DOI:10.16016/j.1000-5404.202008145

0.22 太赫兹电磁辐射暴露致神经母细胞瘤 Neuro-2a 细胞损伤的非热效应研究

马秦龙,陈纯海,林 敏,陶嘉雯,邓 平,高 鹏,卢永辉,皮会丰,何旻蒂,张 蕾,张彦文,余争平
400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)军事预防医学系军队劳动卫生学教研室,电磁辐射医学防护教育部重点实验室

[摘要] **目的** 探讨0.22 太赫兹(terahertz,THz)电磁辐射暴露致小鼠神经母细胞瘤细胞株——Neuro-2a 细胞损伤的非热效应特点。**方法** 以 Neuro-2a 细胞作为体外实验暴露模型,采用频率为 0.22 THz,平均功率密度为 0(Sham 组)、25(25 mW/cm^2 辐照组)、50 mW/cm^2(50 mW/cm^2 辐照组)辐照细胞,辐照时间为 5 min,监测辐照引起的细胞培养基温度变化;于暴露后 24 h 检测细胞增殖(EdU 阳性细胞比例和细胞活力)、凋亡(γH2AX、TUNEL 阳性细胞比例、*Bax* 与 *Bcl2* 基因表达水平);于暴露后 48 h 分析细胞突触生长(突触长度、分支数目及 *Tubb3* 与 *Syp* 基因表达水平)的变化情况。**结果** 与 Sham 组比较,两辐照组细胞培养基温度升高在 0.1~0.4 ℃;EdU 阳性细胞比例、细胞活力、γH2AX 和 TUNEL 阳性细胞比例及 *Bax*、*Bcl2* 基因表达水平均无明显改变;仅 50 mW/cm^2 辐照组细胞突触长度和分支数目较 Sham 组明显减少($P<0.01$),*Tubb3* 和 *Syp* 基因表达也明显降低($P<0.05$)。**结论** THz 辐射暴露以非热效应为主,可抑制 Neuro-2a 细胞突触生长,而不影响细胞增殖和凋亡,提示神经细胞突触生长是 THz 辐射产生神经生物效应的敏感靶标。

[关键词] 太赫兹辐射;细胞增殖;细胞凋亡;突触生长;Neuro-2a 细胞
[中图法分类号] R-334; R146; R730.264 [文献标志码] A

Non-thermal effects of 0.22 terahertz electromagnetic radiation exposure-induced injury in Neuro-2a cells

MA Qinlong, CHEN Chunhai, LIN Min, TAO Jiawen, DENG Ping, GAO Peng, LU Yonghui, PI Huifeng, HE Mindi, ZHANG Lei, ZHANG Yanwen, YU Zhengping Department of Occupational Health, Key Laboratory of Electromagnetic Radiation Protection of Ministry of Education, Faculty of Military Preventive Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the features of non-thermal effects of cell injury induced by terahertz (THz) radiation at a frequency of 0.22 THz, in a mouse neuroblastoma cell line, Neuro-2a. **Methods** The cultured Neuro-2a cells were exposed to 0.22 THz irradiation at average power densities of 0 (sham group), and 25 and 50 mW/cm^2 (radiation groups), for 5 min, respectively. The temperature changes of culture medium were monitored. The cell proliferation and apoptosis and the mRNA expression of *Bax* and *Bcl*2 at 24 h after THz exposure were detected by measuring the ratio of EdU$^+$ cells, CCK-8 assay for cell viability, immunofluorescence assay for γH2AX$^+$ cells, TUNEL assay, and real-time PCR. The neurite length, number of branch points, and mRNA expression of *Tubb*3 and *Syp* were analyzed in the Neuro-2a cells at 48 h after THz exposure. **Results** Compared with the sham group, the temperature of culture medium in the radiation groups was increased by a range from 0.1 to 0.4 ℃. There were no significant differences in the cell viability, ratios of positive cells for EdU, γH2AX and TUNEL, or the mRNA expression levels of *Bax* and

[基金项目] 国家重点研发计划(2017YFC0108601);国家自然科学基金面上项目(31870842)
[通信作者] 余争平,E-mail:yuzping_tmmu@126.com

*Bcl*2. The neurite length and number of branch points were obviously reduced ($P<0.01$), and the mRNA levels of *Tubb*3 and *Syp* were also notably down-regulated ($P<0.05$) in the 50 mW/cm^2 group. **Conclusion** THz radiation mainly exhibits non-thermal effects, and can inhibit neurite outgrowth but not affect the proliferation and apoptosis in Neuro-2a cells. Our findings suggest that neurite outgrowth is a sensitive target of neurobiological effects after THz radiation exposure.

