

PFASs 对土壤白符跳 *Folsomia candida* 氧化应激及繁殖相关基因的影响^①

梁芳^{1,2}, 杨扬³, 李柱^{1*}, 王孜楠⁴, 柯欣^{1,5}, 吴峻³, 吴龙华¹, 骆永明¹

(1 土壤与农业可持续发展全国重点实验室(中国科学院南京土壤研究所), 南京 211135; 2 中国科学院大学, 北京 100049; 3 上海市生物医药技术研究院, 上海 200032; 4 西南大学资源与环境学院, 重庆 400716; 5 中国科学院分子植物卓越创新中心, 上海 200032)

摘要: 全氟和多氟烷基化合物(PFASs)对于土壤白符跳具有显著的生殖毒性。本文探究了 PFASs 对白符跳氧化应激和生殖相关基因表达的影响, 以期从分子水平上揭示 PFASs 对白符跳的生殖毒性。研究结果表明, 在 3 种 PFASs(PFOA、PFBA、F-53B)诱导下, 白符跳氧化应激相关的细胞色素 P450 单加氧酶基因(*CYP6N4V1*、*CYP6N3V2*)表达上调, 其中 F-53B 诱导组上调幅度最大, 分别为 4.94 倍和 11.07 倍; PFASs 显著抑制了白符跳繁殖相关基因组织蛋白酶 *CTSL* 的表达, 在 PFOA、PFBA、F-53B 处理下, *CTSL* 表达量仅为对照组的 64%、39.0% 和 15.0%。表明 PFASs 对土壤白符跳氧化应激及生殖相关基因的表达具有显著影响, 且 F-53B 对白符跳相对而言具有更大的毒性。*CYP6N3V2*、*CYP6N4V1*、*CTSL*、*VMO1* 和 *Vitrec* 等 5 个差异表达基因可作为基于 PFASs 暴露的土壤白符跳早期预警指标的靶标基因。

关键词: 全氟和多氟烷基化合物(PFASs); 土壤动物; 白符跳; 氧化应激; 基因表达

中图分类号: X171.5 **文献标志码:** A

Effects of PFASs on Genes Related to Oxidative Stress and Reproduction in *Folsomia Candida*

LIANG Fang^{1,2}, YANG Yang³, LI Zhu^{1*}, WANG Zinan⁴, KE Xin^{1,5}, WU Jun³, WU Longhua¹, LUO Yongming¹

(1 State Key Laboratory of Soil and Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 211135, China; 2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3 Shanghai Institute for Biological and Pharmaceutical Technologies, Shanghai 200032, China; 4 College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400716, China; 5 Center for Excellence in Molecular Plant Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract: Per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) exhibited significant reproductive toxicity to the soil springtail *Folsomia candida*. This study represented an initial exploration into the oxidative stress and reproduction-related gene expression induced by PFASs and their substitutes, aiming to elucidate the molecular-level reproductive toxicity of PFASs. The findings revealed that three PFASs (PFOA, PFBA, F-53B) induced up-regulation in cytochrome P450 monooxygenase (*CYP6N4V1*, *CYP6N3V2*), genes associated with oxidative stress, with F-53B exhibiting the highest up-regulation amplitude (4.94 and 11.07 times respectively). Additionally, PFASs significantly suppressed the activity of Cathepsin L (*CTSL*), a gene associated with reproduction. The expression level of *CTSL* was observed to be only 64%, 39.0%, and 15% respectively compared to that of the control group levels when exposed to PFOA, PFBA, and F-53B treatments. These results indicated that perfluorinated compounds exert substantial regulatory effects on oxidative stress and reproductive-related genes in *Folsomia candida* inhabiting soil environments. Five differentially expressed genes (*CYP6N3V2*, *CYP6N4V1*, *CTSL*, *VMO1*, and *Vitrec*) can serve as target genes for early warning indicators regarding exposure to PFASs in soil-dwelling collembolan species such as *Folsomia candida*.

