

重金属镉胁迫对果蝇 *dDnmt2*、*dMBD2/3* 表达量的影响*

管德龙 梁 露 张 敏**

(陕西师范大学 生命科学学院, 西安 710062)

摘 要 【目的】 探明重金属镉 (Cadmium, Cd) 对黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* DNA 甲基化修饰相关基因表达的影响, 初步分析镉胁迫可能导致果蝇的表观遗传变异及其可遗传性。【方法】 收集 8 h 内羽化未交配的雌、雄果蝇, 在添加不同质量浓度 (0、0.9375、1.875、3.75、7.5、15.0、30.0、60.0 mg/kg) Cd 的培养基中培养, 以 Real-time PCR 定量检测亲代 (F_0) 果蝇生殖系统、去生殖系统体细胞、整体表达量变化趋势及解除胁迫的子代 (F_1) 果蝇 DNA 甲基化修饰系统相关基因 (*dDnmt2*、*dMBD2/3*) 在 mRNA 水平的表达变化。【结果】 重金属镉胁迫诱导了果蝇卵巢、精巢、去卵巢雌果蝇、去精巢雄果蝇、完整雌果蝇、完整雄果蝇的 *dDnmt2*、*dMBD2/3* 在 mRNA 水平的表达上调, 呈现一定剂量依赖性及雌、雄组织差异性, 且这种表达变化持续至子一代。【结论】 研究结果揭示了重金属镉胁迫可诱导果蝇 *dDnmt2*、*dMBD2/3* 表达量上调, 其可能与果蝇的 DNA 甲基化修饰过程相关联, 导致表观遗传变异并可能向子代传递。

关键词 镉, 黑腹果蝇, DNA 甲基化修饰系统基因, 可遗传性

The effects of cadmium on expression of the *dDnmt2* and *dMBD2/3* genes in *Drosophila melanogaster*

GUAN De-Long LIANG Lu ZHANG Min**

(College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract [Objectives] To investigate the effects of heavy metal cadmium (Cd) on the expression of DNA methylation-related genes, and discuss potential epigenetic variation caused by cadmium stress and its heritability in *Drosophila melanogaster*. [Methods] Unmated male and female flies < 8 h old were collected and incubated in culture medium containing different concentrations of Cd (0.0, 0.9375, 1.875, 3.75, 7.5, 15.0, 30.0, 60.0 mg/kg) for 10 days. Quantitative Real-time PCR was used to detect the mRNA expression of the DNA methylation-related genes, *dDnmt2* and *dMBD2/3* in the reproductive system of parental (F_0) flies with Cd treatment and their offspring (F_1) without Cd. [Results] Cadmium stress can up-regulate the expression of *dDnmt2* and *dMBD2/3* in the ovaries and testes and these changes continue to the next generation (F_1). [Conclusion] Expression of *dDnmt2* and *dMBD2/3* in *D. melanogaster* is positively correlated with cadmium exposure. This may due to the DNA methylation modification process associated with epigenetic variation in *D. melanogaster*.

Key words cadmium, *Drosophila melanogaster*, DNA methylation system genes, heritability

镉 (Cadmium, Cd) 是重要的重金属污染物之一, 已被美国农业委员会列为当前最重要的一种农业环境污染物, 是公认的可致癌重金属

(Chen *et al.*, 2012)。近年来, 我国发生的一系列公共食品安全问题再次将镉污染推进人们视野 (王学琴等, 2011)。研究发现, Cd 暴露可造

* 资助项目: 陕西省自然科学基金研究计划项目 (2012JQ3012) 和中央高校基本科研业务费专项资金资助 (GK201402026)

**通讯作者, E-mail: zhangmin451@snnu.edu.cn

收稿日期: 2013-09-04, 接受日期: 2013-11-12

成动物雄性精子数量减少、活性降低、畸形率上升, 雌性生殖力减弱、产仔数减少, 子代表型不正常、生活力减弱等 (Brama *et al.*, 2012)。

对镉的毒理学分析认为镉具有表观遗传毒性 (Cuypers *et al.*, 2010)。表观遗传指外界环境变化下不改变 DNA 序列而改变遗传机制影响基因表达和功能的过程, DNA 甲基化是最主要的表观遗传修饰, 其通过对特定基因的沉默、抑制有丝分裂与转录、起始凋亡等方式以应对 Cd 暴露带来的压力胁迫 (Castillo *et al.*, 2012)。Cd 的持续暴露会改变基因组 DNA 甲基化模式, 引起 DNA 甲基转移酶活性紊乱, 这可能是镉的蓄积浓度、作用时间和靶器官等多因素共同作用的结果 (Stajn *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2009)。

