

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2024.09.012

幼年期双酚 F 暴露对小鼠空间工作记忆的影响

王子炎, 罗天宇, 王 焱, 朱本山, 胡 繁

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘 要:双酚 F(BPF)作为双酚 A(BPA)的主要替代物,对大脑学习记忆的影响,特别是空间工作记忆的研究相对较少。文章以幼年期(21~49 d)为时间窗口,通过不同的行为学范式及免疫印迹实验研究 BPF 暴露对小鼠空间工作记忆的影响。研究发现,1 mg/(kg·d) BPF 暴露不会影响小鼠的体质量、饮水量等生理状态和小鼠基本的运动能力,但对小鼠的空间工作记忆能力有损害。在 T 迷宫 40 s 测试中,BPF 组的正确率显著低于对照组小鼠;前额叶皮层(prefrontal cortex,PFC)谷氨酸受体蛋白中 GluR2 表达量显著低于对照组。结果表明,幼年期 BPF 暴露损害小鼠的空间工作记忆能力可能与兴奋性蛋白受体亚基 GluR2 表达量降低有关。该研究将为 BPF 引起的神经系统损伤提供了有价值的信息,并在工业生产中为 BPA 替代物的选择提供了理论依据。

关键词:双酚 F(BPF);空间工作记忆;双酚 A(BPA);前额叶皮层(PFC);幼年期

中图分类号:R994.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1003-5060(2024)09-1236-07

Effects of juvenile bisphenol F exposure on spatial working memory of mice

WANG Ziyang, LUO Tianyu, WANG Ye, ZHU Benshan, HU Fan

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: There are relatively few studies on the effects of bisphenol F(BPF), the main substitute for bisphenol A(BPA), on brain learning and memory, especially spatial working memory. In this paper, juvenile(21-49 d) was used as a time window to study the effects of BPF exposure on spatial working memory of mice through different behavioral paradigms and immunoblotting experiments. The study found that 1 mg/(kg·d) BPF exposure did not affect the physiological status of mice such as body weight and water intake, and did not affect the basic exercise ability of mice, but it did damage to the spatial working memory ability of mice. In the T-maze 40 s test, the correct rate of the BPF group was significantly lower than that of the control group; in addition, the expression of GluR2 in the prefrontal cortex(PFC) glutamate receptor protein was significantly lower than that of the control group. These results suggest that juvenile BPF exposure impairs the spatial working memory ability of mice, which may be related to the decreased expression of the excited receptor subunit GluR2. This study will provide valuable information on BPF-induced neurological damage and provide a rationale for the selection of BPA substitutes in industrial production.

Key words: bisphenol F(BPF); spatial working memory; bisphenol A(BPA); prefrontal cortex(PFC); juvenile

收稿日期:2022-03-28;修回日期:2022-04-12

基金项目:国家自然科学基金资助项目(21876041)

作者简介:王子炎(1995—),男,安徽阜阳人,合肥工业大学硕士生;

胡 繁(1982—),女,湖北襄阳人,博士,合肥工业大学副教授,硕士生导师,通信作者,E-mail:hufan@hfut.edu.cn.

0 引言

双酚 A (BPA) 学名 2,2-二(4-羟基苯基)丙烷,简称二酚基丙烷,是一种白色晶体,在生产和生活中无处不在,BPA 也是世界上使用最广泛的工业化合物之一,主要用于制备环氧树脂(约占 65%)和聚碳酸酯(约占 35%),被广泛地应用商业产品中。作为食品包装的重要单体原料,BPA 可以通过物化迁移至食品内容物中,从而进入人体^[1]。人类接触 BPA 的途径主要为饮食和环境^[2],其中饮食暴露超过 95%,环境暴露低于 5%。BPA 的暴露影响健康,造成癌症、糖尿病、生殖问题、心血管疾病、肥胖和神经性疾病等^[2-5]一些生理疾病。因此,许多国家在一些食品包装中禁止 BPA 的使用,这也刺激了工业上使用 BPA 的替代物进行生产,它们与 BPA 具有相似的化学结构。已知的大概有 16 种 BPA 替代物应用于工业生产,其中最主要的是双酚 F (BPF),占所有已知 BPA 替代物的 37% 左右^[6]。