Key words: Per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs); Soil animals; *Folsomia candida*; Oxidative stress; Gene expression

①基金项目: 国家自然科学基金项目(41977136, 41991334)资助。

* 通信作者(lizhu@issas.ac.cn)

作者简介: 梁芳(1993—), 女, 湖南益阳人, 博士研究生, 主要从事土壤污染评价和环境毒理的研究。E-mail: fliang@issas.ac.cn

全氟和多氟烷基化合物(Per-and polyfluoroalkyl substances, PFASs)是含有多个 C-F 键的有机化合物,是一种双疏表面活性剂,广泛应用于消防泡沫、防水衣物和不粘锅具等产品中^[1]。PFASs 难降解,在土壤和水体中长时间积累,人体一旦摄入就将持续存在。已知的几种 PFASs 因其免疫毒性、肝脏毒性、生殖毒性、神经毒性、发育毒性带来的环境健康风险,已被禁用。例如,2009 年禁用全氟辛烷磺酸(PFOS),2019 年禁用全氟辛酸(PFOA)^[2]。虽然大量 PFASs 替代物投入生产和使用,但大多数替代物尚未进行毒理学评估,这在国际上引起了热烈讨论和争议^[3]。

6:2 氯化多氟烷基醚磺酸(6:2 Cl-PFAES, 商业上称为 F-53B)作为抑雾剂已被中国镀铬行业广泛应用数十年,也是人类体内最持久的 PFASs 之一^[4],但作为 PFOS 的替代品,其土壤生态毒性作用方面的研究还很有限。全氟丁酸(PFBA, 四碳,类似于 PFOA,在中国和其他国家取代 PFOA^[5])可以在与脂肪酸相似的亲和力的位点上与人血清白蛋白非共价结合^[6]。Domingo 等^[7]报道,饮用水处理工艺降低了水中除 PFBA 外的所有全氟化合物的浓度。关于短链 PFASs 的毒性,目前存在争议。多年来欧洲人口血液中短链 PFASs 水平开始上升^[8],由此需要更多的研究来阐明其毒性影响,服务于监管决策。

白符跳(*Folsomia candida*)在土壤生物研究中占有重要的地位,过去数十年一直被用作标准化毒性试验的模式生物^[9]。本研究聚焦白符跳解毒应激和生殖两大靶向机制,选定解毒应激的敏感靶标基因 *CYP6N3V2* 和 *CYP6N4V1*,以及影响白符跳生殖的敏感靶标基因 *CTSL*、*VMO1* 和 *Vitrec*,开展 PFASs 急性毒性试验和 F-53B 亚慢性毒性试验。急性毒性试验旨在研究 PFASs 诱导下白符跳氧化应激机制以及繁殖相关基因的瞬时表达差异;亚慢性毒性试验是在急性毒性基础上,聚焦于对白符跳毒性更大的 PFASs 替代物 F-53B,靶标生殖相关基因,进行生命周期过程中对繁殖毒性影响的探讨。通过研究,以期 PFASs 生态毒性评估和早期预警提供方法和理论依据。

1 材料与方法

1.1 PFASs 染毒饲料配制

全氟辛酸(PFOA, $C_8HF_{15}O_2$, CAS 335-67-1, 纯度 $\geq 98\%$)和全氟丁酸(PFBA, $C_4HF_7O_2$, CAS 375-22-4, 纯度 $\geq 98\%$)从 Aladdin 试剂公司(中国上海)获得; 6:2 氯化多氟醚磺酸盐(F-53B, $C_8HClF_{16}O_4SK$, CAS

73606-19-6, 纯度 $\geq 99\%$)购自 Synica 有限公司。

分别配制浓度为 100 mg/L 的 PFOA、PFBA 和 F-53B 溶液,各取 10 mL 加入 10 mg 酵母中(安琪酵母有限公司,中国),搅拌均匀,于 $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻干燥,研磨混匀,得到含 100 mg/kg(本课题组前期相关研究结果 PFASs 的半数致死浓度 LD_{50})PFOA、PFBA、F-53B 的染毒酵母。

