DOI:10.16016/j.2097-0927.202206091

50 Hz 磁场暴露对 APP/PS1 双转基因小鼠大脑皮层组织代谢的影响

张彦文,马秦龙,高 鹏,邓 平,皮会丰,张 蕾,陈纯海,何旻蒂,卢永辉,谢 佳,田 丽,陈梦妍,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** 探究 50 Hz 磁场暴露对 APP/PS1 双转基因小鼠大脑皮层组织代谢的影响。**方法** 将 12 只 APP/PS1 双转基因 12 周龄雄性小鼠随机分为对照组(C 组)和 50 Hz 磁场暴露组(MF 组),每组 6 只。磁场暴露组小鼠暴露在 1.0 mT 50 Hz 磁场中,2 h/d,持续 21 d;对照组小鼠除无磁场暴露外,其余条件与磁场暴露组相同。暴露结束后按标准方法取小鼠大脑皮层组织,进行高分辨非靶代谢组学检测,包括样品代谢物提取、样品 LC-MS/MS 质谱分析、代谢物定性定量、数据分析等。**结果** 50 Hz 磁场暴露对 APP/PS1 双转基因小鼠的发育无明显影响。本次高分辨非靶代谢组学检测共鉴定出 1 068 种代谢物。依据变异倍数分析(FC>1.5 或 FC<0.67 倍,P<0.05),50 Hz 磁场暴露后小鼠皮层组织共定性出 22 种差异代谢物,其中 11-酮-β-乳香酸增加最明显(FC=80.68),5-氨基酮戊酸降低最明显(FC=0.34)。依据 OPLS-DA (VIP>1,P<0.05),共筛选 30 种差异代谢物,其中 VIP 位居前 3 位的是 2-油酰-1-软脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(VIP=19.76,FC=0.52)、去氢抗坏血酸(VIP=12.71,FC=0.72)、肌苷(VIP=10.64,FC=1.05)。差异代谢物层次聚类分析、相关性和 KEGG 通路分析显示,这些差异代谢物可能参与了 16 条 KEGG 通路,其中差异代谢物 L-天冬氨酸可参与其中的 13 条通路、L-丙氨酸可参与其中的 7 条通路、乙酰胆碱可参与其中的 3 条通路。**结论** 50 Hz 磁场暴露可能对 APP/PS1 双转基因小鼠的氨基酸代谢、蛋白转运、辅酶 A 和氨酰 tRNA 生物合成、肌动蛋白细胞骨架调节、神经细胞配体-受体的相互作用等方面产生一定影响。

[**关键词**] 50 Hz 磁场;APP/PS1 双转基因小鼠;大脑皮层;非靶代谢组学
[**中图法分类号**] R-332; R322.81; R594.8 [**文献标志码**] A

Effects of 50 Hz magnetic field exposure on metabolism of cerebral cortex in APP/PS1 transgenic mice

ZHANG Yanwen, MA Qinlong, GAO Peng, DENG Ping, PI Huifeng, ZHANG Lei, CHEN Chunhai, HE Mindi, LU Yonghui, XIE Jia, TIAN Li, CHEN Mengyan, 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 study the effects of 50 Hz magnetic field exposure on metabolism of cerebral cortex in APP/PS1 transgenic mice. **Methods** Twelve 12-week-old male APP/PS1 double transgenic mice were randomly divided into the control group (C group) and the 50 Hz magnetic field exposure group (MF group) (n=6). The mice in the MF group were exposed to 1.0 mT 50 Hz magnetic field 2 h/d for 3 weeks (21 d). The mice in the sham exposure group had the same conditions as those in the MF group, except for no magnetic field exposure. After exposure, the cerebral cortex tissues of mice were taken according to the standard method for high-resolution untargeted metabonomics tests, including sample metabolite extraction, sample LC-MS/MS mass spectrometry analysis, metabolite qualitative and quantitative analysis and

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(31770906)
[**通信作者**] 张彦文,E-mail: zhangyw20022002@aliyun.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

data analysis. **Results** The growth of APP/PS1 double transgenic mice were not affected after 50 Hz magnetic field exposure. The high-resolution untargeted metabonomics showed 1 068 metabolites were identified. Based on fold change analysis (FC > 1.5 or FC < 0.67, P < 0.05), 22 significant changed metabolites were identified in cerebral cortex of mice after 50 Hz magnetic field exposure, and 11-keto-beta-boswellic acid was the most increased metabolite (FC = 80.68), and 5-aminolevulinic acid was the most decreased metabolite (FC = 0.34). Based on the variable importance in the projection (VIP) value of each variable in the orthogonal partial least-squares discriminant analysis (OPLS-DA) model (VIP>1, P<0.05), 30 identified significant changed metabolites were screened in cerebral cortex of mice after 50 Hz magnetic field exposure. And the top 3 significant changed metabolites in VIP value were 2-oleoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (VIP = 19.76, FC = 0.52), dehydroascorbic acid (VIP = 12.71, FC = 0.72) and inosine (VIP = 10.64, FC = 1.05). The analyses of hierarchical clustering, correlation and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) showed that the 30 VIP significant changed metabolites may be involved in 16 KEGG pathways. L-aspartic acid, L-alanine and acetylcholine may be involved in 13, 7 and 3 pathways of the 16 KEGG pathways respectively. **Conclusion** The amino acid metabolism, ATP-binding cassette transporters, CoA and aminoacyl-tRNA biosynthesis, regulation of actin cytoskeleton and neuroactive ligand-receptor interaction may be impacted in cerebral cortex of APP/PS1 transgenic mice by 50 Hz magnetic field exposure.

[**Key words**] 50 Hz magnetic field;APP/PS1 transgenic mice;cerebral cortex;untargeted metabolomics

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (31770906). Corresponding author: ZHANG Yanwen, E-mail: zhangyw20022002@aliyun.com

据世界卫生组织报告,2019 年世界范围内罹患痴呆的人群已达到 5 520 万人,预计到 2030 年罹患人数将达到 7 800 万人,预计到 2050 年罹患人数达到 13 900 万人[1]。而神经退行性疾病阿尔兹海墨病(Alzheimer's disease,AD)是导致痴呆的主要疾病之一。50 Hz 电磁场属于极低频电磁场(extremely low frequency electromagnetic field,ELF-EMF),使用 50 Hz 交流电的各类电器和传输电线均可在其周围产生 50 Hz 的电磁场,其健康效应受到高度关注。既往研究表明,50 Hz 电磁场暴露可以影响中枢神经系统的结构和功能,并且是促进 AD 发生的高危险因素[2-5]。但近年来也有文献表明,50 Hz 磁场可考虑用于一些疾病的治疗,包括 AD 的治疗[6-8]。本文旨在观察 50 Hz 磁场暴露对 APP/PS1 双转基因雄性小鼠(AD 动物模型)大脑皮层组织代谢的影响,为深入研究 50 Hz 磁场生物效应和机制及寻找生物标志物提供线索和依据。

1 材料与方法

1.1 实验对象与分组

本研究的动物实验对象为 12 只 APP/PS1 双转基因 12 周龄雄性小鼠[B6C3-Tg(APPswPS1dE9)/V,编号 VSM40043],购自北京唯尚立拓科技有限公司。随机分为对照组(C 组)和 50 Hz 磁场暴露组(MF 组),每组 6 只,均单笼(智能型独立通气)饲养在 SPF 级标准实验动物饲养室内,自由进食,每天定时光照 12 h。对照组小鼠体质量为(26.67±1.70) g,50 Hz 磁场暴露组小鼠体质量为(26.15±1.64)g,两组体质量差异无统计学意义。动物适应 1 周后,磁场暴露组小鼠暴露在 1.0 mT 50 Hz 磁场中,2 h/d,持续 3 周(21 d);对照组小鼠除无 50 Hz 磁场暴露外(辐照设备未通电),其余条件与磁场暴露组相同。50 Hz 磁场动物暴露装置见图 1。

1.2 主要试剂和仪器

AB Triple TOF 6600 质谱仪(AB SCIEX,美国);Agilent 1290 Infinity LC 超高压液相色谱仪(Agilent,美国);低温高速离心机(Eppendorf,德国);色谱柱:Waters, ACQUITY UPLC BEH Amide 1.7 μm, 2.1 mm×100 mm column;乙腈(Merck,美国);乙酸铵(Sigma,美国);甲醇(Fisher, 美国);氨水(Fisher, 美国)。

1.3 方法

1.3.1 取材 动物辐照结束后第 2 天,快速脱颈致死,开颅取出大脑,立即在冰上分离半个大脑皮层组织装入冻存管中,投入液氮中快速冷冻,转移到-80 ℃冰箱待用。

