DOI: 10.16016/j.1000-5404.201909139

苯并芘暴露大鼠海马组织的全基因组 DNA 甲基化差异分析

谭 强[1],王 晶[2],李春林[3],唐 萍[1],况 桃[1],黄 强[1],陈承志[1],蒋学君[1],程淑群[1],涂白杰[1],夏茵茵[1]
400016 重庆,重庆医科大学公共卫生与管理学院,医学与社会发展研究中心,健康领域社会风险预测治理协同创新中心[1];611430 成都,四川省成都市新津县疾病预防控制中心[2]; 400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院预防保健科[3]

[**摘要**] **目的** 研究苯并芘暴露大鼠海马组织的 DNA 甲基化差异,探讨苯并芘对海马功能损伤的机制。**方法** 将大鼠分为对照组和苯并芘染毒组,每组 10 只;染毒结束后,采用 Morris 水迷宫检测大鼠的空间记忆学习能力,随后对大鼠海马进行 HE 染色与简化表观亚硫酸氢盐测序法(reduced representation bisulfite sequencing, RRBS)测序,对测序结果进行 GO 和 KEGG 分析,用 qRT-PCR 检测 *Tnr* 基因与 *Pla2g2a* 基因 mRNA 的表达。**结果** Morris 水迷宫与 HE 染色发现苯并芘暴露导致了大鼠空间学习记忆能力的障碍与海马组织损伤;RRBS 测序后检测到差异性甲基化区域 32 个,GO 分析富集到 871 条 GO 条目,KEGG 分析得到 52 条通路,其中 145 条 GO 条目和 11 条通路显著富集($P<0.05$),苯并芘染毒组与对照组相比,*Tnr* 基因相对表达量减少,而 *Pla2g2a* 基因相对表达量增加($P<0.05$)。**结论** 与未染毒的大鼠相比,苯并芘染毒后大鼠海马组织存在一定数量的甲基化差异位点,这些甲基化差异位点可能对研究苯并芘导致海马损伤的机制具有重要指导意义。

[**关键词**] 苯并芘;海马;DNA 甲基化;大鼠
[**中图法分类号**] R322.81;R394.1;R994.6 [**文献标志码**] A

Genome-wide differential DNA methylation in hippocampus of rats after benzo(a) pyrene exposure

TAN Qiang[1], WANG Jing[2], LI Chunlin[3], TANG Ping[1], KUANG Tao[1], HUANG Qiang[1], CHEN Chengzhi[1], JIANG Xuejun[1], CHENG Shuqun[1], TU Baijie[1], XIA Yinyin[1] [1]Research Center for Medicine and Social Development, Innovation Center for Social Risk Governance in Health, School of Public Health and Management, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Xinjin Center for Disease Control and Prevention, Chengdu, Sichuan Province, 611430; [3]Department of Preventive Health Care, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China

[**Abstract**] **Objective** To study the differential DNA methylation in the hippocampus of rats exposed to benzo(a)pyrene and explore the mechanism of benzo(a)pyrene-induced functional impairment of the hippocampus. **Methods** Twenty male SD rats (3 weeks old) were randomly divided into control group and benzo(a)pyrene exposure group ($n=10$), and in the latter group, the rats were exposed to benzo(a)pyrene delivered *via* gavage on a daily basis for 7 consecutive weeks. After the exposure, Morris water maze test was performed to assess the changes in the spatial memory and learning ability of rats; the brain tissues were dissected for morphological examination of the hippocampal neurons with HE staining. Reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) of the genomic DNA from the hippocampus was performed, followed by GO and KEGG analyses of the sequencing data; qRT-PCR was used to detect the expression levels of *Tnr* and *Pla2g2a* mRNAs. **Results** Morris water maze test and HE staining showed that exposure to benzo(a)pyrene resulted in obvious impairment of the spatial learning and memory abilities and caused hippocampal injuries in rats.

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81502777,81372957)
[**通信作者**] 夏茵茵,E-mail:100118@cqmu.edu.cn

DNA methylation sequencing identified 32 differentially methylated regions; GO analysis enriched 871 GO items and KEGG analysis obtained 52 pathways, of which 145 GO items and 11 pathways were significantly enriched ($P<0.05$). Compared with the control rats, the benzo(a)pyrene-exposed rats showed significantly decreased *Tnr* mRNA expression and increased *Pla2g2a* mRNA expressions in the hippocampus ($P<0.05$). **Conclusion** A number of differentially methylated sites occur in the genomic DNA in rat hippocampus following benzo(a)pyrene exposure, and these sites may provide important clues in exploring the mechanism of benzo(a)pyrene-induced hippocampal injury.