同理,配制不同浓度梯度(0、20、40、80、160 mg/kg)的 F-53B 染毒酵母,备用。

1.2 供试跳虫

供试白符跳(*Folsomia candida*)源自丹麦奥胡斯大学,于本实验室稳定饲养超过 14 年。饲养方法:培养于含石膏和活性炭(8:1, w/w)基质的 9 cm 培养皿中,每周喂食酵母和超纯水 2 次。饲养条件:75% 相对湿度、温度(20 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 、8 h:16 h(光/暗)光照。

白符跳同步化(synchronized):每培养皿中加入 200~300 头成虫,加入 15 mg 酵母喂养 9~10 d,移出虫卵,选择孵化 1~3 d 的幼虫,继续培养 9~12 d 备用^[10]。

1.3 染毒培养

PFASs 急性毒性试验:将同步化的成虫 200~300 头放入新的石膏培养基中,喂食 100 mg/kg PFOA、PFBA、F-53B 染毒酵母,设置空白对照(CK),共 4 个处理,每处理 4 次重复,于上述条件下培养 48 h 后,将白符跳转移至含 0.5 mL TRIZOL 的 2 mL 离心管中, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存、待测。

F-53B 亚慢性毒性试验:将同步化的 200~300 头白符跳幼虫放入新的石膏培养基中,喂食 0、20、40、80、160 mg/L F-53B 染毒酵母,共 5 个处理,每处理 4 次重复,于上述条件培养 28 d 后,将白符跳转移至含 0.5 mL TRIZOL 的 2 mL 离心管中, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存、待测。

1.4 RNA 提取

取上述保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的试验用虫,65 Hz 匀浆 40 s,重复 3 次,利用 RNasey 试剂盒(RNeasy Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA)提取白符跳总 RNA,抽提步骤参照产品说明书。

1.5 cDNA 反转录

通过天根 FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒(KR106-180123, FastQuant RT Kit (With gDNase))对上述抽提的总 RNA 进行 cDNA 反转录,步骤参照该产品说明书。

1.6 实时荧光聚合酶链式反应(Real-time PCR)

以反转录获得的 cDNA 为模板,对跳虫体内细

胞色素 P450 单加氧酶(*CYP6N3V2*、*CYP6N4V1*)、组织蛋白酶 L(*CTSL*)、卵黄蛋白受体(*Vitrec*)、卵黄膜外层蛋白(*VMOI*)mRNA 量的变化进行分析。反应条件如下：上游 (Forward) 引物 (10 μm/L) 和下游 (Reverse)引物(10 μm/L)各 0.5 μL，Genious 2×SYBR Green Fast Qpcr Mix (No ROX) 10 μL，cDNA 模板 2

μL，用 RNase-free 水补充到 20 μL。反应程序：95 ℃ 15 s，60 ℃ 15 s，72 ℃ 45 s，40 个循环。仪器为罗氏诊断(Roche Diagnostics International AG)Light Cycler® 96 Real-time PCR System。同时检测内参基因(*β-actin*)，3 次重复。模板和内参基因引物序列如表 1。

表 1 用于 Real-time PCR 试验的引物
Table 1 Primers used for real-time PCR analysis

基因缩写	功能描述	引物序列(5'-3')
<i>β-actin</i>	<i>β-actin</i>	F: ACGTTGATATCCGAAAGGACCTC R: TCTGTCAGCAATACCAGGGTACA
<i>CYP6N3V2</i>	cytochrome P450 monooxygenase ^[11]	F: GACGCAGATCCCGAGTATTATG R: TTCTTCACGAGGTCCAAATCTT
<i>CYP6N4V1</i>	cytochrome P450 monooxygenase	F: GGCGATGTCGATAGAATCTTTA R: CGAATCCTTCCCGAAGTAAAT
<i>CTSL</i>	Cathepsin L	F: GAGAAGCATCAATCCCTACAG R: CCTAGCAGGTCTTACAGGATA
<i>Vitrec</i>	vitellogenin receptor	F: TGTCCTCGTAGGGATGTATCTTGA R: GATTGTGTTGTTGTACCCGATGAC
<i>VMOI</i>	Vitelline membrane outer layer protein 1	F: GCTCTAGCGTTGGTCATAAA R: GGATATTATTTCCCGCAGTATCA