1.3.2 大脑皮层组织高分辨非靶代谢组学检测 由上海中科新生命生物科技有限公司提供检测服务。主要步骤包括:样品代谢物提取、样品 LC-MS/MS 质谱分析、代谢物定性定量、数据质量评价、数据分析等。

1.3.2.1　样本代谢物提取　　12 只小鼠(每组 6 只)大脑皮层样本(顶叶)在 4 ℃环境下缓慢解冻后匀浆,取适量样本加入预冷甲醇/乙腈/水溶液(2∶2∶1),涡旋混合,低温超声 30 min,-20 ℃静置 10 min,14 000×*g* 4 ℃离心 20 min,取上清真空干燥,质谱分析时加入 100 μL 乙腈水溶液(乙腈∶水,1∶1)复溶,涡旋,14 000×*g* 4 ℃离心 15 min,取上清液进样分析。

1.3.2.2　色谱-质谱分析　　色谱条件:样品采用 Agilent 1290 Infinity LC 超高效液相色谱系统 HILIC 色谱柱进行分离;柱温 25 ℃;流速 0.5 mL/min;进样量 2 μL;流动相组成 A:水+25 mmol/L 乙酸铵+25 mmol/L 氨水,B:乙腈;梯度洗脱程序如下:0~0.5 min,95% B;0.5~7 min,B 从 95%线性变化至 65% ;7~8 min,B 从 65%线性变化至 40%;8~9 min,B 维持在 40%;9~9.1 min,B 从 40%线性变化至 95%;9.1~12 min,B 维持在 95%;整个分析过程中样品置于 4 ℃自动进样器中。为避免仪器检测信号波动而造成的影响,采用随机顺序进行样本的连续分析。样本队列中插入 QC(quality control)样品,用于监测和评价系统的稳定性及实验数据的可靠性。QC 样本是由待测样本等量混合制成,在待测样本 LC-MS/MS 进样前、进样中和进样后上机检测。

Q-TOF 质谱条件:采用 AB Triple TOF 6600 质谱仪进行样本一级、二级谱图的采集。样品经用 Agilent 1290 Infinity LC 超高效液相色谱系统分离后,用 Triple TOF 6600 质谱仪(AB SCIEX)进行质谱分析,分别采用电喷雾电离(electric spray ionization, ESI)正离子和负离子模式进行检测。

ESI 源设置参数如下:雾化气辅助加热气 1(Gas1):60,辅助加热气 2(Gas2):60,气帘气 (CUR):30 psi,离子源温度:600 ℃,喷雾电压(ISVF)±5 500 V(正负两种模式);一级质荷比检测范围:60~1 000 Da,二级子离子质荷比检测范围:25~1 000 Da,一级质谱扫描累积时间:0.20 s/spectra, 二级质谱扫描累积时间 0.05 s/spectra;二级质谱采用数据依赖型采集模式获得,并且采用峰强度值筛选模式,去簇电压:±60 V(正负两种模式),碰撞能量:(35±15) eV,数据依赖型采集模式设置如下:动态排除同位素离子范围:4 Da,每次扫描采集 10 个碎片图谱。

1.3.2.3　数据分析　　原始数据采用 XCMS 软件进行峰对齐、保留时间校正和提取峰面积。对 XCMS 提取得到的数据先进行代谢物结构鉴定、数据预处理,然后进行实验数据质量评价,最后进行数据分析。数据分析流程如图 2 所示。

单变量统计分析:包括变异倍数分析(fold change analysis,FC Analysis)、*t* 检验/非参检验,检验水准 FC>1.5 或 FC<0.67,同时 $P<0.05$。

差异代谢物筛选:用 OPLS-DA 模型分析得到变量权重值(variable importance for the projection, VIP),检验水准 VIP>1,同时 $P<0.05$。

差异代谢物层次聚类分析:计算样本和样本的距离,或者代谢物与代谢物的距离,每次找到距离最短的两个聚类,合并成一个大的聚类,直到全部合并为一个聚类,建立一个树结构。

相关性分析:衡量显著性差异代谢物(VIP>1, $P<0.05$)之间的代谢密切程度。

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, http://www.kegg.jp/)通路分析:先对正负离子模式筛选到的差异代谢物合并;差异物的 KEGG 通路注释;KEGG 代谢通路中的差异代谢物;通过 KEGG pathway mapper 功能对差异代谢通路进行展示(KEGG 通路图);以 KEGG 通路为单位,以该物种所参与的代谢通路为背景,通过 Fisher 精确检验(Fisher's exact test),来分析计算各个通路代谢物富集度的显著性水平,即 KEGG 通路富集分析;差异代谢通路的差异丰度得分 (differential abundance score) 分析。



A: 磁螺线管; B:50 Hz 正弦波发生仪和信号放大仪

图 1　50 Hz 磁场动物暴露装置

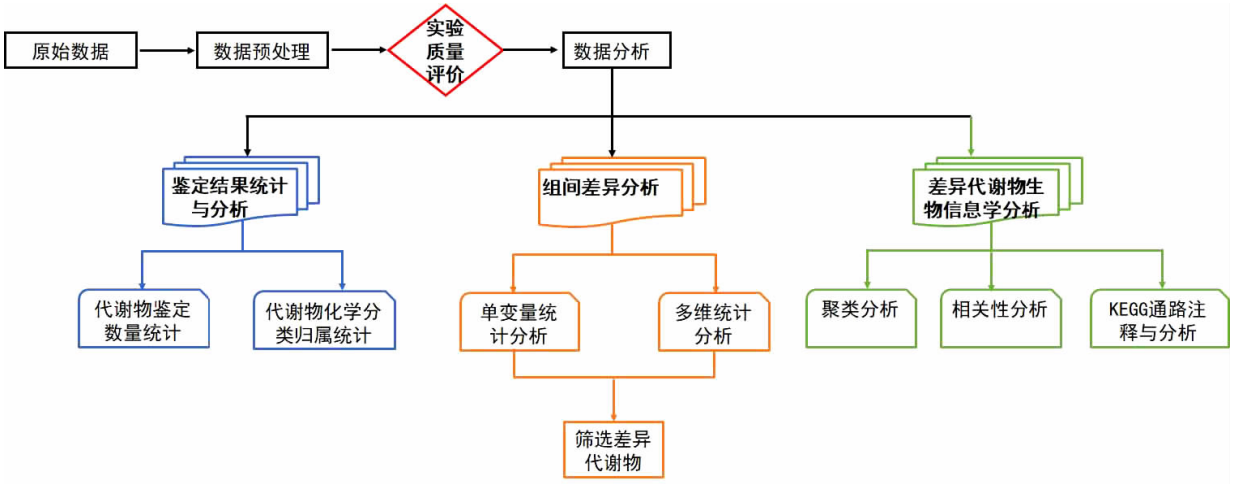


图 2 高分辨非靶代谢组学数据分析流程

表 1 50 Hz 磁场暴露不同时间对小鼠体质量的影响（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	0 d	5 d	10 d	15 d	21 d
对照组	26.27±1.70	26.80±2.11	27.07±2.37	27.30±2.36	27.60±2.23
磁场暴露组	26.15±1.64	25.87±1.54	26.45±1.40	26.78±1.35	26.97±0.73
P	0.91	0.40	0.60	0.65	0.52

1.4 统计学分析

小鼠体质量变化采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 Student's *t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 50 Hz 磁场暴露对小鼠体质量的影响

