DOI:10.16016/j.2097-0927.202210134

50 Hz 磁场暴露对 Neuro2a/APP(695)细胞基因转录的影响

陶嘉雯,马秦龙,龚明月,陈纯海,高 鹏,张 蕾,何旻蒂,卢永辉,皮会丰,余争平,张彦文 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** 研究 50 Hz 磁场暴露对 Neuro2a/APP(695)细胞基因转录的影响。**方法** Neuro2a/APP(695)细胞简单随机分为假性辐照组和磁场暴露组($n=3$)。暴露条件为 1.0 mT 50 Hz 正旋波磁场,4 h/d,连续 3 d;假性辐照组细胞除无磁场暴露外,余同磁场暴露组。暴露结束后按标准方法送样,进行转录组测序检测,包括样品 RNA 提取、数据质量评价和数据分析等。**结果** 50 Hz 磁场暴露后 Neuro2a/APP(695)细胞有 141 种定性的基因表达发生了明显的变化,其中有 129 种表达上调、12 种表达下调。GO 富集分析结果显示,Neuro2a/APP(695)细胞中 62 种上调差异表达基因涉及 432 类显著 GO 功能富集,其中涉及生物学过程 337 类、细胞组分 16 类、分子功能 79 类;3 种下调差异表达基因共涉及 275 类显著 GO 功能富集,其中涉及生物学过程 260 类、细胞组分 5 类、分子功能 10 类。KEGG 通路分析显示,这些差异基因可能参与了 20 条 KEGG 通路,其中 2 个下调差异表达基因通路,18 个上调差异表达基因通路。**结论** 50 Hz 磁场暴露可能对 Neuro2a/APP(695)细胞的黏附连接、Hippo 信号通路、糖胺聚糖生物合成-硫酸软骨素/硫酸皮肤素、蛋白消化和吸收和甘露糖型 O-聚糖生物合成等方面产生影响,以上通路可能是 50 Hz 磁场对 Neuro2a/APP(695)细胞产生影响的主要途径。

[**关键词**] 50 Hz 磁场;Neuro2a/APP9(695)细胞;mRNA 转录组学

[**中图法分类号**] R363.21; R394.3; R594.8 [**文献标志码**] A

Effects of 50 Hz magnetic field exposure on transcription in Neuro2a/APP(695) cells

TAO Jiawen, MA Qinlong, GONG Mingyue, CHEN Chunhai, GAO Peng, ZHANG Lei, HE Mindi, LU Yonghui, PI Huifeng, YU Zhengping, ZHANG Yanwen 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 investigate the impact of exposure to 50 Hz magnetic field on transcription in Neuro2a/APP(695) cells. **Methods** Neuro2a/APP(695) cells were divided into radiation group and sham radiation group ($n=3$). The cells in the former group were exposed to 50 Hz magnetic field (1 mT, 4 h/d) for 3 consecutive days, and those from the latter group were only placed in the same coil system under the same conditions but without 50 Hz magnetic field. After exposure, all samples were collected to undergo standard procedures for transcriptome sequencing, including RNA extraction, data quality evaluation, and data analysis. **Results** There were 141 identified significant differentially expressed genes (DEGs) in Neuro2a/APP(695) cells after exposure, of which 129 were up-regulated and 12 were down-regulated. Gene Ontology (GO) enrichment analysis showed that the 62 up-regulated DEGs were involved in 432 significantly functional properties, of which 337 belong to biological processes, 16 to cellular components and 79 to molecular functions. While, the 3 down-regulated DEGs were involved in 275 significantly functional properties, of which 260 belonged to biological processes, 5 to cellular components and 10 to molecular

[**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/)

functions. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis revealed that these DEGs may be involved in 20 differential KEGG pathways, including 2 down-regulated pathways and 18 up-regulated pathways. **Conclusion** Exposure to 50 Hz magnetic field may affect adhesion junction, Hippo signaling pathway, glycosaminoglycan biosynthesis-chondroitin sulfate/dermatan sulfate, protein digestion and absorption, mannose type O-glycan biosynthesis in Neuro2a/APP(695) cells, and these may be the main pathways that the exposure affects the cells.