1.7 数据分析和统计检验

各基因 mRNA 的变化采用与内参 β-Actin 相对量化表达进行统计。qPCR 计算原理：

$$\Delta Ct_{\text{实验组}} = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参}}$$
$$\Delta Ct_{\text{对照组}} = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参}}$$
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{实验组}} - \Delta Ct_{\text{对照组}}$$
$$\text{表达量差异} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

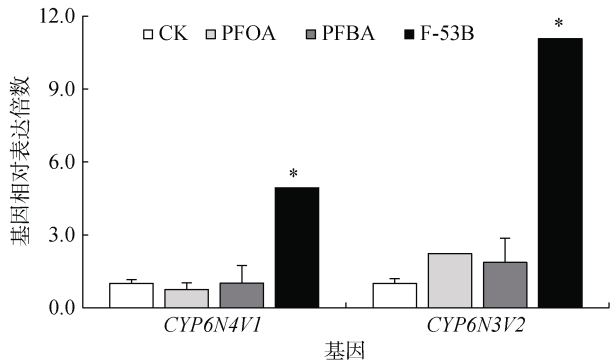
处理间的基因表达差异 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 平均数的显著性检验采用单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 PFASs 急性毒性试验的 mRNA 诱导表达量

2.1.1 氧化应激相关基因 经 48 h PFOA、PFBA、F-53B 染毒酵母饲料喂养后，白符跳体内两种细胞色素 P450 单加氧酶基因 (*CYP6N3V2*、*CYP6N4V1*) mRNA 转录水平呈现不同规律(图 1)。与对照相比，3 种 PFASs 处理下，*CYP6N3V2* 表达均上调，依次为 PFOA 2.23 倍、PFBA 1.87 倍、F-53B 11.07 倍，其中，F-53B 处理下达到显著水平。*CYP6N4V1* 基因表达则表现为 F-53B 暴露下显著上调 4.94 倍。

2.1.2 繁殖相关基因 经 48 h PFOA、PFBA、F-53B 染毒酵母饲料喂养后，白符跳体内组织蛋白酶 L(*CTSL*)、卵黄蛋白受体(*Vitrec*)、卵黄膜外层蛋白(*VMOI*)基因 mRNA 转录水平呈现不同规律(图 2)。其中 3 种 PFASs 处理下，*CTSL* 表达受到显著抑制，



(* 表示与对照比较差异达 $P<0.05$ 显著水平，下图同)
图 1 急性毒性试验(48 h)中 PFASs 对白符跳氧化应激相关基因表达的影响

Fig. 1 Expression of genes related to *Folsomia candida* oxidative stress in PFASs acute toxicity test (48 h)

下调情况分别为 PFOA 36%、PFBA 61%、F-53B 85%。PFOA 一定程度上刺激 *Vitrec* 和 *VMOI* 的表达，相比于对照组，分别提高了 12%、11%；而 PFBA 处理下，白符跳 *VMOI* 的表达受到抑制，下降了 24%。但总体而言，3 种 PFASs 处理下 *Vitrec* 和 *VMOI* 的表达较对照组统计学上无显著性差异。

2.2 F-53B 亚慢性毒性试验

2.2.1 *CTSL* mRNA 诱导表达量 喂食含 F-53B 浓度梯度酵母饲料 28 d 后，F-53B 160 mg/kg 处理组的 *CTSL* mRNA 表达较对照处理组显著降低 89.9% (图 3)；20、40、80 mg/kg F-53B 处理组与对照间无显著差异。

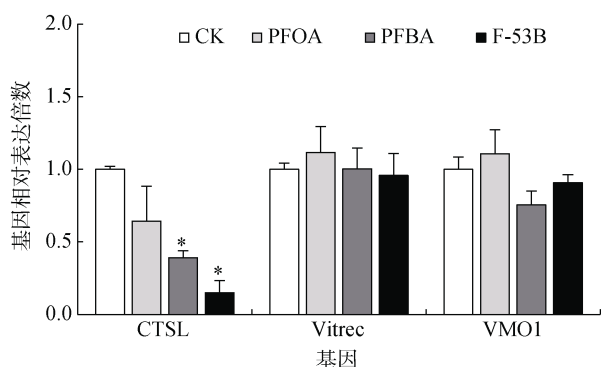


图2 急性毒性试验(48 h)中 PFASs 对白符跳生殖相关基因表达的影响

Fig. 2 Expression of genes associated with *Folsomia candida* reproduction in acute toxicity test of PFASs (48 h)