BPF 同样可以作为合成环氧树脂的单体,并且可以应用于清漆、黏合剂、塑料、水管、牙科密封剂、食品包装涂料等^[7],应用在食品包装中的 BPF 可能给人类健康带来威胁。另外,在地表水、沉积物、污水、废水以及室内灰尘中也均已发现 BPF^[6,8]。在对中国孕妇血清中的双酚物质检测中发现 BPF 的检出率为 20.4%^[9],类似地,在来自西班牙女性乳汁中 BPF 的检测水平达到 22%^[10]。此外,在人类尿液中所检测到 BPF 的质量浓度与 BPA 质量浓度相当^[11]。作为 BPA 的主要替代物,尽管体内与体外研究已表明 BPF 的毒性作用^[12],然而,目前关于 BPF 对大脑功能的影响研究依然很少。

本文利用行为学中经典的行为学范式以及免疫印迹实验观察幼年期 1 mg/(kg·d) BPF 暴露对小鼠空间工作记忆的影响,这将在工业生产中为 BPA 替代物的使用选择提供理论依据,并在食品包装领域为 BPF 的定量标准提供支持。BPA 与 BPF 的结构简式如图 1 所示。

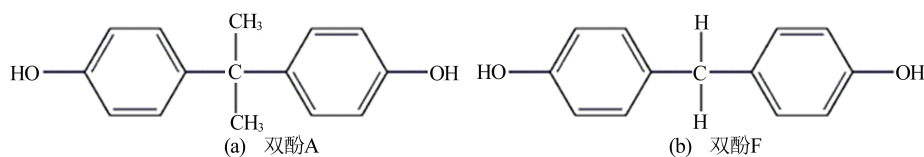


图1 双酚 A 和双酚 F 的结构简式

1 材料与amp;方法

1.1 材料

双酚 F (货号 51453)、二甲基亚砜 (DMSO) 溶液 (货号 V900090) 均购于 Sigma Aldrich; BCA 试剂盒 (货号 BL521A) 购于 Biosharp; Protein Marker (货号 180-6003)、ECL 显影液 (货号 180-501) 均购于上海天能科技有限公司; NR1 (货号 5704)、NR2 (货号 4205)、GluR1 (货号 13185) 均购于 Cell Signaling Technology; GluR2 (货号 AB20673) 购于 Abcam; 无水乙醇 (货号 10009218) 购于国药集团化学试剂有限公司。

1.2 主要仪器

电子天平、旷场箱、T 迷宫、离心机、酶标仪、磁力搅拌器、电泳仪、摇床、分子影像仪。

1.3 实验方法

1.3.1 动物的处理

12 只 C57BL/6J 雄鼠 (21 d) 购于北京斯贝福生物技术有限公司,其中对照组与 BPF 暴露组各

6 只。为了模拟人类暴露 BPF 的途径,本文选择口服饮水的方式暴露 BPF,将 BPF 先溶于 DMSO 中,再溶于水,同时对对照组小鼠饮用水中加入相同体积的 DMSO。其中暴露剂量为 1 mg/(kg·d),该剂量低于当前所研究的未观察到双酚物的不良反应水平 5 mg/(kg·d),且按人鼠体表面积药剂量换算来看,该剂量与人类在日常生活中暴露 BPA 的水平相当。暴露时间为 4 周 (21~49 d),给药完成后第 2 天进行行为学实验。

1.3.2 旷场测试

旷场装置为长、宽、高分别为 50、50、25 cm 白色无盖长方体,其中旷场底部被分为 16 个均等的小方格,中间 4 个小方格为中央区。将每只小鼠从相同位置放入旷场中,任其自由探索 5 min,整个期间通过红外摄像机记录下来,且每只小鼠在测试前用 75% 酒精擦拭箱体,以免上只小鼠的气味造成干扰。后期使用 EthoVision 8.5 软件分析小鼠第 1 次进入中央区的时间、次数以及小鼠的运动总距离和时间。

1.3.3 新物体识别

实验装置是在旷场箱基础上加 2 个正方体,在箱子两侧放 2 个边长为 4 cm 的正方体,把小鼠背对物体放入旷场中,然后让小鼠探索 10 min 后取出放回笼中。用摄像机记录实验全部过程,并分析小鼠在旷场中接触左、右 2 个物体的时间和次数。

