

PFOS/PFOA 对斑马鱼 (*Brachydanio rerio*) 胚胎致毒效应研究

叶露, 吴玲玲, 蒋雨希, 张超杰, 陈玲*

(同济大学环境科学与工程学院, 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 上海 200092)

摘要: 采用斑马鱼胚胎毒性测试方法, 研究了 PFOA/PFOS 对斑马鱼的急性毒性和生命早期阶段生长发育的影响。结果表明, PFOS/PFOA 对斑马鱼有明显毒性作用, LC_{50} (48 h) 分别为 1 005 mg/L 和 107 mg/L, LC_{50} (96 h) 分别为 499 mg/L 和 71 mg/L。PFOS/PFOA 抑制斑马鱼胚胎发育, 可导致胚胎发育畸形, 甚至死亡。高浓度 (> 240 mg/L) PFOS 损伤细胞膜, 导致胚胎分裂中的细胞发生自溶而卵凝死亡, 抑制胚胎原肠胚的形成。在各种亚致死效应中, 脊柱畸形对 PFOS 暴露最敏感, 其 EC_{50} = 9.14 mg/L, PFOA 暴露最敏感亚致死性毒理学终点为 96 h 孵化, 对应 EC_{50} = 328.0 mg/L。PFOA/PFOS 导致胚胎发育延迟, 具有发育毒性。

关键词: 全氟辛酸, 全氟辛基磺酸, 斑马鱼胚胎, 水生毒性

中图分类号: X171.5; X174 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)06- -

Toxicological Study of PFOS/PFOA to Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Embryos

YE Lu, WU Ling-ling, JIANG Yu-xi, ZHANG Chao-jie, CHEN Ling

(College of Environmental Science and Engineering, State Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: Acute toxicity of PFOS/PFOA to zebrafish (*Brachydanio rerio*) and development effects to zebrafish embryo were examined using a zebrafish embryo test. PFOS/PFOA showed remarkably toxicity effects on zebrafish. The LC_{50} (48 h) values are 1 005 mg/L for PFOA, 107 mg/L for PFOS, while the LC_{50} (96 h) values are 499 mg/L for PFOA, 71 mg/L for PFOS. Moreover PFOS/PFOA inhibited embryo development, and caused embryo abnormality and death. After exposure to high concentration of PFOS (> 240 mg/L), cells in animal pole of embryos autolyzed to coagulate, which indicated PFOS caused cell membranes damage. The most sensitive endpoints for PFOS exposure is spinal column malformation, and the EC_{50} values is 9.14 mg/L. While for PFOA hatching (96 h) is the most sensitive, and the EC_{50} values is 328.0 mg/L. Both PFOS and PFOA retarded embryo development which indicates their development toxicity.

Key words: PFOA; PFOS; zebrafish embryos; aquatic toxicity

2004 年著名的美国“杜邦特氟龙事件”引起了人们对全氟化合物 (PFCs) 的高度重视^[1]。全氟辛基磺酸 ($C_8F_{17}SO_3H$, PFOS) 和全氟辛酸 ($C_8F_{17}COOH$, PFOA) 是引起环境污染的重要的 PFCs^[2-5], 在水体^[6]、生物体^[7]、人体组织^[8]和食物^[9]中广泛检出, 同时具有难降解性和生物蓄积性, 被认为是一类新型持久性有机污染物^[10]。近年来部分 PFCs 已经被逐渐淘汰, 但由于其在水环境中持久性及生物蓄积性, PFOS 和 PFOA 仍将是未来水生态环境污染研究的热点问题^[11-13]。

尽管 PFOS 和 PFOA 污染普遍存在, 关于 PFOS 和 PFOA 毒性研究数据并不多^[14-16]。以小型或低等水生动物^[17-19]、鱼类体细胞^[14, 15, 20]、鱼类^[16, 21]等水生生物为实验动物的文献以测试 PFOS/PFOA 的急性毒性^[17, 18, 22]、基因毒性^[17, 22]和肝脏毒性^[15, 17, 20], 以及抑制脂肪酸代谢^[16]等。结果表明 PFOS/PFOA 对于水生生物存在一定毒性, 但缺少关于发育毒性的研究。啮齿类动物实验表明 PFOS 和 PFOA 导致雄性大鼠