[**Key words**] benzo(a)pyrene; hippocampus; DNA methylation; rats

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81502777, 81372957). Corresponding author: XIA Yinyin, E-mail: 100118@cqmu.edu.cn

苯并芘{benzo(a)pyrene,B[a]P}是一种通过煤炭、石油等物质燃烧,食物高温烹调还有吸烟等方式而产生的多环芳烃化合物,广泛存在于人们生产与生活环境中[1]。据报道,B[a]P 除了可以导致肺癌的发生外[2],它的神经毒性也引起了人们的广泛关注。本课题组之前的研究发现,B[a]P 可以影响大鼠的学习记忆功能和造成海马的损伤[3]。表观遗传学是指不改变 DNA 序列的前提下,基因表达发生了改变并导致表型变化的一门学科[4],常见的表观遗传学修饰有 DNA 甲基化、组蛋白修饰、非编码 RNA 调控等,其中 DNA 甲基化是最常见、最主要也是研究最多的一种表观遗传学修饰方式,与多种复杂综合征、癌症等都有密切关系[5]。青春期是大脑发展高级认知能力与运动能力的关键时期[6],为了探讨大鼠从青春期 B[a]P 持续暴露到成年后海马损伤过程与 DNA 甲基化之间的关系,本研究采用 B[a]P 染毒 4 周龄的 SD 大鼠进行建模,检测各组大鼠海马全基因组甲基化水平,为分析 B[a]P 导致海马损伤的机制提供表观遗传学方面的依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 SD 大鼠 20 只,采购于重庆医科大学实验动物中心,SPF 级,3 周龄。将大鼠饲养在适宜环境下[温度为(23±1)℃,相对湿度为 45%~55%,12 h 光照/12 h 黑暗周期,自由饮食和饮水]。实验前动物适应环境 1 周,于第 4 周开始染毒。

1.2 主要试剂

包括:玉米油、苯并芘粉末(美国 Sigma 公司),基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司),HE 染色试剂盒、多聚甲醛(上海碧云天生物技术有限公司),TRIzol 试剂(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)等。

1.3 动物模型建立

将大鼠分为 B[a]P 染毒组与溶剂对照组,每组各 10 只,采取灌胃法进行染毒。将 B[a]P 溶于玉米油中制成储备液,染毒浓度为 2.0 mg/kg[7]。对照组采用等量玉米油进行灌胃,采用每天 1 次,连续 7 周的亚急性染毒。

1.4 Morris 水迷宫实验

在连续染毒 7 周后,进行水迷宫实验。实验第 1 天将两组实验大鼠依次放在水里自由游泳,熟悉环境,适应水温;随后进行为期 5 d 的定位巡航实验,将每只大鼠从划分好的 4 个象限分别入水,记录大鼠找到平台的时间(逃避潜伏期)和游泳路径;在逃避潜伏期训练后的 1 d 撤除平台,进行空间探索实验,记录 60 s 内大鼠在目标象限活动的时间,计算时间百分比。

1.5 HE 染色

大鼠处死后快速分离其脑组织,将组织置于 4% 多聚甲醛中固定,包埋制作石蜡切片,进行脱蜡、水化、染色等常规 HE 染色步骤后封片,光镜下观察海马神经元形态结构。

1.6 海马组织 DNA 的提取

B[a]P 染毒组和溶剂对照组采用简单随机抽样的方法各取 3 只雄鼠海马组织破碎匀浆混合,取 25 mg 根据基因组 DNA 提取试剂盒步骤提取 DNA,通过 ND-2000 Nanodrop 超微量分光光度计来测定 DNA 的浓度及纯度。

1.7 甲基化分析

差异性甲基化区域(differentially methylated regions, DMR)指在不同样本中基因组表现出不同的甲基化状态的 DNA 片段[8]。委托广州锐博生物科技有限公司进行该项检测,将样品进行简化表现亚硫酸氢盐测序法(reduced representation bisulfite sequencing, RRBS)测序,检测甲基化位点的最低深度为 20×,将测序的结果进行信息分析,找出 DMR,进一步进行 GO 和 KEGG 功能富集分析。

1.8　荧光定量 PCR

取大鼠海马组织 20~30 mg,用 TRIzol 试剂提取总 RNA,检测其浓度与纯度,并随后逆转录得到 cDNA;反应所得 cDNA 以 15 μL 体系进行 PCR 反应。引物由上海生工生物工程有限公司设计合成,*Tnr* 上游引物 5′-GCGGGAGGGAGGAGAGTGAAC-3′;下游引物 5′-GTGGAGAAGTTGGTGGCGATGG-3′,产物长度为 307 bp;*Pla2g2a* 上游引物 5′-CTTCTACGGTTGCCATTG-3′;下游引物 5′-TCTCCAGACGGTTGTAAC-3′,产物长度为 101 bp;β-actin 上游引物 5′-GTCATCACTATCGGCAATG-3′;下游引物 5′-GTGTTGGCATAGAGGTCT-3′,产物长度为 152 bp。

1.9　统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件。水迷宫实验中同时间点的两组数据采用两独立样本的 t 检验分析;甲基化数量与水平分析、两组间各甲基化位点间差异采用 χ^2 检验,两两间的比较采用 Bonferroni 法进行校正。检验水准:$\alpha=0.05$。