果蝇 *Drosophila* 具有染毒途径单一 (只经口染毒)、子代发育快、生殖腺易剥离等优点 (郭建民等, 2007), 其代谢系统、生理功能等同哺乳动物也很相似, 故常以果蝇作为模式生物研究环境因子诱导的衰老及其相关机制, 用于评价化学物质的毒性 (王贵民等, 2009)。果蝇曾经被认为是一种缺乏 DNA 甲基化的生物, 但近年来表观遗传学研究发现其具有包含 DNA 甲基转移酶 2 (DNA methyltransferase 2, DNMT2) 和甲基结合蛋白 2/3 (Methyl-binding protein 2/3, MBD2/3) 的简单 DNA 甲基化修饰系统, 且 DNA 甲基化可能对于整个果蝇生命周期的发育都起重要作用 (Redchuk *et al.*, 2012)。对于果蝇而言, DNA 甲基化模式的改变可能会造成果蝇的生长发育以及内在的抗逆性、寿命发生变化, 并且这种改变可以通过生殖过程向子代传递 (Margueron *et al.*, 2010)。本文研究了重金属 Cd 胁迫对果蝇 DNA 甲基化修饰系统相关基因的表达改变, 以及此改变是否在果蝇生殖腺中存在、是否具有可遗传性, 分析探讨重金属 Cd 对果蝇毒性效应的分子机制, 将为重金属污染的评估及其导致人类疾病的分子机制研究奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料及分组

野生型黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*

Canton S 品系, 由陕西师范大学遗传学实验室提供。实验设立对照组 (普通培养基) 和试验组 (Cd 培养基)。试验组指在普通培养基中添加 CdCl₂, 使培养基中 Cd 终浓度分别为 0.9375、1.875、3.75、7.5、15.0、30.0、60.0 mg/kg。

1.1.1 F₀ 代果蝇收集及处理 收集 8 h 内羽化未交配的成蝇, 雌、雄各 20 只, 分别置于普通培养基和 4 种 Cd 培养基中培养 10 d 后对雌、雄果蝇分别取样, 每 20 只果蝇为 1 个样本, 直接用于 RNA 提取或解剖不同组织后用于 RNA 提取 (伍苏然等, 2007)。

1.1.2 F₁ 代果蝇收集 收集 8 h 内羽化未交配的成蝇, 随机放入普通培养基及 7 种 Cd 培养基, 雌、雄分开培养 10 d 后, 雌、雄合管于普通培养基直至产生 F₁ 代成蝇并收集 8 h 内羽化未交配的 F₁ 代成蝇, 雌、雄分开在普通培养基中继续培养 10 d 后对雌、雄果蝇分别取样, 每 20 只果蝇为 1 个样本。

1.2 实验方法

1.2.1 果蝇组织的解剖 在 PBS 溶液中对果蝇精巢、卵巢进行剥离, 为防止 RNA 降解, 解剖出的组织立即放入 Trizol 中进行消化处理。

1.2.2 总 RNA 提取及检测 采用 Trizol 法提取样本果蝇总 RNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性, Nanodrop 微量核酸分析仪测定其浓度与 A260/280、A230/A260。

1.2.3 反转录合成 cDNA 第一条链 按照反转录试剂盒 PrimeScript® RT reagent Kit 说明书将以上各样品 RNA 合成 cDNA 第一链, 并保存于 -20℃ 备用。

1.2.4 引物设计及合成 根据 Genbank 下载果蝇 DNA 甲基转移酶基因 *dDnmt2* (NM_058127.2) 和甲基结合蛋白基因 *dMBD2/3* (NM_169293.1) 序列, Premier Primer 6.0 软件设计特异性引物 (表 1), 以核糖体蛋白基因 *rp49* (Mikhaylova *et al.*, 2012) 作为内参, 由上海生工生物公司合成以上基因引物。

1.2.5 Real-time PCR 以 1.2.2 中的 cDNA 为模板, *rp49* 为内参基因, 每个样品设 3 个重复进行

表 1 实时定量使用的引物
Table 1 Primers used for RT-PCR amplification

基因 Gene	引物上、下游序列 Sequences	目的片段长度 Expected size
<i>rp49</i>	F: GCTAAGCTGTCTGCACAAA R: TCCGGTGGGCAGCATGTG	165 bp
<i>dDnmt2</i>	F: AAAGGGACACGGAAGACAAG R: GCTCCAGCGATTCAATAAACT	184 bp
<i>dMBD2/3</i>	F: CTCAGTGCCTAAGACCATAC R: TAGCGGTTGTTCAGGATTCA	172 bp

Real-time PCR 反应。以试剂盒 SYBR Green I 中的说明为反应体系,采用两步法反应程序:95℃ 变性 3 min; 95℃ 变性 10 s, 60℃ 退火 30 s, 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法计算各个基因在 mRNA 水平的表达。

1.2.6 数据分析 采用 IBM SPSS20.0 统计软件进行分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较及两两比较采用单因素方差分析及 LSD-*t* 法检验。

