b, top2a, cdk1, ptpn11a, pdgfrb, flt1*, and *erbb2*. Four neurodevelopment-related hub genes were further screened and validated by RT-qPCR, confirming the mechanistic differences between TCS and 2,4,6-TCP.

Key words：triclosan；2,4,6-trichlorophenol；zebrafish；neurotoxicity；molecular mechanism

三氯生(TCS)是一种高效广谱抗菌剂,全球年产量超 1000t[1].由于使用量大且生物降解性差,通过生活污水排放、工业废水泄漏等途径大量进入环境,在废水(浓度范围为 0.07~14000/L)、溪流(50~2300ng/L)、海水(50~150ng/L)以及沉积物(1~35μg/kg)中被高频检出[2].TCS 在环境条件下可光解生成 2,4,6-三氯苯酚(2,4,6-TCP),后者作为重要的工业中间体,在农药、木材防腐剂等领域应用广泛[3-5].

现有研究虽已证实 TCS 及其 2,4,6-TCP 均具有内分泌干扰、神经毒性及发育毒性,但二者之间的毒性差异与内在机制关联仍未明确.目前多数研究多聚焦于单一污染物,缺乏对“母体-衍生物”体系的系统比较,且对早期发育阶段(如斑马鱼胚胎期)的敏感毒性指标及相应分子机制解析不足[6-7].为此,本研究以斑马鱼为模型.通过整合形态学、行为学、生理生化及多层次分子终点,系统比较了 TCS 与 2,4,6-TCP 在早期发育阶段的毒性效应差异.研究进一步采用基准剂量分析量化了二者的敏感致畸终点,并借助靶基因预测、生物信息学分析等阐明了二者毒性机制的差异,其中关键 Hub 基因的鉴定与实验验证进一步揭示了其作用网络的本质区别.该研究首次在“母体-衍生物”框架内实现了从表型到机制的多维度系统解析,不仅为阐明二者环境毒性差异提供了分子依据,也为相关污染物的复合风险评估与精准防控提供了重要科学参考[8-9].

本研究通过整合形态学观察、行为学分析等,比较 TCS 及其衍生物 2,4,6-TCP 在斑马鱼早期发育阶段的毒性谱系;通过 BMD 分析量化敏感指标,研究二者的毒性阈值设定提供数据支撑,并从“结构-靶基因-通路”层面揭示毒性差异的分子机制,为环境污染物的风险评估、标准制定及污染防控提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 实验动物饲养方法

以斑马鱼为模型生物,主要使用斑马鱼野生型 AB 品系与转基因品系 Tg(*elavl3*:EGFP),购于国家斑马鱼资源中心,饲养方法依照之前研究所述[10].

1.2 实验试剂及仪器

三氯生(CASNo.3380-34-5,99.9%)和 2,4,6-三氯苯酚(CASNo.88-06-2,98%)均购于 Sigma-Aldrich 公司(St.Louis,USA).药品溶剂为丙酮(Acetone,99.9%),购于浙江中星化工试剂有限公司.

BCA 蛋白试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);卵黄蛋白原(VTG)试剂盒、乙酰胆碱酯酶(AChE)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);活性氧(ROS)染色试剂盒、吖啶橙(AO)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);Trizol 提取试剂盒、SYBR Green Supermix 试剂盒、PrimeScriptTM II 第一链 cDNA 合成试剂盒(北京全式金有限公司).涉及的基因引物由上海生工生物合成."(斑马鱼养殖系统上海海圣生物实验室有限公司),体式显微镜(Cover-015,日本奥林巴斯),低温高速离心机(Gentrifuge5424R,德国 Eppendorf 公司),制冰机(IBS-20,宁波特朗普仪器有限公司),F6/F10 手持式高速匀浆机(上海净信科技公司),Step OnePlusTM Real-Time PCR System 美国 thermofisher 科技公司),多功能酶标仪(美国赛默飞公司).

1.3　暴露浓度设置与致畸形态学观察

参考前期研究[11]及 Ecosar 软件对水生 3 物种的 LC_{50} 预测值,TCS 对斑马鱼的毒性明显高于 2,4,6−TCP.因此,TCS 暴露浓度梯度设置为 0.001%丙酮对照,200,400,600,800,1000,1200μg/L(间隔 200μg/ L),而 2,4,6−TCP 设置为 0.001%丙酮对照,200,500,1000,1800,2100,4000μg/L(间隔 300~1900μg/L),以分别匹配其毒性特征并覆盖亚致死~致死效应范围.统计 120hpf 不同浓度下幼鱼死亡率,拟合剂量−效应曲线得 LC_{50},后续实验分别以二者 LC_{50} 的 1/3:230 和 310μg/L 为最高亚致死剂量,也为二者同 Mol 浓度的等效应剂量,以环境浓度 2.3,23μg/L 和 3.1,31μg/L 作为低效应剂量,浓度梯度持续暴露 6hpf 胚胎至实验所需期.每天更新暴露液,以确保稳定的暴露水平,并适时取出死胚.收集斑马鱼胚胎暴露液,用 0.22μm 膜过滤至棕色样品瓶,用于高效液相色谱分析(HPLC,日立 Chromaster HPLC5310 柱箱),测定 24h 后残留 TCS 和 2,4,6−TCP.色谱柱为 Sym−C18,甲醇−水流动相(80:20*V*/*V*),流速 0.8mL/min,进样量 100μL,柱温 35 ◦C,紫外检测波长 280nm[12].在不同发育节点,随机选取 24 枚胚胎/幼鱼麻醉后观察形态畸形,利用 Tg(*elavl3*:EGFP)转基因斑马鱼通过荧光显微镜分析神经元发育,用 ImageView 软件定量荧光强度.

1.4　畸形指标检测及基准剂量(BMD)分析

基准剂量(BMD)是指某种污染物引起特定生物学效应(如畸形率达到基准反应值 BMR)的剂量水平,其通过拟合完整的剂量−效应曲线计算,相较于传统的无观察效应水平(NOAEL)更能利用实验数据信息,灵敏度更高[13].本研究中,BMD 分析用于量化 TCS 和 2,4,6−TCP 对斑马鱼致畸效应的敏感程度,通过比较二者关键畸形指标的 BMD 值及基准剂量下限(BMDL),明确其毒性作用的靶器官差异."本实验选取了 TCS 浓度为 0,2.3,23,100,150,230,460μg/L 和 2,4,6−TCP 浓度为 0、3.1,31,100,200,310,620μg/L,分别对胚胎持续暴露处理至 120−hpf 后,统计体长、卵黄囊面积等畸形指标的发生率.根据各指标的计量−反应曲线,采用贝叶斯基准剂量法(BBMD)计算 BMD 及 95%置信区间(BMDL 为下限,BMDU 为上限),并设定基准反应值(BMR)为 1%(即畸形率较对照组增加 1%的反应水平),以识别二者最敏感的致畸表型指标.

1.5　幼鱼行为学分析

将 120hpf 的斑马鱼幼鱼对照组、TCS 处理组及 2,4,6−TCP 处理组转移至 96 孔无菌培养板,随后置于荷兰 Noldus 行为分析仪的观察箱内.参照之前行为学分析方法[14],借助 EthoVision XT 软件设定实验程序以采集运动轨迹,并对相关运动指标进行统计.