2　结果

2.1　大鼠的空间学习和记忆功能的变化

通过 Morris 水迷宫实验观察两组大鼠的空间记忆和学习能力,结果显示:随着训练时间的增加,两组大鼠的逃避潜伏期时间总体趋势是减少的;从第 3 天开始,对照组比 B[a]P 染毒组逃避潜伏期缩短($P<0.05$,图 1A),对照组与 B[a]P 染毒组在定位巡航实验时代表性的游泳路径如图 1B 所示;空间探索实验结果显示:对照组在目标象限时间百分比明显长于 B[a]P 染毒组($P<0.05$,图 1C)。

2.2　苯并芘对海马的损害作用

通过 HE 染色观察大鼠海马神经细胞形态学变化,对照组神经细胞形态正常排列紧密且数量偏多,细胞膜边缘界限清晰,细胞核染色均匀;B[a]P 染毒组海马神经细胞排列紊乱,胞膜边界模糊,数量减少;出现了萎缩颗粒细胞与锥体细胞呈均匀红染(图 2)。

2.3　全基因组甲基化数量与水平分析

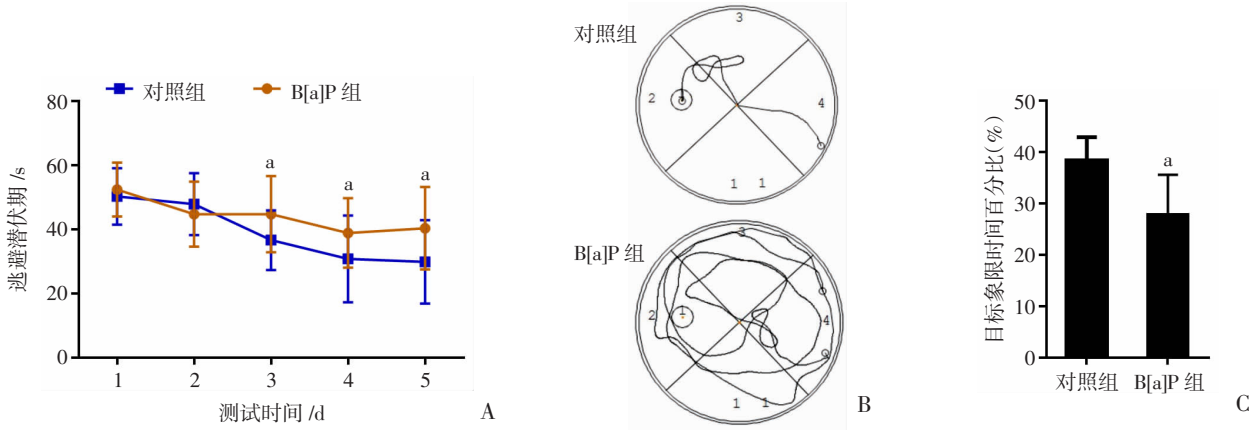
对照组全基因组有 1 777 826 个甲基化 C 位点,B[a]P 染毒组全基因组有 1 802 071 个甲基化 C 位点,但两组各甲基化位点水平差异无统计学意义(表 1);两组大部分甲基化 C 位于 CGI 岛(CpG island)与启动子区域的 CG 位点(图 3);此外,从不同基因元件上来比较,内含子与外显子为甲基化水平最高的两个区域,基因下游和剪切区为这两组的甲基化水平最低的区域(图 4)。

表 1　全基因组不同甲基化 C 碱基的数量及比例

组别	甲基化 CG	甲基化 CHG	甲基化 CHH
B[a]P 组	718 324(39.86%)	436 128(24.20%)	647 619(35.94%)
对照组	681 699(38.34%)	462 816(26.03%)	633 311(35.63%)