[**Key words**] 50 Hz magnetic field; Neuro2a/APP(695) cells; mRNA transcriptomics

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

过去几十年来电子技术飞速发展,通信和数据传输、家用电器、个人无线设备、工业应用和医疗等电子设备广泛应用,人类正暴露于无处不在的电磁场中,电磁场对健康的影响已经成为最受关注的公共卫生问题之一。极低频电磁场(extremely low frequency magnetic fields,ELF-MF)指频率在 300 Hz 以下的交变电磁场,在任何使用交流电的地方,都会产生 ELF-MF,除美洲和亚洲部分地区使用 60 Hz 外,世界上大部分地区都使用 50 Hz 的交流电源[1]。WERTHEIMER 等[2]在 1979 年首次报道了 ELF-MF 与儿童白血病之间的联系,此后,更多人就 ELF-MF 对健康的影响进行了广泛的研究,较高的电磁场暴露水平与儿童癌症、认知功能障碍、糖尿病、精子质量差、生育力下降和其他健康后果息息相关[3-5]。电磁场暴露可影响大量细胞成分并中断大量生理过程,包括产生自由基、诱导细胞凋亡、DNA 损伤和细胞增殖[6-10]。特别值得关注的是不同参数的 ELF-MF 暴露可能会导致不同的神经生物学效应[11-12]。一般来说,低强度和短期的 ELF-MF 暴露对大脑结构和学习记忆能力没有显著影响,然而,长期暴露会导致降低睡眠质量、影响儿童神经行为功能和发育等健康问题[13-14]。职业暴露于 ELF-MF 中可出现头痛头昏、乏力疲劳、记忆力减退、睡眠障碍等精神症状,并且是促进痴呆和阿尔兹海默病(Alzheimer's disease,AD)发生的高危险因素[15]。近年来,有多项研究证明暴露于 ELF-MF 对神经分化和康复存在各种积极影响,如 BAI 等[16-18]的研究证明暴露于极低频电磁场诱导的 PC12 细胞(大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤分化细胞株)轴突长度增加和细胞数增加,促进骨髓间充质干细胞分化为功能神经元,以及 ELF-MF 可减轻 3NP(3-硝基丙酸)所致的脑损伤,防止大鼠纹状体神经元的丢失。

Neuro2a/APP(695)细胞为稳定转染人淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein,APP)695 质粒的 Neuro2a 小鼠神经母细胞,能产生大量的 β-淀粉样蛋白(β-amyloid,Aβ),是常用的 AD 体外模型细胞。这种细胞具有正常神经细胞的细胞突起、离子通道及酶等,可作为良好的神经细胞模型,模拟 AD 的病理生理变化[19]。本研究选用 Neuro2a/APP(695)细胞为实验对象,旨在研究 50 Hz 极低频电磁辐射暴露对 AD 样神经细胞基因转录的影响,为深入研究效应机制和寻找生物标志物提供线索和依据。

1 材料与方法

1.1 Neuro2a/APP(695)细胞培养方法与暴露实验

Neuro2a/APP(695)细胞由厦门大学神经科学研究所许华曦教授和张云武教授赠送,简单随机分为假性辐照组和磁场暴露组(n = 3)。将 Neuro2a/APP(695)细胞培养在含 10%胎牛血清和 G418 遗传霉素硫酸盐的混合培养基(减血清培养基和高糖培养基按 1∶1体积配置)中,置于细胞培养箱中培养,培养条件为 37 ℃、5%CO_2。当细胞生长至约 80%培养瓶底部时进行传代培养和正旋波磁场暴露(1.0 mT 50 Hz,4 h/d,连续 3 d)。辐照仪器为放置在细胞培养箱内 2 个完全相同的电离室,以确保稳定和一致的环境条件,其中一个放置假性辐照组细胞(不暴露 ELF-MF),另一个放置磁场暴露组细胞(ELF-MF 暴露),假性辐照组细胞除无 50 Hz 磁场暴露外与磁场暴露组所处环境一致。辐照过程由计算机控制,辐照参数包括 ELF 频率、强度和时间,本研究中使用的辐照系统(IT'IS Foundation 公司,瑞士)见图 1。