精子减少, 发育减缓^[23], 初生小鼠存活率下降, 发育延缓, 具有发育和生殖毒性^[11-14], 此外, PFOS 和 PFOA 对肝脏影响显著, 可导致实验动物肝肿大, 体重显著下降^[24, 25], Hoff 等^[15]报道鱼血清中肝损伤指示物——转氨酶活性与肝脏 PFOS 含量正相关^[15], PFOA 影响脂肪酸代谢酶, 进而损伤肝脏^[26]。PFOS 使得雌性成鱼卵巢病变^[27]。Oakes 等^[16, 28]报道了呆头鱼血清中性激素水平受 PFOS 和 PFOA 暴露改变。鲤鱼 (*Gobiocypris rarus*) 暴露在 PFOA, 病理切片显示肝有损伤, 进一步 DNA 测试显示与脂肪酸代谢关系密切的基因受损^[21]。PFOS 和 PFOA 暴露可使小型水生无脊椎生物的活动能力降低^[17, 22]。

本研究利用国际标准模式鱼——斑马鱼

收稿日期: 2008-07-08; 修订日期: 2008-10-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20807032), 科技部中俄科技合作计划项目 (2007DFR90050)

作者简介: 叶露 (1982~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向污染防治和水生毒理学, E-mail: karen_yl@163.com

* 通讯联系人, E-mail: zhenling@tongji.edu.cn

(*Brachydanio rerio*) 开展 PFOA 和 PFOS 的水生毒理学研究,旨在研究 PFOS 和 PFOA 对斑马鱼胚胎急性毒性,考察不同发育阶段模式鱼对毒物的敏感性差异,初步探讨其作用机制,以期为进一步开展此类物质低浓度、慢性水生毒性研究奠定基础,为制定安全的环境影响评价浓度并对其进行生态风险评价与管理提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验试剂及仪器

PFOS 为 40% 的水溶液,购买自 Flucka 公司。PFOA 为纯度 > 97% 的固体,购买于 Merck 公司。本试验所用 PFOS 和 PFOA 的标准储备液浓度分别为 1 500 mg/L、480 mg/L。

标准稀释水参照文献 [29] 中的方法配制。本实验采用专用鱼卵收集器收集鱼卵,采用 24 孔聚丙烯细胞培养板作为染毒器具,Nikon TE2000-U 倒置显微镜进行观察,Nikon D200 数码相机拍照。

1.2 试验方法

1.2.1 斑马鱼饲养及鱼卵采集

斑马鱼是常见的暖水性(21~32℃)观赏鱼,鲤科,个体小(4~5 cm),孵化后 3 个月性成熟,常年产卵,鱼卵易收集,而且小规模饲养技术简单。鱼种属 AB 品系斑马鱼,系复旦大学生命科学院卢大儒教授课题组惠赠。用于本次试验鱼卵采集的成鱼已在本实验室饲养了 6 个月以上。挑选鱼龄相近成年斑马鱼(雌雄鱼数比 1:2)饲养在曝气的水体内,水温保持在(26±1)℃,pH 值控制在 7~8 之间。每日喂食 2 次经过消毒处理的冷冻红线虫。光照/黑暗周期控制(h)14:10。为防止成鱼掠食鱼卵,用网覆盖收集器。成鱼在给光照 30 min 内完成交配和产卵,1 h 内将鱼卵取出,用重组水迅速清洗以除去残余物,用于进行毒性实验。

斑马鱼胚胎整个实验过程中的试验用水,包括稀释水和清洁用水,均为统一配制、充分氧饱和、温度保持(26±1)℃的标准稀释水。

1.2.2 胚胎染毒实验设计

按照 Schulte 等^[30]长期研究方法指导设置胚胎染毒实验。在 Nikon TE2000-U 倒置显微镜观察,挑选发育正常的受精卵进行实验。选用 24 孔细胞培养板作为染毒器具,实验时每孔加入 2 mL 试液,放入 4 枚受精卵。试验设置 5 个不同浓度,每个浓度处理放置 16 枚卵,3 次重复,同时另设 16 枚卵作为空白对照。锡箔纸封面以免挥发改变实验浓度。多孔板培养

环境温度为(26±1)℃,光照/黑暗周期(h)14:10。每 24 h 更换 1 次溶液。在倒置显微镜下观察胚胎发育 120 h 内的毒理学终点,并拍照记录。以上试验进行 3 次重复。