1.3.4 T 迷宫

T 迷宫实验装置是由白色亚克力板制成,迷宫由 2 个长、宽、高分别为 46、10、15 cm 的目标臂和 1 个与之垂直的长、宽、高分别为 71、10、15 cm 的起始臂组成,起始臂内置 1 个 10、15 cm 的起始箱。该实验靠食物奖励驱动小鼠进行实验,实验中小鼠饮水不限,但进食控制在 1.2 ~ 1.5 g/(只·d)(保持小鼠体质量维持正常体质量的 80% 以上),实验分为 3 个阶段。

第 1 阶段为适应阶段,将 3 个门都打开,并在目标臂两端放上奖励食物 5 mL($V(\text{水}) : V(\text{炼乳}) = 1 : 1$),将禁食的小鼠放进去自由探索 10 min,并且自由获取奖励食物,让其适应迷宫与奖励食物,适应 2 d。

第 2 阶段为训练实验,训练时每个实验分为强迫选择训练和延迟位置匹配训练 2 个部分。强迫选择是任意关闭其中一个臂的闸门,小鼠只能进入未关闭闸门的一臂获取食物;取食完毕后,进入延迟位置匹配训练,即将小鼠放回起始臂中。10 s 后撤去所有臂的闸门后进行自由选择,将两臂全部打开,让小鼠从起始臂开始探索,若小鼠选择未曾进入的臂,则为正确选择,给以食物奖励;若重复进入相同的臂,则为错误选择,不给食物奖励。每只动物每天进行 10 个实验,实验之间间隔 1 min,然后计算每天每只小鼠选择路径的正确率。当平均正确率都达到 80% 以上,结束训练阶段。

第 3 阶段为测试阶段,测试阶段延长强迫选择训练与延迟位置匹配训练之间的时间间隔为 40 s,分别进行 10 组实验计算正确率。

1.3.5 免疫印迹实验

免疫印迹实验的基本原理是利用特异性抗体对经凝胶电泳处理过的细胞或生物组织样品进行着色,被检测物是蛋白质,“探针”是抗体,“显色”用标记的二抗,通过分析着色的位置和深度获得特定蛋白质在所分析的细胞或组织中的表达情况。

实验分别从对照组和 BPF 组前额叶中提取

蛋白质样品,采用 BCA 法标定样品蛋白质浓度,用 8% 硫酸-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶分离蛋白质样品;然后将该蛋白转移到 PVDF 膜上,用 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h;将印迹与初级抗体(GluR1、GluR2、NR2A 以及 GAPDH)在 4 °C 过夜孵育,将结合一抗的印迹和辣根过氧化物酶(HRP)二次抗体共同孵育 1 h,用 TBST 洗涤后,在分子影像仪上观察蛋白条带进行显影。利用 PS 软件对每个蛋白条带的灰度值进行测量,再用 Prism 软件做显著性分析。

1.4 数据分析

采用 Prism 5.0 对所有行为数据进行显著性差异分析,其中小鼠体质量与饮水量选择重复测量方差分析,数据表示为(平均值±标准差),其中: * 表示 $P < 0.05$ 具有统计学差异; # 表示 $P > 0.05$ 不具有统计学差异。

2 结果与分析

2.1 BPF 暴露对小鼠体质量及饮水量的影响

小鼠在幼年期暴露 BPF 期间,本实验每隔 2 d 称取其体质量以及饮水量观察其生理状态,如图 2 所示。

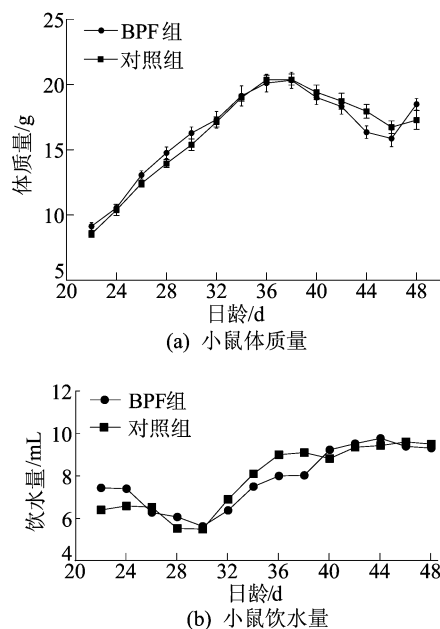


图 2 小鼠在 BPF 暴露期间的生理状态

由图 2a 可知,幼年期 BPF 暴露组与对照组小鼠的成长体质量之间无差异。由图 2b 可知,两组小鼠在幼年期药物暴露期间的饮水量之间也无差异。综上所述,幼年期 BPF 暴露不会影响小鼠的正常生理状态。