1.2 主要试剂和仪器

胎牛血清(美国 Gibco 公司),G418 遗传霉素硫酸盐(G-418 Sulfate,北京索莱宝科技有限公司),减血清培养基(美国赛默飞世尔科技公司),高糖培养基(DMEM/High glucose,美国思诺凡公司)。RNA 提取剂(TRIzol,广州美基生物科技有限公司),RNA 分析试剂盒(美国安捷伦科技有限公司),RNA 文库制备试剂盒(爱博泰克生物技术公司),核酸纯化试剂盒(美国贝克曼库尔特有限公司)。微量分光光度计(赛默飞世尔科技公司,美国),荧光定量仪 Qubit 4.0(赛默飞

世尔科技公司,美国),自动化电泳系统(安捷伦科技有限公司,美国),测序仪(Illumina 公司,美国),冷冻高速离心机(艾本德公司,德国),PCR 仪(耶拿分析仪器股份公司,德国),凝胶成像系统(天能科技,上海),核酸电泳仪(天能科技,上海),辐照系统(IT'IS Foundation 公司,瑞士)。

1.3 RNA 提取

细胞辐照结束后第 2 天,冰上吸净培养基,PBS 冲洗 2 次后立即使用 TRIzol 从细胞中提取总 RNA。采用微量分光光度计检测 RNA 样本的 A260/A280 吸光度比,RNA 分析试剂盒测定 RNA 的 RIN 值。

1.4 真核有参转录组(RNA-Seq 技术)建库和测序

提取总 RNA,监测 RNA 的质量后,根据试剂盒说明书,使用 RNA 文库制备试剂盒构建文库,使用测序仪进行测序。使用 DESeq2 进行差异表达分析,设置 P 值<0.05 和 $\log_2$(FoldChange)>1 或 $\log_2$(FoldChange)<−1 作为显著差异表达基因的阈值。RNA 检测和分析服务由上海中科新生命生物科技有限公司提供。

1.5 数据分析

从 Illumina/BGI 平台生成的数据用于生物信息学分析。所有分析由上海中科新生命生物科技有限公司完成,主要步骤包括:质控、比对参考基因组、预测新基因、表达量分析、表达差异分析、GO(gene ontology)富集分析和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)通路分析。其中,检测到的基因通过 Fisher 精确检验(Fisher's Exact Test),根据 P 值(P<0.05)和 $\log_2$(FoldChange)数值(大于 1 或小于−1),进行差异的显著性分析。

2 结果

2.1 样本数据质量汇总统计

Neuro2a/APP(695)细胞在辐照仪器中暴露 4 h/d,连续 3 d 后,对假性辐照组和磁场暴露组进行转录组学测序分析,各样本的原始数据,过滤后数据条数、错误率等信息表明数据质量合格,如表 1 所示。

2.2 50 Hz 磁场暴露对 Neuro2a/APP(695)细胞基因转录的影响

Neuro2a/APP(695)细胞在辐照仪器中暴露 4 h/d,连续 3 d 后,进行转录组学测序分析。结果表明,假性辐照组和磁场暴露组依据 $\log_2$(FoldChange)>1 或 $\log_2$(FoldChange)<−1,且 P<0.05 作为差异显著性标准,有 169 种基因表达发生了明显的变化,其中 28 种为未定性的新基因;在 141 种定性的差异表达基因中有 129 种表达上调、12 种表达下调(图 2),其中有具体描述且 GO 差异显著的基因共 65 种(表 2)。



A:暴露的辐照盒;B:暴露仪器;C:使用的程序软件

图 1 50 Hz 磁场细胞暴露装置

表 1 50 Hz 磁场暴露后 Neuro2a/APP(695)细胞样本质量汇总统计

样品名	原始数据	过滤后数据	过滤后数据乘序列长度/G	错误率/%	碱基质量分数大于 20 占比/%	碱基质量分数大于 30 占比/%	碱基 G 和 C 总和占比/%
假性辐照组-1	46 198 986	45 790 940	6.83	0.03	97.19	92.26	49.29
假性辐照组-2	65 276 424	64 727 886	9.67	0.02	98.43	94.99	49.55
假性辐照组-3	40 641 988	40 208 100	5.99	0.02	98.04	94.14	50.73
磁场暴露组-1	60 736 904	60 101 464	8.95	0.03	98.01	94.13	51.61
磁场暴露组-2	37 668 850	37 236 802	5.55	0.02	98.03	94.17	49.40
磁场暴露组-3	48 513 842	48 125 688	7.16	0.02	98.27	94.73	49.32