1.3 统计检验

采用统计检验水平为 0.05。采用 Kolmogorov-Smirnov 检验数据分布形式。对不同分布形式用 ANOVA 和 Kruskal-Wallis 检验,Dunnett 做后决检验。所有相关性分析和统计检验采用 SPSS 10.0 软件完成。非线性拟合采用 Origin 7.5 软件完成。图片处理采用 Photoshop 完成。

2 结果与讨论

2.1 实验质量控制措施

实验通过控制对照组胚胎死亡率实现毒性实验质量控制。本实验中对照组样本总量为 216,48 h 死亡率为 1.1%,96 h 死亡率为 2.7%,满足 OECD 测试标准要求。

2.2 PFOS 和 PFOA 对斑马鱼胚胎的毒性效应

2.2.1 PFOS 和 PFOA 急性毒性

根据预试验的结果,选取 1.5、45、100、200、300、400、800、1 000、1 350、1 500 mg/L PFOA,及 10、85、100、110、160、200、240 mg/L PFOS 对斑马鱼胚胎进行染毒试验。PFOA 染毒组样本总量为 640 枚,PFOS 染毒组样本总量为 448 枚。

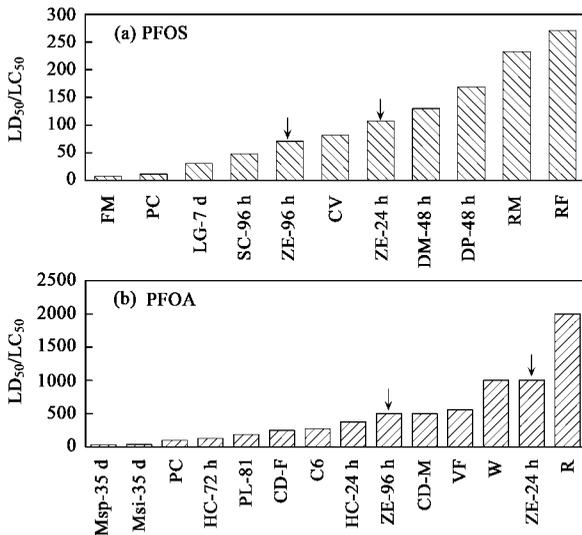
本研究选择非线性函数来描述剂量-效应曲线^[31],计算半数致死浓度 LC₅₀,包括 24 h 致死率、48 h 致死率、96 h 致死率等指标^[32,33]。通过拟合函数给出定量的急性毒性结果,列于表 1。

如表 1 所示,PFOS 和 PFOA 对斑马鱼胚胎的毒性随浓度增加而增加,随暴露时间延长而增加。24 h PFOA 的急性毒性 LC₅₀ = 790 mg/L,远低于 PFOS 相应的 LC₅₀ 值,PFOS 毒性远高于 PFOA。据文献 [7,34,35] 报道对大鼠急性毒性实验表明,PFOA 属低毒性,PFOS 属于中等毒性化合物;通过文献 [14,16~19,34~37] 结果的综合比较,可得出一致结果,即无论是哺乳动物、鱼类或是原生动物的试验体系,PFOS 均表现出较 PFOA 更强的毒性。

通过比较不同生物试验方法(图 1),可以看出斑马鱼胚胎对 PFOS 毒性较为敏感。在各种水生生物急性毒性试验方法中,斑马鱼胚胎检测技术属于敏感性很高的方法。如 PFOS 对斑马鱼胚胎的急性毒性 LC₅₀(96 h) 值介于绿藻 *S. capricornutum* 和绿藻 *C. vulgaris* 之间,但是斑马鱼属于更高等生物,其

表1 PFOA 和 PFOS 对斑马鱼胚胎致死性效应半数致死浓度(LC₅₀)Table 1 Media lethal concentration(LC₅₀) of PFOS and PFOA to zebrafish embryos