50 Hz 磁场暴露后(1.0 mT,2 h/d,21 d)小鼠各个时段的体质量与对照组小鼠比差异均无统计学意义(表 1),表明本实验条件下,50 Hz 磁场暴露对 APP/PS1 双转基因小鼠的发育无明显影响。

2.2 代谢物鉴定数量和化学分类归属

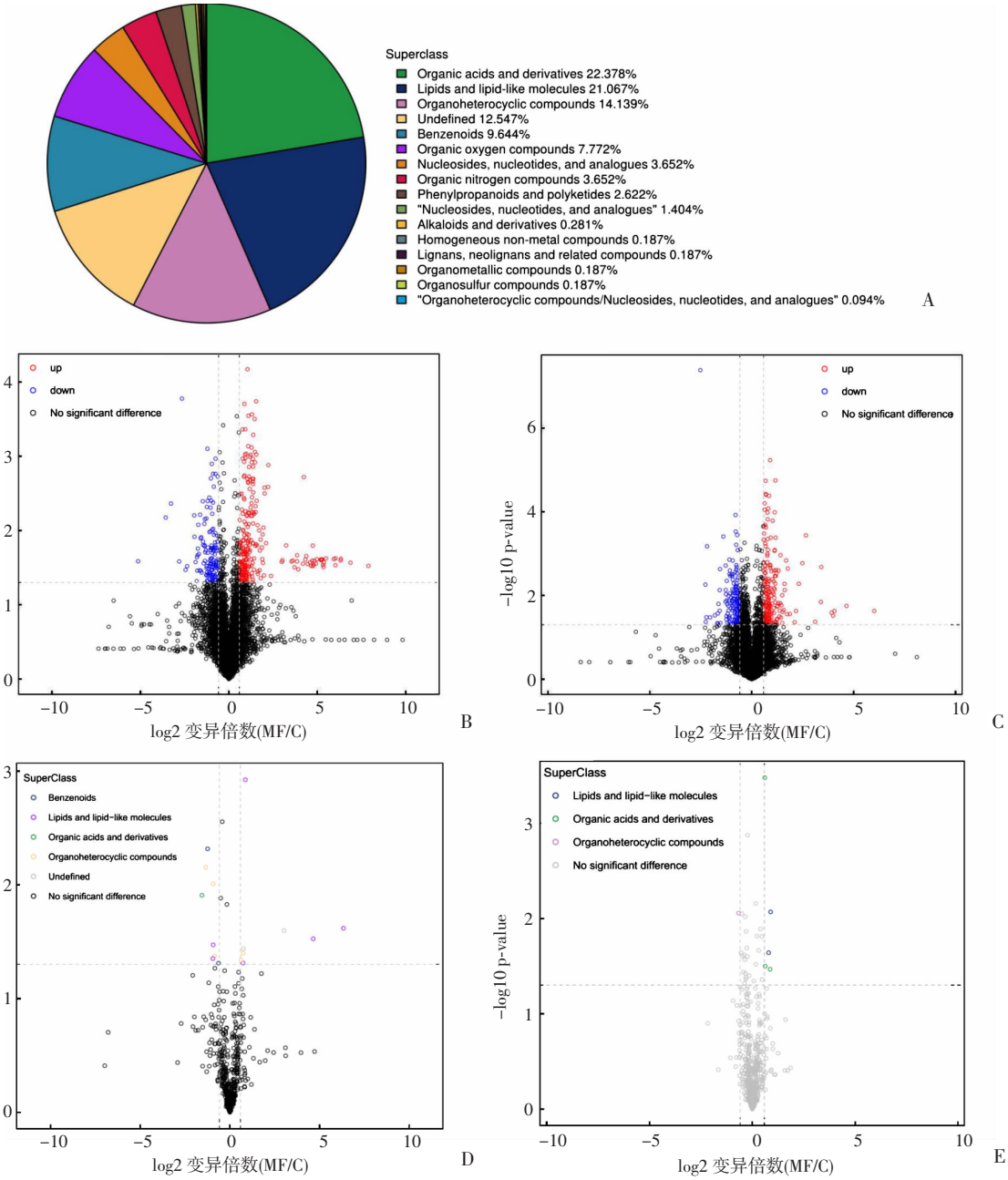
本项目共鉴定出 1 068 种代谢物,其中正离子模式(Pos)鉴定到 521 种、负离子模式(Neg)鉴定到 547 种。根据化学分类(chemical taxonomy)归属信息进行分类统计,各类代谢物分别属于 16 个超类(superclass),其中 75%属于有机酸及其衍生物(organic acids and derivatives)、脂类及脂样分子(lipids and lipid-like molecules)、有机杂环化合物(organoheterocyclic compounds)、苯环型化合物(benzenoids)、有机氧化合物(organic oxygen compounds)5 个超类(图 3A)。

2.3 50 Hz 磁场暴露对 APP/PS1 双转基因小鼠皮层组织代谢物的影响

2.3.1 单变量统计分析 应用变异倍数分析和 *t* 检验/非参检验方法,以 FC(磁场辐照组 MF:对照组 C)>1.5 或 FC<0.67 倍,且 $P<0.05$ 为检验水准,50 Hz 磁场暴露后(1.0 mT,2 h/d,21 d)小鼠皮层组织共有 745 种代谢物发生了明显变化,其中正离子模式有 397 种(图 3B),负离子模式有 348 种(图 3C),主要属于苯环类化合物、脂类及脂样分子、有机酸及其衍生物、有机杂环化合物(图 3D、E)。397 种变化明显的代谢物(正离子模式)中只有 16 种代谢物被鉴定(定性),其中 8 种代谢物在 50 Hz 磁场暴露后明显增加、8 种代谢物明显降低;348 种变化明显的代谢物(负离子模式)中只有 6 种代谢物被鉴定(定性),其中 5 种代谢物在 50 Hz 磁场暴露后明显增加,1 种代谢物明显降低(表 2)。这 22 种代谢物中有 8 种归属于脂类及脂样分子(6 种增加/2 种降低),6 种归属于有机杂环化合物(2 种增加/4 种降低),4 种归属于有机酸及其衍生物(3 种增加/1 种降低),2 种归属于苯环型化合物(均降低),其中增加最明显的是 11-酮-β-乳香酸,降低最明显的是 5-氨基酮戊酸(表 2)。

2.3.2　正交偏最小二乘判别分析　　偏最小二乘判别分析(partial least squares discrimination analysis,PLS-DA)是一种有监督的判别分析统计方法,运用偏最小二乘回归建立代谢物表达量与样品类别之间的关系模型,来实现对样品类别的预测,并可以从数据集中筛选出与分组相关的差异代谢物。正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares discrimination analysis,OPLS-DA)是一种对 PLS-DA 进行修正的分析方法,可滤除与分类信息无关的噪音。

在 OPLS-DA 得分图上,横坐标 t[1]属于预测主成分,能直接反映组间差异;纵坐标 to[1]属于正交主成分,直接反映组内的变异;由图 4A、B 可知,正负两种检测模式下组间差异比较明显,组内也有一定的变异。正负离子模式下经 7 次循环交互验证(7-fold cross-validation)得到的模型评价参数(Q^2)均>0.3,表明 OPLS-DA 模型稳定性较好(表 3)。



A:鉴定的代谢物在各化学分类的数量占比;B:代谢物变化正离子模式火山图　红色:FC>1.5 且 $P<0.05$,蓝色:FC<0.67 且 $P<0.05$,黑色:其他;C:代谢物变化负离子模式火山图;D:正离子模式下差异代谢物的分类归属火山图　黑色:示非显著差异代谢物(差异代谢物用不同的颜色来区分化学分类归属);E:负离子模式下差异代谢物的分类归属火山图

图 3　鉴定代谢物的化学分类及火山图

表 2 被鉴定的代谢物

检测模式	变化趋势	质谱编号	加合离子	名称	倍数	*P*	超类
正离子模式	磁场暴露后增加	M471T39	$[M^+H]^+$	11-keto-. beta. -boswellic acid	80.68	0.024	Lipids and lipid-like molecules
		M395T38	$[M^+H^-H_2O]^+$	4, 4-dimethylcholest-8 (9), 24-dien-3. beta. -ol	25.08	0.030	Lipids and lipid-like molecules
		M141T238	$[M^+H]^+$	(1r, 5s)-8-methyl-8-azabicyclo [3.2.1]octan-3-amine	8.14	0.025	
		M453T146	$[M^+H^-2H_2O]^+$	Asiatic acid	1.82	0.001	Lipids and lipid-like molecules
		M247T331_1	$[M^+H^-H_2O]^+$	Alpha-N-Phenylacetyl-L-glutamine	1.68	0.036	
		M141T560	$[M^+H]^+$	Hexamethylenetetramine	1.67	0.040	Organoheterocyclic compounds
		M357T559_1	$[M^+H]^+$	. beta. -estradiol 17-valerate	1.66	0.049	Lipids and lipid-like molecules
		M205T496_2	$[M^+H]^+$	Levamisole	1.54	0.046	Organoheterocyclic compounds
	磁场暴露后降低	M168T242	$[M^+H]^+$	2,4-diamino-6-nitrotoluene	0.64	0.049	Benzenoids
		M351T429	$[M^+H^-H_2O]^+$	2-furancarboxylic acid	0.55	0.042	Organoheterocyclic compounds
		M783T43_1	$[M^+Na]^+$	2-oleoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	0.52	0.034	Lipids and lipid-like molecules
		M242T481	$[M^+H]^+$	Quinclorac	0.52	0.010	Organoheterocyclic compounds
		M371T660	$[M^+Na]^+$	Ingenol	0.52	0.044	Lipids and lipid-like molecules
		M387T657	$[M^+Na]^+$	Pyridaben	0.42	0.005	Benzenoids
		M218T68	$[M^+H^-2H_2O]^+$	D-neopterin	0.39	0.007	Organoheterocyclic compounds
		M114T254_1	$[M^+H^-H_2O]^+$	5-aminolevulinic acid	0.34	0.012	Organic acids and derivatives
负离子模式	磁场暴露后增加	M214T406	$[M^-H]^-$	sn-Glycerol 3-phosphoethanolamine	1.86	0.008	Lipids and lipid-like molecules
		M246T129	$[M^-H]^-$	(s)-(+)-2-phenyl-n-(trifluoro-acetyl) glycine	1.82	0.034	Organic acids and derivatives
		M171T398	$(M^-H)^-$	Glycerol 3-phosphate	1.73	0.023	Lipids and lipid-like molecules
		M145T238	$[M^-H^-C_8H_6O]^-$	Phenylacetyl-l-glutamine	1.54	0.032	Organic acids and derivatives
		M611T514	$[M^-H]^-$	Glutathione, oxidized	1.52	0.000	Organic acids and derivatives
	磁场暴露后降低	M347T113	$[M^-H]^-$	Dehydro-l-(+)-ascorbic acid dimer	0.63	0.009	Organoheterocyclic compounds