[**Key words**] terahertz radiation; cell proliferation; cell apoptosis; neurite outgrowth; Neuro-2a cell

Supported by the National Key R&D Program of China (2017YFC0108601) and the General Program of National Natural Science Foundation of China (31870842). Corresponding author: YU Zhengping, E-mail: yuzping_tmmu@126.com

太赫兹(terahertz,THz)电磁辐射是指频率在0.1~10 THz的电磁辐射,处于宏观电子学向微观光子学过渡的频段。早期由于THz源及检测技术发展的滞后,关于THz的研究进展缓慢。因此,THz频段一度被称为电磁波谱中的"THz空隙"。目前,THz技术在雷达通讯、安检及生物医学等领域具有广泛的应用前景[1-4]。特别是在生物医学领域,THz辐射在药物结构和纯度分析及筛选、病原体鉴定和定量、生物医学成像诊断等方面表现出极大优势[5-7]。

许多生物大分子如核酸、蛋白质等的吸收、共振及谐振频段均处于THz波段[8]。因此,THz辐射很可能通过影响这些生物大分子的结构和功能进而对机体产生影响。尽管THz辐射属于非电离辐射,其量子能量较低,不会对生物大分子、细胞和组织产生电离损伤[9-10],但近年研究表明,THz辐射仍然具有热效应和非热效应,并且对细胞、组织甚至实验动物产生影响。比如THz辐射可通过热效应引起脂质体和细胞膜通透性改变,导致细胞和组织的基因组、蛋白组和转录组发生一定程度的变异[11-12],甚至可以引起实验动物焦虑、抑郁样行为发生[13-14]。因此,针对THz辐射的生物效应与生物安全性问题亟待研究解决。

当前,关于THz辐射的生物效应特点及生物安全性研究的结果尚不明确。基于神经系统是THz辐射的敏感靶标,本研究采用小鼠神经母细胞瘤Neuro-2a细胞株作为神经细胞体外暴露模型,监测THz辐射暴露细胞温度变化特点,检测细胞增殖、凋亡和突触生长等基本生理过程,旨在揭示THz辐射暴露对神经系统的生物效应特点,为THz辐射相关环境和职业暴露医学防护提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

Neuro-2a细胞株购自ATCC细胞库。将细胞培养在含10%胎牛血清(HyClone,美国)和100 U的双抗(Sigma,美国)的DMEM高糖培养基(HyClone,美国)中,置于细胞培养箱中培养,培养条件为37 ℃,5%CO_2。当细胞长满约80%培养瓶底部时进行传代培养或实验处理。

1.2 太赫兹暴露系统及细胞暴露

太赫兹辐照装置(图1)主要由1支0.22 THz的行波管、前级固态信号源、高压电源、冷却系统、测试组件和控制系统组成(中国工程物理研究院研制)。该装置可以产生中心频率为0.22 THz,输出功率达1.18 W的THz波束。由于水对太赫兹波的强烈吸收,而培养细胞的塑料孔板对太赫兹波的透过,所以采用从细胞孔板底部进行辐照,同时控制THz辐射过程中细胞培养基温度在25 ℃,并在辐照过程中采用电热偶测温仪(LIHUADA,中国)实时监测细胞培养基温度变化情况。实验分为3组:Sham组、25 mW/cm^{2}辐照组和50 mW/cm^{2}辐照组,辐照时间为5 min。分别于辐照后不同时相点进行相关指标检测。

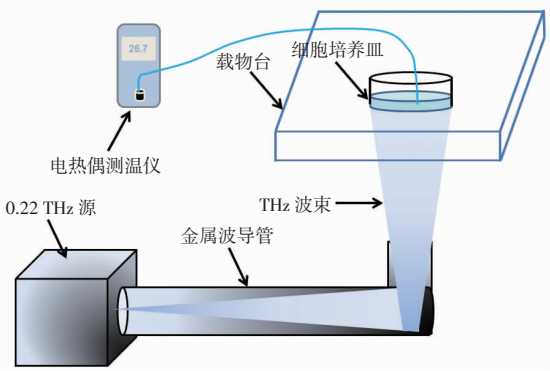


图1 THz辐射暴露装置及细胞暴露模式图

1.3 光学显微镜观察细胞生长情况

细胞于辐照结束后24 h置于光学显微镜(Leica,德国)下进行观察并采集图片。

1.4 EdU掺入法检测细胞增殖

EdU(锐博,中国)掺入法检测细胞增殖的具体方法参照产品说明书。细胞于辐照结束后22 h加入EdU溶液(50 μmol/L)于细胞培养箱中孵育2 h,弃掉

细胞培养基,PBS 清洗细胞 5 min×3 次;4%多聚甲醛溶液(博士德,中国)室温固定 15 min,然后加入甘氨酸溶液(2 mg/mL)摇床孵育 5 min 以中和过量的甲醛;加入 0.5% Triton X-100-PBS 溶液打孔 10 min;加入 1×Apollo 染色反应液,室温避光孵育 30 min,弃染液,PBS 清洗 5 min×3 次;细胞核用 DAPI 染液(碧云天,中国)复染;利用荧光显微镜(Leica,德国)进行图像采集及细胞计数,细胞增殖情况以 EdU 阳性细胞百分比表示。