2.2 BPF 暴露对小鼠运动能力的影响

旷场测试是用来评估啮齿类动物基本运动能力以及“焦虑样”行为的经典行为范式。小鼠在旷场中移动总距离($P=0.7754, t=0.2951$)和移动速度($P=0.1900, t=1.4320$)如图 3a、图 3b 所示。

从图 3a、图 3b 可以看出,两组小鼠之间的运动情况没有显著性差异。结果表明,幼年期

BPF 暴露对小鼠空间工作记忆的影响与小鼠的运动状况和运动能力无关。BPF 组进入中央区的总时间显著低于对照组($P=0.0242, t=2.8650$),如图 3c 所示。

BPF 组穿过中央区的次数显著低于对照组($P=0.0330, t=2.6500$),BPF 组在中央区的活跃程度不高,表现出焦虑行为,如图 3d 所示。

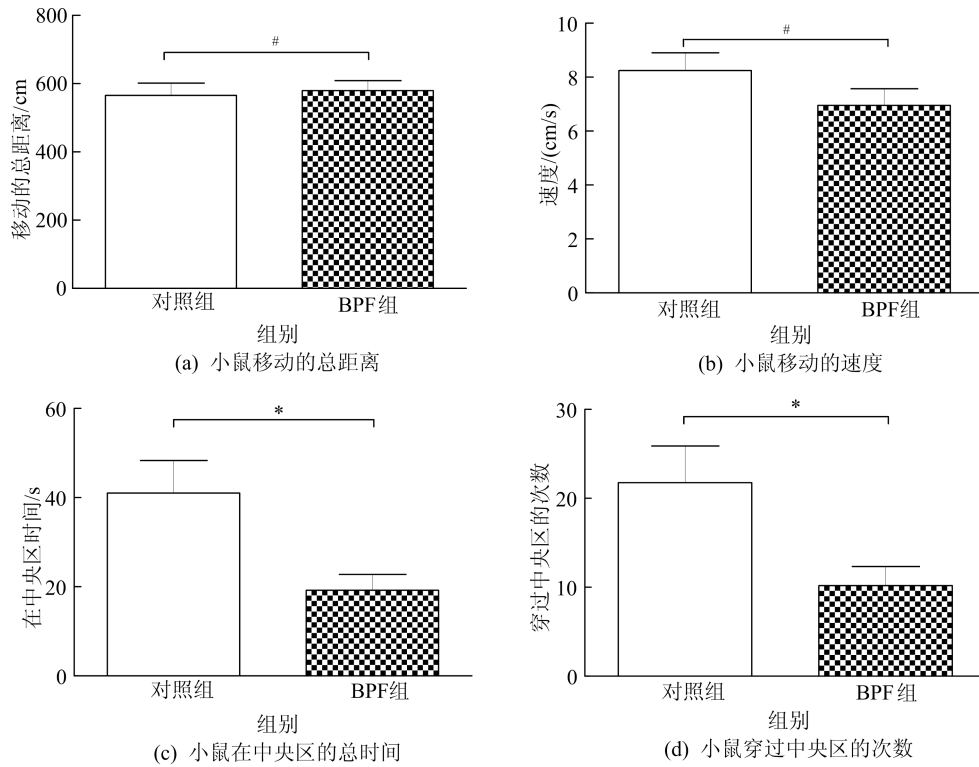


图 3 小鼠在旷场测试期间的运动能力以及行为表现

2.3 BPF 暴露对小鼠左右偏好行为的影响

为了排除小鼠存在左右偏好的影响,利用物体识别实验判断 BPF 组和对照组小鼠对旷场中 2 个物体是否有左右偏好,其表现如图 4 所

示。为 T 迷宫实验排除小鼠自身左右偏好的干扰因素,从图 4 可以看出,无论是 BPF 组($P=0.8085, t=0.2505$)还是对照组($P=0.9208, t=0.1026$)都不存在左右偏好。