1.6　吖啶橙(AO)调亡染色

在加入 PTU 黑色素抑制剂的胚胎持续暴露 72hpf 后,各组收集于 1.5mL 离心管.按照先前的染色方法[15],于体视荧光显微镜下成像记录并量化调亡严重区域与器官,量化荧光强度代表凋亡发生严重度.

1.7　生理生化指标检测

取 30 尾 120hpf 各处理组幼鱼置于 EP 管冰浴麻醉后,PBS 溶液对鱼体进行 3 次清洗,吸弃所有清洗液后,加入蛋白提取液,通过超声研磨将幼鱼匀浆后,2500r/min 离心 15min,小心吸取上清液,严格依照碧云天 BCA 蛋白浓度测定试剂盒的操作规范,用全波段酶标仪进行卵黄蛋白原(VTG)和乙酰胆碱酯酶(AChE)检测并导出数据.

1.8　污染物作用靶预测与生物信息学分析

从有机小分子活性数据库 PubChem(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)中获取了 TCS 和 2,4,6−TCP 化学结构式.将其结构导入 PharmMapper 在线平台(http://lilab−ecust.cn/pharmmapper/)预测其潜在作用靶点.将筛选靶蛋白信息提交至 STRING 在线数据库(https://cn.string−db.org/)进行蛋白质互作网络(String)构建与分析.利用 Metascape 数据库(https://metascape.org) 和生信平台 (https://www.bioinformatics.com.cn)对 STRING 分析结果进一步生信解读,对预测到的作用靶基因进行 GO 功能分析和 KEGG 信号通路的富集.

1.9　RT−qPCR 检测 hub 基因的转录水平变化

根据制造商说明从不同污染物暴露处理组 5dpf 幼鱼中提取总 RNA,参照之前的方法[16],完成 RT−qPCR 分析.

1.10　数据统计分析方法

每处理组包括 3 个生物复制,每个生物重复包含 3 个技术重复.所有实验数据均表示为平均值±标准差(SD).统计分析使用 SPSS18.0 软件,在不同处理组和对照组间,结果显著性差异水平用 $P<0.05$(*)、

P<0.01(**)或 P<0.001(***)表达.

2 结果与讨论

2.1 TCS 和 2, 4, 6-TCP 导致斑马鱼早期发育毒性

由图 1,表 1 可知,表型畸形观察时间为 72, 120hpf 时,TCS230μg/L 暴露组 24h 后实测浓度为 172μg/L(残留率 74.8%),2,4,6-TCP310μg/L 暴露组 24h 后实测浓度为 261μg/L(残留率 84.2%),证实介质浓度维持稳定.通过 Ecosar Applcation 软件分析得出 TCS 和 2,4,6-TCP 对不同生物的半致死浓度(表 2),二者对鱼类 96hLC_{50} 预测值分别为 0.965,8.15mg/L,对绿藻 EC_{50} 分别为 1.44,6.84mg/L,水蚤 48hLC_{50} 分别为 0.701,5.29mg/L,由此判断 2 种污染物对鱼类、水蚤和绿藻的毒性排序为 TCS>2,4,6-TCP,即 TCS 对水生生物的毒性更高.参考两者对鱼类 LC_{50} 预测值,分别在其上下各设定 2~3 个浓度梯度暴露处理授精后 6hpf 胚胎于 6 孔板中持续暴露处理至 120hpf,模拟出 TCS 和 2,4,6-TCP 对斑马鱼 120hpf 幼鱼 LC_{50} 分别为 0.591,1.137mg/L.拟合回归曲线 R^2 分别为 0.991 和 0.981,二者剂量-效应回归方程 R^2 均>95%(图 2).因此,后续转录组测序实验选取 LC_{50} 的约 1/3 作为亚致死处理剂量的等效应剂量 230, 310μg/L.

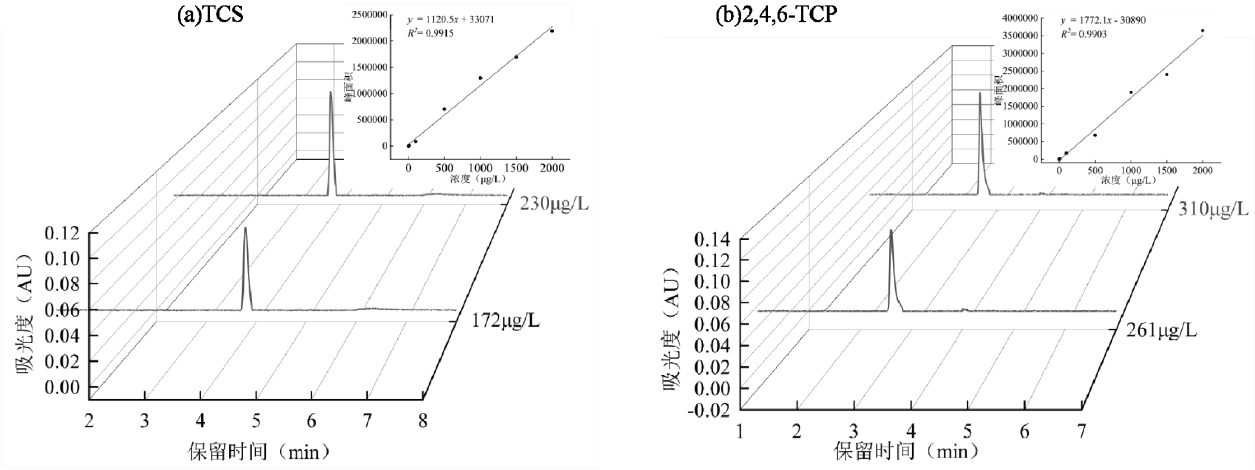


图 1 TCS 和 2,4,6-TCP 的标准曲线及 24h 后最大浓度残留状态

Fig.1 Standard curves for TCS and 2,4,6-TCP, as well as the maximum concentration residual state after 24hours

表 1 TCS 和 2, 4, 6-TCP 的配置浓度及(0 和 24h)实测浓度值

Table 1 Configuration concentrations of TCS and 2,4,6-TCP, and measured concentration values (at 0 and 24h)

污染物	配制浓度(μg/L)	0h 实测浓度(μg/L)	24h 实测浓度(μg/L)
TCS	2.3	2.5	1.6
	23	20	15
	230	212	172
2, 4, 6-TCP	3.1	3	2.2
	31	33	27
	310	300	261

为了评估二者环境暴露剂量下的健康风险,选取了 TCS 的 2.3,23μg/L 与 2,4,6-TCP 的 3.1,31μg/L 作为环境浓度组.与对照组相比,经过 TCS 处理后,幼鱼在 72hpf 出现体长减小和卵黄囊肿等畸形现象,暴露至 12hpf 观察到心包肿大.而 2,4,6-TCP 致 72hpf 幼鱼脊柱弯曲和卵黄囊肿的发育畸形,暴露 120hpf 时游囊发育显著迟缓(图 2(c)) 二者均影响一些个体耳石发育.生长发育畸形量化统计如图 2(d)所示, TCS 暴露组发育畸形率达 63%,其中脊椎弯曲比率最为显著;2,4,6-TCP 幼鱼发育畸形率达 56%,其中卵黄囊畸形比率偏高.上述结果显示 TCS 及其氯代衍生物 2,4,6-TCP 对斑马鱼毒性较强、致畸表现与潜在的作用靶器官和靶系统存在差异.