1.5 CCK-8 检测细胞活力

细胞活力采用 CCK-8 试剂盒(Dojindo,日本)检测,方法参考前期研究[15]。具体方法如下:将细胞(1×10^4 个/孔)接种于 96 孔培养板,待其贴壁后更换培养基,进行 THz 辐射暴露。暴露结束后 24 h,取 10 μL CCK-8 试剂加入到 90 μL 细胞培养基中,37 ℃孵育 1 h。在荧光分光光度仪 Infinite™ M200 Microplate Reader (Tecan, Mannedorf, 瑞士)中检测培养基光密度。

1.6 细胞 γH2AX 免疫荧光染色

细胞处理结束 24 h 后,采用 4%多聚甲醛固定 15 min。免疫荧光染色步骤参照本实验室前期研究进行[16],具体方法如下:向固定好的细胞加入 PBS 漂洗 5 min×3 次;加入 0.5% Triton X-100-PBS 溶液打孔 10 min;PBS 漂洗 5 min×3 次,加入 γH2AX 一抗(兔源,Abcam,美国),浓度为 1∶300,4 ℃过夜;PBS 漂洗 5 min×3 次,加入驴抗兔-488 荧光二抗(Invitrogen,美国),浓度为 1∶500,室温避光孵育 1 h;PBS 漂洗 5 min×3 次,DPAI 复染细胞核 5 min 后,PBS 漂洗后采用荧光抗淬灭封片剂封片,于陆军军医大学基础医学院生物医学测试中心利用共聚焦显微镜(Leica SP5,德国)观察染色结果。

1.7 TUNEL 法检测细胞凋亡

利用 TUNEL 试剂盒(罗氏,瑞士)检测细胞凋亡,具体方法参考产品说明书。主要步骤如下:细胞处理结束 24 h 后,采用 4%多聚甲醛固定 20 min,PBS 漂洗 5 min×3 次;3% H_2O_2 甲醇溶液室温封闭 10 min,PBS 漂洗 5 min×3 次;0.25% Ttiton 冰上透膜 10 min,PBS 漂洗 5 min×3 次;加入 TdT 和荧光素标记的 dUTP 的混合反应液(1∶9配置),于 37 ℃湿盒避光孵育 1 h,PBS 漂洗 10 min×3 次;DPAI 复染细胞核 5 min 后封片,在荧光显微镜(Leica,德国)下进行图像采集及细胞计数。

1.8 实时定量荧光 PCR 分析

细胞处理结束 24 h 后,采用 RNAiso Plus(宝生物,日本)试剂提取总 RNA,具体步骤详见产品说明书。按照逆转录试剂盒 PrimeScript RT reagent Kit(宝生物,日本)说明书步骤取 0.5 μg 总 RNA,将其逆转录为 cDNA 模板以进行后续基因表达检测。采用荧光定量检测试剂 SYBR Master Mix(宝生物,日本)及荧光定量 PCR 仪(CFX96,美国伯乐)进行相关基因 mRNA 表达分析,引物序列见表 1。以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 mRNA 表达量[17]。参照 Sham 组计算基因相对表达水平。

1.9 细胞突触生长分析

采用 Incucyte 活细胞分析系统 (Essen BioScience, 美国)分析细胞突触生长。首先将 Neuro-2a 细胞培养于含有 10 μmol/L 视黄酸(retinoic acid,RA,Sigma-Aldrich,美国)的 DMEM 高糖培养基中诱导突触生长,同时进行 THz 辐射暴露。于暴露结束 48 h 后将细胞置于 Incucyte 活细胞分析系统中记录胞体上发出的突触长度和分支数目。

1.10 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组比较先进行单因素方差分析,再采用 Fisher's post hoc 检测进行两两比较,检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 THz 辐射暴露后细胞培养基温度变化研究

将 Neuro-2a 细胞暴露于 0.22 THz 太赫兹电磁辐射场中(图 1),采用电热偶测温仪实时监测细胞培养基温度变化情况。结果显示,平均功率密度为 25 mW/cm² 和 50 mW/cm² 的太赫兹电磁辐射暴露过程中,与 Sham 组比较,辐照组细胞培养基温度升高在 0.1~0.4 ℃(表 2),均不超过 1 ℃。

表 1 基因引物列与产物长度

基因名称	Genbank 编码	上游引物(5′→3′)	下游引物(5′→3′)	产物长度/bp
Bax	NM_007527.3	TTGGAGATGAACTGGACAGC	CAGTTGAAGTTGCCATCAGC	124
Bcl2	NM_009741.5	GGACTTGAAGTGCCATTGGTA	GTTATCATACCCTGTTCTCCCG	78
Tubb3	NM_023279.3	CGCCTTTGGACACCTATTCAG	TTCTCACACTCTTTCCGCAC	141
Syp	NM_009305.2	AGTGCCCTCAACATCGAAG	GCCACGGTGACAAAGAATTC	149
GAPDH	NM_008084.3	CTTTGTCAAGCTCATTTCCTGG	TCTTGCTCAGTGTCCTTGC	133