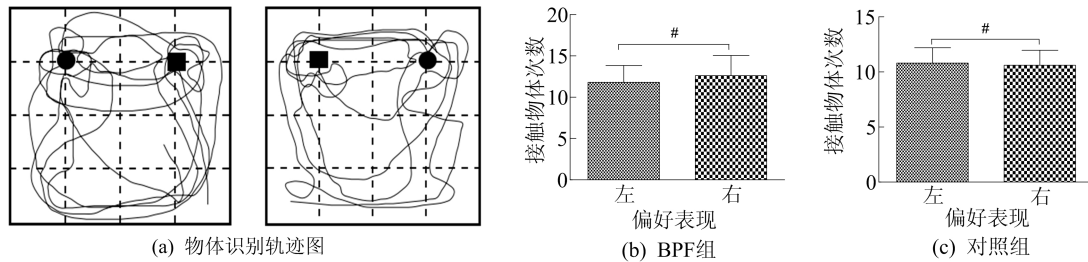


图 4 小鼠在物体识别中的左右偏好表现

2.4 BPF 暴露对小鼠工作记忆的影响

为了得到幼年期 BPF 暴露对小鼠空间工作

记忆的影响,本文进行 T 迷宫实验,示意图如图 5 所示。T 迷宫实验是典型的检测前额叶皮层

(prefrontal cortex, PFC) 依赖的空间工作记忆的行为范式, 实验分为 3 个阶段。

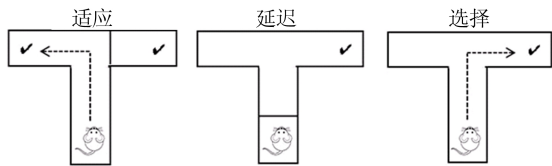


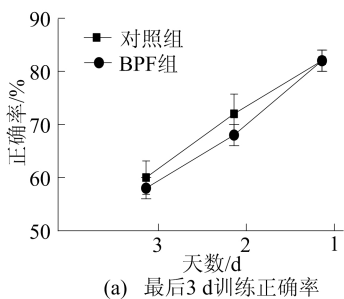
图 5 T 迷宫示意图

首先是适应阶段, 当适应阶段结束后开始第 2 阶段(学习阶段), 学习阶段延迟时间为 10 s。BPF 组与对照组在学习阶段的正确率没有显著差异性 ($P < 0.05$), 表明幼年期 BPF 暴露不会损

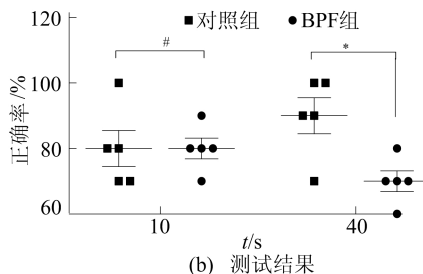
伤小鼠正常的学习能力, 如图 6a 所示。

当小鼠进行 5 d 的学习训练后, 平均正确率达到 80% 左右后进行第 3 阶段。第 3 阶段为测试阶段, 将延迟时间间隔延长至 40 s, 每只小鼠进行 10 组测试, 行为表现结果如图 6b~图 6d 所示。

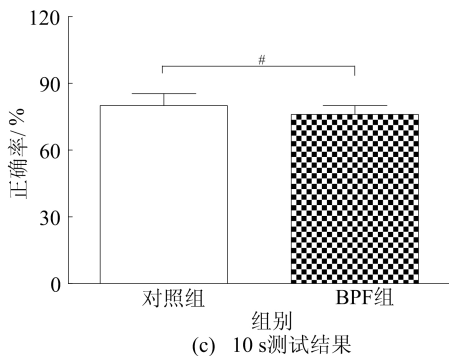
由图 6b~图 6d 可知: BPF 组小鼠选择路径的正确率在 10 s 测试中无显著差异 ($P = 0.5716$, $t = 0.5898$); 在 40 s 测试时, BPF 组的正确率与对照组小鼠相比显著降低 ($P = 0.0133$, $t = 3.1620$)。结果表明, 在幼年期 BPF 暴露会损伤小鼠的空间工作记忆能力。