2 结果与分析

2.1 镉对亲代 (F_0) 果蝇生殖系统 *dDnmt2* 及 *dMBD2/3* 基因表达的影响

图 1 显示,与对照组相比,Cd 胁迫可诱导雌、雄果蝇生殖系统(卵巢或精巢)中 DNA 甲基转移酶基因 *dDnmt2*、及甲基结合蛋白基因 *dMBD2/3* 的转录表达。各实验组 *dDnmt2* 以及 *dMBD2/3* 基因 mRNA 的表达均表现出上调趋势,在最低浓度(0.9375 mg/kg)处即与对照组产生显著性差异($P < 0.05$)。卵巢中 *dDnmt2* 相对于内参的表达量与相对自身对照组的表达倍数均显著高于精巢($P < 0.05$)。卵巢与精巢间表达量与表达倍数均无显著差异。表明重金属镉能诱导果蝇及其生殖腺中 DNA 甲基化相关基因的表达改变,可能作为子代发生 DNA 甲基化的模板。

2.2 镉对亲代 (F_0) 果蝇非生殖系统体细胞 *dDnmt2* 及 *dMBD2/3* 基因表达的影响

图 2 显示,与对照组相比,Cd 胁迫可诱导雌、雄果蝇非生殖系统体细胞中 DNA 甲基转移酶基因 *dDnmt2* 及甲基结合蛋白基因 *dMBD2/3*

的转录表达。实验组 *dDnmt2* 以及 *dMBD2/3* 基因 mRNA 的表达均上调,与对照组相比差异具有显著性($P < 0.05$)。去卵巢雌蝇中 *dDnmt2* 相对于内参的表达量与表达倍数均显著高于去精巢雄蝇精巢($P < 0.05$)。*dMBD2/3* 基因与内参的比值高于 *dDnmt2*,去卵巢与去精巢果蝇间表达量与表达倍数均无显著差异。与生殖系统相比,去卵巢后体细胞中 *dDnmt2* 对照组表达量显著低于卵巢($P < 0.01$),其他组当中,去生殖系统体细胞的 *dDnmt2*、*dMBD2/3* 相对于内参表达量与表达倍数均显著低于生殖系统($P < 0.05$)。表明镉具有改变亲代基因表达模式的表观遗传学毒性,与生殖系统可能有区别,能够直接影响 DNA 甲基化相关基因表达,并可能进一步通过 DNA 甲基化改变亲本基因的表达模式。

2.3 镉对亲代 (F_0) 果蝇完整个体 *dDnmt2* 及 *dMBD2/3* 基因表达的影响

图 3 显示,与对照组相比,Cd 胁迫可诱导雌、雄果蝇完整个体中 DNA 甲基转移酶基因 *dDnmt2* 及甲基结合蛋白基因 *dMBD2/3* 的转录表达上升。*dDnmt2* 与 *dMBD2/3* 各实验组与对照组相比差异均具有显著性($P < 0.05$)。将整体果蝇与之前果蝇生殖系统、去生殖系统结果进行比较发现,*dDnmt2* 相对于内参的相对表达量为卵巢>整体雌>去卵巢雌>精巢>整体雄>去精巢,表达倍数变化为生殖系统>整体果蝇>非生殖系统,雌性>雄性。表明适当浓度的 Cd 暴露可能导致果蝇 DNA 甲基转移酶相关基因表达改变,从而改变果蝇 DNA 甲基化模式。

