

文章编号: 1674-7054(2016)02-0253-06

全氟辛酸暴露对蚯蚓 DNA 损伤和抗氧化酶 基因表达水平的影响

冯少君^{1,2}, 刁晓平^{1,2}, 程华民^{1,2}, 陶菁^{1,2}, 胡家琪², 童雪²

(1. 海南大学 海口市环境毒理学重点实验室, 海口 570228; 2. 海南大学 农学院, 海口 570228)

摘要: 笔者采用自然土壤培养法, 通过 28 d 亚急性暴露实验, 研究了全氟辛酸(perfluorooctanoic acid, PFOA) 对赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*) 的 SOD, CAT, GST 3 种抗氧化酶基因表达水平及 DNA 损伤的影响。研究表明: (1) PFOA 胁迫可致蚯蚓体腔细胞 DNA 损伤, 不同质量浓度的 PFOA 对蚯蚓体腔细胞尾长、尾部 DNA 含量和尾距均有明显的影响, 且具有一定的剂量-效应关系, 其中, 尾矩和慧尾长度这 2 个指标对 PFOA 的胁迫最敏感。(2) PFOA 胁迫也能引致蚯蚓抗氧化特异性基因表达水平的变化, CAT, GST, SOD 3 种基因表达量变化趋势相似, 质量浓度为 1 mg·kg⁻¹ 时, 蚯蚓 SOD 基因表达水平被诱导上调, 质量浓度为 5 mg·kg⁻¹ 和 10 mg·kg⁻¹ 时, SOD 表达量呈现剧烈下调的趋势; GST 基因在 10 mg·kg⁻¹ 组有明显下调, CAT 基因表达在 5 mg·kg⁻¹ 组基因表达水平最低, 说明 SOD 基因的表达对 PFOA 的胁迫较敏感。蚯蚓体腔细胞 DNA 损伤和 3 种抗氧化酶基因表达水平的变化可作为潜在的生物标志物, 用于监测 PFOA 对土壤生物蚯蚓的毒性大小。

关键词: 全氟辛酸; 赤子爱胜蚓; DNA 损伤; 抗氧化酶; 基因表达

中图分类号: X 171.5 文献标志码: A DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2016.02.019

全氟辛酸(perfluorooctanoic acid, PFOA) 是环境中存在的最典型的全氟化合物之一, 能在高等动物体内蓄积, 成为备受关注的持久性有机物^[1]。PFOA 的 C-F 共价键具有极高的化学键能, 这使其具有疏水疏油、耐高温耐氧化的特性; 其作为表面活性剂被广泛应用于航空科技、电子、化工、纺织等行业, 如纺织物、皮革、食品包装材料、泡沫灭火器以及厨具等民生用品^[2]。水体、沉积物、土壤、生物体内均发现存在 PFOA。陈舒等^[3] 利用固相萃取分离富集等方法, 同时结合高效液相色谱-电喷雾负电离源串联质谱法分析我国东部 8 个农村的土壤、地表水、地下水的 PFOA 的含量, 结果表明, 土壤、地表水、地下水的 PFOA 的含量分别为 0.34~14.5 ng·g⁻¹, 4.8~29.6 ng·L⁻¹, 0~176 ng·L⁻¹。胡国成等^[4] 利用高效液相色谱与质谱联用技术检测了广州、东莞、深圳、珠海 4 个城市 45 个土壤样品的全氟辛烷磺酸(PFOS) 和全氟辛酸(PFOA) 含量, 结果表明 4 个城市土壤中 PFOA 的平均含量为 0.15 ng·g⁻¹, 含量范围为 0.02~1.24 ng·g⁻¹。崔媛等^[5] 研究了 PFOA 对斑马鱼胚胎发育、行为和 DNA 损伤的毒性, 结果表明, PFOA 对斑马鱼胚胎具有发育毒性, 具体表现为自主运动异常, 心率降低和行为反应能力变弱, 同时伴随畸形、细胞凋亡和 DNA 损伤。徐冬梅等^[6] 通过人工土壤染毒的方法研究了 PFOA 对赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*) 的毒性, 结果显示, PFOA 对蚯蚓的急性毒性作用与染毒时间和染毒浓度相关, 其中 7 d 和 14 d 的 LC₅₀ 值分别为 816.58, 792.50 mg·kg⁻¹。蚯蚓在土壤中分布广泛, 数量多, 且对土壤污染胁迫比较敏感, 被称为土壤质量的指示生物^[7]。赤子爱胜蚓生长周期短, 繁殖力强, 易饲养, 是 OECD(经济合作与发展组织) 标准品种。基因转录水平作为一个敏感的指标, 被用于评估毒物对蚯蚓的毒性作用。单细胞凝胶电泳实验(Sin-