2.4　差异性甲基化区域分析及其关联基因分析

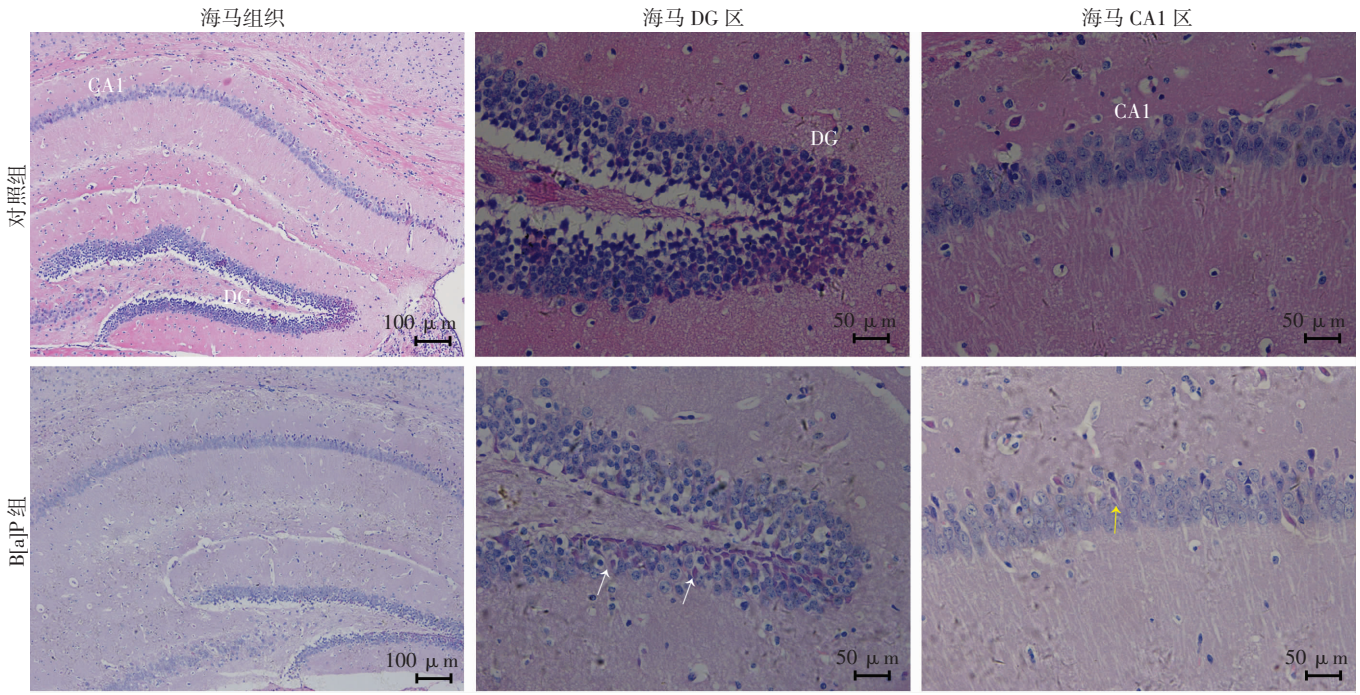
对照组与 B[a]P 染毒组在不同染色体上存在 32 个 DMR,318 个差异甲基化 C 碱基(differentially methylated C, DMC)(表 2)。对 DMR 相关基因进行 GO 和 KEGG 富集分析。通过 KEGG 分析得到 52 条通路,其中 11 条通路显著富集($P<0.05$,表 3)。GO 富集到 871 条 GO 条目,其中 145 条 GO 条目显著富集($P<0.05$,图 5)。



a:$P<0.05$,与对照组比较

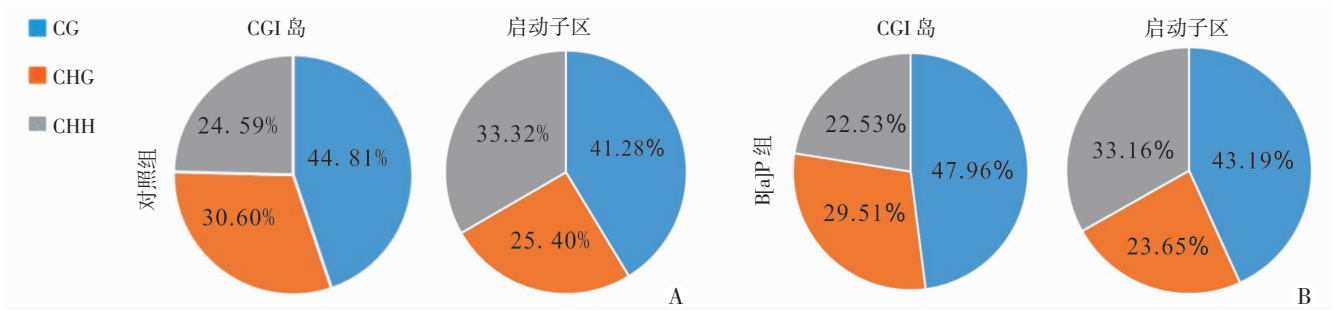
A:两组大鼠 5 d 的逃避潜伏期时间;B:大鼠定位航行第 5 天的代表性路径;C:空间探索实验中大鼠在目标象限中花费的时间百分比

图 1　Morris 水迷宫实验观察两组大鼠的空间记忆和学习能力



白色箭头示萎缩颗粒细胞呈均匀红染;黄色箭头示萎缩椎体细胞呈均匀红染

图 2 HE 染色观察大鼠海马神经细胞形态学变化



A:对照组;B:B[a]P 组

图 3 不同类型甲基化 C 分布比例

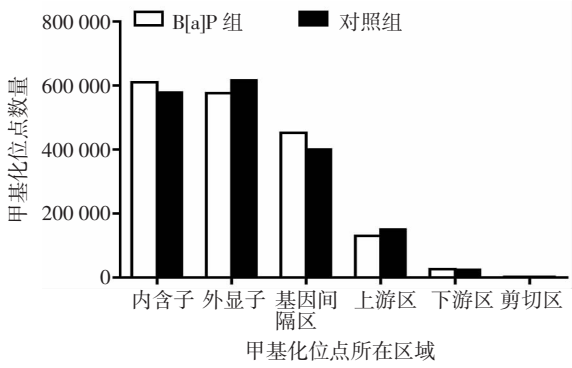


图 4 不同功能元件区域的甲基化水平分布

表 2 各染色体 DMR 的数目及长度分析

染色体	DMC 的数目	DMR 的数目	DMR 的长度
染色体 1	90	7	1 103
染色体 4	7	1	99
染色体 5	3	1	51
染色体 7	11	2	173
染色体 8	20	2	301
染色体 10	20	3	331
染色体 12	8	1	91
染色体 13	10	2	148
染色体 14	80	5	634
染色体 15	6	1	345
染色体 18	13	1	253
染色体 19	18	3	416
染色体 X	32	3	623
合计	318	32	4 568