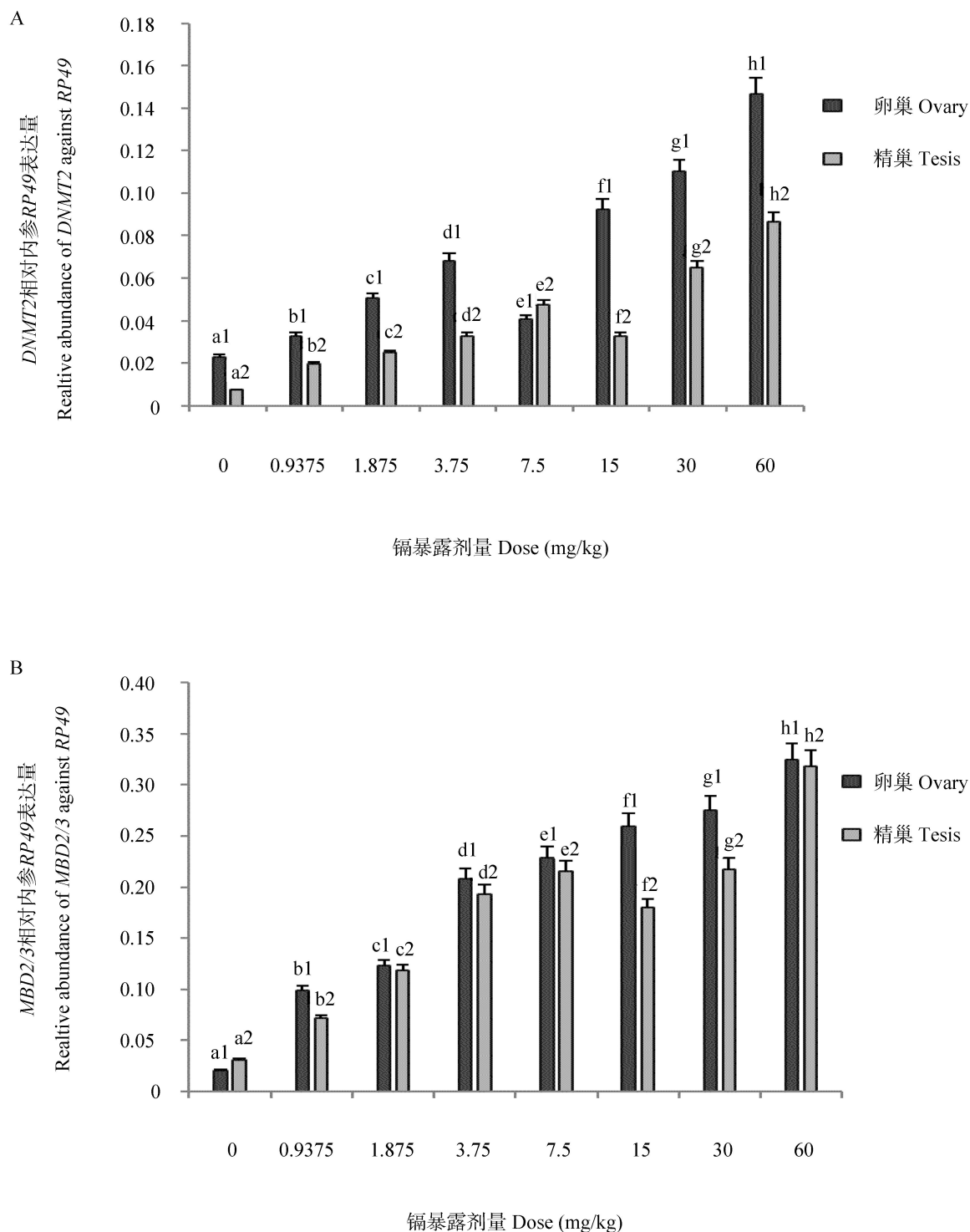


图 1 不同质量浓度镉处理后 F_0 代果蝇生殖系统 *dDnmt2* (A)、*dMBD2/3* (B) 相对表达量

Fig. 1 Relative abundance of *dDnmt2* (A), *dMBD2/3* (B) in F_0 flies reproduction system cells after Cd treatment

柱上方不同字母及数字代表显著性差异, $n=3$, $P<0.05$, 下图同。

Histograms with different letters and numbers mean significant difference between each other, $n=3$, $P<0.05$.
The same below.