表 2 TCS 和 2, 4, 6-TCP 的 LC_{50} 预测

Table2 LC_{50} prediction of pollutants TCS and 2,4,6-TCP

污染物	生物体	持续时间(h)	终点	浓度(mg/L)
TCS	鱼	96	LC_{50}	0．965
	水蚤	48	LC_{50}	0.701
	绿藻	96	EC_{50}	1.44
2,4,6-TCP	鱼	96	LC_{50}	8.15
	水蚤	48	LC_{50}	5.29
	绿藻	96	EC_{50}	6.84

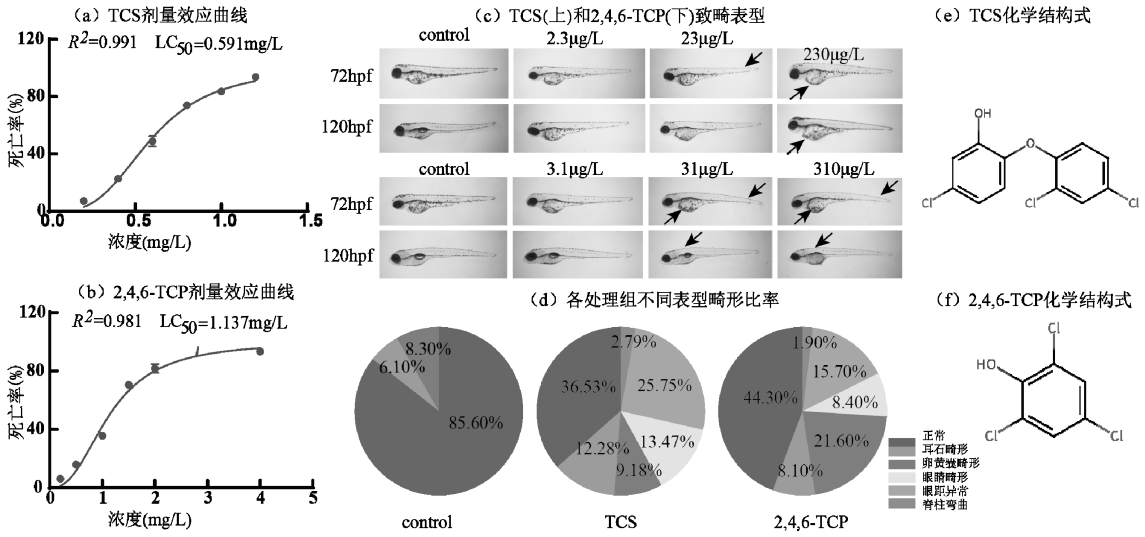


图 2　TCS 和 2,4,6−TCP 的化学结构式及斑马鱼幼鱼发育畸形

Fig.2　TCS and 2,4,6−TCP Chemical structural formulas of TCS and 2,4,6−TCP, and developmental malformations in zebrafish larvae

2.2　畸形指标检测及基准剂量(BMD)分析

基于上述二者的致畸表型,使用贝叶斯基准剂量分析系统(https://benchmarkdose.org)绘制剂量−畸形效应关系曲线.结果显示,TCS 暴露对斑马鱼幼鱼体长、眼距、耳石面积和眼睛大小等指标均呈现剂量依赖性抑制.其中,体长和眼睛大小的抑制作用最为显著;而眼距仅在较高浓度下才受到显著影响(图3(a)).与 TCS 相比,2,4,6−TCP 对幼鱼发育致畸作用也呈剂量依赖性,尤其对卵黄囊肿影响最为显著(图3(b)).综合二者畸形指标的权重热图分析表明,心包囊肿是 TCS 暴露下最敏感的表型指标(图 3(c)),而卵黄囊面积是 2,4,6−TCP 作用下最敏感的表型指标(图3(d)).这些结果提示,二者对幼鱼发育影响存在差异,可能是由于作用的靶器官和机制不同造成的.

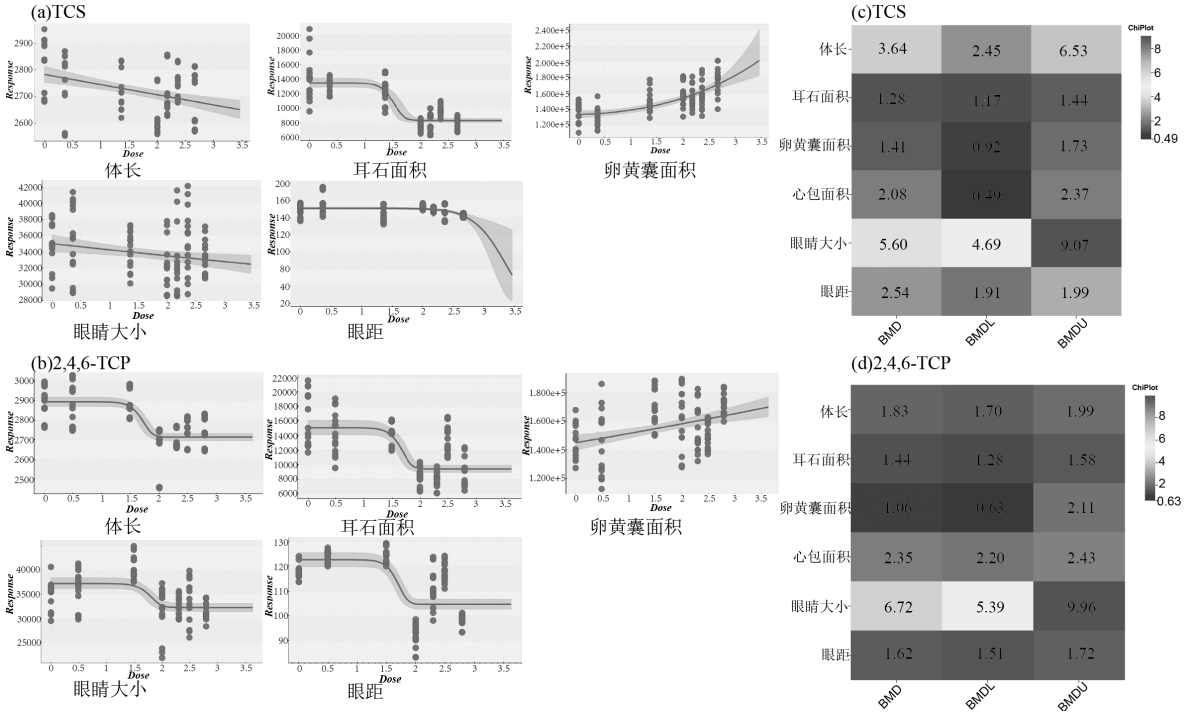


图 3　TCS 和 2,4,6−TCP 对斑马鱼幼鱼发育畸形的基准剂量(BMD)分析

Fig.3　Baseline Dose (BMD) Analysis of TCS and 2,4,6−TCP on Developmental Abnormalities in Zebrafish