表 3 差异甲基化基因的 KEGG 富集分析

通路	通路编号	候选基因数量	*P* 值	基因名称
Ras 信号通路	rno04014	3	0.001	*Ikbkg*; *Fgf*14; *Pla2g2a*
B 细胞受体信号通路	rno04662	2	0.002	*Cr*2; *Ikbkg*
凝血与补体级联反应信号通路	rno04610	2	0.003	*Plg*; *Cr*2
PI3K-Akt 信号通路	rno04151	3	0.004	*Ikbkg*; *Fgf*14; *Tnr*
EB 病毒感染	rno05169	2	0.021	*Cr*2; *Ikbkg*
α-亚麻酸代谢	rno00592	1	0.025	*Pla2g2a*
MAPK 信号通路	rno04010	2	0.026	*Ikbkg*; *Fgf*14
脂肪的消化吸收	rno04975	1	0.039	*Pla2g2a*
原发性免疫缺陷	rno05340	1	0.039	*Ikbkg*
亚油酸代谢	rno00591	1	0.040	*Pla2g2a*
醚脂质代谢	rno00565	1	0.042	*Pla2g2a*

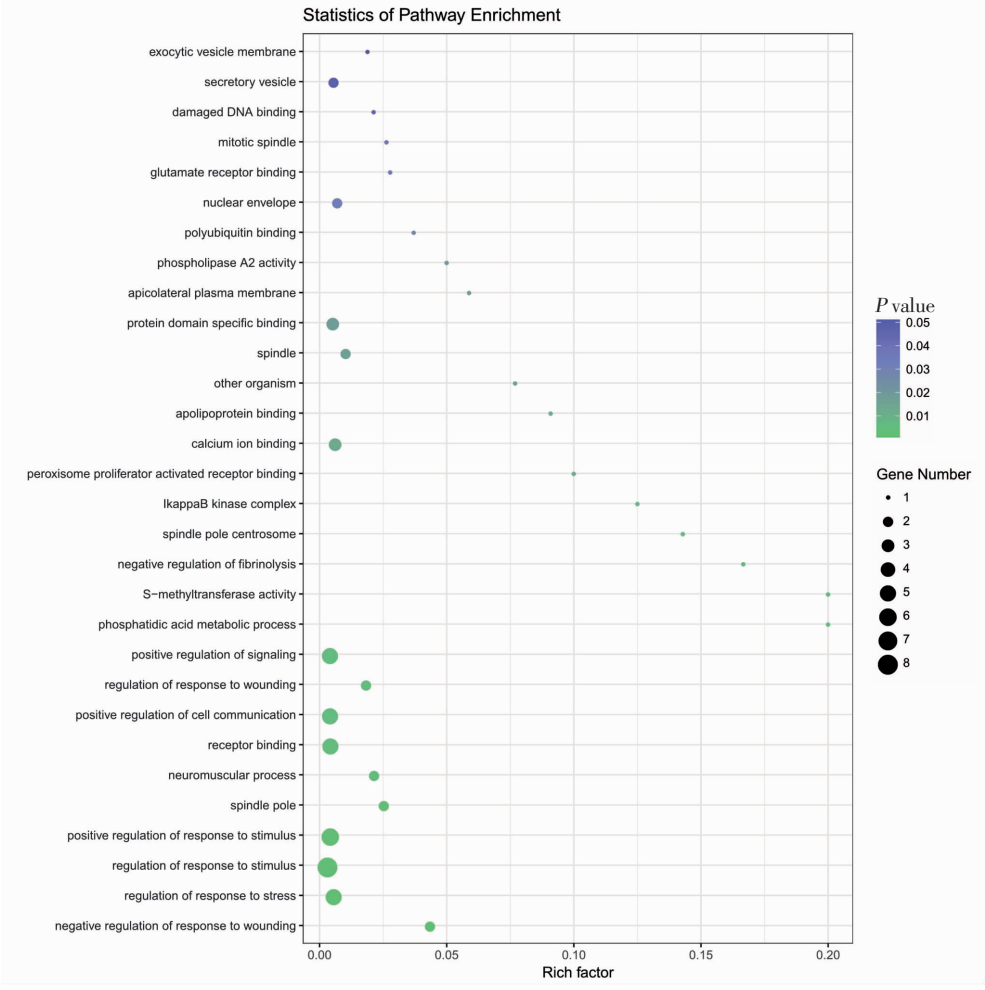


图 5 差异甲基化基因的 GO 分析

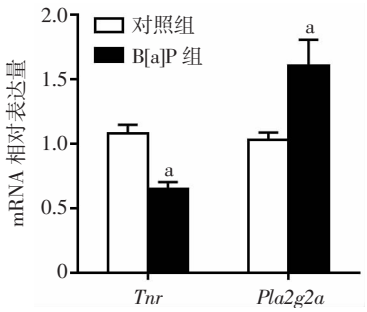
2.5 *Tnr* 与 *Pla2g2a* 基因甲基化状态与 mRNA 的表达

根据 KEGG 与 GO 分析指标,选出代表性基因 *Tnr* 与 *Pla2g2* 进行分析。*Tnr* 与 *Pla2g2a* 基因差异甲基化所处的功能元件分别为基因间区域与外显子区域,与对照组相比,B[a]P 染毒组中 *Tnr* 基因在基因间隔区为低甲基化水平,*Pla2g2a* 基因在外显子区域表现为高甲基化水平(表 4)。与对照组相比,B[a]P 染毒组大鼠海马组织中 *Tnr* 的 mRNA 表达降低,*Pla2g2a* 的 mRNA 表达升高($P<0.05$,图 6)。

表 4 *Tnr* 与 *Pla2g2a* 基因的甲基化特点

染色体	起始位置	终止位置	基因名称	功能元件	差异甲基化水平均值	差异甲基化C碱基数目	*P* 值
染色体 13	77 120 964	77 121 027	*Tnr*	基因间隔区	-48.62	4	<0.01
染色体 5	157 284 899	157 284 949	*Pla2g2a*	外显子	41.74	3	<0.01