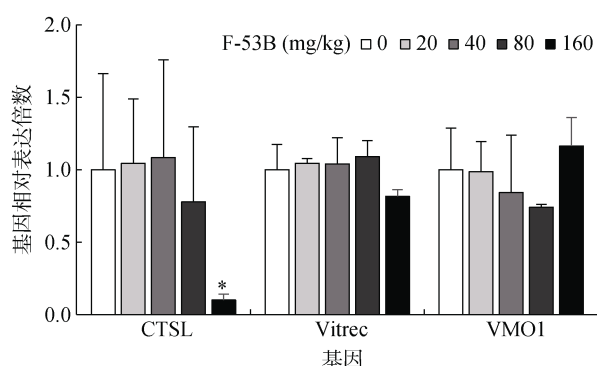


图3 亚慢性毒性试验(28 d)中 F-53B 对白符跳生殖相关基因表达的影响

Fig. 3 Expression of genes associated with *Folsomia candida* reproduction in F-53B subchronic toxicity test (28 d)

2.2.2 Vitrec mRNA 诱导表达量 喂食含 F-53B 浓度梯度酵母饲料 28 d 后, 白符跳 *Vitrec* mRNA 的表达量随 F-53B 含量的上升无明显变化, 当 F-53B 浓度为 160 mg/kg 时, *Vitrec* 表达量降低了 18.4%, 但差异不显著(图 3)。

2.2.3 VMO1 mRNA 诱导表达量 喂食含 F-53B 浓度梯度酵母饲料 28 d 后, 白符跳 *VMO1* mRNA 的表达量随 F-53B 含量的上升先降低后升高。20、40、80 mg/kg F-53B 处理组分别相较于对照组降低 1.4%、15.8% 和 25.8%; 当 F-53B 浓度为 160 mg/kg 时, *VMO1* 表达量则提高了 16.3%, 但差异均不显著(图 3)。

3 讨论

本研究首次以土壤小节肢动物白符跳为研究对象, 评估了全氟化合物及其替代物对其体内应激相关基因激活与生殖相关基因表达的影响。研究共涉及 5 个基因, 包括细胞色素 P450 单加氧酶(*CYP6N3V2*、*CYP6N4V1*)、组织蛋白酶 L(*CTSL*)、卵黄蛋白受体(*Vitrec*)和卵黄膜外层蛋白(*VMO1*)。研究结果表明,

白符跳体内相关基因 mRNA 转录水平能被外界环境中的 PFASs 所诱导或抑制。其中, F-53B 对氧化应激相关基因 *CYP6N3V2*、*CYP6N4V1* 和繁殖相关基因 *CTSL* 的影响最大, 与对照组相比, *CYP6N4V1*、*CYP6N3V2* 基因的表达量大幅上调(4.94 倍和 11.1 倍), *CTSL* 大幅下调(0.15 倍)。

基因的差异调节是压力导致内环境稳态破坏的早期预警信号, 当应对变化的环境, 它先于蛋白质翻译和代谢物的生物合成^[12]。昆虫细胞色素 P450 酶在昆虫体内执行许多重要功能, 包括蜕皮激素和保幼激素的合成与分解、各种天然或人工合成的外源化合物的代谢^[13]。细胞色素 P450 在生物体内的多样性构成了昆虫对环境变化的适应。*CYP6* 家族是昆虫特异性的家族, 参与外源有机化学物质的生物转化, 在药物的代谢中起着重要作用^[14], 如杀虫剂和植物毒素。果蝇 *CYP6* 基因簇可受巴比妥诱导^[15]。F-53B 显著刺激 *CYP6N4V1*、*CYP6N3V2* 基因的表达, 表明 F-53B 处理下, 白符跳解毒和应激反应的需求增加, 两种 *CYP6* 基因可能在白符跳代谢解毒过程中发挥重要的作用。*CYP6N4V1* 的转录水平通常随暴露水平的增加而增加, 如菲和镉^[16]、城市垃圾填埋场土壤^[17]、醚菊酯^[11]暴露环境下, *CYP6N3V2* 和 *CYP6N4V1* 的表达也增加。