(a, b) TCS 和 2,4,6−TCP 的剂量−效应关系曲线(X 轴为污染物浓度的对数转换值,单位 μg/L;Y 轴为畸形发生率;曲线为拟合的剂量−效应关系,阴影部分为95%置信区间);(c, d)1%BMR 下各畸形指标的 BMD、BMDL 和 BMDU 热图(颜色越深表示 BMDL 值越低,敏感性越高)

2.3 TCS 和 2,4,6-TCP 对斑马鱼运动行为的影响

运动习性与行为学是神经功能最直观的体现形式,且行为学检测具有普适性、稳定性和易操作性等优点,因此,神经行为检测在神经毒性的高通量筛选中被广泛应用[17].为探究 TCS 和 2,4,6-TCP 对幼鱼神经运动行为的影响,通过自主运动、光暗节律和声刺激实验进行评价.与对照组相比,TCS 和 2,4,6-TCP 处理组幼鱼运动轨迹热度下降(图 4(a-b)).表明其运动活力下降(图 4(d)),表现为一定时间内的运动距离和游泳速度显著降低(图 4(e),$P<0.05$, $P<0.001$).随着二者暴露浓度的升高,光暗交替刺激下的幼鱼运动活力显著低于对照组,表明对光暗刺激反应迟钝或惶恐(图 4(c)),表明二者均可造成神经运动行为和视觉神经的不良影响,且 TCS 对行为学的影响更严重.

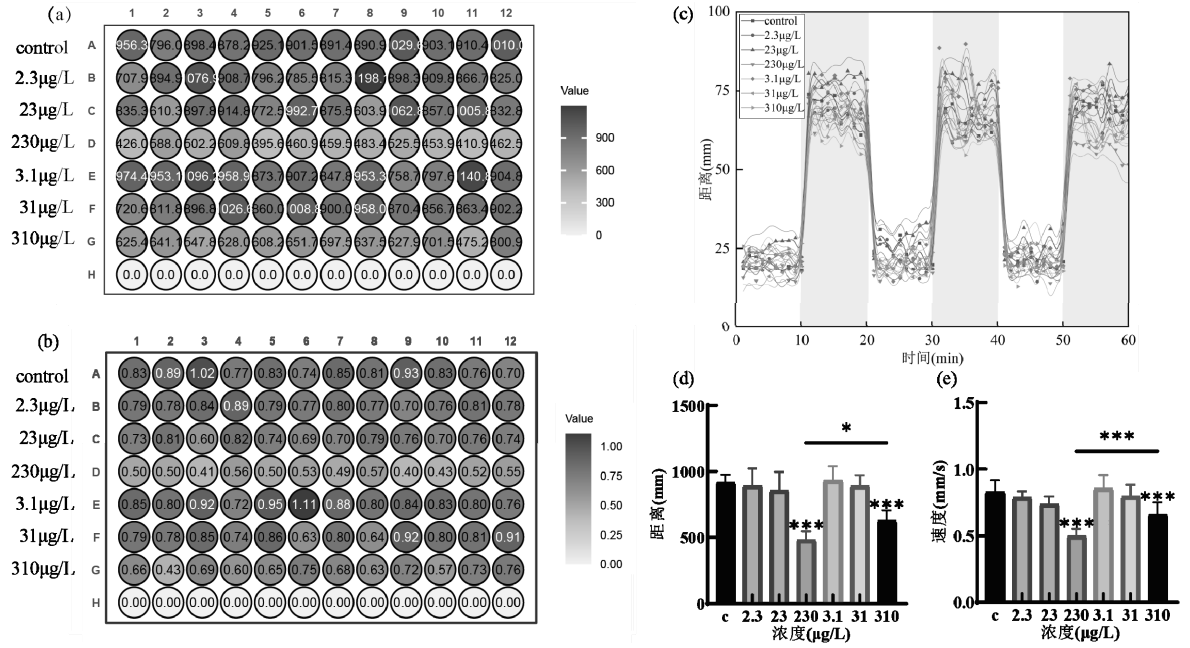


图 4 TCS 和 2,4,6-TCP 诱导斑马鱼幼鱼运动和神经行为紊乱

Fig.4 TCS and 2,4,6-TCP induce motor and neurobehavioral disorders in zebrafish

(a, b) 120hpf 幼鱼于 96 孔板运动轨迹示踪;(c) 10min 光/暗场交替变化 120hpf 幼鱼运动距离变化;(d, e) 120hpf 幼鱼自主运动运动平均距离和运动速度量化;"*"表示显著性水平 $P<0.05$,"**"表示显著性水平 $P<0.01$,"***"表示显著性水平 $P<0.001$

2.4 TCS 和 2,4,6-TCP 暴露对斑马鱼神经元分化的影响

为探究 TCS 和 2,4,6-TCP 暴露对斑马鱼神经系统发育影响及对神经网络的调控作用,利用 Tg(*elavl3*:EGFP)转基因斑马鱼可视化神经元生长情况.*elavl3* 是一种神经特异性 RNA 结合蛋白,在全身神经元中特异表达,对于维持成熟神经元的轴突稳态至关重要,在神经元分化中发挥作用[18].Tg(*elavl3*:EGFP)即是使用神经发育标记基因 *elavl3* 启动子驱动 EGFP 表达.参与神经系统生长发育过程,且特异性标记斑马鱼的神经元细胞[19].该基因缺失会导致视觉神经系统缺陷伴随神经系统问题[20].如图 5A、B 所示,对照组幼鱼脑部和脊椎绿色荧光清晰,而 TCS 和 2,4,6-TCP 处理组幼鱼脑部和脊椎前部荧光强度及面积显著下降,且间脑与后脑间隙非常模糊.ImageView 软件对脑部荧光密度量化分析发现 TCS 和 2,4,6-TCP 高浓度处理下荧光强度显著下降,且 TCS 更为显著(图 5(e),$P<0.05$,$P<0.001$).此结果推测,二者通过抑制斑马鱼脑部新生神经元细胞分化而导致斑马鱼神经行为的异常.

利用吖啶橙(AO)整体染色 120hpf 幼鱼,对照组幼鱼脑部有自然凋亡情况,而 TCS 和 2,4,6-TCP 处理组幼鱼脑部可观察到明显致密的绿色荧光碎片(图 5(c-d)),荧光强度及数量较对照组显著增强(图 5(f),$P<0.05$,$P<0.01$,$P<0.001$),预示二者通过诱导神经元细胞过渡调亡引起新生神经元的数量减少.

基于上述对体节生长、神经元分化抑制、凋亡和神经行为的干扰,进一步测定了幼鱼神经递质乙酰胆碱酯酶(AChE)和卵黄蛋白原(VTG)转化卵黄蛋白的能力.TCS 和 2,4,6-TCP 梯度处理组中,VTG 的

含量均有显著上升(图 4(g),P<0.01,P<0.001),表明二者作用下均抑制了 VTG 向卵黄蛋白的转化,进而抑制其生长.AChE 含量也呈显著下降(图 5(h),P<0.05, P<0.01,P<0.001),且二者均呈现浓度依赖性变化.预示在功能上对神经递质的抑制作用是引起斑马鱼幼鱼运动活力下降的主要原因之一.