收稿日期: 2016-02-22

基金项目: 海口市重点科技项目(海口城市污泥和热带农业废弃物的资源化利用关键技术研究)

作者简介: 冯少君(1991-), 女, 海南大学农学院 2013 级硕士研究生, E-mail: 1269679182@qq.com

通信作者: 刁晓平(1963-), 女, 博士, 教授, 主要研究方向为生态毒理学, E-mail: diaoxip@hainu.edu.cn

gle cell gel electrophoresis, SCGE) 又称彗星实验(comet assay) 是检测真核细胞基因损伤的重要方法, 该方法能够在单细胞水平上检测 DNA 损伤。目前, 关于 PFOA 暴露胁迫下蚯蚓特异性蛋白基因表达的研究还较为缺乏, 以蚯蚓为模式生物探讨 PFOA 对其基因损伤的研究更鲜见报道。鉴于药物与生物体之间的相互作用始于分子水平, 因此, 有必要开展分子水平上 PFOA 土壤污染胁迫蚯蚓特异性蛋白基因响应表达的研究。笔者拟在自然土壤环境中研究 PFOA 暴露对蚯蚓 DNA 的损伤以及对 SOD, CAT, GST 3 种抗氧化酶基因在转录水平上表达量的影响, 以期筛选出敏感分子生物标志物, 为 PFOA 暴露对蚯蚓亚急性毒性效应的早期分子诊断和生态风险评价提供重要依据。

1 材料与方 法

1.1 供试动物和试剂 赤子爱胜蚓购自海南省儋州市蚯蚓养殖繁育基地。选择 3 月龄以上, 体质量约 300 ~ 400 mg · 条, 环带明显, 健康成熟的蚯蚓作为受试动物, 各处理间蚯蚓的大小和体质量基本相等。PFOA(纯度 > 96%) 购自 sigma aldrich 公司, RNAiso Plus(TaKaRa), M-MLV Reverse Transcriptase (Promega), FastStart Essential DNA Green Master(Roche)。

1.2 仪器与耗材 电子分析天平、电子秤、人工气候箱(MGC - 300H, 上海, 一恒)、低温离心机(eppendorf)、制冰机、容积 1 L 的玻璃烧杯、超微量分光光度计(Thermo Nanodrop 2000)、荧光检测器(ROCHE LightCycler96), PCR 仪。

1.3 PFOA 对蚯蚓的染毒实验 挑选具有环带的成熟蚯蚓, 用清水冲洗, 置于底部铺有 1 层湿润滤纸的烧杯中, 用塑料薄膜封口, 并用解剖针扎出透气孔, 将烧杯放入人工气候箱中清肠 24 h。人工气候箱条件: 温度(20 ± 1) °C, 湿度 75% \pm 2%, 光暗比 12 h/12 h。自然土壤采自海南大学农学院秀英农场, 该土壤为未被化学药品污染。实验前土壤经研磨, 过筛, 高温灭菌等处理, 含有机质 7.83 g · kg⁻¹, 速效磷 0.57 g · kg⁻¹, 速效钾 71 mg · kg⁻¹, 全氮 0.23 g · kg⁻¹, pH = 4.17。

根据文献 [8] 的研究结果: 土壤 PFOA 轻度和中度污染的临界值分别为 34, 171 mg · kg⁻¹, 在预实验的基础上, 设 1 个对照(CK) 4 个处理(暴露 PFOA 为 1, 5, 10, 50 mg · kg⁻¹), 每处理设 3 个重复, 每重复 10 条蚯蚓。取适当的 PFOA 溶于蒸馏水中, 配成不同浓度梯度的溶液, 均匀拌于自然土壤中, 用去离子水调节土壤湿度为 25%。挑选 10 条体质量大致相等且已清肠处理的蚯蚓放入预装 500 g 湿土的烧杯(1 000 mL) 中, 并放置于人工气候箱中培养 28 d。人工气候箱条件: 温度(20 ± 1) °C, 湿度 75% \pm 2%, 光暗比 12 h/12 h。每周添加适量的牛粪和水。