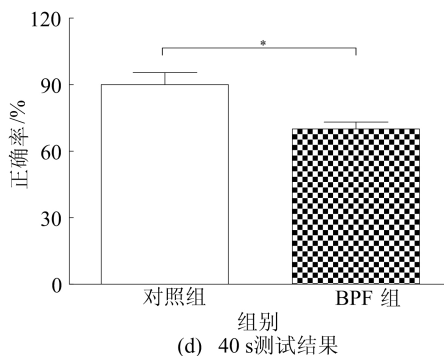
(a) 最后 3 d 训练正确率



(b) 测试结果



(c) 10 s 测试结果



(d) 40 s 测试结果

图 6 小鼠在 T 迷宫测试期间的行为表现

2.5 BPF 暴露对小鼠前额叶蛋白表达的影响

传统意义上, 前额叶被认为是空间记忆的关键大脑区域。然而, 执行功能(如空间工作记忆)在空间导航等复杂行为中也发挥着重要作用。本研究主要关注小鼠在学习一段时间后, 即在熟悉事物相关的工作任务下, 做出决策的判断来评估其空间工作记忆的能力, 所研究的脑区集中在前额叶皮层。兴奋性突触的突触可塑性, 是大脑学习和认知的信息处理基础。兴奋性神经递质谷氨酸受体主要有 AMPA 受体和 NMDA 受体, 其中: AMPA 受体主要包括 GluR1、GluR2、GluR3、GluR4; NMDA 受体主要包括 NR1、NR2、NR3。因为这 2 个受体介导 LTD 和 LTP, 对突触可塑

性以及学习认知至关重要, 所以本文研究了 PFC 中 AMPA 受体亚基(GluR1、GluR2)和 NMDA 受体亚基(NR1、NR2), 其电泳图及相关蛋白表达情况如图 7、图 8 所示。

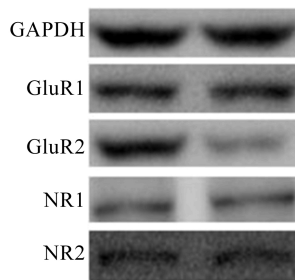


图 7 受体亚基电泳图

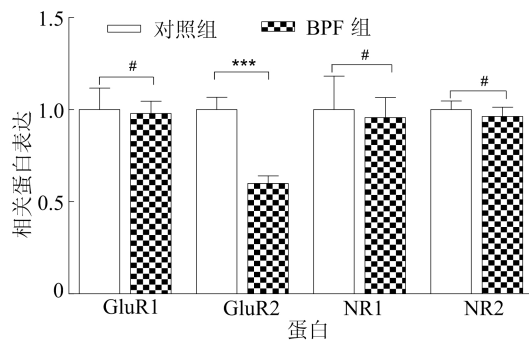


图8 BPF暴露的小鼠PFC相关蛋白表达情况

从图7、图8可以看出:前额叶皮层中兴奋性受体亚单位GluR2的表达明显低于对照组($P=0.0009, t=4.8560$),具有显著性差异;而NR1($P=0.8502, t=0.1943$)、NR2($P=0.6086, t=0.5305$)和GluR1($P=0.8861, t=0.1473$)的表达没有显著性差异。结果表明,GluR2表达的降低可能与幼年期BPF暴露导致小鼠的空间工作记忆损伤有关。

3 讨论

PFC在大脑中的作用主要是负责储存信息,除了这个作用之外,也发挥着学习短时记忆(在当前短时操作范围内记忆)能力,这种短时记忆被称为空间工作记忆。因为它在人类高级认知活动中的突出重要性,所以影响着人的许多复杂认知活动。大量研究已经表明BPA的毒性作用(包括生殖毒性、神经毒性、消化系统毒性),因此它已被限制使用,然而BPF作为BPA的主要替代物,其研究仍然相对比较少。此外,幼年期作为大脑发育关键期,尽管激素水平稳定,但神经系统仍易受到外界环境物质的干扰^[13]。因此本文以幼年期为时间窗口,观察并测试BPF暴露对小鼠学习记忆行为,特别是空间工作记忆的影响。