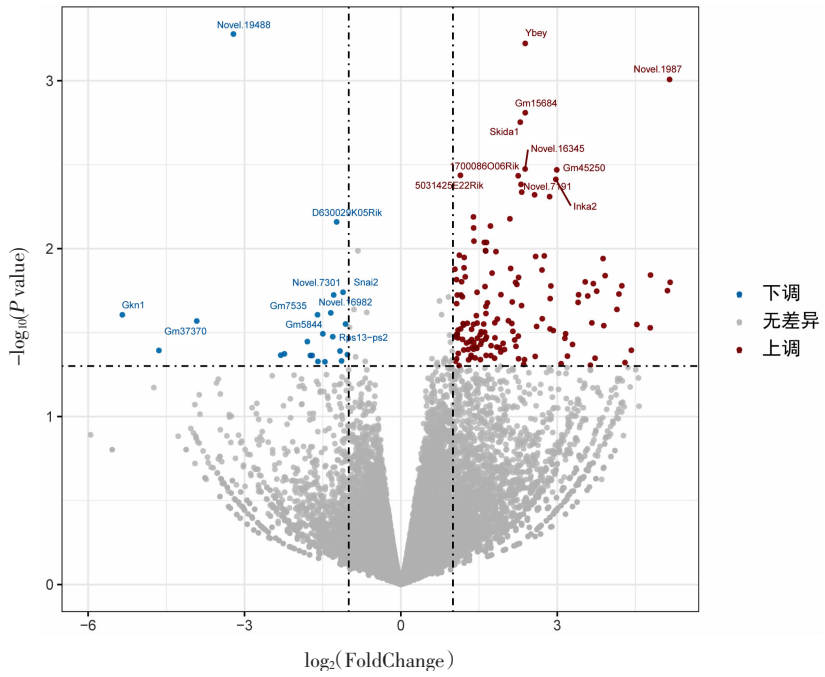


图 2　50 Hz 磁场暴露后 Neuro2a/APP(695)细胞差异基因火山图

表 2　代表性组间差异表达基因(65 种)

变化	基因编号	代号	描述	$\log_2$(FoldChange)	*P*
上调	ENSMUSG00000043807	Ly6g5b	lymphocyte antigen 6 complex, locus G5B [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2385809]	4.528	0.028
	ENSMUSG00000030270	Cpne9	copine family member IX [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2443052]	4.300	0.048
	ENSMUSG00000039194	Rlbp1	retinaldehyde binding protein 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:97930]	4.240	0.017
	ENSMUSG00000026928	Card9	caspase recruitment domain family, member 9 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2685628]	3.894	0.029
	ENSMUSG00000025255	Zfhx4	zinc finger homeodomain 4 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2137668]	3.665	0.028
	ENSMUSG00000020264	Slc36a2	solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1891430]	3.636	0.049
	ENSMUSG00000047501	Cldn4	claudin 4 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1313314]	3.147	0.034
	ENSMUSG00000048458	Inka2	inka box actin regulator 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1923497]	2.973	0.004
	ENSMUSG00000042320	Prox2	prospero homeobox 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1920672]	2.862	0.031
	ENSMUSG00000039883	Lrrc17	leucine rich repeat containing 17 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1921761]	2.713	0.026
	ENSMUSG00000050796	B3galt6	UDP-Gal:betaGal beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 6 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2152819]	2.586	0.011
	ENSMUSG00000020176	Grb10	growth factor receptor bound protein 10 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:103232]	2.566	0.005
	ENSMUSG00000020930	Ccdc103	coiled-coil domain containing 103 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1920543]	2.372	0.046