CTSL 是重要的消化蛋白酶, 与昆虫的变态和蜕皮有关。*CTSL* 基因沉默后, 南方小花蝽(*Orius strigicollis*)的发育显著延长, 体长和体重显著下降^[18]。此外, 组织蛋白酶与胚胎发育有关。Matsumoto 等^[19]发现 *CTSL* 参与了玉米象(*Sitophilus zeamais*)卵的成熟过程; Fagotto^[20]在非洲钝缘蜱(*Ornithodoros moubata*)卵中检测到 *CTSL* 基因在胚胎发育过程中起着降解卵黄蛋白的作用。对 *CTSL* 在七星瓢虫雌虫滞育的研究中发现^[21], 抑制 *CTSL* 基因的表达可导致脂肪酸合成酶相关基因表达降低, 从而抑制脂质积累, 并进一步影响发育。崔攀^[22]也发现 *CTSL* 通过影响昆虫对脂肪的利用, 干扰南方小花蝽的发育和繁殖。Sun 等^[23]发现组织蛋白酶 L 可调控家蚕变态和脂肪体解离过程。本试验中, PFASs 处理下白符跳 *CTSL* 基因表达显著降低, 推测 PFASs 可能干扰了白符跳的脂质积累、变态、蜕皮及胚胎发育等过程, 从而引发育和繁殖毒性。其中 F-53B 对 *CTSL* 的干扰程度最大, 表明其对白符跳生长、发育和生殖的不利影响更为严重。不同 F-53B 浓度处理下, *CTSL* 表现出明显的剂量-效应关系, 即随着 F-53B 浓度的增加, *CTSL* 受抑制程度显著加剧, 最高浓度下 *CTSL* 表达仅为对照组

的 1/10。表明 F-53B 对白符跳的生长、发育和繁殖的干扰随 F-53B 浓度的增加而加剧,高浓度下抑制作用最为明显。

VMOI 蛋白存在于卵的外层,也即卵黄膜中,是卵黄和外界环境之间的屏障,通过在卵黄外形成纤维层屏障以防止细菌感染,与卵形成^[24]有关。*VMOI* 在母鸡雌性生殖道中的组织和细胞特异性差异表达是对雌激素、蜕皮及其靶 miRNA 的响应,其在雌激素应答和蜕皮过程中的输卵管形态发生中起重要作用^[25]。F-53B 存在下 *VMOI* 被持续抑制,白符跳卵的形成过程受到干扰,与预期结果一致。但当 F-53B 浓度继续增加至 160 mg/kg,白符跳体内的 *VMOI* 表达反而升高。

本研究对生殖相关的 *Vitrec* 基因也进行了研究,因为生殖是最重要的生态利益,在经典生态毒理学研究中有涉及。当 F-53B 浓度达到 160 mg/kg 时,白符跳 *Vitrec* 基因表达较对照组降低 18.4%,*Vitrec* 表达量降低可能预示着对生殖的不利影响。卵黄蛋白受体在卵黄蛋白运输到卵子及在卵巢成熟过程中发挥作用^[26],*Vitrec* 是卵黄蛋白发育为卵母细胞的必需蛋白^[27]。降低卵黄蛋白原 *Vitrec* 的 mRNA 水平可影响蝗虫卵巢生育^[28],具体表现为产卵量和孵化率显著降低,从而达到害虫防治的目的。类似的研究还包括秀丽隐杆线虫^[29]、家蚕^[30]等。这与本课题研究前期试验结果一致。