表 2 THz 辐射暴露细胞培养基温度升高情况($n=3$)

暴露时间	ΔT1/℃	ΔT2/℃
1 min	0.1	0.4
2 min	0.2	0.3
3 min	0.1	0.1
4 min	0.1	0.1
5 min	0.1	0.2

ΔT1:25 mW/cm^2 辐照组与 Sham 组温度差;ΔT2:50 mW/cm^2 辐照组与 Sham 组温度差

2.2 THz 暴露后细胞增殖情况改变

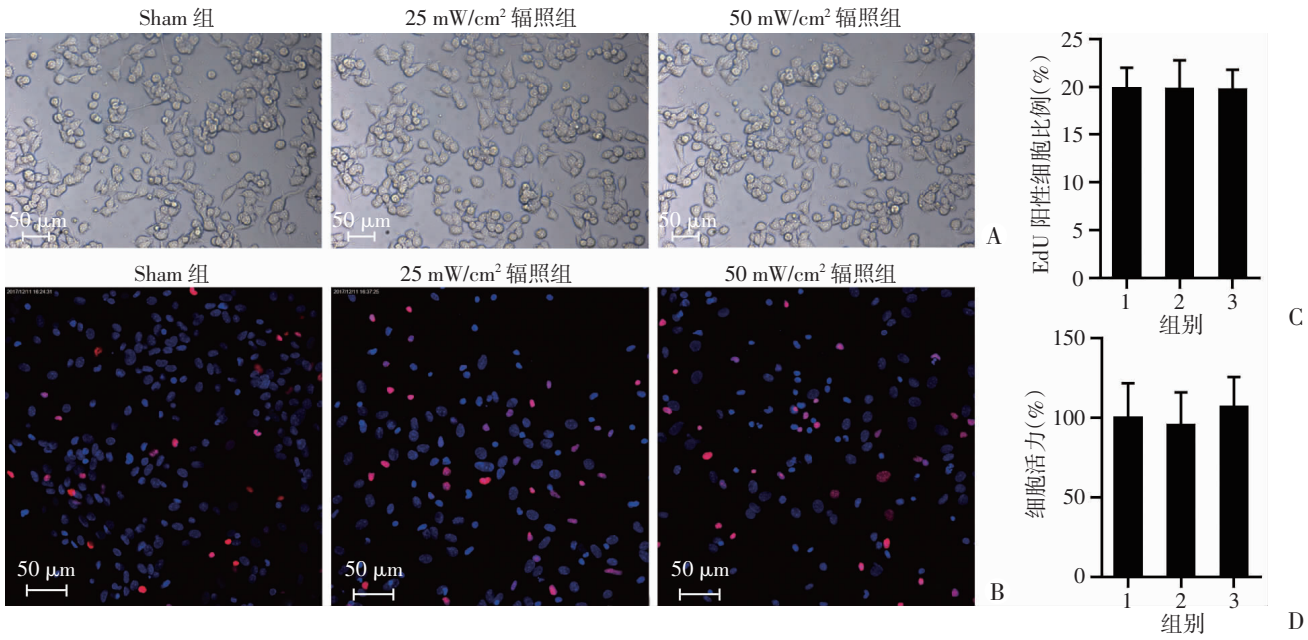
光学显微镜下观察 THz 辐射暴露后 24 h 后细胞生长情况,结果显示,25 mW/cm^2 和 50 mW/cm^2 辐照组细胞数目和细胞成团能力与 Sham 组相比无明显变化(图 2A)。在此基础上,采用 EdU 掺入法进一步检测细胞增殖能力变化情况。结果显示,THz 辐射暴露细胞 5 min,于暴露后 24 h 时 EdU 阳性细胞比例与 Sham 组相比差异无统计学意义(图 2B、C)。同时,CCK-8 比色法检测细胞活力,结果也未见明显变化(图 2D)。

2.3 THz 辐射暴露后细胞凋亡情况

将细胞采用不同平均功率密度 THz 辐射暴露 5 min,于暴露后 24 h,采用细胞免疫荧光法检测细胞核中 γH2AX 变化情况。结果显示,25 mW/cm^2 和 50 mW/cm^2 辐照组 γH2AX 阳性细胞比例无明显改变(图 3A、B)。进一步通过 TUNEL 试剂盒检测细胞凋亡情况,与 Sham 组比较,辐照组细胞凋亡也未见明显增加(图 3C、D),并且凋亡相关基因 *Bax* 和 *Bcl2* 的 mRNA 表达均未见明显改变(图 3E、F)。