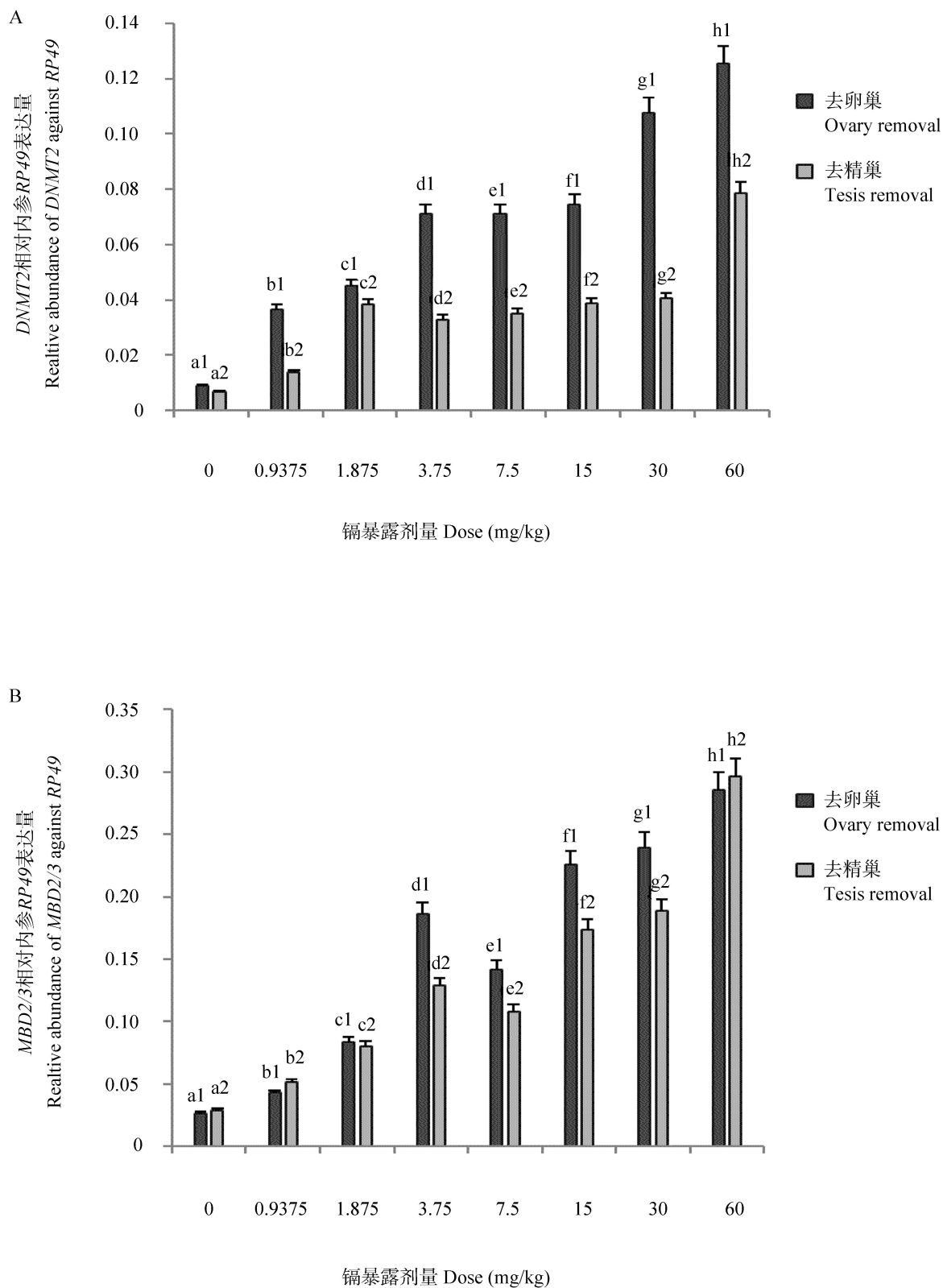


图2 不同质量浓度镉处理后 F_0 代果蝇非生殖系统体细胞 *dDnmt2* (A)、*dMBD2/3* (B) 相对表达量
Fig. 2 Relative abundance of *dDnmt2* (A), *dMBD2/3* (B) in F_0 flies body cells (reproductive system removed) after Cd treatment

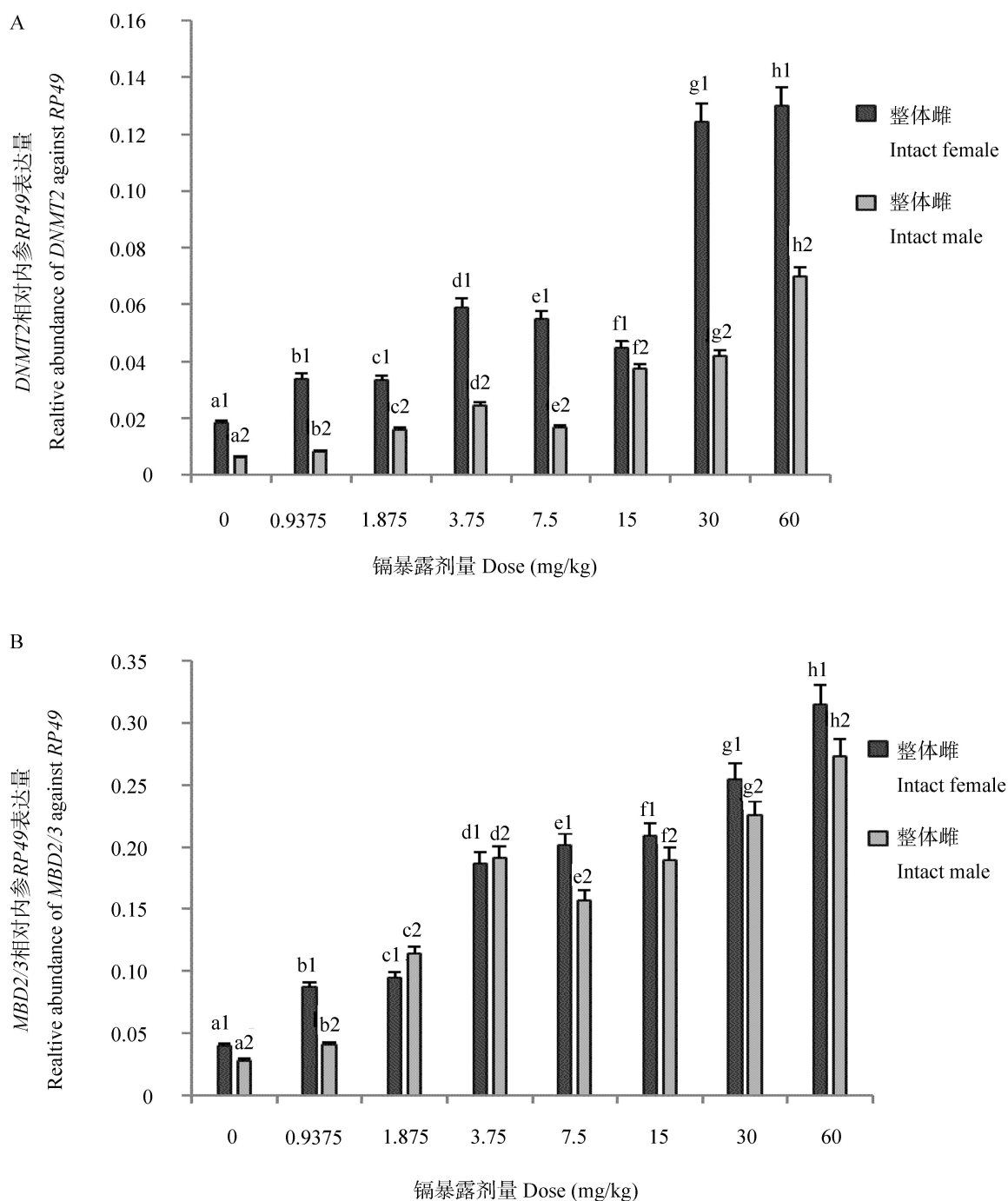


图 3 不同质量浓度镉处理后 F_0 代果蝇完整个体 *dDnmt2* (A)、*dMBD2/3* (B) 相对表达量

Fig. 3 Relative abundance of *dDnmt2* (A), *dMBD2/3* (B) in F_0 flies intact body cells after Cd treatment