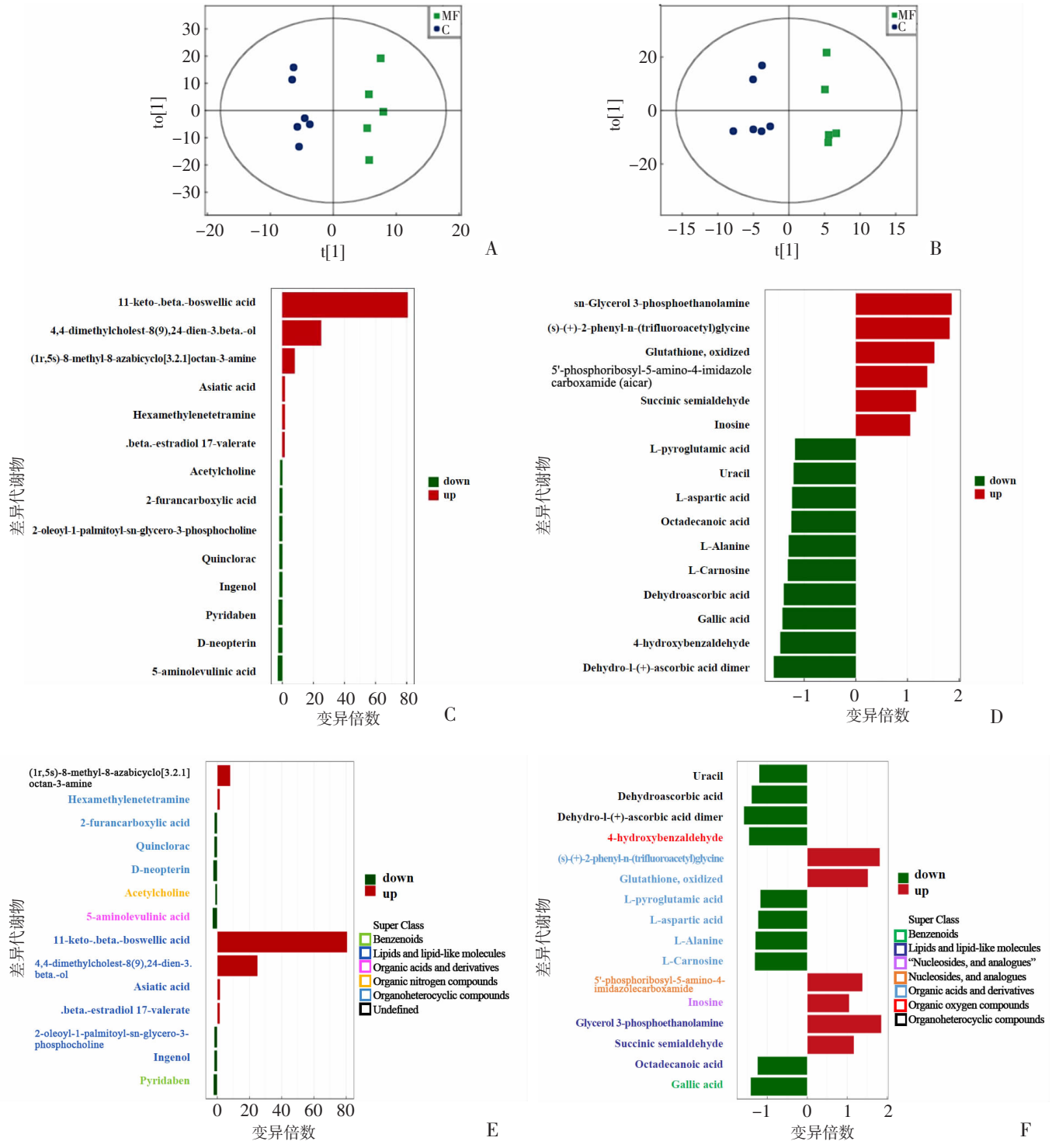
FC>1.5 或 FC<0.67 倍,且 $P<0.05$;正离子模式另有 381 个代谢物未定性,负离子模式另有 342 个代谢物未定性

表 3 OPLS-DA 模型评价参数

检测模式	样品分组	A	R^2X(cum)	R^2Y(cum)	Q^2(cum)
正离子	MF *vs* C	1+1	0.361	0.971	−0.358
负离子	MF *vs* C	1+1	0.424	0.944	0.691

A:主成分数;R^2X:模型对 X 变量解释率;R^2Y:模型对 Y 变量的解释率;Q^2:模型预测能力;$Q^2>0.5$:模型稳定可靠;$0.3<Q^2\leqslant 0.5$:模型稳定性较好;$Q^2\leqslant 0.3$:模型可靠性较低

OPLS-DA 模型得到的 VIP 能够用于衡量各代谢物的表达模式对各组样本分类判别的影响强度和解释能力,挖掘具有生物学意义的差异分子。以 VIP>1 和 $P<0.05$ 为显著性差异代谢物筛选标准,50 Hz 磁场暴露后(1.0 mT,2 h/d,21 d)小鼠皮层组织共有 30 种代谢物(被鉴定)发生了明显变化,其中正离子模式有 14 种(图 4C),负离子模式有 16 种(图 4D),主要属于脂类及脂样分子(9 种)、有机杂环化合物(7 种)、有机酸及其衍生物(7 种)、苯环类化合物(2 种)、核苷类及其类似物(2 种)等(图 4E、F),详细变化趋势和变化幅度等信息见表 4,其中 VIP 最大的代谢物是 2-油酰-1-软脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(VIP = 19.76,FC = 0.52),其次是去氢抗坏血酸(VIP = 12.71,FC = 0.72),第三是肌苷(VIP = 10.64,FC = 1.05)。与上述变异倍数分析(FC>1.5 或 FC<0.67 倍,且 $P<0.05$)比较,组间差异代谢物数量由 22 种增加到 30 种,但构成有所变化,即原 22 种代谢物中减少了 5 种,在此基础上增加了 13 种代谢物(3 种增加/10 种降低,0.67<FC<1.5 倍)。



A:正离子模式 OPLS-DA 得分图;B:负离子模式 OPLS-DA 得分图;C:正离子模式显著性差异代谢物表达差异倍数分析;D:负离子模式显著性差异代谢物表达差异倍数分析;E:正离子模式显著性差异代谢物超类归属图;F:负离子模式显著性差异代谢物超类归属图