1.4 单细胞凝胶电泳实验 将染毒 28 d 的蚯蚓清肠, 每重复随机挑选 3 条蚯蚓。蚯蚓体腔细胞的提取采用 Eyambe G S 等 [9] 的方法, 用磷酸缓冲液调整细胞浓度后, 保存于 4 °C 条件下待用。实验采用 3 层凝胶法, 第 1 层是 80 μ L 1% 正常熔点琼脂糖; 第 2 层是 75 μ L 混合液(75 μ L 0.8% 低熔点琼脂糖和 10 μ L 细胞悬浮液混匀); 第 3 层是 80 μ L 0.8% 低熔点琼脂糖。用 CASP 软件分析彗星图像, 每重复分析 100 个细胞, 得到 DNA 损伤指标: 彗星尾长(tail length, TL)、彗尾 DNA 含量(tail DNA content, TD)、尾距(tail moment, TM)。电泳后, 经 SYBR Green I 染色, 用荧光显微镜观察, 每份样品随机拍 10 个 DNA 受损细胞图像, 每组为 3 个样本, 即每组观察 30 个 DNA 受损细胞。

1.5 SOD, GST, CAT 蛋白基因 mRNA 的 RT-qPCR 检测 按 Trizol 试剂说明书进行蚯蚓体腔液总 RNA 的提取, 取得的总 RNA 沉淀用 DEPC(diethylprocarbonate, 即乙基焦碳酸酯) 水溶解分装 - 80 °C 保存。RNA 的完整性通过 1% 琼脂糖电泳, 染色后观察。RNA 浓度 OD 值采用超微量分光光度计测定, 取 OD = 1.8 ~ 2.1 的样品进行反转。取 2 μ g 总 RNA, 按照反转录试剂盒的操作要求进行, 产物 cDNA 于 - 20 °C 保存。3 种抗氧化酶的 RT-qPCR 检测采用 10 μ L 体系, 包括 2Xsybr Select Master Kit 5 μ L, 上下游引物各 0.2 μ L, 模板 DNA 1 μ L, ddH₂O 3.6 μ L。反应条件: 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 90 s 45 个循环; 溶解曲线条件: 95 °C 10 s 65 °C 60 s 97 °C 1 s。内参基因(β -actin) 和 3 个抗氧化酶基因检测引物序列见表 1。

表 1 抗氧化酶基因 RT-qPCR 检测的引物序列

Tab. 1 Primer sequences of the antioxidant enzyme genes used for RP-qPCR assay

基因	登录号	上游引物	下游引物	PCR 产物大小/bp
Gene	Accession no.	Forward primer	Reverse primer	Length
β -actin	GU177854	TCCATCGTCCACAGAAAG	AAATGTCCTCCGCAAGCT	149
SOD	GU177856	TGCTCACTTCAACCCATTT	TTGGCAACACCACTTTCA	105
CAT	GU177857	CATTGCGGATGGAAACTA	CCAAGGACAACAACCTGCTC	165
GST	HQ693699	ATGCCATTCTGCGCTACGTTGC	TCCGGCGCCTCCTTGATTTTC	984

1.6 数据统计与分析 荧光定量 PCR 的数据应用 Delta-Delta Ct 方法进行相对定量分析, 基因的相对表达的实验数据应用 Excel 和 SPSS 19.0 软件进行统计分析。每样本重复 3 次, 取平均值。彗星实验数据采用 SPSS 19.0 软件统计, 绘图采用 Excel 完成。在 $P=0.05$ 的置信水平对尾长、尾部 DNA 含量、尾距进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 蚯蚓体腔细胞彗星图像分析的 DNA 受损形态 图 1 表明, 空白对照组的体腔细胞头部为圆形, 荧光强度均匀, 边缘整齐, 无拖尾现象; 经不同的 PFOA 处理后, 细胞 DNA 出现断裂, 在荧光显微镜下可见整个细胞呈彗星状, 即表现为头部 DNA 集中, 荧光较强, 尾部为荧光较弱的 DNA 断片。DNA 受损的细胞有 1 个像彗星一样的尾巴, 并且随着 PFOA 剂量的增加, 彗星拖尾越明显, 彗星的尾巴增长, 尾部的荧光强度增加, 说明 DNA 损伤越严重。