2.4 镉对子代 (F_1) 果蝇 *dDnmt2* 和 *dMBD2/3* 基因表达的影响

图 4 显示, 与对照组相比, 在胁迫解除的

F_1 代果蝇中继续存在与亲代果蝇相一致的 DNA 甲基化修饰系统相关基因表达改变。实验组 *dDnmt2* 以及 *dMBD2/3* 表达均上调, 与对照组相

比差异具有显著性 ($P < 0.05$)。其表达模式与亲本 F_0 代接近, 说明其 DNA 甲基化修饰模式也具有向子代传递的能力, 且有可能与子代基因表达

出现胁迫特征有关。雌、雄间比较发现差异性同亲本相同, $dDNMT2$ 、 $dMBD2/3$ 表达为雌性高于雄性 ($P < 0.05$)。

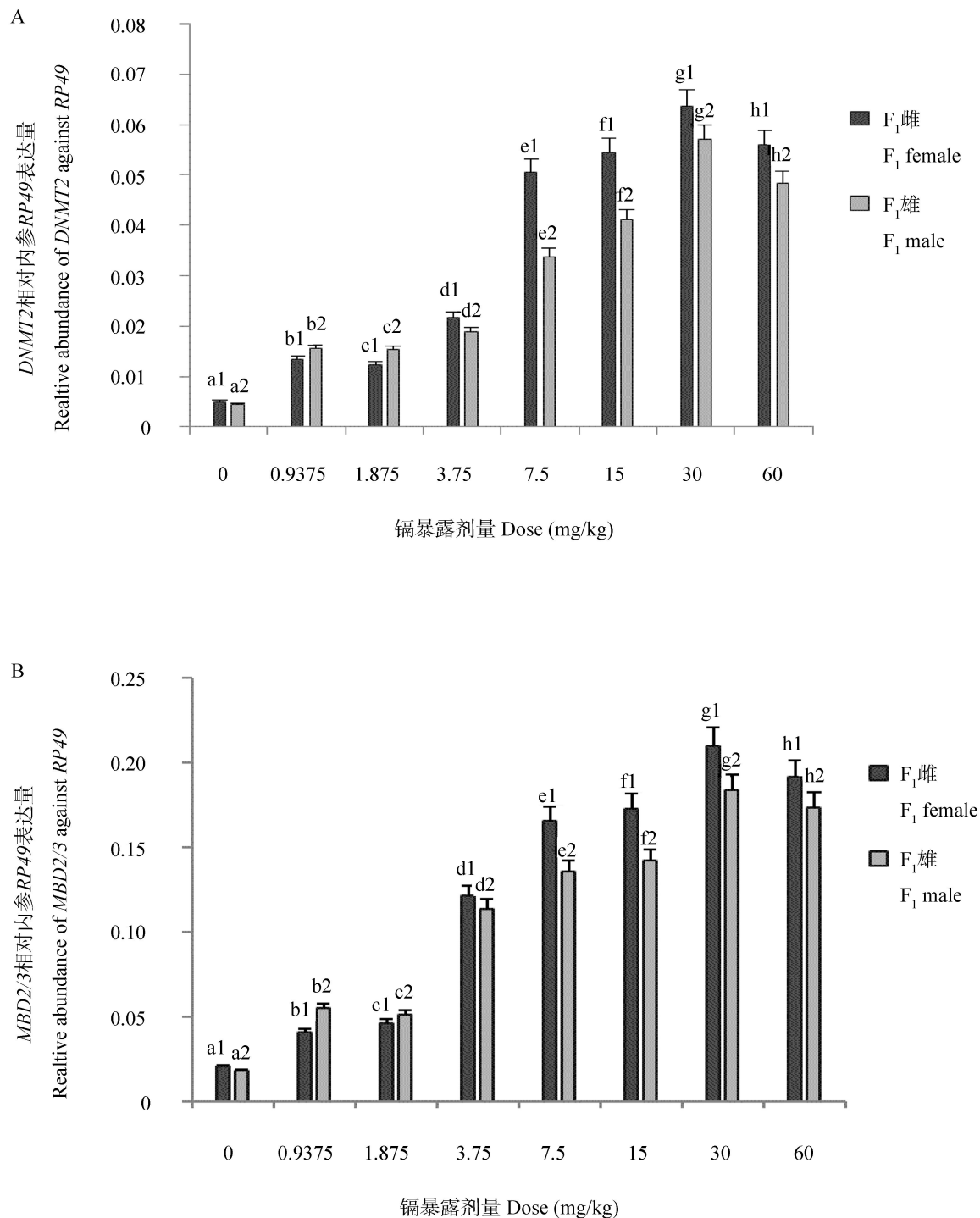


图 4 不同质量浓度镉处理后 F_1 代果蝇 $dDnmt2$ (A)、 $dMBD2/3$ (B) 相对表达量
Fig. 4 Relative abundance of $dDnmt2$ (A), $dMBD2/3$ (B) in F_1 flies after Cd treatment