续表 2

变化	基因编号	代号	描述	$\log_2$(FoldChange)	*P*
	ENSMUSG00000056643	Chst13	carbohydrate sulfotransferase 13 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1919047]	2.357	0.049
	ENSMUSG00000038754	Elovl3	elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, yeast)-like 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1195976]	2.258	0.045
	ENSMUSG00000037085	Trmt12	tRNA methyltransferase 12 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1915510]	2.226	0.016
	ENSMUSG00000071724	Smpd5	sphingomyelin phosphodiesterase 5 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:3709877]	2.107	0.013
	ENSMUSG00000020150	Gamt	guanidinoacetate methyltransferase [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1098221]	2.092	0.007
	ENSMUSG00000001657	Hoxc8	homeobox C8 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:96198]	1.962	0.037
	ENSMUSG00000054932	Afp	alpha fetoprotein [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:87951]	1.920	0.019
	ENSMUSG00000004473	Clec11a	C-type lectin domain family 11, member a [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1298219]	1.852	0.027
	ENSMUSG00000021594	Srd5a1	steroid 5 alpha-reductase 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:98400]	1.825	0.010
	ENSMUSG00000071256	Zfp213	zinc finger protein 213 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:3053094]	1.803	0.028
	ENSMUSG00000015942	Gtf2ird2	GTF2I repeat domain containing 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2149780]	1.798	0.045
	ENSMUSG00000001558	Klhl10	kelch-like 10 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2181067]	1.727	0.043
	ENSMUSG00000068154	Insm1	insulinoma-associated 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1859980]	1.719	0.007
	ENSMUSG00000036469	Marchf1	membrane associated ring-CH-type finger 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1920175]	1.635	0.043
	ENSMUSG00000004500	Zfp324	zinc finger protein 324 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2444641]	1.632	0.022
	ENSMUSG00000052957	Gas1	growth arrest specific 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:95655]	1.628	0.010
	ENSMUSG00000047146	Tet1	tet methylcytosine dioxygenase 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1098693]	1.625	0.035
	ENSMUSG00000024868	Dkk1	dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1329040]	1.624	0.010
	ENSMUSG00000117406	Ntn3	netrin 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1341188]	1.615	0.017
	ENSMUSG00000033174	Mgll	monoglyceride lipase [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1346042]	1.608	0.031
	ENSMUSG00000056481	Cd248	CD248 antigen, endosialin [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1917695]	1.541	0.031
	ENSMUSG00000062694	Cav3	caveolin 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:107570]	1.532	0.037
	ENSMUSG00000025927	Tfap2b	transcription factor AP-2 beta [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:104672]	1.468	0.034
	ENSMUSG00000039070	Cpa4	carboxypeptidase A4 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1919041]	1.462	0.019
	ENSMUSG00000032492	Pth1r	parathyroid hormone 1 receptor [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:97801]	1.448	0.025
	ENSMUSG00000032806	Slc10a3	solute carrier family 10(sodium/bile acid cotransporter family), member 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:95048]	1.443	0.039
	ENSMUSG00000036599	Chst12	carbohydrate sulfotransferase 12 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1929064]	1.394	0.028

续表 2

变化	基因编号	代号	描述	$\log_2$(FoldChange)	*P*
	ENSMUSG00000003949	Hlf	hepatic leukemia factor [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:96108]	1.358	0.035
	ENSMUSG00000067158	Col4a4	collagen, type IV, alpha 4 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:104687]	1.357	0.030
	ENSMUSG00000048920	Fkrp	fukutin related protein [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2447586]	1.319	0.036
	ENSMUSG00000039765	Cc2d2a	coiled-coil and C2 domain containing 2A [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1924487]	1.299	0.046
	ENSMUSG00000049287	Iba57	IBA57 homolog, iron-sulfur cluster assembly [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:3041174]	1.260	0.036
	ENSMUSG00000034771	Tle2	transducin-like enhancer of split 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:104635]	1.235	0.015
	ENSMUSG00000006494	Pdk1	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1926119]	1.216	0.011
	ENSMUSG00000021456	Fbp2	fructose bisphosphatase 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:95491]	1.213	0.013
	ENSMUSG00000029778	Adcyap1r1	adenylate cyclase activating polypeptide 1 receptor 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:108449]	1.206	0.028
	ENSMUSG00000030772	Dkk3	dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 3 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1354952]	1.181	0.019
	ENSMUSG00000023328	Ache	acetylcholinesterase [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:87876]	1.148	0.030
	ENSMUSG00000047143	Dmrta2	doublesex and mab-3 related transcription factor like family A2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2653629]	1.101	0.042
	ENSMUSG00000025036	Sfxn2	sideroflexin 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2137678]	1.096	0.031
	ENSMUSG00000004748	Mtfp1	mitochondrial fission process 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1916686]	1.096	0.034
	ENSMUSG00000036430	Tbcc	tubulin-specific chaperone C [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1919976]	1.083	0.019
	ENSMUSG00000041559	Fmod	fibromodulin [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1328364]	1.071	0.021
	ENSMUSG00000038807	Rap1gap2	RAP1 GTPase activating protein 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:3028623]	1.071	0.045
	ENSMUSG00000055493	Epm2a	epilepsy, progressive myoclonic epilepsy, type 2 gene alpha [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1341085]	1.070	0.032
	ENSMUSG00000042116	Vwa1	von Willebrand factor A domain containing 1 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:2179729]	1.068	0.015
	ENSMUSG00000027875	Hmgcs2	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:101939]	1.054	0.034
	ENSMUSG00000024206	Rfx2	regulatory factor X, 2 (influences HLA class II expression) [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:106583]	1.050	0.047
	ENSMUSG00000031825	Crispld2	cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1926142]	1.037	0.013
下调	ENSMUSG00000031722	Hp	haptoglobin [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:96211]	−1.737	0.043
	ENSMUSG00000078672	Mup20	major urinary protein 20 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:3651981]	−1.703	0.043
	ENSMUSG00000022676	Snai2	snail family zinc finger 2 [Source:MGI Symbol;Acc:MGI:1096393]	−1.109	0.018