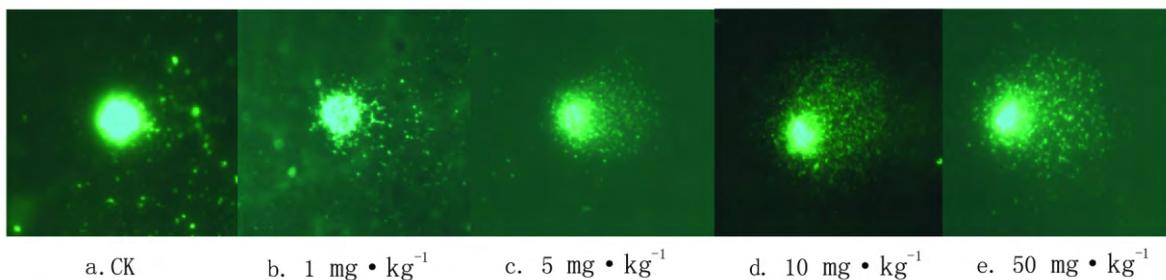


图 1 蚯蚓体腔细胞彗星实验图示

Fig. 1 Typical comet images of earthworms' coelomocytes cells

2.2 PFOA 暴露对蚯蚓体腔细胞 DNA 的损伤 图 2 显示, PFOA 能引起蚯蚓体腔细胞 DNA 的损伤, 表现为彗尾 DNA 含量的增加 (a)、彗尾长度加长 (b)、Olive 尾矩增加 (c), 存在明显的剂量-效应关系。彗尾 DNA 含量在 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 处理组呈显著增加 ($P < 0.05$), 其最大值 (38.38%) 出现在 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 处理组, 是

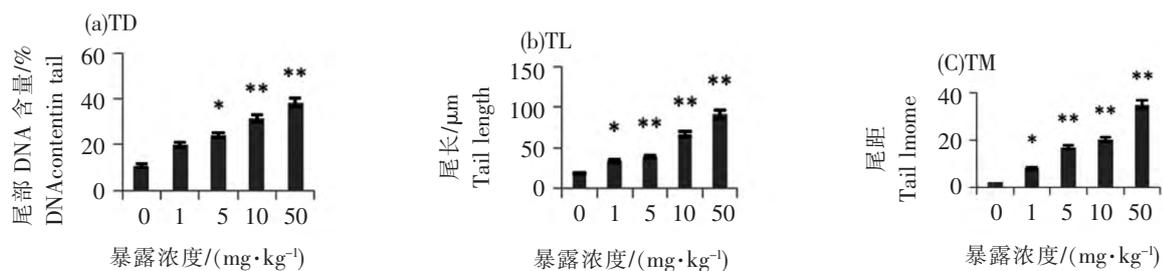


图 2 PFOA 暴露 28 d 对蚯蚓 TD(a), TL(b), TM(c) 的影响
与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig. 2 Effect of PFOA on earthworm TD(a), TL(b), TM(c) after 28-day exposure
Significant differences from the control are indicated as * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

对照组的3.7倍 ($P < 0.01$) ; 慧尾长度对PFOA的胁迫尤为敏感 在 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 处理组呈显著增加 ($P < 0.05$) 其在 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 处理组的最大值 ($92.11 \mu\text{m}$) 是对照组的5.4倍 ($P < 0.01$) 。PFOA胁迫对尾矩也表现为在 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 处理组呈现显著增加 ($P < 0.05$) 其在 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 处理组是35.01, 为对照组的17倍 ($P < 0.01$) 。PFOA对这3个指标的影响表现出很好的一致性, 同时药物的染毒浓度与这4个指标间均有很好的相关性。在测定的3个指标中以尾矩和慧尾长度对PFOA的胁迫尤为敏感。