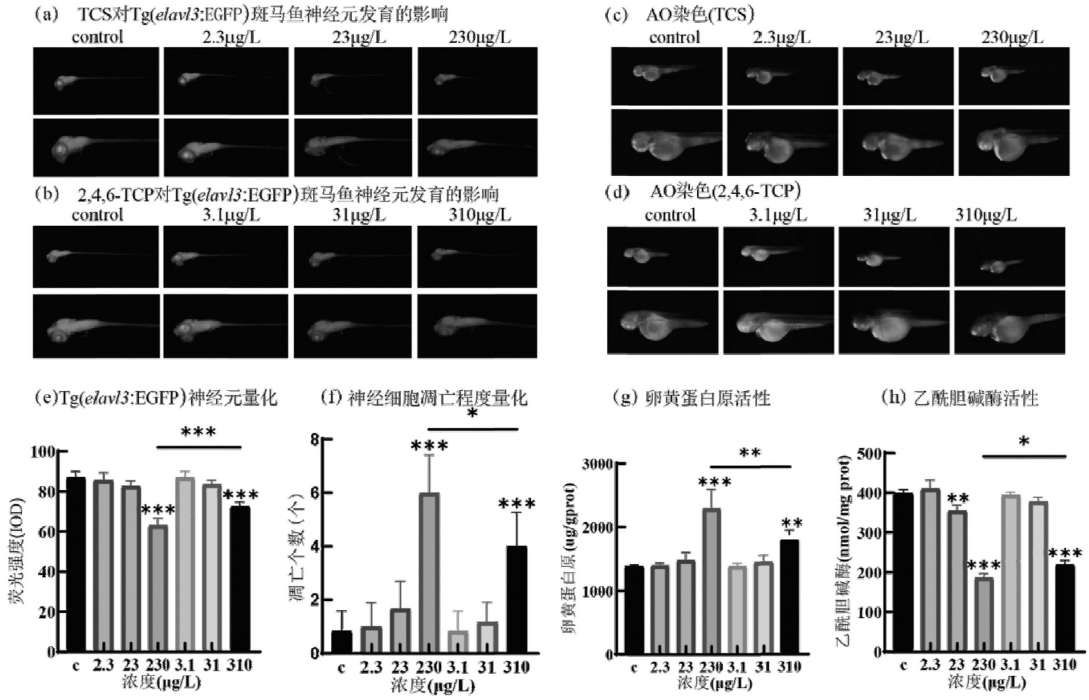


图 5　TCS 和 2,4,6−TCP 暴露对斑马鱼神经元细胞发育和生化指标的影响

Fig.5　The effects of TCS and 2,4,6−TCP exposure on neuronal cell development and biochemical indicators in zebrafish

"*"表示显著性水平 P<0.05,"**"表示显著性水平 P<0.01,"***"表示显著性水平 P<0.001

2.5　TCS 和 2,4,6−TCP 对斑马鱼作用靶分析预测与生物信息分析

为进一步分析 TCS 和 2,4,6−TCP 对神经毒性作用机制和作用途径的异同,预测二者的作用靶标分子,借助生物信息学分析靶基因的 GO 功能(Gene Ontology)和 KEGG 代谢信号通路富集(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,)图 6(a,b)所示,TCS 主要作用于参与生物过程(Biological process)靶基因为"药物反应(response to drug)、细胞质钙离子浓度调节(regulation of cytosolic calcium ion concentration)和单胺转运(monoamine transport)"等生物过程. 而 2,4,6−TCP 更多作用于"药物反应(response to drug)"功能.在细胞组成(Celluar component)方面,TCS 主要作用于"突触膜组分(integral component of synaptic membrane)和突触膜内内成分(intrinsic component of synaptic membrane)",而 2,4,6−TCP 则作用于"线粒体基质(vesicle lumen)"和细胞质囊腔(cytoplasmic vesicle lumen)等组分.就分子功能(Molecular function)而言,TCS 作用于"碳酸盐脱水酶活性(carbonate dehydratase activity)和神经递质受体活性(neurotransmitter receptor activity)",而 2,4,6−TCP 则在"核受体活性(nuclear receptor activity)"和"配体激活转录因子活性(ligand−activated transcription factor activity)功能上起作用.GO 功能分析预示,二者在作用靶组织、靶细胞和靶分子均不同.

二者作用靶基因 KEGG 信号通路富集发现(图 6(c,d)),TCS 和 2,4,6−TCP 具有"前列腺癌(Prostate cancer)、化学致癌作用−受体激活(Chemical carcinogenesis−receptor activation)共同的通路富集.值得注意的是,TCS 在"MAPK 信号通路(MAPK signaling pathway)、化学致癌活性氧(Chemical carcinogenesis−reactive oxygen species)和 FoxO 信号通路(FoxO signaling pathway)"富集基因比较多,而 2,4,6−TCP 在"神经活性配体−受体相互作用(Neuroactive ligand−receptor interaction)、钙信号通路(Calcium signaling pathway)、氮代谢(Nitrogen metabolism)"等代谢相关通路富集较多基因,综合上

述 GO 和 KEGG 分析表明,二者均能诱导神经毒性,但其诱导神经毒性的作用机制和调控途径不同.