3 结论与讨论

镉能引发包括植物、昆虫、人类在内的 DNA 甲基化水平发生紊乱,而随着研究的不断深入发现以 DNA 甲基化为主的表观遗传变异是化学致癌的关键通路 (Lionel *et al.*, 2002)。国内外研究表明 Cd 胁迫可诱导机体 DNA 甲基转移酶活性及 DNA 甲基化水平的改变,并存在一定的剂量依赖性,但具体关系尚无定论 (Takiguchi *et al.*, 2003a)。本研究结果显示羽化 8 h 内雌、雄果蝇于不同质量浓度 Cd 暴露 10 d 后,其 DNA 甲基转移酶基因 *dDnmt2* 和甲基结合蛋白基因 *dMBD2/3* 呈上调趋势,在最小剂量组 (0.9375 mg/kg) 即发生基因表达显著上调,达到差异显著水平 ($P < 0.05$),并且伴随镉浓度的升高而升高且呈现一定的剂量依赖趋势。由于镉胁迫可以诱导包括果蝇在内的许多昆虫的寿命显著缩短及生殖力显著减弱 (Gao *et al.*, 2012; Emre *et al.*, 2013),我们推测重金属 Cd 可能通过诱导果蝇产生氧自由基 (Reactive oxygen species, ROS) 及发生氧化损伤,并通过改变 DNA 甲基化模式从而具有改变亲代基因表达模式的表观遗传学毒性 (Filipic *et al.*, 2012; Takiguchi *et al.*, 2003b)。

之前利用 Northern blotting 技术对 *D.melanogaster* 的 *dDnmt2* 进行检测,发现其两个开放阅读框 *dDnmt2* 和 *ORF2* 均在胚胎期和成年雌果蝇中有强表达,原位杂交显示雌蝇中杂交信号主要集中在卵巢的营养细胞,并且去除了卵巢的雌蝇无表达信号 (Lyko *et al.*, 2000)。本文在对果蝇生殖系统、非生殖系统、整体间以及雌、雄间的 DNA 甲基化相关表达基因的表达进行检测后,发现镉对果蝇生殖系统的影响大于非生殖系统,生殖腺包含亲代的生殖器官与生殖细胞,其变化趋势与亲代整体与去生殖腺体细胞类似,说明重金属镉可诱导果蝇生殖腺中 DNA

甲基化相关基因的表达,可能作为子代发生 DNA 甲基化的模版。

表观遗传学改变的跨代遗传必需通过生殖细胞传递,使子代在胁迫去除以后表现出胁迫下的应激状态,即在无重金属离子干扰酶活性的情况下,其相应的 mRNA 表达依旧与亲代保持一致 (Daxinger *et al.*, 2012)。本实验结果显示 Cd 胁迫影响除了影响亲本果蝇外,也可持续到 F_1 代果蝇,即解除胁迫的 F_1 代果蝇 *dDnmt2*、*dMBD2/3* 在 mRNA 水平的表达特点与亲本 F_0 类似。Cd 胁迫导致果蝇表观遗传发生变异并且这种变异可传递至子一代果蝇。镉胁迫诱导发生的表观遗传变异可在生物世代间传递,由此提示镉污染可能存在潜在的遗传风险。

综上,镉能够诱导果蝇发生表观遗传发生变异,重金属 Cd 胁迫诱导了亲代果蝇卵巢、精巢、去卵巢雌果蝇、去精巢雄果蝇、完整雌果蝇、完整雄果蝇的 *dDnmt2*、*dMBD2/3* 在 mRNA 水平的表达随着镉暴露浓度升高其表达呈上升趋势,呈一定剂量依赖性。生殖系统与整体、非生殖体细胞比较发现生殖系统大于整体大于非生殖细胞,雌雄间比较发现雌性大于雄性,而且这种表达变化持续至子一代。研究果蝇 DNA 甲基化修饰相关基因在镉胁迫环境下的作用方式,探究镉的表观遗传学毒性、甲基化修饰系统相关基因在胁迫环境中的变化,以及此变化是否可以通过生殖过程向子代遗传,为探索 Cd 诱导引起的 DNA 甲基化修饰变化以及更深入的了解镉毒性作用奠定一定实验基础。

参考文献 (References)

- Brama M, Politi L, Santini P, Migliaccio S, Scandurra R, 2012. Cadmium-induced apoptosis and necrosis in human osteoblasts: role of caspases and mitogen-activated protein kinases pathways. *J. Endocrinol. Invest.*, 35(2): 198.
- Castillo P, Ibáñez F, Guajardo A, Llanos MN, Ronco AM, 2012. Impact of cadmium exposure during pregnancy on hepatic