毒理学终点	PFOA				PFOS			
	LC ₅₀ /mg·L ⁻¹	95%置信区间	r ²	相伴概率 p	LC ₅₀ /mg·L ⁻¹	95%置信区间	r ²	相伴概率 p
24 h 致死	790	773,807	0.996 3	0.00	107	106,108	0.993 9	0.00
24 h 卵凝结	1 005	962,107 3	0.966 8	0.00	107	106,109	0.972 3	0.02
48 h 致死	790	773,807	0.996 3	0.00	107	104,110	0.979 0	0.00
48 h 卵凝结	1 005	970,104 1	0.966 7	0.00	106	104,109	0.942 5	0.01
96 h 致死	499	457,538	0.993 0	0.00	71	60,82	0.953 5	0.00
120 h 致死	200	181,219	0.977 8	0.00	20	17,23	0.986 0	0.00



实验生物全称与缩写对照表见表2

图1 PFOS 对和 PFOA 不同生物的毒性比较

Fig. 1 Toxicity of PFOS and PFOA to different test organism

表2 实验生物全称与缩写对照表

Table 2 Full name and its abbreviation of test organism

缩写	试验生物全称
CV	绿藻 <i>Chlorella vulgaris</i>
C6	大鼠胶质瘤细胞株 C6
CD-F	雄性克罗斯病大鼠
CD-M	雌性克罗斯病大鼠
DM	水蚤 <i>Daphnia magna</i>
DP	水蚤 <i>Daphnia pulicaria</i>
FM	黑头呆鱼
HC	人结肠癌细胞株 HCT116
LG	大型挺水植物 <i>Lemna gibba</i>
Msi	水生植物 <i>Myriophyllum sibiricum</i>
Msp	水生植物 <i>Myriophyllum spicatum</i>
PC	草履虫 KNZ 82
PL-81	大鼠早幼粒细胞白血病细胞株 IPC-81
RM	雄性大鼠
RF	雌性大鼠
R	兔
SC	绿藻 <i>Selenastrum capricornutum</i>
VF	<i>V. fischeri</i> 细菌 NRRLB-11177 型
W	Wistar 大鼠
ZE	斑马鱼胚胎

生理活动复杂,对评价 PFOS 的环境毒性有更高借鉴意义。

斑马鱼胚胎急性毒性试验方法对 PFOA 毒性敏感性则不高,LC₅₀(96 h)值与对大鼠急性毒性相当,远高于多个细胞株试验体系的试验结果。

2.3.2 PFOS 和 PFOA 对斑马鱼胚胎的致死性效应

在本试验设计浓度内 PFOA 及 PFOS 均对斑马鱼胚胎有致死影响。受精卵产出后 2 h 染毒,胚胎发育到 4 h 时发生卵凝结。PFOA 浓度高于 1 000 mg/L 时,胚胎约在 4 h 时开始出现卵凝结。相同现象,PFOS 的浓度为高于 160 mg/L。

实验中还观察到,高浓度(>240 mg/L)PFOS 染毒,可直接损伤斑马鱼胚胎动物极的细胞结构,导致胚胎分裂中的细胞发生自溶,随后发生卵凝结(4 h)抑制斑马鱼胚胎原肠胚的形成,结果如图 2(b)~(d)所示。这可能是由于胚胎处于囊胚期,细胞高度分裂,毒物作用的压力可使胚胎在进入外包期前就停止发育,并伴随着胚盘细胞损毁和卵凝结^[32]。

2.3.2 PFOS 和 PFOA 对斑马鱼胚胎的亚致死效应

根据 EC₅₀值(表 3),按照各个毒理学终点敏感性从高到低顺序排列,PFOS 为:脊柱畸形>96 h 孵化>48 h 水肿>48 h 尾部畸形>48 h 无血液循环。对于 PFOA,各个毒理学终点敏感性从高到低次序为 96 h 孵化>脊柱畸形>48 h 水肿>48 h 尾部畸形>48 h 无血液循环。

胚胎在毒物作用下直接致死,这些致死性反应掩盖了部分非致死性反应,使得部分亚致死毒理学终点发生率较低,无法计算 EC₅₀值。首先,24 h 尾部未延展或未延展完这个毒理学终点,PFOS 组发生率最高值 5.5%(100 mg/L 组)。PFOA 暴露组 1 000 mg/L 组和 1 500 mg/L 组各出现 1 例尾部未延展胚胎。其次,PFOA 暴露组 48 h 无血液循环和 48 h 尾部畸形 2 个毒理学终点的最高发生率分别为 16.7%和 33%。