2.3 50 Hz 磁场暴露后 Neuro2a/APP(695)细胞差异表达基因的 GO 功能富集分析

GO 分析是基于基因本体联合会(Gene Ontology Consortium)所建立的数据库,对基因和蛋白功能进行限定和描述,以全面阐述基因及蛋白质在细胞内所扮演的角色及属性。GO 功能注释的显著性富集分析是将所有差异表达基因与参考物种的基因组 GO 功能的注释结果进行对照比较,通过 Fisher 精确检验,得出两者差异的显著性,从而找到所有差异表达基因富集的功能类别($P<0.05$)。GO 数据库分为 3 大类,分别是生物学过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF),各自描述了基因产物可能行使的分子功能,所处的细胞环境以及参与的生物学过程。将假性辐照组和磁场暴露组细胞的差异表达的基因进行 GO 富集分析,分析结果显示,Neuro2a/APP(695)细胞中 62 种上调差异表达基因涉及 432 类显著 GO 功能富集,其中涉及生物学过程 337 类、细胞组分 16 类、分子功能 79 类;3 种下调差异表达基因共涉及 275 类显著 GO 功能富集,其中涉及生物学过程 260 类、细胞组成 5 类、分子功能 10 类。下调差异表达基因数目偏少,未做 GO 功能富集分析。表 3 为上调差异表达基因涉及的 GO 功能富集中各分类前 10 的 GO 子集条目,按照 P 值进行排序。该结果表明,CC 分类中主要是富集于基质和内质网相关基因,提示 50 Hz 磁场暴露可能会影响神经细胞内质网;MF 类别中,显著变化的是软骨素 4-磺基转移酶活性和软骨素磺基转移酶活性;而 BP 分类中,变化最为显著的是碳水化合物生物合成过程和硫酸软骨素生物合成过程,表明暴露于 50 Hz 磁场暴露后神经细胞的代谢很可能受损。