差异甲基化水平均值:该区间差异甲基化水平均值,该值为{B[a]P 组-对照组}×100



a:*P*<0.05,与对照组比较

图 6 *Tnr* 与 *Pla2g2a* 基因 mRNA 相对表达量分析

3 讨论

近年来,相关研究证明 B[a]P 作为一种潜在的神经毒素,可以造成神经损伤从而影响学习和记忆功能[3]。本研究通过对大鼠进行 B[a]P 染毒并进行 Morris 水迷宫实验和海马 HE 染色,验证了 B[a]P 对大鼠海马的损伤及空间学习记忆功能的影响,与本课题组之前研究结果基本一致[9]。DNA 甲基化是表观遗传学最主要现象之一[10],DNA 甲基化可以发生在不同染色体、不同基因区域和功能元件上,有转录抑制、DNA 损伤和修复、DNA 的复制与包装等功能[11]。本研究发现 B[a]P 染毒组甲基化 C 位点数量多于对照组,与 WANG 等[12]的研究结果一致,苯并芘暴露引起的大鼠海马甲基化异常,即在 WANG 等[12]的从幼年暴露和本研究从青春期开始的暴露,均可能通过表观改变调节突触可塑性,从而影响哺乳动物的认知功能。

为了更好了解 B[a]P 诱导的神经毒性机制,本研究对差异甲基化基因进行 GO 与 KEGG 功能富集。GO 富集分析结果显示基因都直接或间接与学习记忆相关,如突触可塑性主要的表现形式为长时程增强(long-term potentiation, LTP),而 LTP 则是构成学习与记忆的主要分子机制之一[13];同时,GO 分析也富集了钙离子转运与其通道活性的调节,YANG 等[14]通过对新生大鼠进行 B[a]P 暴露进行研究得出:钙离子在神经传递、神经退行性病变与神经发育等神经元间的过程可能起关键作用。在 KEGG 分析富集到的通路中,MAPKs 通路是哺乳动物中存在的重要信号转导通路,参与细胞增殖、分化、凋亡以及应激反应等生理活动过程[15],张盼盼等[16]研究得出 MAPKs 通路中的经典通路—ERK 通路的激活会促进 c-fos 蛋白表达,调控海马 CA1 区神经元的凋亡,ERK 通路也在学习、记忆功能等方面发挥关键作用[17];而在文献[18]中发现 Ras 信号通路与 PI3K-Akt 信号通路也与学习记忆功能相关,这些功能与通路都可能在 B[a]P 致青春期到成年阶段的大鼠海马损伤中起关键作用,但是 B[a]P 具体在通路中充当何种角色,还需要接下来进一步研究。