2.4 THz 辐射暴露损伤细胞突触生长

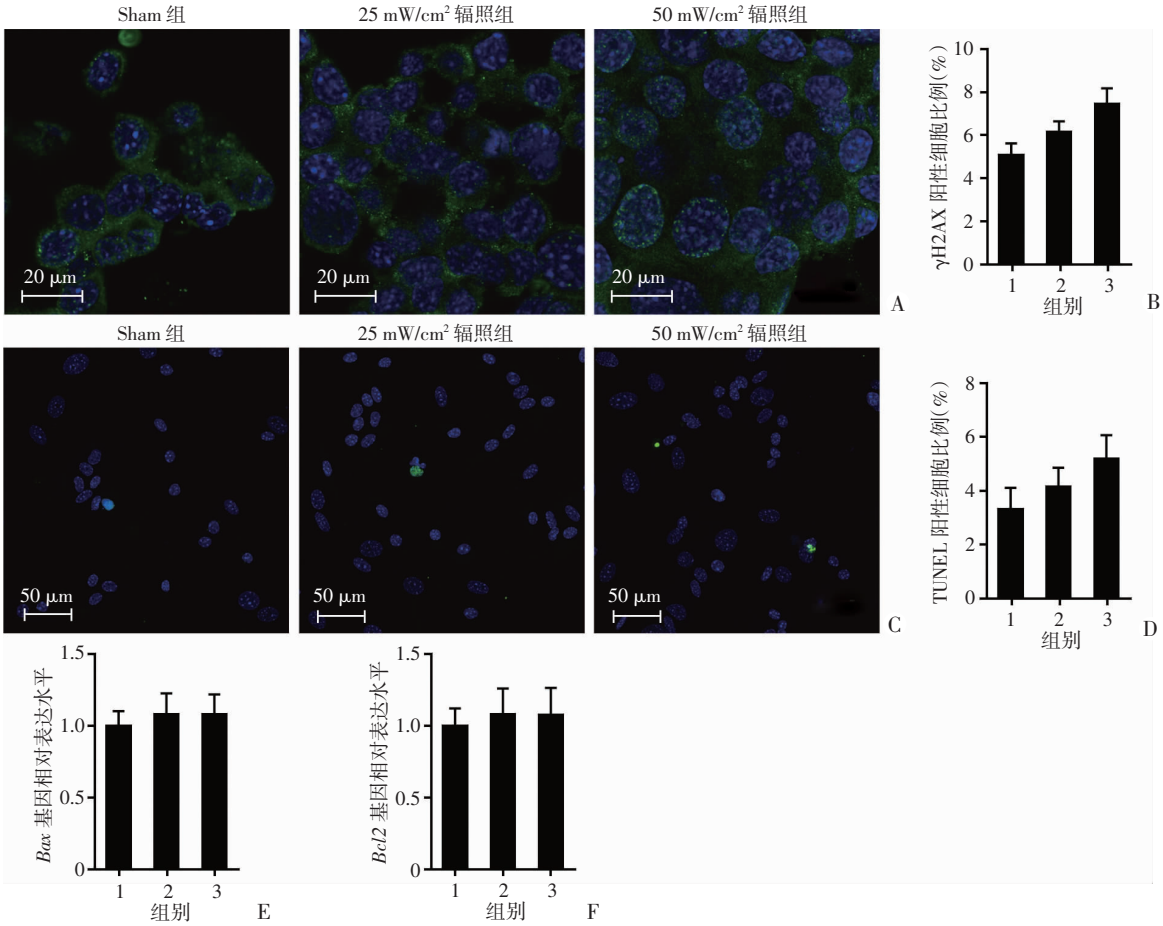
Neuro-2a 细胞在 RA 诱导下可分化产生神经元,其突触生长能反映神经元的成熟情况。结果显示,50 mW/cm^2 辐射组暴露后 48 h,经 RA 诱导产生的神经元突触长度以及由胞体上产生的分支数显著低于 Sham 组($P<0.01$),而 25 mW/cm^2 辐照组并不引起突触生长发生改变(图 4A~C)。通过实时荧光定量 PCR 检测突触生长及功能相关的基因 *Tubb3* 和 *Syp* 的表达水平,结果显示仅 50 mW/cm^2 辐照组 *Tubb3* 和 *Syp* 的 mRNA 表达明显降低($P<0.05$,图 4D、E)。