本文测量并分析小鼠在幼年期BPF暴露对其体质量及饮水量的影响,结果表明,BPF暴露不会影响小鼠的正常生理状态。旷场测试实验结果表明,BPF暴露不会影响小鼠的基本运动能力,但是在中央区的活动程度显著减弱,小鼠产生焦虑行为。结果与先前在围产期^[14]、青春期^[15]以及成年期^[16]暴露BPA对啮齿类动物的研究一致。在研究幼年期BPF暴露对小鼠空间工作记忆之前,本文做了物体识别实验,检测两组小鼠是否有左右偏好,把有左右偏好的小鼠剔除出去,为T迷宫实验排除其他干扰因素。物体识别实验结果表明,BPF组和对照组小鼠无左右偏好。

为了研究BPF暴露对小鼠空间工作记忆的影响,本文进行不同组别的T迷宫测试,在40s测试阶段,BPF组小鼠的T迷宫选择路径正确率显著低于对照组,在10s测试阶段,两组小鼠选择路径的正确率无显著性差异。结果表明,随着工作记忆任务难度梯度的上升,幼年期BPF暴露会对小鼠空间工作记忆产生影响,与之前BPA相同时期暴露对小鼠空间工作记忆的影响结果相似。

BPF与BPA暴露这种行为相似的结果与其在大脑中发挥的类雌激素作用有关。文献^[17]以斑马鱼为模型,研究了BPA及其替代物的雌激素活性,发现BPA的雌激素活性与BPF相当。但文献^[18]报道BPF的雌激素活性高于BPA,该结果的不一致性可能与双酚物质的暴露剂量和时期不同有关。近年来对于BPA暴露对学习记忆的影响研究较多,但是双酚类似物在这方面的探索仍然较少,未来研究思路可以延伸到BPS、BPAF等其他双酚类似物对学习记忆的影响探究,或者BPF对情绪社交影响的探究。未来将继续探究双酚物质对神经系统的影响及可能的生理机制,为工业上以双酚物质为原料的生产,尤其是在食品包装领域提供理论支持。

4 结论

幼年期 $1\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ BPF暴露降低小鼠空间工作记忆能力,并伴有小鼠在中央区活跃程度不高,表现出抑郁行为,但对小鼠本身的生理状态和运动能力没有影响。前额叶皮层脑区的谷氨酸受体蛋白亚基GluR2表达显著低于对照组,可知空间工作记忆的损伤可能与该蛋白表达量降低有关。BPF作为BPA的主要替代物,在工业生产应用上需谨慎,BPF对大脑发育关键期的毒性作用应引起重视。

[参 考 文 献]

- [1] MERCEA P. Physicochemical processes involved in migration of bisphenol A from polycarbonate[J]. Journal of Applied Polymer Science, 2010, 112(2): 579-593.
- [2] SUSANA A, ANTONIO R, MAIRA A G, et al. Bisphenol A: food exposure and impact on human health[J]. Comprehensive Reviews in Food Science & Food Safety, 2018, 17(6): 1503-1517.
- [3] ROGERS J A, METZ L, YONG V W. Endocrine disrupting chemicals and immune responses: a focus on bisphenol-A