在 8~120 h 这段发育时期内,PFOS 和 PFOA 暴露均导致斑马鱼胚胎发育延迟,主要表现为暴露

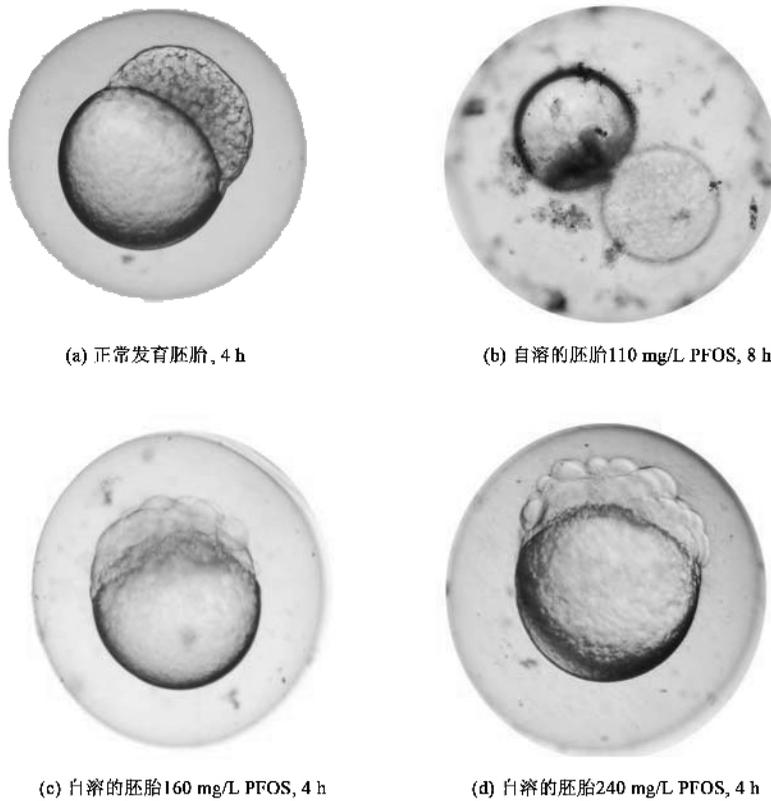


图 2 胚胎动物极细胞的自溶现象

Fig.2 Autolyzed cells in animal pole of embryos

表 3 2 种典型全氟辛基化合物对斑马鱼胚胎亚致死性反应的半数反应浓度(EC_{50})

Table 3 Media effect concentration of two typical perfluorooctane chemicals to zebrafish embryos

毒理学终点	PFOA			PFOS		
	$EC_{50}/mg \cdot L^{-1}$	95% 置信区间	r^2	$EC_{50}/mg \cdot L^{-1}$	95% 置信区间	r^2
48 h 亚致死	151	115 ,200	0.957 2	1 001	501 ,2 089	0.992 4
120 h 亚致死	147	110 ,186	0.945 1	813	162 ,104 7	0.998 3
48 h 无血液循环	159	123 ,191	0.998 6	—	—	—
48 h 水肿	149	145 ,155	0.993 9	1 409	813 ,134 9	0.897 2
48 h 尾部畸形	153	63 ,282	0.981 0	—	—	—
96 h 孵化	106	13 ,617	0.986 9	328	89 ,112 2	0.959 7
脊柱畸形	9.14	2.14 ,41.7	0.987 2	884	195 ,223 9	0.772 2

12 h 后,对照组胚胎发育处于 100% 外包期,此时部分暴露组胚胎外包活动偏缓慢,仍处于 50% 外包期.暴露试验 24 h 时,对照组胚胎处于成形期,尾部向体后延伸,脑干、心脏、血液循环已逐渐形成.此时暴露组部分胚胎尚处于分节期,肌节未达到 26 个,肌节发育尚未完成,尾部未延展,无自主运动.暴露 48 h 后,对照组胚胎体表和眼部有黑色素沉积,黑色素形成,长出胸鳍.而发育延迟胚胎主要表现为黑色素沉积很少或无黑色素沉(眼睛黑色素明显少于正常胚胎),且尚未完成耳石发育,尾部完全延展,但血液循环未开始或血液循环开始,但血细胞尚未形成.

心脏器官发育成形,并开始规律跳动,但平均心率低于对照组,如图 3 所示.