本研究聚焦于土壤白符跳解毒应激和生殖两大敏感靶标,*CYP6N3V2*、*CYP6N4V1* 是解毒应激的敏感靶标基因,而 *CTSL*、*VMOI* 和 *Vitrec* 是影响白符跳生殖的敏感靶标基因。与传统生测指标相比,实时荧光 PCR 法的检测时间大大缩短,可指示该类化合物的环境毒害作用,有望实现对一类化合物的早期监控。土壤白符跳对环境外源 PFASs 的生物转化,刺激了其本身的药物代谢作用环节,解毒和应激反应的需求增加,具体表现为两大靶标基因 *CYP6N3V2*、*CYP6N4V1* 的表达升高。与此同时,PFASs 抑制了白符跳体内生殖相关基因的表达,*CTSL* 表达量降低,干扰了卵的成熟过程,进而影响胚胎发育。同时,*CTSL* 通过影响昆虫对脂肪的利用,阻碍昆虫的变态发育和蜕皮过程。此外,F-53B 处理下,与卵形成有关的 *VMOI* 和在卵巢成熟过程中发挥作用的 *Vitrec* 在白符跳体内的表达也受到抑制,不利于白符跳产卵、孵化等生命活动的进行。

4 结论

PFASs 对土壤白符跳氧化应激及生殖相关基因

的表达具有显著影响。*CYP6N3V2*、*CYP6N4V1*、*CTSL*、*VMOI* 和 *Vitrec* 等 5 个差异表达基因可作为基于 PFASs 暴露的土壤白符跳早期预警指标的靶标基因。相对于 PFOA、PFBA 化合物,F-53B 对上述基因 mRNA 转录水平调控的影响程度最大。推测相较于前两种化合物,F-53B 可能具有更强的生物毒性。不同 PFASs 对土壤白符跳的氧化应激、生殖相关基因具有显著影响,这一发现为此类污染物的早期监控奠定了基础。

参考文献:

- [1] Lim X. Could the world go PFAS-free? Proposal to ban 'forever chemicals' fuels debate[J]. *Nature*, 2023, 620(7972): 24–27.
- [2] 丁达,宋昕,刘朝阳,等. 某化工园区周边土壤中传统和新兴全氟化合物的赋存特征及潜在来源[J]. *土壤*, 2021, 53(4): 779–787.
- [3] Gold S C, Wagner W E. Filling gaps in science exposes gaps in chemical regulation[J]. *Science*, 2020, 368(6495): 1066–1068.
- [4] Shi G H, Cui Q Q, Pan Y T, et al. 6: 2 Chlorinated polyfluorinated ether sulfonate, a PFOS alternative, induces embryotoxicity and disrupts cardiac development in zebrafish embryos[J]. *Aquatic Toxicology*, 2017, 185: 67–75.
- [5] Pan Y T, Zhang H X, Cui Q Q, et al. Worldwide distribution of novel perfluoroether carboxylic and sulfonic acids in surface water[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(14): 7621–7629.
- [6] 汤婕,张银龙. 土壤/沉积物中全氟辛酸(PFOA)、全氟辛烷磺酸(PFOS)吸附-解吸行为研究进展[J]. *土壤*, 2014, 46(4): 599–606.
- [7] Domingo J L, Ericson-Jogsten I, Perelló G, et al. Human exposure to perfluorinated compounds in Catalonia, Spain: Contribution of drinking water and fish and shellfish[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(17): 4408–4415.
- [8] Liu S Y, Yang R J, Yin N Y, et al. The short-chain perfluorinated compounds PFBS, PFHxS, PFBA and PFHxA, disrupt human mesenchymal stem cell self-renewal and adipogenic differentiation[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2020, 88: 187–199.
- [9] 李进,柯欣,李柱,等. 铅锌矿区周边农田土壤跳虫群落特征与重金属污染的关联[J]. *土壤学报*, 2021, 58(3): 732–743.
- [10] OECD. Test No. 232: Collembolan reproduction test in soil[S]. OECD (Organisation for Economic Co-operation Development), 2009.
- [11] Szabó B, Lang Z, Bakonyi G, et al. Transgenerational and multigenerational stress gene responses to the insecticide etofenprox in *Folsomia candida* (Collembola)[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 175: 181–191.