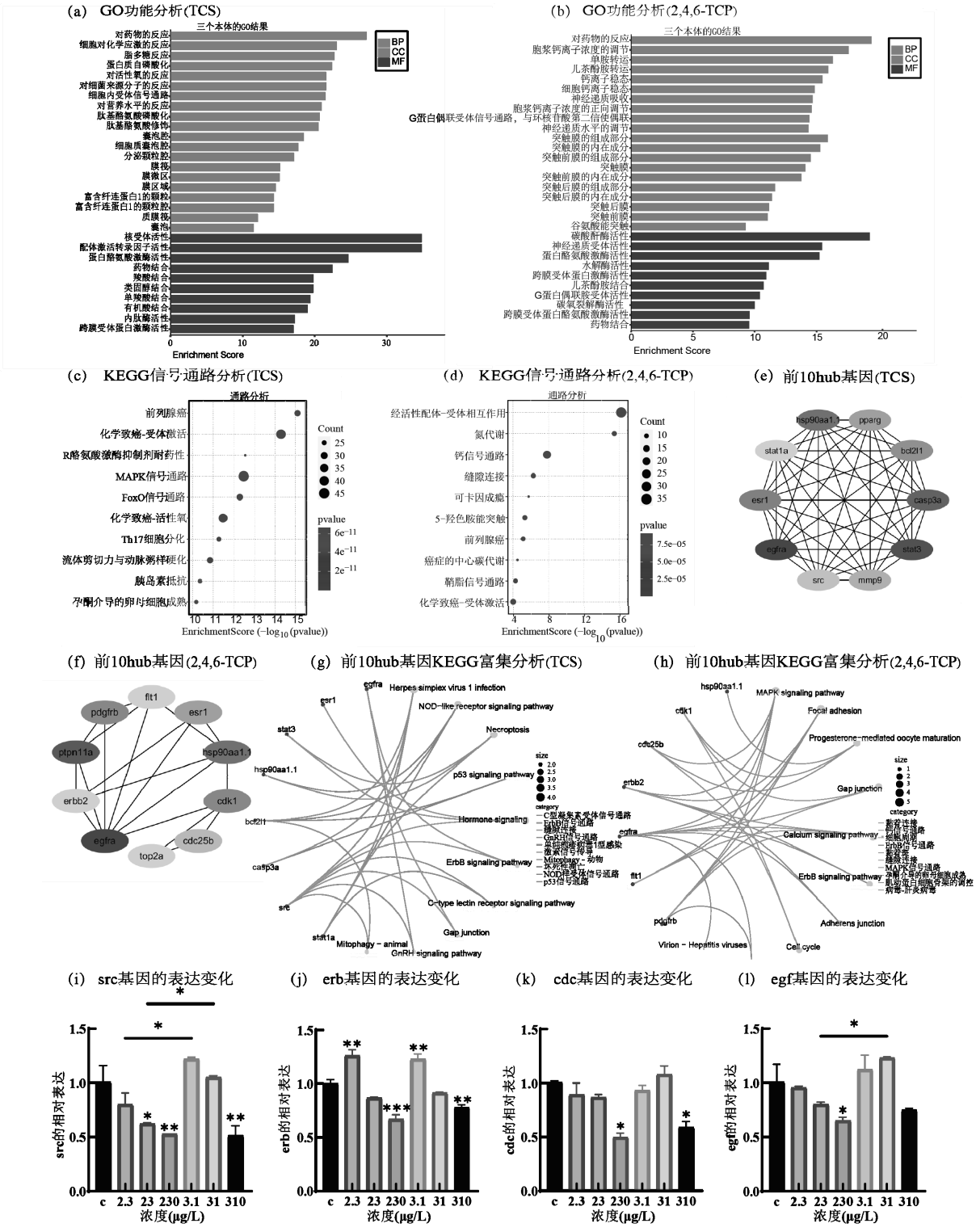


图 6 TCS 及 2,4,6−TCP 作用靶基因 GO 功能分析与 KEGG 信号通路富集及神经发育相关基因变化

Fig.6 Functional analysis of GO genes targeted by TCS and 2,4,6−TCP, enrichment of KEGG signaling pathway, and changes in neurodevelopmental related genes

"*"表示显著性水平 $P<0.05$,"**"表示显著性水平 $P<0.01$,"***"表示显著性水平 $P<0.001$

为进一步探索 TCS 和 2,4,6−TCP 作用靶分子差异,利用 Cytohubba 对其作用靶枢纽 Hub 基因筛选对

比,其中 TCS 组排名前 10 的 Hub 基因(图 6(e))分别为 *hsp90aa1*、*pparg*、*bcl2l1*、*casp3a*、*stat3*、*mmp9*、*src*、*egfra*、*esr1*、*stat1a*.2,4,6−TCP 排名前 10 的 Hub 基因(图 6(f))分别为 *cdc25b*、*top2a*、*cdk1*、*ptpn11a*、*pdgfrb*、*flt1*、*hsp90aa1*、*esr1*、*egfra*、*erbb2*.比较 Top10 基因发现,除了 3 个共同 hub 基因 *hsp90aa1*、*esr1*、*egfra,*70%hub 基因不同.

对 Top10Hub 基因分别进行 KEGG 富集分析显示,二者仅有两条信号通路相同,即 ErbB signaling pathway 和 Gap junction.TCS 组的 Top10Hub 基因主要在激素信号通路(Hormone signaling pathway)、NOD 样受体信号通路(NOD−like receptor signaling pathway)、坏死性凋亡通路(Necroptosis pathway)等通路富集.而后者 Top10Hub 基因则富集于钙信号通路(Calcium signaling pathway)和 MAPK 信号通路(MAPK siganaling pathway)等.

为验证 hub 基因在二者作用下的表达变化,筛选 4 个神经相关功能基因 *src*,*erb*,*cdc*,*egf* 进行 RT−qPCR 实验,暴露组 *src*、*cdc* 和 *egf*(图 6(i,k,l))基因表达随浓度梯度依赖性抑制(P<0.05, P<0.01, P<0.001),且 TCS 等效应浓度下抑制更为严重.*Src* 表达下调会导致神经炎症反应减弱或异常.*cdc* 失调还与神经元凋亡增加相关,表明其在神经发育和神经退行性疾病中具有双重作用[21].*egf* 在神经系统中调控神经元的增殖、分化和存活,促进神经元的迁移和突触形成,并参与神经损伤后的修复过程[22].*erb* 在两种污染物作用下均表现为在环境浓度下上调,而在较高浓度下表达抑制,呈典型的倒 U 字型变化模式(图 6(h),P<0.01,P<0.001).*erb* 参与神经元生长、分化和存活.其下调影响神经发育异常、突触功能改变、髓鞘化缺陷以及神经炎症反应[23].上述结果呈现了二者神经毒性的作用靶分子,也证实了其暴露干扰斑马鱼神经元发育、运动行为和生理功能的机制.尽管二者对神经网络相关的四大家族基因的调控模式相同,但二者对其家族内部的亚基因作用不同.

3　讨论

3.1　TCS 和 2,4,6−TCP 的毒性效应综合评价与机制差异

研究发现 TCS 与 2,4,6−TCP 致畸的表观形态畸形比例是不同的,从各层次上的指标变化程度均显示 TCS 对斑马鱼毒性效应显著高于 2,4,6−TCP.畸形指标的 BMD 权重分析也证实了二者的敏感致畸部位也不同.神经毒性的分子机制分析发现,二者的作用靶基因涉及的功能与生物组成,以及靶基因富集的信号通路均存在较多差异,前 Top10hub 枢纽 70%不同,表明其致神经毒性的作用靶分子是不同的.该研究成果为后续神经毒性多维度机制深入探索提供基础,也提示环境浓度下的 TCS 和 2,4,6−TCP 存在具有潜在的神经毒性,为做好公共卫生保护、提高公民防范意识及二者环境标准的制定修改提供依据.

3.2　基于神经行为学与通路的毒性阐释

斑马鱼幼鱼行为模型可以检测大脑和神经系统的功能变化,如空间和社交学习、记忆、焦虑以及由神经递质驱动的社交或神经退休性疾病行为[25].本研究中斑马鱼幼鱼对外界刺激的反射行为以及运动活力发生了改变.表明 TCS 和 2,4,6−TCP 暴露处理可导致幼鱼运动距离和游动速率降低,运动行为活力下降,并损伤幼鱼对光暗刺激和声音刺激的感知神经功能,对斑马鱼幼鱼运动行为和习性有明显干扰作用.行为学仅仅是一种表现,但对行为影响的潜在分子机制需要进一步深入探讨,对减轻污染的挽救措施和精准靶向治疗待进一步的分子确证[26].二者对运动神经感知功能障碍的影响,本研究是基于斑马鱼早期发育和幼鱼神经毒性的研究,若二者长期作用于水生态系统和人为的行业性接触,是否会诱发各种神经退行性疾病或增加其风险均需环境浓度下的慢性暴露研究.