图 4　正交偏最小二乘判别分析进行差异代谢物筛选结果

表 4 组间差异代谢物

检测模式	变化趋势	质谱编号	加合离子	名称	变量权重值	倍数	*P*	超类
正离子模式	磁场暴露后增加	M471T39	$[M^+H]^+$	11-keto-. beta. -boswellic acid	2.10	80.68	0.024	Lipids and lipid-like molecules
		M395T38	$[M^+H^-H_2O]^+$	4, 4-dimethylcholest-8 (9), 24-dien-3. beta. -ol	2.14	25.08	0.030	Lipids and lipid-like molecules
		M141T238	$[M^+H]^+$	(1r, 5s)-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-amine	1.73	8.14	0.025	
		M453T146	$[M^+H^-2H_2O]^+$	Asiatic acid	1.61	1.82	0.001	Lipids and lipid-like molecules
		M141T560	$[M^+H]^+$	Hexamethylenetetramine	1.52	1.67	0.040	Organoheterocyclic compounds
		M357T559_1	$[M^+H]^+$	. beta. -estradiol 17-valerate	1.27	1.66	0.049	Lipids and lipid-like molecules
	磁场暴露后降低	M146T157	$(M^+H)^+$	Acetylcholine	4.16	0.74	0.003	Organic nitrogen compounds
		M351T429	$[M^+H^-H_2O]^+$	2-furancarboxylic acid	1.12	0.55	0.042	Organoheterocyclic compounds
		M783T43_1	$[M^+Na]^+$	2-oleoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine	19.76	0.52	0.034	Lipids and lipid-like molecules
		M242T481	$[M^+H]^+$	Quinclorac	1.57	0.52	0.010	Organoheterocyclic compounds
		M371T660	$[M^+Na]^+$	Ingenol	1.20	0.52	0.044	Lipids and lipid-like molecules
		M387T657	$[M^+Na]^+$	Pyridaben	1.21	0.42	0.005	Benzenoids
		M218T68	$[M^+H^-2H_2O]^+$	D-neopterin	1.61	0.39	0.007	Organoheterocyclic compounds
		M114T254_1	$[M^+H^-H_2O]^+$	5-aminolevulinic acid	4.08	0.34	0.012	Organic acids and derivatives
负离子模式	磁场暴露后增加	M214T406	$[M^-H]^-$	sn-Glycerol 3-phosphoethanolamine	2.68	1.86	0.008	Lipids and lipid-like molecules
		M246T129	$[M^-H]^-$	(s)-(+)-2-phenyl-n-(trifluoro-acetyl)glycine	2.28	1.82	0.034	Organic acids and derivatives
		M611T514	$[M^-H]^-$	Glutathione, oxidized	3.49	1.52	0.000	Organic acids and derivatives
		M337T378	$[M^-H]^-$	5'-phosphoribosyl-5-amino-4-imidazolecarboxamide (aicar)	1.17	1.38	0.015	Nucleosides, and analogues
		M101T383	$[M^-H]^-$	Succinic semialdehyde	2.48	1.17	0.015	Lipids and lipid-like molecules
		M267T222_4	$[M^-H]^-$	Inosine	10.64	1.05	0.045	"Nucleosides, and analogues"
	磁场暴露后降低	M128T310_4	$[M^-H]^-$	L-pyroglutamic acid	7.35	0.85	0.025	Organic acids and derivatives
		M111T69_3	$[M^-H]^-$	Uracil	8.12	0.83	0.020	Organoheterocyclic compounds
		M132T416	$[M^-H]^-$	L-aspartic acid	7.23	0.81	0.014	Organic acids and derivatives
		M283T90	$[M^-H]^-$	Octadecanoic acid	4.50	0.80	0.043	Lipids and lipid-like molecules
		M88T265	$[M^-H]^-$	L-Alanine	1.38	0.77	0.048	Organic acids and derivatives
		M225T434_2	$[M^-H]^-$	L-Carnosine	2.15	0.76	0.024	Organic acids and derivatives
		M173T113	$[M^-H]^-$	Dehydroascorbic acid	12.71	0.72	0.025	Organoheterocyclic compounds
		M169T142	$[M^-H]^-$	Gallic acid	3.07	0.70	0.009	Benzenoids
		M121T91	$[M^-H]^-$	4-hydroxybenzaldehyde	1.86	0.68	0.023	Organic oxygen compounds
		M347T113	$[M^-H]^-$	Dehydro-l-(+)-ascorbic acid dimer	5.56	0.63	0.009	Organoheterocyclic compounds

VIP>1.0,且 $P<0.05$

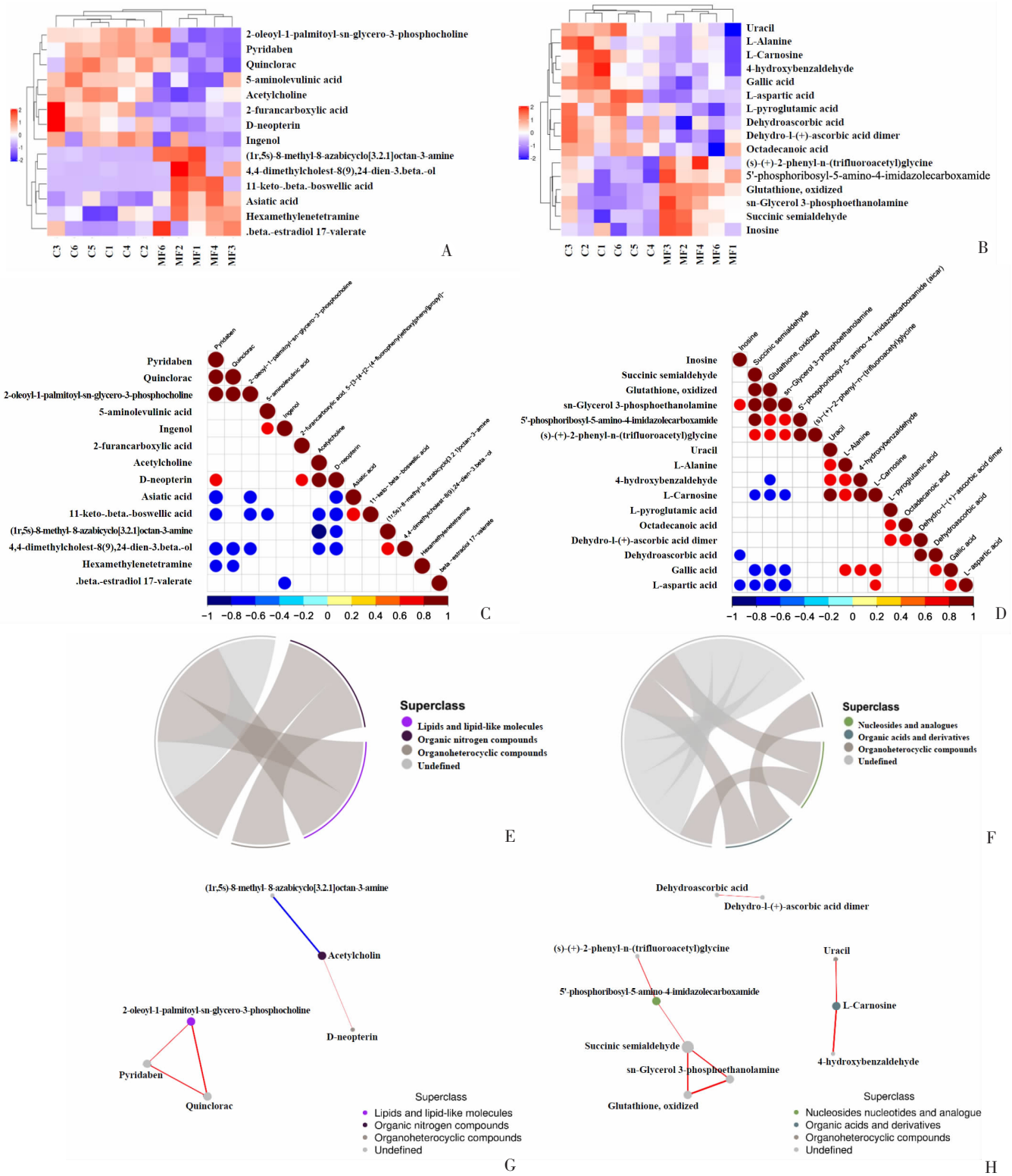
2.3.3 VIP 差异代谢物的层次聚类分析 为了更全面直观地显示样本之间的关系以及代谢物在不同样本中的表达模式差异,将所有样本及差异代谢物的表达量都减去所属组的平均值后再除以这组数的均方根以进行标准化,然后进行距离矩阵计算,并进行层次聚类分析。50 Hz 磁场暴露后(1.0 mT,2 h/d,21 d)雄性小鼠皮层组织 2-油酰-1-软脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(2-oleoyl-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)与哒螨灵(pyridaben)、L-肌肽(L-carnosine)与 4-羟基苯甲醛(4-hydroxybenzaldehyde)等具有明显相似的表达模式(均降低),11-酮-β-乳香酸(11-keto-beta-boswellic acid)与亚细亚酸(asiatic acid)、氧化型谷胱甘肽(glutathione, oxidized, GSSG)与 sn-丙三醇-3-磷酸氨基乙醇(sn-Glycerol-3-phosphoethanolamine)等同样具有明显相似的表达模式(均增加),提示两两之间可能具有相似的功能或者共同参与同一代谢过程或者细胞通路(图 5A、B)。