表 3 50 Hz 磁场暴露后 Neuro2a/APP(695)细胞上调差异表达基因(前 10)涉及的显著 GO 功能富集

类型	GO 编号	名称	基因数	P
生物学过程	0016051	carbohydrate biosynthetic process	7	0.000 021
	0030206	chondroitin sulfate biosynthetic process	3	0.000 034
	0006790	sulfur compound metabolic process	8	0.000 043
	0044272	sulfur compound biosynthetic process	5	0.000 068
	0050650	chondroitin sulfate proteoglycan biosynthetic process	3	0.000 091
	0030204	chondroitin sulfate metabolic process	3	0.000 170
	0050654	chondroitin sulfate proteoglycan metabolic process	3	0.000 312
	0008207	C21-steroid hormone metabolic process	3	0.000 639
	0005975	carbohydrate metabolic process	9	0.000 667
	0006024	glycosaminoglycan biosynthetic process	3	0.000 890
细胞组分	0005791	rough endoplasmic reticulum	4	0.000 849
	0005604	basement membrane	4	0.001 044
	0031012	extracellular matrix	7	0.003 518
	0062023	collagen-containing extracellular matrix	5	0.015 283
	0005967	mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex	1	0.023 829
	0098556	cytoplasmic side of rough endoplasmic reticulum membrane	1	0.023 829
	0005587	collagen type IV trimer	1	0.027 746
	0098642	network-forming collagen trimer	1	0.027 746
	0098645	collagen network	1	0.027 746
	0098651	basement membrane collagen trimer	1	0.027 746
分子功能	0047756	chondroitin 4-sulfotransferase activity	2	0.000 048
	0034481	chondroitin sulfotransferase activity	2	0.000 158
	0019203	carbohydrate phosphatase activity	2	0.001 023
	0039706	co-receptor binding	2	0.001 023
	0048019	receptor antagonist activity	2	0.001 840
	0030731	guanidinoacetate N-methyltransferase activity	1	0.004 011
	0047220	galactosylxylosylprotein 3-beta-galactosyltransferase activity	1	0.004 011
	0102522	tRNA 4-demethylwyosine alpha-amino-alpha-carboxypropyltransferase activity	1	0.004 011
	0042802	identical protein binding	17	0.004 570
	0000981	DNA-binding transcription factor activity, RNA polymerase II-specific	12	0.005 144

2.4 50 Hz 磁场暴露后对 Neuro2a/APP(695)细胞差异表达基因的 KEGG 通路分析

京都基因和 KEGG 是常用于通路研究的数据库之一,基于 KEGG 通路的分析有助于更进一步了解差异表达基因在生物体内相互协调行使其生物学功能的情况。KEGG 通路富集分析是以 KEGG 通路为单位,以参考基因组为背景,通过 Fisher 精确检验来分析计算各个通路差异表达基因富集度的显著性水平,从而确定受到显著影响的基因表达和信号转导途径。图 3 为假性辐照组和磁场暴露组细胞的差异基因富集最显著的 20 条通路条目,其中 2 个下调差异表达基因通路为黏附连接和 Hippo 信号通路,其余 18 个为上调的差异表达基因通路,包括糖胺聚糖生物合成-硫酸软骨素/皮肤素、蛋白质消化和吸收和甘露糖型 O-聚糖生物合成等。

3 讨论

3.1 AD 的病理学特征与现状

痴呆及其他相关认知障碍的防控已成为全球公共卫生面临的巨大挑战,我国作为世界上老年人口最多的国家,随着人口老龄化程度不断加深,认知障碍老年人数量也在迅速增长,目前 60 岁及以上老年痴呆患者约有 1 507 万,预计到 2030 年,中国老年痴呆人数将达到 2 220 万,到 2050 年将达到 2 898 万[20]。AD 是一种神经系统疾病,呈进行性发展,会导致记忆、执行功能和语言受损,占全世界痴呆症病例的 60%~80%,全世界有超过 4 600 万人患有这种疾病。AD 的特征性病理学改变为大脑皮质神经细胞内神经原纤维缠结、细胞外大量老年斑形成和大脑皮质细胞减少。β-淀粉样蛋白沉积被认为是 AD 的发病机制之一,而沉积的原因是淀粉样前体蛋白的代谢异常导致的。世界卫生组织资料显示,在经济负担方面,2019 年,全球用于痴呆症的费用估计为 1.3 万亿美元,预计到 2030 年,这一费用将增至 1.7 万亿美元[21],可见对 AD 发生发展的机制研究意义重大。有研究显示 ELF-MF 暴露不仅可影响学习记忆等神经行为,还可能是促进 AD 发生的高危因素,但一直缺乏足够的实验室研究数据支持。

3.2 ELF-MF 暴露对基因表达的影响

ELF-MF 有着广泛的生物学作用,并有可能通过影响基因表达进而影响细胞分化而产生各种疾病,大量证据表明 ELF-MF 暴露在细胞、动物和人类中会造成遗传损害[22-27]。此前也有不少关于辐射影响基因转录的研究,有研究利用 ES(多能胚胎干细胞)分化模型,检测 ES 源性神经前体细胞在暴露于 ELF 时显著上调了 bcl-2 和 bax 的 mRNA 水平[28]。朱茂林等[29]通过高通量测序技术分析 ELF-MF 辐射干扰小鼠成纤维细胞后转录组的变化情况,辐照组与对照组相比,