在斑马鱼早期神经发育中,*elavl3* 基因起着关键作用,其缺失会导致视觉及神经系统发育缺陷,是神经发育的重要标志基因[27].本研究中,转基因斑马鱼幼鱼的荧光观察显示,TCS 和 2,4,6−TCP 均能抑制中枢神经发育,减少新生神经元数量,该结果与细胞凋亡染色及神经行为异常一致.生物信息学分析表明,二者诱导神经毒性的作用通路既有重叠又存在差异.2,4,6−TCP 相关基因在神经活性配体−受体相互作用、钙信号通路等富集,而 TCS 则更多干扰药物代谢与抗氧化系统,引发氧化损伤;二者均涉及 MAPK 等共同通路,该通路在神经发育中至关重要[28-29].这些毒性通路的差异可能与两者的化学结构及靶分子亲和力有关,具体机制有待进一步实验验证.

3.3　毒性分化的深层分子网络与构效关系

TCS 与 2,4,6-TCP 的毒性差异可能源于其分子结构特性(图 2).TCS 具有双酚结构(两个苯环通过氧桥连接)和三个氯取代基,赋予其更强的脂溶性和膜渗透性,易在靶器官(如心脏和神经系统)蓄积;而 2,4,6-TCP 为单酚结构,仅含三个氯取代基,其极性和代谢速率更高.此外,TCS 的醚键(C-O-C)可参与氧化应激反应,直接生成 ROS,而 2,4,6-TCP 主要通过苯环羟基化代谢,毒性效应相对温和[30].这种结构差异解释了 TCS 对氧化应激通路的更强激活能力.

基于 Hub 基因的分析发现,二者 Top10hub 基因存在较大差异,仅 70%相似,表明其致毒分子存在潜在差异.在 TCS 网络中,*src* 是关键枢纽,参与细胞信号转导与骨架重塑,并通过磷酸化调控神经元轴突生长与突触可塑性;斑马鱼研究表明,*src* 活性影响感觉神经元导向及外周神经系统发育,进而干扰外界刺激感知[31].而在 2,4,6-TCP 网络中,关键枢纽基因包括 *cdc25b*、*top2a* 和 *cdk1*.*cdc25b* 通过激活 *cdk1* 调控细胞周期进程,其异常表达可扰乱神经元分化与迁移[32];*top2a* 维持基因组稳定性,其功能缺失会导致神经嵴细胞迁移障碍与神经元凋亡[33];*cdk1* 作为有丝分裂核心激酶,其活性异常影响神经干细胞增殖与皮质发育[34].这些结果进一步从分子互作层面揭示了两者毒性机制的差异

对于 Hub 基因的 KEGG 富集分析显示,二者致毒机制存在较大差异.TCS 组 Top10Hub 基因主要在激素信号通路(Hormone signaling pathway)、NOD 样受体信号通路(NOD-like receptor signaling pathway)、坏死性凋亡通路(Necroptosis pathway)等通路富集.这一结果表明,TCS 可能通过介导 NOD 样受体通路过度激活及坏死性凋亡调控失衡,触发"神经炎症-氧化应激-细胞死亡"级联反应,导致斑马鱼出现运动行为异常、神经元分化障碍及发育畸形等表型改变.同时,还可能通过调控 *esr1* 等靶点的表达水平干扰雌激素稳态进而介导神经毒性效应.2,4,6-TCP Top10Hub 基因则主要富集与 Calcium signaling pathway 和 MAPK siganaling pathway.研究发现 MAPK 信号通路与神经损伤高度相关.MAPK 信号通路是细胞内高度保守的核心信号转导通路,与 200 余种通路存在调控联系.其在神经发育中至关重要,参与神经前体细胞分化、神经元迁移及突触形成,通过磷酸化级联反应调控神经干细胞命运与突触可塑性[35].在神经毒性中,该通路可被氧化应激、炎症因子激活,介导神经元损伤信号传导与凋亡启动.这一差异从分子层面进一步佐证了二者诱导神经毒性的作用机制存在本质区别.该发现为深入解析 TCS 与 2,4,6-TCP 的神经毒理学机制提供了关键的分子靶点依据,也为环境污染物神经毒性的差异化风险评估奠定了理论基础.

关键 Hub 基因 RT-qPCR 实验则进一步说明 TCS 和 2,4,6-TCP 暴露干扰斑马鱼神经元发育、运动行为和生理功能的机制,尽管二者对神经网络相关的四大家族基因的调控模式相同,但二者对其家族内部的亚基因作用不同.

4 结论

4.1 TCS 对斑马鱼 120hpf 幼鱼的半致死浓度(LC_{50}=0.591mg/L)低于 2,4,6-TCP(LC_{50}=1.137mg/L),表明其急性毒性更强.在发育毒性上,TCS 暴露组的总畸形率达 63%,显著高于 2,4,6-TCP 暴露组(56%).基准剂量分析进一步揭示,TCS 最敏感的致畸终点为心包囊肿,并显著抑制体长与眼睛大小;而 2,4,6-TCP 最敏感的终点为卵黄囊面积.二者敏感终点的分化提示其初始作用靶器官存在差异.

4.2 TCS 与 2,4,6-TCP 暴露均导致幼鱼运动距离与平均速度显著下降(如高浓度 TCS 组运动距离下降约 50%),并损害其对光暗刺激的反应能力.此行为异常拥有共同的细胞与生化基础:二者均显著抑制神经发育标记基因 *elavl3* 的表达(荧光强度下降>50%),诱导脑部细胞凋亡增加,并降低乙酰胆碱酯酶活性(高浓度 TCS 组抑制率达 55%),且 TCS 对乙酰胆碱酯酶活性的抑制强于 2,4,6-TCP,提示共有的神经毒性机制可能产生协同风险.

4.3 TCS 与 2,4,6-TCP 的化学根本差异,导致其激活了不同的分子毒性网络.TCS 激活氧化应激与凋亡通路,2,4,6-TCP 干扰神经递质与 MAPK 信号.TCS 依赖 *pparg*、*casp3a* 等基因富集 p53 通路,而 2,4,6-TCP 通过 *cdc25b*、*top2a* 调控细胞周期,70%的 Hub 基因不重叠印证了结构导向的靶点特异性.

参考文献:

[1] Yin Y, Ren H, Wu H, et al. Triclosan dioxygenase: A novel two-component rieske nonheme iron ring-hydroxylating dioxygenase initiates triclosan degradation [J]. Environmental Science &