2.3.4 VIP 差异代谢物间的相关性分析 相关性分析可以帮助衡量显著性差异代谢物之间的代谢密切程度,有利于进一步了解生物状态变化过程中代谢物之间的相互调节关系。50 Hz 磁场暴露后(1.0 mT, 2 h/d, 21 d)雄性小鼠皮层组织 2-油酰-1-软脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱与哒螨灵和二氯喹啉酸(quinclorac)三者之间、sn-丙三醇-3-磷酸氨基乙醇与琥珀半醛(succinic semialdehyde)和氧化型谷胱甘肽三者之间、乙酰胆碱(acetylcholine)和 D-新蝶呤(D-neopterin)两者之间、琥珀半醛和 5'-磷酸核糖基-5-氨基-4-咪唑羧酰胺(5'-phosphoribosyl-5-amino-4-imidazolecarboxamide)两者之间、L-肌肽和 4-羟基苯甲醛两者之间、L-肌肽和尿嘧啶(uracil)两者之间、去氢抗坏血酸(dehydroascorbic acid)和去氢-1-抗坏血酸二聚体[dehydro-1-(+)-ascorbic acid dimer]两者之间均存在明显的正相关关系(相关系数>0.8),提示它们之间可能共同参与同一生物过程(功能相关/协同关系)或来源于同一合成途径;乙酰胆碱和 8-甲基-8-氮杂双环辛烷-3-胺{(1r,5s)-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-amine}两者之间存在明显的负相关关系(相关系数>0.8),提示它们之间可能存在互斥关系或合成转化关系(图 5C、D)。和弦图和网络图更直观地揭示了上述代谢物之间的相关性和共调节关系(图 5E~H)。

2.3.5 差异代谢物 KEGG 通路分析 50 Hz 磁场暴露后(1.0 mT,2 h/d,21 d)小鼠皮层组织差异代谢物可能参与的 KEGG 通路有 16 条($P<0.05$,图 6A、B)。从差异代谢物参与的数目看,ABC 转运子(ABC transporters)有 4 种差异代谢物参与,丙氨酸天冬氨酸谷氨酸盐代谢(Alanine, aspartate and glutamate metabolism)、β 丙氨酸代谢(beta-Alanine metabolism)、谷胱甘肽代谢(glutathione metabolism)、组氨酸代谢(histidine metabolism)、碳代谢(carbon metabolism)5 条通路有 3 种差异代谢物参与,泛酸盐和辅酶 A 生物合成(pantothenate and CoA biosynthesis)、癌症主要碳代谢(central carbon metabolism in cancer)、蛋白消化和吸收(protein digestion and absorption)、甘氨酸丝氨酸苏氨酸代谢(glycine, serine and threonine metabolism)、神经活性的配体-受体相互作用(neuroactive ligand-receptor interaction)、氨酰 tRNA 生物合成(aminoacyl-tRNA biosynthesis)、烟酸盐和烟酰胺代谢(nicotinate and nicotinamide metabolism)、半胱氨酸和甲硫氨酸代谢(cysteine and methionine metabolism)8 条通路有 2 种差异代谢物参与,肌动蛋白细胞骨架调节(regulation of actin cytoskeleton)和尼古丁成瘾(Nicotine addiction)2 条通路有 1 种差异代谢物参与(图 6A,C~H)。但从差异代谢物个数在该通路中注释到的代谢物个数的占比看,肌动蛋白细胞骨架调节通路中差异代谢物占比最高(20%),丙氨酸天冬氨酸谷氨酸盐代谢、β 丙氨酸代谢、谷胱甘肽代谢的占比分别为 11%、9%、8%。

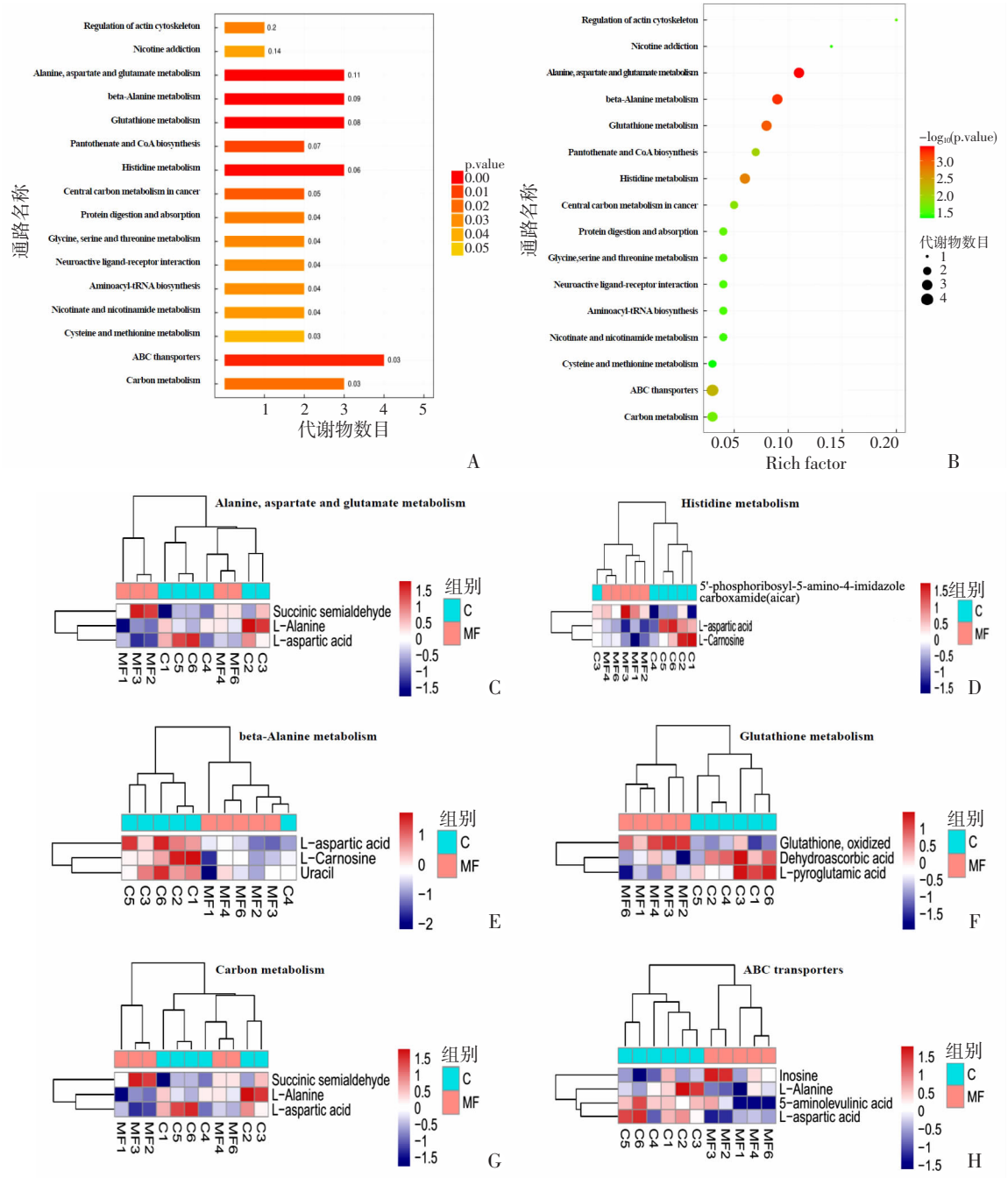
3 讨论

APP/PS1 双转基因小鼠是常见的 AD 动物模型之一。该动物模型不仅转染了 β-淀粉状蛋白前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)基因,能过表达跨膜蛋白 APP,酶解后可导致神经毒性物 β-淀粉状蛋白(amyloid-β, Aβ)在脑组织的沉积;而且还转染了早老素 1(presenilin-1, PS1)突变基因,PS1 是 γ-分泌酶(γ-secretase)的关键催化亚基,可增强 γ-分泌酶的蛋白水解活性,加速 APP 的水解和 Aβ 的生成,增强 APP 的毒性,加速动物 AD 表型的出现[9-10]。因此该动物模型常用于早发 AD(early-onset Alzheimer's disease, EOAD)的研究。



A:正离子模式层次聚类热图;B:负离子模式层次聚类热图　横坐标:样品信息,纵坐标:代谢物,红色:显著性上调,蓝色:显著性下调,颜色深浅:上下调程度;C:正离子模式相关性热图;D:负离子模式相关性热图　红色:正相关,蓝色:负相关,白色:非显著性相关,颜色深浅:相关程度(颜色越深越相关),点的大小:相关的显著性(越显著,点越大);E:正离子模式和弦图;F:负离子模式和弦图　内圈 link 的起点:代谢物,外圈上的弧线:代谢物所属分类,彩色线条:各类代谢物内部的相关性,深灰色线条:不同类别代谢物之间的相关性;G:正离子模式网络图;H:负离子模式网络图　点:代谢物(点越大,连接度越大),红色线条:正相关,蓝色线条:负相关(线条越粗,相关性越大)

图 5　显著性差异代谢物的聚类分析和相关性分析



A:KEGG 富集通路柱状图;B:KEGG 富集通路气泡图　rich factor:该通路中差异代谢物的个数在该通路中注释到的代谢物个数的占比　气泡所在纵坐标和气泡颜色:富集分析的 *P* 值(颜色越深 *P* 值越小,富集程度越显著);C~H:KEGG 通路的差异代谢物聚类热图　红色:显著性上调 蓝色:显著性下调 颜色深浅:上下调的程度