根据本研究 GO 与 KEGG 富集分析结果,筛选出代表性基因进行分析。与对照组相比,B[a]P 染毒组中 *Tnr* 基因在基因间区域的甲基化水平降低,*Pla2g2a* 基因在外显子区域的甲基化水平升高,其中 *Tnr* mRNA 表达下降,*Pla2g2a* mRNA 表达增加。*Tnr* 与神经系统的发育、神经元的可塑性以及神经细胞的迁移等有密切关系[19],SAGHATELYAN 等[20]通过对 *Tnr* 基因敲除小鼠的研究发现:*Tnr* 基因的缺失能够导致神经细胞外周的抑制性电流减弱,从而增加了兴奋性突触传递,并有可能最终引起了海马 CA1 区的 LTP 变异。*Pla2g2a* 作为分泌型磷脂酶 A_2 中的一种亚型,是一种广泛的促炎症因子[21],能够诱导神经元的凋亡并与神经退行性病变相关[22]。由此,我们推测甲基化所致的基因表达水平改变可能是 B[a]P 导致青春期到成年大鼠海马组织神经毒性的原因之一。

RRBS 虽是一种准确、高效、经济的 DNA 甲基化研究方法,但仍有它的局限性[23],本研究发现的基因甲基化位点、基因表达水平和相应功能元件的表达情况仍然需要多种方法联合验证。从表观遗传学方面深入探讨 B[a]P 对大鼠海马的损伤机制,有望为未来研究 B[a]P 导致神经功能损伤的原因提供新的思路。

参考文献:

[1] KIM K H, JAHAN S A, KABIR E, *et al*. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their hu-

man healtheffects[J]. Environ Int, 2013, 60: 71-80. DOI: 10.1016/j.envint.2013.07.019.

[2] 代文娟, 黄海燕, 胡恭华. 苯并芘致肺癌的研究进展[J]. 毒理学杂志, 2018, 32(6): 489-493. DOI: 10.16421/j.cnki.1002-3127.2018.06.014.
DAI W J, HUANG H Y, HU G H. Research progress of lung cancer caused bybenzopyrene [J]. J Toxicol, 2018, 32(6): 489-493. DOI: 10.16421/j.cnki.1002-3127.2018.06.014.

[3] CHENG S Q, XIA YY, HE J L, *et al*. Neurotoxic effect of subacute benzo(a)pyrene exposure on gene and protein expression in Sprague-Dawley rats[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2013, 36(2): 648-658. DOI: 10.1016/j.etap.2013.06.008.

[4] 曹家雪, 张红平, 杜立新. 环境因素对 DNA 甲基化的影响[J]. 遗传, 2013, 35(7): 839-846.
CAO J X, ZHANG H P, DU L X. Influence of environmental factors on DNAmethylation[J]. Hereditas, 2013, 35(7): 839-846.

[5] 金灵, 张元珍. 孕期外源物暴露致 DNA 甲基化异常与发育源性疾病的关系研究[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2018, 38(6): 521-525. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2096-2916.2018.06.017.
JIN L, ZHANG Y Z. Relation of abnormal DNA methylation induced by prenatalxenobiotics exposure and the development origins of disease[J]. Chin J Reprod Contracept, 2018, 38(6): 521-525. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2096-2916.2018.06.017.

[6] 鞠恩霞, 李红, 龙长权, 等. 基于神经成像技术的青少年大脑发育研究[J]. 心理科学进展, 2010, 18(6): 907-913.
JU E X, LI H, LONG C Q, *et al*. A neuroimaging-based review of the teen braindevelopment[J]. Adv Psychol Sci, 2010, 18(6): 907-913.

[7] LI C L, WANG J, SU Q P, *et al*. Postnatalsubacute benzo(a)pyrene exposure caused neurobehavioral impairment and metabolomic changes of cerebellum in the early adulthood period of sprague-dawley rats[J]. Neurotox Res, 2018, 33(4): 812-823. DOI: 10.1007/s12640-017-9832-8.

[8] 凡时财, 李承哲, 裴云飞. 人类基因组 DNA 甲基化数据分析的研究现状[J]. 中国科学: 生命科学, 2015, 45(5): 450-459. DOI: 10.1360/N052015-00009.
FAN S C, LI C Z, PEI Y F. DNAmethylome data analysis in human genome[J]. Sci Sin Vitae, 2015, 45(5): 450-459. DOI: 10.1360/N052015-00009.

[9] 唐倩, 夏茵茵, 程淑群, 等. 苯并芘对大鼠记忆及谷氨酸盐受体基因表达影响[J]. 中国公共卫生, 2011, 27(7): 902-903. DOI: 10.11847/zgggws2011-27-07-39.
TANG Q, XIA Y Y, CHENG S Q, *et al*. Effect of benzo(a)pyrene on memory and expression of glutamate receptor mRNA in rat[J]. Chin J Public Heal, 2011, 27(7): 902-903. DOI: 10.11847/zgggws2011-27-07-39.

[10] 李宁, 刘紫阳, 詹向红, 等. 长期负性情绪应激对 D-gal 大鼠认知功能及海马 NR2B 基因甲基化表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(6): 702-707. DOI: 10.7661/j.cjim.20190123.126.
LI N, LIU Z Y, ZHAN X H, *et al*. Effects of long-term negative emotional stress on cognitive function and methylation of NR2B gene in Hippocampus of D-gal rats[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2019, 39(6): 702-707. DOI: 10.7661/j.cjim.20190123.126.