Technology, 2024,58(31):13833−13844.
[2] Singer H, Müller S, Tixier C, et al. Triclosan: occurrence and fate of a widely used biocide in the aquatic environment: Field measurements in wastewater treatment plants, surface waters, and lake sediments [J]. Environmental Science & Technology, 2002,36(23):4998−5004.
[3] Marques I, Magalhães−Mota G, Pires F, et al. Detection of traces of triclosan in water [J]. Applied Surface Science, 2017,421:142−147.
[4] Li Q, Yu J, Chen W, et al. Degradation of triclosan by chlorine dioxide: reaction mechanism, 2, 4-dichlorophenol accumulation and toxicity evaluation[J]. Chemosphere, 2018, 207: 449-456.
[5] Pan Y, Yang L, Wang G. Self−assembly of nanovesicles for enhanced adsorption and efficient photodegradation of 2,4,6−trichlorophenol [J]. ACS applied materials & interfaces, 2024,(37):16.
[6] Zhang X, Zhang X, Niu Z, et al. 2,4,6−trichlorophenol cytotoxicity involves oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis [J]. International Journal of Toxicology, 2014,33(6):532−541.
[7] Wang J, Sun Z. Successful application of municipal domestic wastewater as a co-substrate in 2, 4, 6-trichlorophenol degradation[J]. Chemosphere, 2021,280:130707.
[8] Yueh M F, Tukey R H. Triclosan: A widespread environmental toxicant with many biological effects [J]. Annual Review of Pharmacology & Toxicology, 2016,56(1):251.
[9] Szychowski K A, Wnuk A, Kajta M, et al. Triclosan activates aryl hydrocarbon receptor (AhR)−dependent apoptosis and affects Cyp1a1and Cyp1b1expression in mouse neocortical neurons [J]. Environmental research, 2016,151:106−114.
[10] Zhao L, Duan H, Liu Y, et al. Long−term exposure of zebrafish (Danio rerio) to Cr (VI): reproductive toxicity and neurotoxicity [J]. Regional Studies in Marine Science, 2024,74:103559.
[11] Iannetta A, Caioni G, Vito V D, et al. Developmental toxicity induced by triclosan exposure in zebrafish embryos [J]. Birth defects research, 2022,114(5/6):175−183.
[12] Qian Q, Pu Q, Li X, et al. Acute/chronic triclosan exposure induces downregulation of m6A−RNA methylation modification via mettl3 suppression and elicits developmental and immune toxicity to zebrafish [J]. Chemosphere, 2024,352:141395.
[13] Chen H, Zhang X, Jia X, et al. Thyroid disrupting effects of polychlorinated biphenyls in ovariectomized rats: A benchmark dose analysis [J]. Environmental Toxicology & Pharmacology, 2015,40(3):733−740.
[14] 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 W, Chen C, et al. Toxic effects of acute exposure to azithromycin in zebrafish larvae. Chinese Environmental Science, 2024,44(3):1671−1678.
[15] 韩晓雯,徐婕妤,王伟伟,等.三氯生和双酚 A 对斑马鱼神经毒性的比较研究 [J]. 中国环境科学, 2024,44(2):1111−1121.
Han X W, Xu J S, Wang W W, et al. Effects of triclosan and bisphenol A on zebrafish neurotoxicity. Chinese Environmental Science, 2024, 44(2):1111−1121.
[16] Pullaguri N, Grover P, Abhishek S, et al. Triclosan affects motor function in zebrafish larva by inhibiting ache and syn2a genes [J]. Chemosphere, 2021,266:128930.
[17] Gendelev L, Taylor J, Myers−Turnbull D, et al. Deep phenotypic profiling of neuroactive drugs in larval zebrafish [J]. Nature Communications, 2024,15(1):9955.
[18] Grassi E, Santoro R, Umbach A, et al. Choice of alternative polyadenylation sites, mediated by the RNA-binding protein Elavl3, plays a role in differentiation of inhibitory neuronal progenitors[J]. Frontiers in cellular neuroscience, 2019, 12: 518.
[19] Ogawa Y, Yamaguchi J, Yano M, et al. Elavl3 regulates neuronal polarity through the alternative splicing of an embryo−specific exon in AnkyrinG [J]. Neuroscience Research, 2018,135:13−20.
[20] Hong P, Hu Z, Lin J, et al. Multi−omics revealed that ELAVL3 regulates MYCN in neuroblastoma via immunogenic cell death: Risk stratification and experimental research [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024,282:137045.
[21] Punessen N C, Pena C, Sandberg A, et al. A novel anti−apoptotic role for Cdc42/ACK−1signaling in neurons [J]. Molecular and Cellular Neuroscience, 2023,126:103865.
[22] Nakano F, Kanamaru H, Kawakita F, et al. Epidermal growth factor receptor mediates neuronal apoptosis after subarachnoid hemorrhage in mice [J]. Stroke, 2023,54(6):1616−1626.
[23] Ledonne A, Mercuri N B. On the modulatory roles of neuregulins/ErbB signaling on synaptic plasticity [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019,21(1):275.
[24] Zhang Y, Liu M, Liu J, et al. Combined toxicity of triclosan, 2,4−dichlorophenol and 2,4,6−trichlorophenol to zebrafish (Danio rerio). [J]. Environmental Toxicology & Pharmacology, 2018,57(JAN.):9−18.
[25] Wengrovitz A, Ivantsova E, Crespo N, et al. Differential effects of dopamine receptor agonists ropinirole and quinpirole on locomotor and anxiolytic behaviors in larval zebrafish (Danio rerio): A role for the GABAergic and glutamate system? [J]. Neurotoxicology and teratology, 2023,98:107183.
[26] Xu J. Comment on “neurotoxicity of 4-nonylphenol in adult zebrafish: Evaluation of behaviour, oxidative stress parameters and histopathology of brain” by Jay K. Desai. et al. [Environmental Pollution 334(2023):122206] [J]. Environmental Pollution, 2024,343:123214.
[27] Lu Y L, Liu Y, Mccoy M J, et al. MiR−124synergism with ELAVL3 enhances target gene expression to promote neuronal maturity [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 118(22):e2015454118.
[28] Liu H, Tang T. MAPK signaling pathway−based glioma subtypes, machine−learning risk model, and key hub proteins identification [J]. Scientific Reports, 2023,13(1):19055.
[29] Hui T, Jing H, Lai X. Neuromuscular junction−specific genes screening by deep RNA−seq analysis [J]. Cell & Bioscience, 2021,11(1):1−15.
[30] Apell J N, Kliegman S, Sola−Gutierrez C, et al. Linking triclosan's structural features to its environmental fate and fhotoproducts [J]. Environmental Science And Technology, 2020,54(22):14432−14441.
[31] Moysenovich A M, Tatarskiy V V, Yastrebova M A, et al. Akt and Src mediate the photocrosslinked fibroin−induced neural differentiation [J]. Neuroreport, 2020,31(10):770−775.
[32] Roussat M, Jungas T, Audouard C, et al. Control of G2phase duration by CDC25B modulates the switch from direct to indirect neurogenesis in the neocortex [J]. Journal of Neuroscience, 2023,43(7):1154−1165.
[33] Keck J M, Conner J D, Wilson J T, et al. Clarifying the mechanism of copper (II) α−(N)−heterocyclic thiosemicarbazone complexes on DNA topoisomerase IIα and IIβ [J]. Chemical Research in Toxicology, 2019, 32(10):2135−2143.
[34] Marlier Q, Jibassia F, Verteneuil, Sébastien, et al. Genetic and pharmacological inhibition of Cdk1provides neuroprotection towards ischemic neuronal death [J]. Cell Death Discovery, 2018,4(1):43.
[35] Gallagher E R, Oloko P T, Fitch T C, et al. Lysosomal damage triggers a p38MAPK−dependent phosphorylation cascade to promote lysophagy via the small heat shock protein HSP27 [J]. Current Biology, 2024,34(24):5739−5757.

作者简介：代卓雅(1997−),女,安徽宿州人,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.1173892468@qq.com.