* 资助项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划项目 (2012JQ3012) 和中央高校基本科研业务费专项资金资助 (GK201402026)

**通讯作者, E-mail: zhangmin451@snnu.edu.cn

收稿日期: 2013-09-04, 接受日期: 2013-11-12

- glucocorticoid receptor methylation and expression in rat fetus. *PLoS ONE*, 7(9): e44139.
- Chen N, He Y, Su Y, Li XM, Huang Q, Wang HF, Tai RZ, Zhang XZ, Fan CH, 2012. The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots. *Biomaterials*, 33(5): 1238–1244.
- Cuypers A, Plusquin M, Remans T, Jozefczak M, Keunen E, Gielen H, Opdenakker K, Nair AR, Munters E, Artois TJ, Nawrot T, Vangronsveld J, Smeets K, 2010. Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biomaterials*, 23(5): 927–940.
- Daxinger L, Whitelaw E, 2012. Understanding transgenerational epigenetic inheritance via the gametes in mammals. *Nat. Rev. Genet.*, 13(3): 153–162.
- Emre I, Kayis T, Coskun M, Dursun O, Cogun HY, 2013. Changes in antioxidative enzyme activity, glycogen, lipid, protein, and malondialdehyde content in Cadmium-treated *Galleria mellonella* larvae. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 106(3): 371–377.
- Filipiĉ M, 2012. Mechanisms of cadmium induced genomic instability. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 733(1): 69–77.
- Gao HH, Zhao HY, Du C, Deng MM, Du EX, Hu ZQ, Hu XS, 2012. Life table evaluation of survival and reproduction of the aphid, *Sitobion avenae*, exposed to cadmium. *J. Insect. Sci.*, 12(44): 1–9.
- Lyko F, Whittaker AJ, Orr-Weaver TL, Jaenisch R, 2000. The putative *Drosophila* methyltransferase gene *dDnmt2* is contained in a transposon-like element and is expressed specifically in ovaries. *Mech. Dev.*, 95(1/2): 215–217.
- Margueron R, Reinberg D, 2010. Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. *Nat. Rev. Genet.*, 11(4): 285–296.
- Mikhaylova LM, Nurminsky DI, 2012. No severe and global X chromosome inactivation in meiotic male germline of *Drosophila*. *BMC Biol.*, 10(1): 50.
- Poirier LA, Vlasova TI, 2002. Depend on lineage heterogeneity. *Cytology and Genetics*, 46(1): 58–61.
- he prospective role of abnormal methyl metabolism in cadmium toxicity. *Environ. Health Perspect.*, 110(Suppl 5): 793–795.
- Redchuk TA, Rozhok AI, Zhuk OW, Kozeretska IA, Mousseau TA, Stajn A, Zikiĉ RV, Ognjanović B, Saiciĉ ZS, Pavloviĉ SZ, Kostić MM, 1997. Effect of cadmium and selenium on the antioxidant defense system in rat kidneys. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 117(2): 167–172.
- Takiguchi M, Achanzar WE, Qu W, Li G, Waalkes MP, 2003. Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. *Exp. Cell Res.*, 286(2): 355–365.
- Takiguchi M, William EA, Qu W, Li G, Waalkes MP, 2003. Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. *Exp. Cell Res.*, 286(2): 355–365.
- Zhang J, Fu Y, Li J, Wang J, He B, Xu S, 2009. Effects of subchronic cadmium poisoning on DNA methylation in hens. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 27(3): 345–349.
- 郭建明, 2007. 樱桃新害虫黑腹果蝇的生物学特性. 应用昆虫学报, 44(5): 743–745. [GUO JM, 2007. Bionomics of fruit flies, *Drosophila melanogaster*, damage cherry in Tianshui. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 44(5): 743–745.]
- 王贵民, 董振红, 郝再彬, 2009. 甜叶菊糖苷对果蝇生长和繁殖的影响. 应用昆虫学报, 46(1): 129–133. [WANG GM, DONG ZH, HAO ZB, 2009. Effect of steviol glycosides on growth and reproduction of *Drosophila melanogaster*. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 46(1): 129–133.]
- 王学琴, 杨欢春, 魏秋宁, 丁亚磊, 索芳, 2011. 重金属污染监测 9 类粮食的结果分析. 宁夏医学杂志, 33(5): 466–467. [WANGXQ, YANGHC, WEIQN, DINGYL, SUOF, 2011. Heavy metal pollution monitoring and analysis of 9 kinds of food. *Ningxia Medical Journal*, 33(5): 466–467.]
- 伍苏然, 李江涛, 兰建强, 孙阳, 肖春, 2007. 云南德膏对樱桃果蝇成虫寿命的影响. 应用昆虫学报, 44(4): 585–587. [WUSR, LIJT, LANJQ, SUNY, XIAOC, 2007. Effect of Yunnan Degao on the longevity of *drosophila suzukii* adults. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 44(4): 585–587.]