1:Sham 组;2:25 mW/cm^2 辐照组;3:50 mW/cm^2 辐照组

A:光镜观察各组细胞生长;B:EdU 染色检测各组细胞增殖变化;C:各组 EdU 阳性细胞比例分析;D:CCK-8 检测各组细胞活力

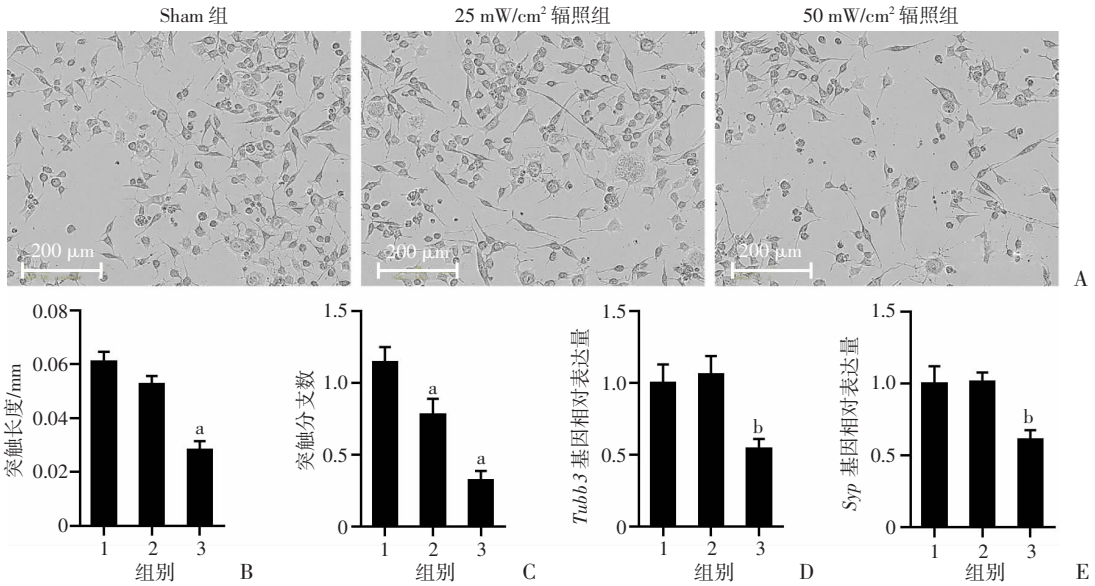
图 2 THz 辐射暴露细胞增殖变化($n=5$)



1:Sham 组;2:25 mW/cm² 辐照组;3:50 mW/cm² 辐照组

A:γH2AX 染色检测各组 DNA 链断裂改变;B:各组 γH2AX 阳性细胞比例分析;C:TUNEL 检测各组细胞凋亡;D:各组 TUNEL 阳性细胞比例分析;E:各组 *Bax* mRNA 表达;F:各组 *Bcl2* mRNA 表达

图 3 THz 辐射暴露后细胞凋亡情况($n=5$)



1:Sham 组;2:25 mW/cm² 组;3:50 mW/cm² 组;a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与 Sham 组比较

A:光镜观察各组胞体上突触生长情况;B:各组突触长度;C:各组胞体突触分支数目;D:各组 *Tubb3* mRNA 表达;E:各组 *Syp* mRNA 表达

图 4 THz 暴露后细胞突触生长变化情况($n=5$)

3 讨论

随着 THz 辐射从理论走向现实,作为一种新开发利用的电磁辐射频段,其生物效应研究日益受到关注。本研究采用 0.22 THz 辐射暴露小鼠神经母细胞瘤细胞株——Neuro-2a 细胞,发现 THz 辐射暴露以非热效应为主,能够损伤细胞的突触生长,而并不改变细胞的增殖和凋亡。

神经系统是电磁辐射作用于机体的敏感靶系统,无论是极低频,还是射频段(包括微波)已有大量关于神经系统生物效应的研究,比如 50 Hz 极低频电磁辐射可以促进神经发生及神经元突触生长[18-19],高功率微波暴露损伤大鼠学习记忆功能[20],然而 THz 辐射对于神经系统的影响尚不明确。尽管已有 THz 辐射对神经系统生物效应的报道[13-14],但相关研究较少。神经细胞突触生长是脑发育过程中的重要事件,涉及神经纤维投射、突触形成及神经元成熟等。我们既往研究发现突触生长是极低频(50 Hz)和射频(1 800 MHz)电磁辐射作用于神经系统的敏感靶点[19,21],但是 THz 频段的电磁辐射对神经细胞突触生长的效应尚不明确。基于文献[22-24]报道,结合本研究结果,提示 THz 辐射是否影响神经细胞突触生长受到细胞类型、THz 频率、波型、功率密度、暴露时间等因素的影响。此外,各实验室进行体外细胞暴露的实验体系千差万别,特别是细胞暴露过程中对温度和培养基体积的控制(水对 THz 辐射具有明显的吸收),对 THz 暴露的剂量效应关系影响很大。因此,全面揭示 THz 辐射的神经生物效应亟需大量研究。

目前,THz 生物效应研究的相关文献较少,关于暴露参数(频率、功率密度、时间等)与生物效应之间的剂量效应关系尚不清楚。TITOVA 等[25]将人造人体三维皮肤组织暴露于功率密度为 57 mW/cm^2 的 THz 辐射 10 min 后,可诱导 H2AX 磷酸化增加,上调细胞周期和肿瘤抑制相关蛋白的表达。然而,BOURNE 等[26]报道,将背根神经节神经母细胞(ND7/23 细胞系)和原代培养皮肤角质细胞暴露于功率密度为 24 mW/cm^2 和 62 mW/cm^2 的 0.14 THz 辐射 10 min 或 24 h 后,角质细胞的活力和屏障功能、神经元分化能力以及反映细胞应激反应的谷胱甘肽和热休克蛋白 70 表达均未受影响;而且我们前期动物皮肤暴露实验结果也显示,功率密度为 50 mW/cm^2 的 THz 辐射暴露导致皮肤组织明显损伤。因此,在体外细胞效应研究中,本研究采用 25 mW/cm^2 和 50 mW/cm^2 两种功率密度,以便与文献报道和前期实验结果比较。