[11] 陈旭涛, 万卓, 韦梦影, 等. 大鼠 BMSCs 与 ADSCs 全基因组 DNA 甲基化差异分析[J]. 实用口腔医学杂志, 2019, 35(2): 170-175. DOI: 10.3969/j.issn.1001-3733.2019.02.002.
CHEN X T, WAN Z, WEI M Y, *et al*. Comparison of the DNA methylation in a genome wide between BMSCs and ADSCs[J]. J Pract Stomatol, 2019, 35(2): 170-175. DOI: 10.3969/j.issn.1001-3733.2019.02.002.

[12] WANG J, LI C L, TU B J, *et al*. Integrated epigenetics, transcriptomics, and metabolomics to analyze the mechanisms of benzo[a]pyrene neurotoxicity in the Hippocampus[J]. Toxicol Sci, 2018, 166(1): 65-81. DOI: 10.1093/toxsci/kfy192.

[13] AN L, LI Z Y, YANG Z, *et al*. Cognitive deficits induced by melamine inrats[J]. Toxicol Lett, 2011, 206(3): 276-280. DOI: 10.1016/j.toxlet.2011.08.009.

[14] YANG K, CHEN C Z, CHENG S Q, *et al*. Effects ofbenzo(a)pyrene exposure on the ATPase activity and calcium concentration in the hippocampus of neonatal rats[J]. Int J Occup Med Environ Health, 2017, 30(2): 203-211. DOI: 10.13075/ijomeh.1896.00744.

[15] 王一夫, 刘爽. MAPKs 信号通路与阿尔兹海默病的研究进展[J]. 世界中医药, 2016, 11(9): 1929-1931. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7202.2016.09.073.
WANG Y F, LIU S. The research progress of Alzheimer's disease and MAPKs signaling pathways[J]. World Chin Med, 2016, 11(9): 1929-1931. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7202.2016.09.073.

[16] 张盼盼, 韩晓庆, 李琳, 等. 间歇低氧大鼠细胞外信号调节激酶与认知功能变化[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2014, 40(9): 517-521. DOI: 10.3936/j.issn.1002-0152.2014.09.002.
ZHANG P P, HAN X Q, LI L, *et al*. The effect of intermittent hypoxia on hippocampal ERK signaling and cognitive function in rats[J]. Chin J Nerv Ment Dis, 2014, 40(9): 517-521. DOI: 10.3936/j.issn.1002-0152.2014.09.002.

[17] FELD M, DIMANT B, DELORENZI A, *et al*. Phosphorylation

of extra-nuclear ERK/MAPK is required for long-term memory consolidation in the crab Chasmagnathus[J]. Behav Brain Res, 2005, 158(2): 251-261. DOI: 10.1016/j.bbr.2004.09.005.

[18] PARK H J, KWON H, LEE J H, *et al*. β-amyrin ameliorates alzheimer's disease-like aberrant synaptic plasticity in the mouse hippocampus[J]. Biomol Ther (Seoul), 2019 Jul 30. DOI: 10.4062/biomolther.2019.024.

[19] 黄文辉, 廖红, 牛蕤, 等. 细胞外基质分子 Tenascin-R 的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(4): 375-379. DOI: 10.3321/j.issn: 1000-5048.2007.04.020.
HUANG W H, LIAO H, NIU R, *et al*. Progress in extracellular matrix molecule tenascin-R[J]. J China Pharm Univ, 2007, 38(4): 375-379. DOI: 10.3321/j.issn: 1000-5048.2007.04.020.

[20] SAGHATELYAN A K, DITYATEV A, SCHMIDT S, *et al*. Reducedperisomatic inhibition, increased excitatory transmission, and impaired long-term potentiation in mice deficient for the extracellular matrix glycoprotein tenascin-R[J]. Mol Cell Neurosci, 2001, 17(1): 226-240. DOI: 10.1006/mcne.2000.0922.

[21] 杨武, 郭薇, 黄春洪. 分泌型磷脂酶 A2 亚家族: 结构与功能[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2013, 29(10): 932-940. DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2013.10.006.
YANG W, GUO W, HUANG C H. The subfamily of secretory phospholipase A2: structure and functions[J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2013, 29(10): 932-940. DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2013.10.006.

[22] LEE J C, SIMONYI A, SUN A Y, *et al*. Phospholipases A2 and neural membrane dynamics: implications for Alzheimer's disease[J]. J Neurochem, 2011, 116(5): 813-819. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2010.07033.x.

[23] 沈圣, 屈彦纯, 张军. 下一代测序技术在表观遗传学研究中的重要应用及进展[J]. 遗传, 2014, 36(3): 256-275. DOI: 10.3724/SP.J.1005.2014.0256.
SHEN S, QU Y C, ZHANG J. The application of next generation sequencing on epigeneticstudy[J]. Hereditas, 2014, 36(3): 256-275. DOI: 10.3724/SP.J.1005.2014.0256.

(**收稿**:2019-09-18;**修回**:2019-12-10)

(编辑 王 红)