2.3 蚯蚓总 RNA 的纯度和完整度 由图3可见, 蚯蚓总RNA完整性较好, 其28s, 18s, 5s RNA条带清晰; 且RNA的 A_{260}/A_{280} 比值均在1.8~2.1之间, 表明抽提的总RNA纯度较高。说明Trizol法提取的RNA可满足cDNA合成和RT-qPCR反应的需求。

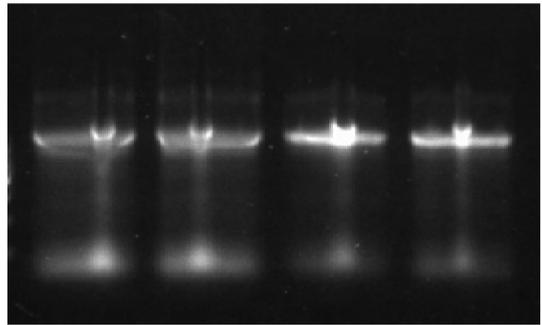


图3 蚯蚓总RNA电泳图谱
Fig.1 Electrophoresis image of total RNA extracted from earthworms

2.4 PFOA胁迫对蚯蚓SOD, CAT, GST抗氧化酶基因表达的影响 图4可见, SOD基因呈现先上调后下调的趋势, 与对照组相比, $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组SOD基因表达水平呈显著下调 ($P < 0.05$) , $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组下调最低; 随着浓度的增加, 其表达量有所回升。GST基因表达也有相似的先上调后下调趋势, 与对照组相比, $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组下调最低呈显著差异 ($P < 0.05$) 。CAT基因表达在 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组基因表达水平最低, 与对照组相比, 没有显著差异 ($P > 0.05$) 随着染毒浓度的增加, 其表达量在 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组有明显回升, 但未达显著差异。可见SOD基因表达水平对PFOA的胁迫尤为敏感。

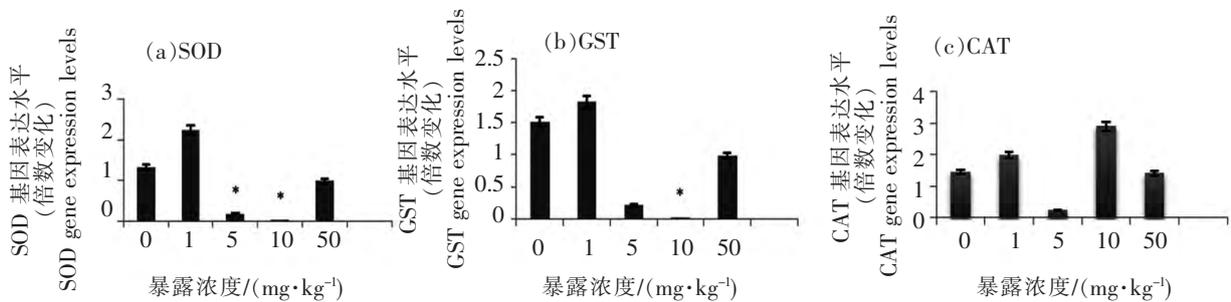


图4 PFOA暴露28 d对蚯蚓SOD、CAT、GST基因表达的影响
与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig.4 Gene expression levels of SOD, CAT, GST in the control and PFOA exposed earthworms after 28-day exposure
Significant differences from the control are indicated as * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

化学物质进入生物体后, 在机体内发生生物转化, 形成一系列代谢中间产物, 其中, 一些产物参与氧化还原反应, 进而诱导活性氧大量生成^[10]。活性氧若未及时清除, 会造成机体的氧化损伤, 包括脂质过氧化、蛋白质过氧化和DNA的损伤等。笔者利用彗星实验探讨在PFOA胁迫下, 蚯蚓体腔细胞DNA的损伤程度。实验结果表明, PFOA能致蚯蚓细胞DNA发生损伤, 且随着染毒浓度的升高, 损伤越明显, TL、TD和TM逐渐增大, 存在明显的剂量—效应关系。这可能是在PFOA胁迫下, 蚯蚓体内产生了活性氧自由基和其他中间反应产物, 能够造成细胞核DNA裂解, 从而对细胞DNA造成损伤。郑晓奇等^[11]研究发现, 全氟辛磺酸(PFOS)可造成赤子爱胜蚓体腔细胞DNA的损伤, 其变化趋势与笔者的研究结果一致。崔媛等^[5]证明PFOA暴露致斑马鱼细胞DNA损伤, 且损伤程度与PFOA浓度呈正相关。尽管研究的对象不同, 物种有差异, 但崔媛等^[5]的研究结果与笔者的研究结果具有高度的相似性。