图 6　显著性差异代谢物 KEGG 通路分析

3.1　50 Hz 磁场暴露引起了 APP/PS1 双转基因小鼠皮层组织代谢的改变

AD 是一种进行性的不可逆的神经退行性疾病,最终可影响大脑皮层和海马脑区等大部分区域,其代谢功能紊乱明显,可表现为能量代谢、糖代谢、脂代谢、氨基酸代谢异常等,并且与氧化应激和胰岛素抵抗等有关,代谢功能紊乱在 AD 的发生发展等方面都起着重要的作用[10-14]。已有研究表明,50/60 Hz 极低频电磁辐射作为一种在日常生活和生产中常见的、与用电相关的物理性因素也可引起生物体代谢功能的异常。60 Hz 磁场(3.8 mT)急性暴露 15 min 可引起大鼠血糖升高、血清丙酮酸和乙酰乙酸升高、血清游离脂肪酸

和乳酸下降,并且葡萄糖代谢的改变与细胞氧化还原状态、血清胰岛素/胰高血糖素比值改变有关[15]。50 Hz 磁场(3.0 mT)持续暴露可致秀丽隐杆线虫三羧酸循环代谢异常(延胡索酸酶表达下调)和前列腺素 E2 合成异常(脂类代谢物花生四烯酸和前列腺素 E2 升高,前列腺素 E2 合酶表达上调),并伴有氧化应激反应(活性氧含量升高,总抗氧化能力降低)[16]和脂类代谢改变(脂类组学结果显示有 64 种脂类发生了明显的变化)[17]。50/60 Hz 极低频电磁辐射对 AD 生物体代谢的影响还未见系统研究。本研究发现,50 Hz 磁场暴露后 APP/PS1 双转基因小鼠皮层组织共有 30 种代谢物发生了明显变化,主要属于脂类及脂样分子(9 种)、有机杂环化合物(7 种)、有机酸及其衍生物(7 种)、苯环类化合物(2 种)、核苷类及其类似物(2 种)等;通过差异代谢物 KEGG 通路分析,这些差异代谢物可能参与的 KEGG 通路有 16 条,其中差异代谢物乙酰胆碱、GSSG、肌苷(inosine)、L-天冬氨酸(L-aspartic acid)、L-丙氨酸(L-alanine)、L-肌肽值得关注。

3.2 50 Hz 磁场暴露可能会加重胆碱能系统紊乱和谷胱甘肽氧化还原状态的失衡,影响天冬氨酸、丙氨酸和嘌呤代谢

AD 病人脑脊液和 APP SW 转基因小鼠脑组织中乙酰胆碱浓度均明显降低,提示 Aβ 在脑组织的沉积可引起胆碱能系统的紊乱[18-19]。乙酰胆碱酯酶可以通过水解乙酰胆碱影响乙酰胆碱的浓度或含量。已有文献表明,50 Hz 极低频电磁辐射可引起乙酰胆碱酯酶活性的双相变化[20],也可引起从小鼠小脑分离的突触体内乙酰胆碱酯酶活性的可逆性降低[21]。本代谢组学研究发现,50 Hz 磁场暴露后 APP/PS1 双转基因小鼠皮层组织乙酰胆碱浓度明显降低。AD 患者体液(血清、脑脊液等)、血细胞、脑组织中谷胱甘肽氧化还原状态表现异常,即氧化型谷胱甘肽增加、还原型谷胱甘肽(glutathione,GSH)降低,即 GSH/GSSG 比值降低。GSH/GSSG 比值在 1 月龄 APP/PS1 双转基因小鼠脑组织中比较高,5 月龄过渡期时(淀粉样斑块形成前)比值逐渐降低,11 月龄时 GSSG 明显增加、GSH/GSSG 比值明显降低[22]。多数文献表明 50 Hz 极低频电磁辐射可引起动物脑组织谷胱甘肽氧化还原状态失衡,GSH/GSSG 比值降低[23]。本研究发现,50 Hz 磁场暴露后 APP/PS1 双转基因小鼠皮层组织氧化型谷胱甘肽明显增加。L-aspartic acid 和 L-alanine 均是合成蛋白质的 20 种氨基酸之一,均属于非必需氨基酸,均参与许多氨基酸等的代谢过程。L-carnosine 是一种二肽,由 β-丙氨酸和组氨酸组成,主要可参与 β-丙氨酸代谢、组氨酸代谢。文献表明 AD 动物脑组织中天冬氨酸、丙氨酸含量增加[24-25]或降低[10],血浆肌肽含量降低[26],表明 AD 动物体内氨基酸代谢异常,推测这与 AD 动物脑细胞在能量代谢受损的情况下以氨基酸作为代偿性原料维持生长代谢有关。已有文献表明,短期暴露于 50 Hz 电磁场(100 kV/m,320 h)中可导致大鼠纹状体部分氨基酸类神经递质(包括天冬氨酸和丙氨酸)含量降低[27];2.0 mT 60 Hz 磁场暴露 5 d 可导致大鼠大脑皮层内的天冬氨酸等神经递质含量降低[28]。本代谢组学研究发现,50 Hz 磁场暴露后 APP/PS1 双转基因小鼠皮层组织 L-天冬氨酸、L-丙氨酸、L-肌肽均明显降低。肌苷属于嘌呤核苷类有机化合物,是嘌呤核苷类化合物降解为尿酸的中间产物,主要参与嘌呤代谢。有文献表明,20 周鼠龄的 APP/PS1 双转基因小鼠皮层组织中肌苷含量明显增加(VIP = 1.54,FC = 1.69,且 $P<0.000\ 5$)[10]。以往文献未发现 50 Hz 电磁场对生物体内肌苷的影响。本代谢组学研究发现,50 Hz 磁场暴露后 APP/PS1 双转基因小鼠皮层组织肌苷含量明显升高。

3.3 50 Hz 磁场暴露可能影响了氨基酸代谢、蛋白转运、辅酶 A 和氨酰 tRNA 生物合成、肌动蛋白细胞骨架调节、神经细胞配体-受体相互作用通路

从差异代谢物参与的 16 条 KEGG 通路看,有 2 种或 3 种差异代谢物参与了丙氨酸天冬氨酸谷氨酸盐代谢、β 丙氨酸代谢、组氨酸代谢、甘氨酸丝氨酸苏氨酸代谢、半胱氨酸和甲硫氨酸代谢通路,提示本实验条件下 50 Hz 磁场暴露可能主要对 APP/PS1 双转基因小鼠大脑皮层组织中氨基酸的代谢过程产生了一定影响。由于 AD 动物脑细胞在能量代谢受损的情况下常以氨基酸作为代偿性原料维持生长代谢,推测 50 Hz 磁场暴露可能会影响动物 AD 表型的发生和发展。ABC(ATP-binding cassette)转运蛋白是一类功能多样的跨膜转运蛋白,负责多种物质的跨膜转运、抵抗外源物侵犯和清除异源物质、营养摄取等,与 AD、帕金森症、肾上腺脑白质营养不良等神经退行性疾病有关[29]。辅酶 A 是一种含有泛酸的辅酶,其主要功能是携带及转运酰基;胺酰 tRNA 是一种与之对应的氨基酸相结合的转移核糖核酸,其职责是将氨基酸传递到核糖体中,并合并到正在延伸中的多肽链中。细胞骨架主要由微丝、微管、中间纤维组成,而微丝的主要成分是肌动蛋白,为细胞内囊泡转运提供了轨道,肌动蛋白细胞骨架调节囊泡转运发生障碍与 AD 的发病有关。神经活性的配体-受体相互作用信号通路是细胞膜上所有与细胞内外信号通路相关的受体配体的集合。本实验研究发现 4 种差异代谢物参与了 ABC 转运蛋白通路,2 种差异代谢物参与了辅酶 A 和氨酰

tRNA 生物合成通路、神经活性配体-受体的相互作用通路,1 种差异代谢物(差异代谢物占比高达 20%)参与了肌动蛋白细胞骨架调节通路,因此 50 Hz 磁场暴露可能对 APP/PS1 双转基因小鼠大脑皮层上述通路产生的影响也值得关注。另外,由于差异代谢物 L-天冬氨酸可参与上述 16 条 KEGG 通路中的 13 条通路、L-alanine 可参与 7 条通路、乙酰胆碱可参与 3 条通路,因此这些差异物有可能是人体 50 Hz 磁场暴露血清标志物的候选对象。

本研究利用代谢组学技术观察了 50 Hz 磁场暴露(1.0 mT,2 h/d)21 d 后 16 周龄 APP/PS1 双转基因小鼠皮层组织代谢的变化,筛选出的差异代谢物及相关 KEGG 代谢通路虽为后续研究 50 Hz 磁场效应机制和寻找生物标志物提供了一定的依据和线索,但后期仍需采用其他技术手段加以验证。另外,本研究仅以 APP/PS1 双转基因小鼠为实验对象,未使用同品系的野生型小鼠进行对比观察,无法判断该转基因小鼠在 50 Hz 磁场暴露后取材前阶段 AD 相关表型的状况以及 50 Hz 磁场暴露对野生型小鼠代谢的影响情况,这是本研究不足之处。但该 AD 模型动物是较成熟的动物模型,可根据动物的年龄和以该动物模型为研究对象的其他相关文献对该阶段动物 AD 相关表型的现状进行大致的判断,一定程度上可弥补这一不足。

参考文献:

[1] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global status report on the public health response to dementia. https://www.who.int/health-topics/dementia

[2] QIU C X, FRATIGLIONI L, KARP A, *et al*. Occupational exposure to electromagnetic fields and risk of alzheimer's disease[J]. Epidemiology, 2004, 15(6): 687-694. DOI: 10.1097/01.ede.0000142147.49297.9d.