胚胎发育 48 h 时,对照组的心率为(132 ± 13)次/min,PFOS 和 PFOA 暴露组(即图 3 中染毒对照组)的心率分别为(128 ± 12)次/min 和(129 ± 21)次/min.但是出现发育延迟症状的胚胎平均 48 h 心率值: PFOA 暴露组(110 ± 16)次/min, PFOS 暴露组(87 ± 11)次/min.通过分别与空白对照组及暴露组未延迟胚胎 48 h 心率进行统计检验,结果表明差异的相伴概率均小于 0.01.由此可推测,出现 48 h 心率过低的胚胎是因发育延迟造成,而非污染物损伤

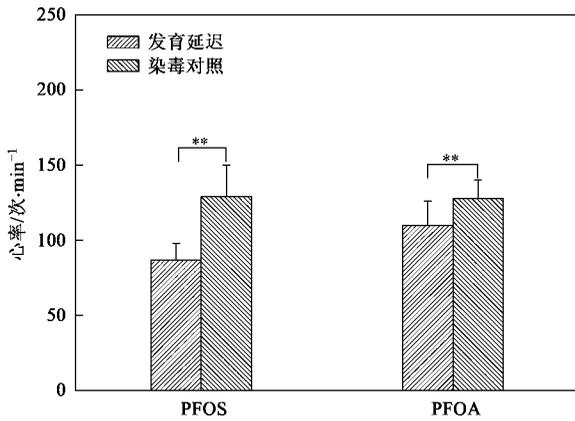
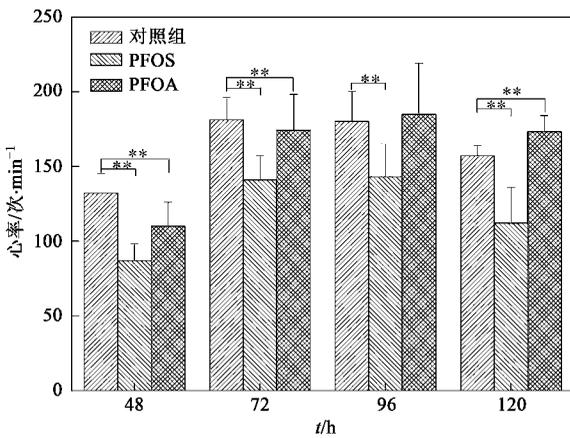


图3 发育延迟和染毒对照斑马鱼胚胎的48 h心率

Fig.3 Heart rate (48 h) for growth retard and normal development zebrafish

胚胎心脏功能而造成。

持续观测发育延迟的胚胎,通过比较48~120 h期间对照组胚胎心率与发育延迟胚胎心率,如图4所示,PFOS暴露组心率值始终低于同时期的对照组胚胎心率值,表现出对胚胎发育的抑制作用。暴露试验到72 h,各处理组仔鱼陆续孵化,仔鱼外形上差异较小,很难从形态指标上再进行区分。



** 表示检验水平 $p = 0.01$

图4 发育延迟斑马鱼胚胎48~120 h心率

Fig.4 Heart rate of growth retarded embryos at 48-120 h

3 结论

(1) PFOS和PFOA对斑马鱼胚胎发育的有害影响随浓度升高而增强,即存在浓度-效应正相关的影响。PFOA和PFOS的 LC_{50} (48 h)分别为1005 mg/L和107 mg/L, LC_{50} (96 h)分别为499 mg/L和71 mg/L。不同生物毒性试验结果一致表明PFOS毒性强于

PFOA毒性。在各种亚致死效应中,脊柱畸形对PFOS暴露最敏感,其 $EC_{50} = 9.14$ mg/L, PFOA暴露最敏感亚致死性毒理学终点为96 h孵化,对应 $EC_{50} = 328$ mg/L。

(2) 高浓度(>240 mg/L)PFOS染毒损伤动物细胞膜,导致胚胎细胞自溶,进而凝结死亡,抑制斑马鱼胚胎原肠胚的形成。斑马鱼胚胎急性毒性试验方法对PFOS毒性较为敏感,可以作为一种指示水中PFOS污染的生物标志物。

(3) PFOA和PFOS暴露均导致胚胎发育延迟,具有发育毒性。

参考文献:

- [1] Stokstad E. DuPont settlement to fund test of potential toxics[J]. Science, 2006, 311(5757): 26-27.
- [2] Van de Vijver K I, Hoff P, Das K, et al. Tissue distribution of perfluorinated chemicals in harbor seals (*Phoca vitulina*) from the Dutch Wadden Sea[J]. Environ Sci Technol, 2005, 39(18): 6978-6984.
- [3] Yeung L W Y, So M K, Jiang G B, et al. Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in human blood samples from China[J]. Environ Sci Technol, 2006, 40(3): 715-720.
- [4] Key B D, Howell R D, Criddle C S. Fluorinated Organics in the Biosphere[J]. Environ Sci Technol, 1997, 31(9): 2445-2454.
- [5] Kannan K, Franon J C, Bowerman W W, et al. Perfluorooctane sulfonate in fish-eating water birds including bald eagles and albatrosses[J]. Environ Sci Technol, 2001, 35(15): 3065-3070.
- [6] Wania F. A Global mass balance analysis of the source of perfluorocarboxylic acids in the Arctic ocean[J]. Environ Sci Technol, 2007, 41(13): 4529-4535.
- [7] Lau C, Butenhoff J L, Rogers J M. The developmental toxicity of perfluoroalkyl acids and their derivatives[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2004, 198(15): 231-241.
- [8] Maestri L, Negri S, Ferrari M, et al. Determination of perfluorooctanoic acid and perfluorooctanesulfonate in human tissues by liquid chromatography/single quadrupole mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2006, 20(18): 2728-2734.
- [9] Kärman A, Ericson I, Bert V B, et al. Exposure of perfluorinated chemicals through lactation, levels of matched human milk and serum and a temporal trend, 1996-2004, in Sweden[J]. Environ Health Persp, 2007, 115(2): 226-230.
- [10] 周启星, 胡献刚. PFOS/PFOA 环境污染行为与毒性效应及机理研究进展[J]. 环境科学, 2007, 28(10): 2153-2162.
- [11] Luebker D J, York R G, Hansen K J, et al. Neonatal mortality from in utero exposure to perfluorooctanesulfonate in Sprague-Dawley rats: Dose response, and biochemical and pharmacokinetic parameters[J]. Toxicology, 2005, 215(1-2): 149-169.
- [12] Grasty R C, Bjork J A, Wallace K B, et al. Effects of prenatal perfluorooctane sulfonate (PFOS) exposure on lung maturation in the perinatal rat[J]. Birth Defects Research Part B-Developmental and Reproductive, 2005, 74(5): 405-416.