生物细胞进行正常代谢时, 常产生大量的超氧阴离子自由基、过氧化氢、羟自由基等活性氧。少量的自由基作为第2信使, 在信号传递的过程中非常重要, 也是生物体所必须的。然而自由基的性质十分活

泼, 多余的自由基如未及时清除, 将会破坏各种生物大分子, 引发一系列氧化损伤, 比如DNA损伤、酶失活、脂质过氧化等, 导致生物体的生理病变^[12]。SOD在清除活性氧反应过程中首先发挥作用, 将超氧阴离子自由基快速歧化为过氧化氢和分子氧。过氧化氢在过氧化氢酶和谷胱甘肽硫转移酶的作用下转化为水和分子氧。本研究结果显示: 蚯蚓暴露于PFOA土壤28d后, $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 浓度组蚯蚓SOD基因表达水平被诱导上调, 反映了SOD基因表达受到抗氧化应激的刺激, 在受到应激的生理条件下SOD通过上调基因表达保持动态平衡, 以消除超氧化物自由基, 从而满足机体的需要。随着染毒浓度增加, 当外源性化学物质的胁迫超过其自身的调节能力, 抗氧化酶活性受到明显抑制, 因而出现SOD基因表达量呈现剧烈下调的趋势^[13]。CAT、GST基因表达量均出现先上调再下调的趋势, GST基因表达量在 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 处理组明显下调, 这可能与这2种酶在受到外界胁迫时, 均参与清除活性氧的反应, 并通过调节代谢水平来维系其动态平衡。Yeung L W Y等^[14]利用基因芯片技术证明PFOS对基因表达有抑制作用, 这与笔者的研究结果一致。其他化学物质胁迫蚯蚓后, 对蚯蚓生长和抗氧化酶基因表达水平影响也有相似的结果^[15]。

PFOA胁迫对蚯蚓体腔细胞的DNA能造成明显损伤, 尾矩和慧尾长度这2个指标对PFOA的胁迫尤其敏感, 表现出明显剂量—效应关系。PFOA胁迫能致蚯蚓抗氧化特异性基因表达和调控产生变化, CAT、GST和SOD的基因表达量变化趋势相似, 其中SOD基因的表达对PFOA的胁迫较敏感。本试验结果表明, 蚯蚓体腔细胞DNA的损伤程度和3种抗氧化酶(CAT、GST、SOD)基因表达水平的变化可作为潜在的生物标志物, 用以监测PFOA对土壤生物蚯蚓的毒性大小, 并为构建PFOA土壤污染早期预警体系提供理论依据。

参考文献:

- [1] Renn R. Growing concern over perfluorinated chemicals [J]. *Environmental Science & Technology*, 2001, 35(7): 154A–160A.
- [2] 宋维平, 季宇彬, 郎朗. 全氟辛酸的毒理学研究进展 [C]//中国毒理学会环境与生态毒理学专业委员会. 中国毒理学会环境与生态毒理学专业委员会成立大会论文集, 2008: 8.
- [3] 陈舒, 焦杏春, 盖楠, 等. 中国东部农村地区土壤及水环境中全氟化合物的组成特征和来源初探 [J]. *岩矿测试*, 2015(5): 579–585.
- [4] 胡国成, 郑海, 张丽娟, 等. 珠江三角洲土壤中全氟化合物污染特征研究 [J]. *中国环境科学*, 2013(S1): 37–42.
- [5] 崔媛, 程艳, 刘伟, 等. 全氟辛酸铵的斑马鱼急性毒性 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2013, 11(27): 1.
- [6] 徐冬梅, 李禅丹, 王艳花, 等. 全氟辛酸(PFOA)对蚯蚓的毒性作用 [J]. *生态毒理学报*, 2012, 7(5): 532–536.
- [7] 史志明, 徐莉, 胡锋. 蚯蚓生物标记物在土壤生态风险评估中的应用 [J]. *生态学报*, 2014, 19: 5369–5379.
- [8] 田海霞, 孔龙, 黄琴, 等. 全氟辛酸铵盐对土壤呼吸强度和微生物数量的影响 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2011(1): 131–136.
- [9] Eyambe G S, Goven A J, Fitzpatrick L C, et al. A non-invasive technique for sequential collection of earthworm (*Lumbricus terrestris*) leukocytes during subchronic immunotoxicity studies [J]. *Laboratory Animals*, 1991, 25(1): 61–67.
- [10] 张克烽, 张子平, 陈芸, 等. 动物抗氧化系统中主要抗氧化酶基因的研究进展 [J]. *动物学杂志*, 2007(2): 153–160.
- [11] 郑晓奇, 史雅娟, 吕永龙, 等. 全氟辛烷磺酸暴露对赤子爱胜蚓的急性毒性效应 [J]. *生态毒理学报*, 2013(5): 687–694.
- [12] 宫晓宁. PFOS和PFOA对涡虫胁迫相关蛋白的基因表达影响及DNA损伤研究 [D]. 淄博: 山东理工大学, 2014.
- [13] 高颖晖, 周万红, 窦鹏, 等. 九香虫醇提物对运动大鼠骨骼肌抗氧化酶活性及其基因表达水平的影响 [J]. *生物技术通报*, 2015(12): 146–149.
- [14] Yeung L W Y, Guruge K S. Differential expression of chicken hepatic genes responsive to PFOA and PFOS [J]. *Toxicology*, 2007, 237(1/2/3): 111–125.
- [15] Xiangbo Xu, Yajuan Shi, Yonglong Hu, et al. J Ritchie. 2015. Growth Inhibition and Altered Gene Transcript Levels in Earthworms (*Eisenia fetida*) Exposed to 2,2,4,4-Tetrabromodiphenyl Ether [J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2015(1): 1–7.

The Effect of PFOA Exposure on DNA Damage and Gene Expression Levels of Antioxidant Enzyme of *Eisenia foetida*

FENG Shaojun^{1,2}, DIAO Xiaoping^{1,2}, CHENG Huaming^{1,2}, TAO Jing^{1,2}, HU Jiaqi², TONG Xue²

(1. Haikou Key Laboratory of Environment Toxicology, Hainan University, Haikou, Hainan, Hainan 570228;

2. College of Agronomy, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: Perfluorooctanoic acid (PFOA), a kind of synthetic chemicals, widely exists in the environment. It can be accumulated in higher animals because of its good chemical stability and thermal stability, which makes it become a persistent organic matter of concern in the environment. Earthworms of *Eisenia foetida*, an indicating animal, were exposed to PFOA at different exposure concentrations to assay their DNA damage and the gene expression of their antioxidant enzymes, SOD, CAT and GST, by using natural soil contact method with a cycle of 28 days. PFOA stress resulted in DNA damage of the coelomic cells of the earthworm. PFOA exhibited significant effect on the tail length (TL), tail moment (TM) and tail DNA content (TD) ($P < 0.05$) of the earthworms at different exposure concentrations with a given dose-response relationship ($P < 0.01$), and the TL and TM were two indicators that were most sensitive to PFOA exposure. PFOA stress also induced the change of antioxidant-specific gene expression of the earthworms. SOD gene expression was induced to show upregulation in response to the PFOA at the concentration of $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, and then significant down-regulation at the concentration of $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. GST gene expression was obviously down-regulated at the PFOA concentration of $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. The expression level of CAT gene was lowest at the PFOA concentration of $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ without significant difference compared with the control. Of the genes of the antioxidant enzymes in the earthworm the SOD gene was found the most sensitive to PFOA. All these results showed that the DNA damage of earthworm coelomic cells and the change of gene expression of antioxidant enzymes of the earthworm could be used as biomarkers to indicate the effect of PFOA on the earthworm, a soil organism.

Keywords: perfluorooctanoic acid (PFOA); *Eisenia foetida*; DNA damage; antioxidant enzyme; gene expression