既往研究表明,THz 辐射存在热效应和非热效应[27-29]。由于水对 THz 辐射的吸收非常显著,当功率密度较高时,THz 辐射的能量被细胞培养基吸收引起其温度升高,同时,THz 辐射本身作用于细胞中的生物大分子,引起其分子高速振动、碰撞、摩擦产热,导致细胞温度升高,随之产生一系列生理功能改变甚至损伤效应。根据现有基于细胞水平的 THz 辐射生物效应结果来看,当 THz 暴露引起培养基温度上升超过 1 ℃时,就能引起细胞活力、细胞增殖、细胞周期等的改变,部分应激性分子如热休克蛋白升高,甚至出现 γH2AX 表达升高和 DNA 损伤及染色体分离异常[25,30-32],例如以功率密度为 84.8 mW/cm^2 的 THz 辐射暴露人皮肤成纤维细胞,发现细胞培养基温度升高达 3 ℃,细胞热休克蛋白表达显著增加[27];当以较低功率密度的 THz 辐射进行暴露时,辐射能量不足以引起细胞培养基温度显著升高,但是 THz 辐射可能通过改变生物大分子自身的共振、谐振状态,进而改变 DNA 双链的动态稳定性(DNA breathing dynamics)、影响酶的活性等,从而产生生物效应[33-34]。本研究显示,两种平均功率密度的 THz 辐射暴露,其细胞培养基温度升高与 Sham 组相比均不超过 1 ℃,而细胞突触生长受到抑制,提示 THz 辐射非热效应产生的损伤效应同样需要引起重视。我们既往研究发现 1 800 MHz 电磁辐射能抑制神经细胞突触生长[21],同在非热效应的暴露剂量下,THz 辐射也可损伤神经细胞突触生长。与射频辐射相比,THz 辐射由于频率更高,其穿透细胞的深度更浅。因此,我们推测其抑制细胞突触生长的机制有别于射频辐射,需要进一步深入研究。

综上,本研究发现,0.22 THz 暴露在 50 mW/cm^2 时,能够明显损伤 Neuro-2a 细胞的突触生长。提示神经细胞突触生长是 THz 辐射暴露所致细胞损伤的靶点,为后期深入研究揭示 THz 辐射暴露所致神经细胞损伤特点,阐明相关分子机制提供了实验依据。

参考文献:

[1] CROWE T W, GLOBUS T, WOOLARD D L, *et al*. Terahertz sources and detectors and their application to biological sensing[J]. Philos Trans Royal Soc Lond Ser A: Math Phys Eng Sci, 2004, 362(1815): 365-377. DOI:10.1098/rsta.2003.1327.

[2] 谢莎, 李浩然, 李玲香, 等. 太赫兹通信技术综述[J]. 通信学报, 2020, 41(5): 168-186. DOI:10.11959/j.issn.1000-436x.2020107.
XIE S, LI H R, LI L X, *et al*. Survey of terahertz communication technology[J]. J Commun, 2020, 41(5): 168-186. DOI:10.11959/j.issn.1000-436x.2020107.

[3] 陈小霞, 李玉钊, 安建波, 等. 太赫兹近场成像雷达系统

误差补偿方法[J]. 太赫兹科学与电子信息学报, 2019, 17(1): 1-7. DOI:10.11805/TKYDA201901.0001.
CHEN X X, LI Y Z, AN J B, *et al*. Error compensation methods of terahertz near-field imaging radar system[J]. J Terahertz Sci Electron Inf Technol, 2019, 17(1): 1-7. DOI:10.11805/TKYDA201901.0001.

[4] SUN Q S, HE Y Z, LIU K, *et al*. Recent advances in terahertz technology for biomedical applications[J]. Quant Imaging Med Surg, 2017, 7(3): 345-355. DOI:10.21037/qims.2017.06.02.

[5] STERCZEWSKI L A, NOWAK K, SZLACHETKO B, *et al*. Chemometric evaluation of THz spectral similarity for the selection of early drug candidates[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 14583. DOI:10.1038/s41598-017-14819-6.

[6] LEE D K, KANG J H, KWON J, *et al*. Nano metamaterials for ultrasensitive terahertz biosensing[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 8146. DOI:10.1038/s41598-017-08508-7.

[7] DORADLA P, JOSEPH C, GILES R H. Terahertz endoscopic imaging for colorectal cancer detection: Current status and future perspectives[J]. World J Gastrointest Endosc, 2017, 9(8): 346-358. DOI:10.4253/wjge.v9.i8.346.