- and its potential mechanisms[J]. *Molecular Immunology*, 2013, 53(4): 421-430.
- [4] KERI R A, HO S M, HUNT P A, et al. An evaluation of evidence for the carcinogenic activity of bisphenol A[J]. *Reproductive Toxicology*, 2007, 24(2): 240-252.
- [5] RANCIERE F, LYONS J G, LOH V H Y, et al. Bisphenol A and the risk of cardiometabolic disorders: a systematic review with meta-analysis of the epidemiological evidence[J]. *Environmental Health*, 2015, 14(46): 1-23.
- [6] CHEN D, KANNAN K, TAN H, et al. Bisphenol analogues other than BPA: environmental occurrence, human exposure, and toxicity—a review[J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(11): 5438-5453.
- [7] LIAO C Y, LIU F, YING G, et al. Occurrence of eight bisphenol analogues in indoor dust from the united states and several asian countries: implications for human exposure [J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(16): 9138-9145.
- [8] YANG Y, LU L, ZHANG J, et al. Simultaneous determination of seven bisphenols in environmental water and solid samples by liquid chromatography: electrospray tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1328: 26-34.
- [9] LI A J, ZHANG T F, SHI W, et al. Serum concentration of bisphenol analogues in pregnant women in China[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 707: 1-7.
- [10] DUALDE P, PARDO O, CORPAS-BURGOS F, et al. Bio-monitoring of bisphenols A, F, S in human milk and probabilistic risk assessment for breastfed infants[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 668(10): 797-805.
- [11] ZHOU X L, KRAMER J P, CALAFAT A M, et al. Automated on-line column-switching high performance liquid chromatography isotope dilution tandem mass spectrometry method for the quantification of bisphenol A, bisphenol F, bisphenol S, and 11 other phenols in urine[J]. *Journal of Chromatography B*, 2014, 944: 152-156.
- [12] ELADAK S, GRISIN T, MOISON D, et al. A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound[J]. *Fertility and Sterility*, 2015, 103(1): 11-21.
- [13] SISK C L, ZEHR J L. Pubertal hormones organize the adolescent brain and behavior[J]. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 2005, 26(3/4): 163-174.
- [14] XU X H, HONG X, XIE L D, et al. Gestational and lactational exposure to bisphenol-A affects anxiety-and depression-like behaviors in mice[J]. *Hormones & Behavior*, 2012, 62(4): 480-490.
- [15] WEINSTEIN S D, VILLAFANE J J, JULIANO N, et al. Adolescent exposure to Bisphenol-A increases anxiety and sucrose preference but impairs spatial memory in rats independent of sex[J]. *Brain Research*, 2013, 1529(13): 56-65.
- [16] XU X H, DONG F N, YANG Y L, et al. Sex-specific effects of long-term exposure to bisphenol-A on anxiety-and depression-like behaviors in adult mice[J]. *Chemosphere*, 2015, 120: 258-266.
- [17] MOREMAN J, LEE O, TRZNADEL M, et al. Acute toxicity, teratogenic, and estrogenic effects of bisphenol A and its alternative replacements bisphenol S, bisphenol F, and bisphenol AF in zebrafish embryo[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(21): 12796-12805.
- [18] LEFOL V, AIT-AISSA S, SONAVANE M, et al. *In vitro* and *in vivo* estrogenic activity of BPA, BPF and BPS in zebrafish-specific assays[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2017, 142(8): 150-156.

(责任编辑 闫杏丽)

(上接第 1235 页)

- [7] CHUNG M Y, VREBALOV J, ALBA R, et al. A tomato (*Solanum lycopersicum*) *APETALA2/ERF* gene, *SlAP2a*, is a negative regulator of fruit ripening[J]. *The Plant Journal*, 2010, 64(6): 936-947.
- [8] FU C C, HAN Y C, QI X Y, et al. Papaya *CpERF9* acts as a transcriptional repressor of cell-wall-modifying genes *Cp-PME1/2* and *CpPG5* involved in fruit ripening[J]. *Plant Cell Reports*, 2016, 35(11): 2341-2352.
- [9] LI T, JIANG Z, ZHANG L, et al. Apple (*Malus domestica*) *MdERF2* negatively affects ethylene biosynthesis during fruit ripening by suppressing *MdACS1* transcription[J]. *The Plant Journal*, 2016, 88(5): 735-748.
- [10] ZHOU H, ZHAO L, YANG Q, et al. Identification of *EIL* and *ERF* genes related to fruit ripening in peach[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(8): 2846-2861.
- [11] GIOVANNONI J. Molecular biology of fruit maturation and ripening[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2001, 52: 725-749.
- [12] GIOVANNONI J J. Fruit ripening mutants yield insights into ripening control[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, 10(3): 283-289.
- [13] SEYMOUR G B, STERGAARD L, CHAPMAN N H, et al. Fruit development and ripening[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2013, 64: 219-241.
- [14] PIRRELLO J, PRASAD B C, ZHANG W, et al. Functional analysis and binding affinity of tomato ethylene response factors provide insight on the molecular bases of plant differential responses to ethylene[J]. *BMC Plant Biology*, 2012, 12: 190-204.

(责任编辑 闫杏丽)