- [12] 穆阳杰, 詹玉洁, 许卫锋, 等. 高 pH 胁迫下拟南芥根转录组学与网络应答[J]. 土壤学报, 2020, 57(3): 691–701.
- [13] Daborn P J, Yen J L, Bogwitz M R, et al. A single p450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*[J]. Science, 2002, 297(5590): 2253–2256.
- [14] Pitombeira de Figueirêdo L, Daam M A, Mainardi G, et al. The use of gene expression to unravel the single and mixture toxicity of abamectin and difenoconazole on survival and reproduction of the springtail *Folsomia candida*[J]. Environmental Pollution, 2019, 244: 342–350.
- [15] Maitra S, Dombrowski S M, Waters L C, et al. Three second chromosome-linked clustered Cyp6 genes show differential constitutive and barbital-induced expression in DDT-resistant and susceptible strains of *Drosophila melanogaster*[J]. Gene, 1996, 180(1/2): 165–171.
- [16] de Boer M E, Ellers J, van Gestel C A M, et al. Transcriptional responses indicate attenuated oxidative stress in the springtail *Folsomia candida* exposed to mixtures of cadmium and phenanthrene[J]. Ecotoxicology, 2013, 22(4): 619–631.
- [17] Roelofs D, de Boer M, Agamennone V, et al. Functional environmental genomics of a municipal landfill soil[J]. Frontiers in Genetics, 2012, 3: 85.
- [18] 苗雅博. 南方小花蝽 Ctsd、CtsI、Naga 和 Lps 基因的消化功能分析及其在天敌人工饲料中的应用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2023.
- [19] Matsumoto I, Emori Y, Abe K, et al. Characterization of a gene family encoding cysteine proteinases of *Sitophilus zeamais* (maize weevil), and analysis of the protein distribution in various tissues including alimentary tract and germ cells[J]. Journal of Biochemistry, 1997, 121(3): 464–476.
- [20] Fagotto F. Yolk degradation in tick eggs: I. occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres[J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 1990, 14(4): 217–235.
- [21] Chen J J, Guo P H, Li Y Y, et al. *Cathepsin I* contributes to reproductive diapause by regulating lipid storage and survival of *Coccinella septempunctata* (Linnaeus)[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 24(1): 611.
- [22] 崔攀. FAS 和 GP 基因在南方小花蝽取食不同食物源中的功能研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2022.
- [23] Sun Y X, Tang L, Wang P, et al. Cathepsin L-like protease can regulate the process of metamorphosis and fat body dissociation in *Antheraea pernyi*[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2018, 78: 114–123.
- [24] Kido S, Morimoto A, Kim F, et al. Isolation of a novel protein from the outer layer of the vitelline membrane[J]. Biochemical Journal, 1992, 286(1): 17–22.
- [25] Lim W, Song G. Differential expression of vitelline membrane outer layer protein 1: Hormonal regulation of expression in the oviduct and in ovarian carcinomas from laying hens[J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2015, 399: 250–258.
- [26] Jing Y P, Wen X P, Li L J, et al. The vitellogenin receptor functionality of the migratory locust depends on its phosphorylation by juvenile hormone[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2021, 118(37): e2106908118.
- [27] Ali M W, Zhang Z Y, Xia S, et al. Biofunctional analysis of Vitellogenin and Vitellogenin receptor in *Citrus* red mites, *Panonychus citri* by RNA interference[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 16123.
- [28] Tokar D R, Veleta K A, Canzano J, et al. Vitellogenin RNAi halts ovarian growth and diverts reproductive proteins and lipids in young grasshoppers[J]. Integrative and Comparative Biology, 2014, 54(5): 931–941.
- [29] Murphy C T, McCarroll S A, Bargmann C I, et al. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature, 2003, 424(6946): 277–283.
- [30] Lin Y, Meng Y, Wang Y X, et al. Vitellogenin receptor mutation leads to the oogenesis mutant phenotype “scanty vitellin” of the silkworm, *Bombyx mori*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(19): 13345–13355.