[8] PLUSQUELLIC D F, SIEGRIST K, HEILWEIL E J, *et al*. Applications of terahertz spectroscopy in biosystems[J]. ChemPhysChem, 2007, 8(17): 2412-2431. DOI:10.1002/cphc.200700332.

[9] SUN Y W. A promising diagnostic method: terahertz pulsed imaging and spectroscopy[J]. World J Radiol, 2011, 3(3): 55. DOI:10.4329/wjr.v3.i3.55.

[10] YU C, FAN S, SUN Y, *et al*. The potential of terahertz imaging for cancer diagnosis: a review of investigations to date[J]. Quant Imaging Med Surg, 2012, 2(1): 33-45. DOI:10.3978/j.issn.2223-4292.2012.01.04.

[11] YANG X, ZHAO X, YANG K, *et al*. Biomedical applications of terahertz spectroscopy and imaging[J]. Trends Biotechnol, 2016, 34(10): 810-824. DOI:10.1016/j.tibtech.2016.04.008.

[12] ROMANENKO S, BEGLEY R, HARVEY A R, *et al*. The interaction between electromagnetic fields at megahertz, gigahertz and terahertz frequencies with cells, tissues and organisms: risks and potential[J]. J R Soc Interface, 2017, 14(137): 20170585. DOI:10.1098/rsif.2017.0585.

[13] BONDAR N P, KOVALENKO I L, AVGUSTINOVICH D F, *et al*. Behavioral effect of terahertz waves in male mice[J]. Bull Exp Biol Med, 2008, 145(4): 401-405. DOI:10.1007/s10517-008-0102-x.

[14] KIRICHUK V F, ANTIPOVA O N, KRYLOVA Y A. Effect of continuous irradiation with terahertz electromagnetic waves of the NO frequency range on behavioral reactions of male albino rats under stress conditions[J]. Bull Exp Biol Med, 2014, 157(2): 184-189. DOI:10.1007/s10517-014-2521-1.

[15] PI H F, LI M, TIAN L, *et al*. Enhancing lysosomal biogenesis and autophagic flux by activating the transcription factor EB protects against cadmium-induced neurotoxicity[J]. Sci Rep, 2017, 7: 43466. DOI:10.1038/srep43466.

[16] CHEN C H, MA Q L, DENG P, *et al*. Critical role of TRPC1 in thyroid hormone-dependent dopaminergic neuron development[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2017, 1864(10): 1900-1912. DOI:10.1016/j.bbamcr.2017.07.019.

[17] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408. DOI:10.1006/meth.2001.1262.

[18] CUCCURAZZU B, LEONE L, PODDA M V, *et al*. Exposure to extremely low-frequency (50 Hz) electromagnetic fields enhances adult hippocampal neurogenesis in C57BL/6 mice[J]. Exp Neurol, 2010, 226(1): 173-182. DOI:10.1016/j.expneurol.2010.08.022.

[19] MA Q L, CHEN C H, DENG P, *et al*. Extremely low-frequency electromagnetic fields promote *in vitro* neuronal differentiation and neurite outgrowth of embryonic neural stem cells *via* up-regulating TRPC1[J]. PLoS ONE, 2016, 11(3): e0150923. DOI:10.1371/journal.pone.0150923.

[20] WANG H, PENG R Y, ZHAO L, *et al*. The relationship between NMDA receptors and microwave-induced learning and memory impairment: a long-term observation on Wistar rats[J]. Int J Radiat Biol, 2015, 91(3): 262-269. DOI:10.3109/09553002.2014.988893.

[21] CHEN C H, MA Q L, LIU C, *et al*. Exposure to 1800 MHz radiofrequency radiation impairs neurite outgrowth of embryonic neural stem cells[J]. Sci Rep, 2014, 4: 5103. DOI:10.1038/srep05103.

[22] ZHI T S, CHENG T P, QING L L, *et al*. Exposure effects of terahertz waves on primary neurons and neuron-like cells under nonthermal conditions[J]. Biomed Environ Sci, 2019, 32(10): 739-754.

[23] PERERA P, APPADOO D, CHEESEMAN S, *et al*. PC 12 pheochromocytoma cell response to super high frequency terahertz radiation from synchrotron source[J]. Cancers, 2019, 11(2): 162. DOI:10.3390/cancers11020162.

[24] DUKA M V, DVORETSKAYA L N, BABELKIN N S, *et al*. Numerical and experimental studies of mechanisms underlying the effect of pulsed broadband terahertz radiation on nerve cells[J]. Quantum Electron, 2014, 44(8): 707-712. DOI:10.1070/qe2014v044n08abeh015486.

[25] TITOVA L V, AYESHESHIM A K, GOLUBOV A, *et al*. Intense THz pulses cause H2AX phosphorylation and activate DNA damage response in human skin tissue[J]. Biomed Opt Express, 2013, 4(4): 559. DOI:10.1364/boe.4.000559.

(下转2289页)