[3] DEL GIUDICE E, FACCHINETTI F, NOFRATE V, *et al*. Fifty Hertz electromagnetic field exposure stimulates secretion of beta-amyloid peptide in cultured human neuroglioma[J]. Neurosci Lett, 2007, 418(1): 9-12. DOI: 10.1016/j.neulet.2007.02.057.

[4] DENG Y X, ZHANG Y W, JIA S J, *et al*. Effects of aluminum and extremely low frequency electromagnetic radiation on oxidative stress and memory in brain of mice[J]. Biol Trace Elem Res, 2013, 156(1/2/3): 243-252. DOI: 10.1007/s12011-013-9847-9.

[5] DAVANIPOUR Z, TSENG C C, LEE P J, *et al*. Severe cogni tive dysfunction and occupational extremely low frequency magnetic field exposure among elderly mexican americans [J]. Br J Med Med Res, 2014, 4(8): 1641-1662. DOI: 10.9734/bjmmr/2014/7317.

[6] HU Y, LAI J S, WAN B Q, *et al*. Long-term exposure to elf-mf ameliorates cognitive deficits and attenuates tau hyperphosphorylation in 3xtg AD mice[J]. Neurotoxicology, 2016, 53: 290-300. DOI: 10.1016/J.Neuro.2016.02.012.

[7] ZUO H Y, LIU X, LI Y, *et al*. The mitochondria/caspase-dependent apoptotic pathway plays A role in the positive effects of a power frequency electromagnetic field on alzheimer's disease neuronal model[J]. J Chem Neuroanat, 2020, 109: 101857. DOI: 10.1016/j.jchemneu.2020.101857.

[8] ZUO H Y, LIU X, WANG D W, *et al*. RKIP-mediated NF-κB signaling is involved in elf-mf-mediated improvement in AD rat[J]. Int J Med Sci, 2018, 15(14): 1658-1666. DOI: 10.7150/Ijms.28411.

[9] HOLCOMB L, GORDON M N, MCGOWAN E, *et al*. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes[J]. Nat Med, 1998, 4(1): 97-100. DOI: 10.1038/nm0198-097.

[10] CHANG K L, WONG L R, PEE H N, *et al*. Reverting metabolic dysfunction in cortex and cerebellum of APP/PS1 mice, a model for Alzheimer's disease by pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ) agonist[J]. Mol Neurobiol, 2019, 56(11): 7267-7283. DOI: 10.1007/s12035-019-1586-2.

[11] PODDAR M K, BANERJEE S, CHAKRABORTY A, *et al*. Metabolic disorder in Alzheimer's disease[J]. Metab Brain Dis, 2021, 36(5): 781-813. DOI: 10.1007/s11011-021-00673-Z.

[12] KELLAR D, CRAFT S. Brain insulin resistance in Alzheimer's disease and related disorders: mechanisms and therapeutic approaches[J]. Lancet Neurol, 2020, 19(9): 758-766. DOI: 10.1016/s1474-4422(20)30231-3.

[13] ZHU T B, ZHANG Z, LUO P, *et al*. Lipid metabolism in Alzheimer's disease[J]. Brain Res Bull, 2019, 144(2): 68-74. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2018.11.012.

[14] YIN F, SANCHETI H, PATIL I, *et al*. Energy metabolism and inflammation in brain aging and Alzheimer's disease [J]. Free Radic Biol Med, 2016, 100: 108-122. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.200.

[15] MARTIÑÓN-GUTIÉRREZ G, LUNA-CASTRO M, HERNÁNDEZ-MUÑOZ R. Role of insulin/glucagon ratio and cell redox state in the hyperglycaemia induced by exposure to a 60-Hz magnetic field in rats[J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 11666. DOi: 10.1038/s41598-021-91228-w.

[16] SUN Y Y, SHI Z H, WANG Y H, *et al*. Coupling of oxidative stress responses to tricarboxylic acid cycle and prostaglandin E2 alterations in *Caenorhabditis elegans* under extremely low-frequency electromagnetic field[J]. Int J Radiat Biol, 2018, 94(12): 1159-1166. DOI: 10.1080/

09553002.2019.1524943.

[17] SUN Y Y, HUANG X M, WANG Y H, *et al*. Lipidomic alteration and stress-defense mechanism of soil nematode caenorhabditis elegans in response to extremely low-frequency electromagnetic field exposure[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2019, 170: 611-619. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.11.137.

[18] JIA J P, JIA J M, ZHOU W D, *et al*. Differential acetylcholine and choline concentrations in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and vascular dementia [J]. Chin Med J (Engl), 2004, 117(8): 1161-1164.

[19] IKARASHI Y, HARIGAYA Y, TOMIDOKORO Y, *et al*. Decreased level of brain acetylcholine and memory disturbance in APP SW mice[J]. Neurobiol Aging, 2004, 25(4): 483-490. DOI: 10.1016/S0197-4580(03)00122-2.

[20] AFRASIABI A, RIAZI G H, ABBASI S, *et al*. Synaptosomal acetylcholinesterase activity variation pattern in the presence of electromagnetic fields[J]. Int J Biol Macromol, 2014, 65: 8-15. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.01.006.

[21] RAVERA S, BIANCO B, CUGNOLI C, *et al*. Sinusoidal ELF magnetic fields affect acetylcholinesterase activity in cerebellum synaptosomal membranes[J]. Bioelectromagnetics, 2010, 31(4): 270-276. DOI: 10.1002/bem.20563.

[22] ZHANG C, RODRIGUEZ C, SPAULDING J, *et al*. Age-dependent and tissue-related glutathione redox status in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. J Alzheimers Dis, 2012, 28(3): 655-666. DOI: 10.3233/jad-2011-111244.

[23] MANIKONDA P K, RAJENDRA P, DEVENDRANATH D, *et al*. Extremely low frequency magnetic fields induce oxidative stress in rat brain[J]. Gen Physiol Biophys, 2014, 33(1): 81-90. DOI: 10.4149/GPB_2013059.

[24] LIU Y Y, LIU Z Y, WEI M Y, *et al*. Pharmacodynamic and urinary metabolomics studies on the mechanism of schisandra polysaccharide in the treatment of Alzheimer's disease[J]. Food Funct, 2019, 10(1): 432-447. DOI: 10.1039/c8fo02067a.

[25] KORI M, AYDN B, UNAL S, *et al*. Metabolic biomarkers and neurodegeneration: a pathway enrichment analysis of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and Amyotrophic lateral sclerosis[J]. OMICS, 2016, 20(11): 645-661. DOI: 10.1089/omi.2016.0106.

[26] FONTEH A N, HARRINGTON R J, TSAI A, *et al*. Free amino acid and dipeptide changes in the body fluids from Alzheimer's disease subjects[J]. Amino Acids, 2007, 32(2): 213-224. DOI: 10.1007/S00726-006-0409-8.

[27] ZECCA L, FERRARIO P, MARGONATO V, *et al*. Neurotransmitter amino acid variations in striatum of rats exposed to 50 Hz electric fields[J]. Biochim Biophys Acta, 1991, 1075(1): 1-5. DOI: 10.1016/0304-4165(91)90066-P.

[28] CHUNG Y H, LEE Y J, LEE H S, *et al*. Extremely low frequency magnetic field modulates the level of neurotransmitters [J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2015, 19(1): 15-20. DOI: 10.4196/kjpp.2015.19.1.15.

[29] 侯文韬, 王亮, 徐达, 等. ABC 转运蛋白与人类疾病[J]. 中国科学技术大学学报, 2018, 48(10): 853-861. HOU W T, WANG L, XU D, *et al*. ABC transporters and human diseases[J]. J Univ Sci Technol China, 2018, 48(10): 853-861.

(**收稿**:2022-06-15;**修回**:2022-09-23)

(编辑 邓强庭)