- [13] Lau C , Thibodeaux J R , Hanson R G , *et al.* Effects of perfluorooctanoic acid exposure during pregnancy in the mouse [J]. *Toxicol Sci* , 2006 **90** (2) :510-518.
- [14] Mulkiewicz E , Jastorff B , Składanowski A C , *et al.* Evaluation of the Acute Toxicity of Perfluorinated Carboxylic Acids Using Eukaryotic Cell Lines , Bacteria and Enzymatic Assays [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology* , 2007 **23** (3) :279-285.
- [15] Hoff P T , Van Dongen W , Esmans E L , *et al.* Evaluation of the Toxicological Effects of Perfluorooctane Sulfonic Acid in the Common Carp (*Cyprinus Carpio*) [J]. *Aquatic Toxicology* , 2003 **62** (4) :349-359.
- [16] Oakes K D , Sibley P K , Martin J W , *et al.* Short-Term Exposures of Fish to Perfluorooctane Sulfonate : Acute Effects on Fatty Acyl-Coa Oxidase Activity , Oxidative Stress , and Circulating Sex Steroids [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry* , 2005 **24** (5) :1172-1181.
- [17] Matsubara E , Harada K , Inoue K , *et al.* Effects of Perfluorinated Amphiphiles on Backward Swimming in Paramecium Caudatum [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications* , 2006 , **339** (2) :554-561.
- [18] Boudreau T M , Sibley P K , Mabury S A , *et al.* Laboratory Evaluation of the Toxicity of Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) on *Selenastrum Capricornutum* , *Chlorella Vulgaris* , *Lemna Gibba* , *Daphnia Magna* , and *Daphnia Pulicaria* [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* , 2003 **44** (3) :307-313.
- [19] Hanson M L , Small J , Sibley P K , *et al.* Microcosm Evaluation of the Fate , Toxicity , and Risk to Aquatic Macrophytes from Perfluorooctanoic Acid (PFOA) [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* , 2005 **49** (3) :307-316.
- [20] Tomy G T , Tittlemier S A , Palace V P , *et al.* Biotransformation of N-Ethyl Perfluorooctanesulfonamide by Rainbow Trout (*Onchorhynchus Mykiss*) Liver Microsomes [J]. *Environ Sci Technol* , 2004 **38** (3) :758-762.
- [21] Wei Y H , Liu Y , Wang J S , *et al.* Toxicogenomic analysis of the hepatic effects of perfluorooctanoic acid on rare minnows (*Gobiocypris rarus*) [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology* , 2008 , **226** (3) :285-297.
- [22] Li M H . Effects of nonionic and ionic surfactants on survival , oxidative stress , and cholinesterase activity of planarian [J]. *Chemosphere* , 2008 **70** (10) :1796-1803.
- [23] 范轶欧 , 金一和 , 麻懿馨 , 等 . 全氟辛酸磺酸对雄性大鼠生精功能的影响 [J]. *卫生研究* , 2005 **34** (1) :37-39.
- [24] Han X , Kemper R A , Jepson G W . Subcellular distribution and protein binding of perfluorooctanoic acid in rat liver and kidney [J]. *Drug Chem Toxicol* 2005 **28** (2) :197-209.
- [25] Guruge K S , Yeung L W , Yamanaka N , *et al.* Gene expression profiles in rat liver treated with perfluorooctanoic acid (PFOA) [J]. *Toxicol Sci* , 2006 **89** (1) :93-107.
- [26] Kudo N , Kawashima Y . Toxicity and Toxicokinetics of Perfluorooctanoic Acid in Humans and Animals [J]. *Journal of Toxicology Science* , 2003 **28** (2) :49-57.
- [27] Ankley G T , Kuehl D W , Kahl M D , *et al.* Reproductive and developmental toxicity and bioconcentration of perfluorooctanesulfonate in a partial life-cycle test with the fathead minnow (*Pimephales promelas*) [J]. *Environ Toxicol Chem* 2005 **24** (9) :2316-2324.
- [28] Oakes K D , Sibley P K , Solomon K R , *et al.* Impact of perfluorooctanoic acid on fathead minnow (*Pimephales promelas*) fatty acyl-CoA oxidase activity , circulating steroids , and reproduction in outdoor microcosms [J]. *Environ Toxicol Chem* 2004 , **23** (8) :1912-1919.
- [29] GB/T 13267-91 水质物质对淡水鱼(斑马鱼)急性毒性测定方法 S] .
- [30] Schulte C , Nagel R . Testing Acute Toxicity in the Embryo of Zebrafish , *Brachydanio Rerio* , as an Alternative to the Acute Fish Test : Preliminary Results [J]. *ATLA* , 1994 **22** :12-19.
- [31] 王宇 , 刘树深 , 高树梅 , 等 . 硫代磷酸酯类化合物对斑马鱼的急性毒性及 QSAR 分析 [J]. *生态毒理学报* , 2006 , **1** (2) :140-143.
- [32] Kimmel C B , Ballard W W , Kimmel S R , *et al.* Stages of Embryonic Development of the Zebrafish [J]. *Developmental Dynamics* , 1995 , **203** (3) :253-310.
- [33] Braunbeck T , Lammer E . Background Document on Fish Embryo Toxicity Test [R]. German Federal Environment Agency , 2006.
- [34] Glaza S . Acute Oral Toxicity Study of T-6669 in Rats [R]. US EPA Public Docket AR226-0420 , 1997.
- [35] Glaza S . Acute Dermal Toxicity Study of T-6342 in Rabbits [R]. Coming Hazelton Inc . , Madison , WI . Project ID : HW1 50800374 . 3M Company . St . Paul , MN . US EPA . AR 226-0427 , 1995.
- [36] Dean W P , Jessup D C , Thompson G , *et al.* Acute Oral Toxicity (LD50) Study in Rat [R]. USEPA AR226-0419 , 1978.
- [37] Kleszczynski K , Gardzielewski P , Mulkiewicz E , *et al.* Analysis of Structure-Cytotoxicity in Vitro Relationship (SAR) for Perfluorinated Carboxylic Acid [J]. *Toxicology in Vitro* , 2007 **21** (6) :1206-1211.