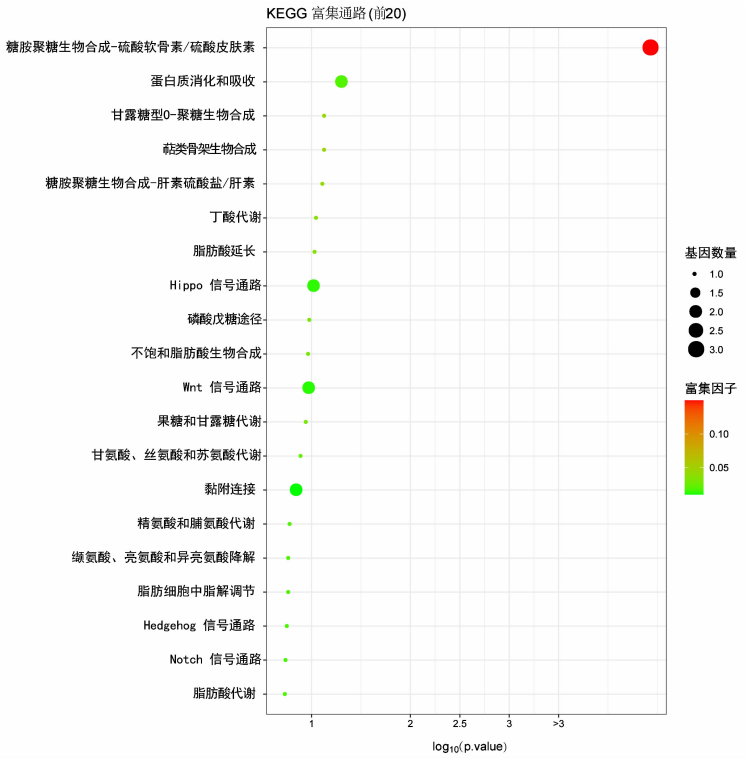


图 3 50 Hz 磁场暴露后对 Neuro2a/APP(695)细胞差异表达基因的 KEGG 分析结果

MAPK12、AGTR2 和 VEGF 等基因表达存在差异。本研究对 50 Hz 磁场暴露后的 Neuro2a/APP(695)细胞进行 mRNA 测序分析,共检测到 141 种定性的差异表达基因,其中 129 种表达上调、12 种表达下调。老年性黄斑退化症在氧化应激等方面与 AD 相似,因此老年性黄斑退化症可被看做是眼睛的 AD。Rlbp1(retinaldehyde binding protein 1)被认为与老年性黄斑退化症相关,研究发现常用于 AD 造模的 4-羟基-2-壬烯醛(4-Hydroxy-2-nonenal,HNE)可引起与维持视网膜稳态相关的 Rlbp1 基因表达下调[30]。本研究发现,50 Hz 磁场暴露后 Neuro2a/APP(695)细胞内 Rlbp1 mRNA 表达明显增加[$\log_2$(FoldChange)=4.240,且P<0.05],提示 50 Hz 磁场暴露可能会有益于神经细胞应对氧化应激状况。Grb10(growth factor receptor bound protein 10)被认为可以抑制胰岛素信号转导,而脑胰岛素信号转导缺陷会导致 AD 患者的认知功能障碍。有研究发现跑台训练有效减少了异常 Grb10 的表达,从而减轻了空间学习记忆障碍[31]。本研究发现,50 Hz 磁场暴露后(1.0 mT,4 h/d,3 d) Neuro2a/APP(695)细胞内 Grb10 mRNA 表达明显增加[$\log_2$(FoldChange)=2.566,且 P<0.05],提示 50 Hz 磁场暴露可能会抑制细胞的胰岛素信号转导途径。Gas1(growth arrest specific 1)是一个参与中枢神经系统发育的基因,研究证明 Gas1 表达可抑制 APP 的全部糖基化,强烈抑制 APP 的转运,减少 Aβ 的产生,是一种新发现的控制 APP 成熟和加工过程的 APP 结合蛋白[32]。本研究发现,50 Hz 磁场暴露后 Neuro2a/APP(695)细胞内 Gas1 mRNA 表达明显增加[$\log_2$(FoldChange)=1.628,且P<0.05],提示 50 Hz 磁场暴露可能会抑制 Aβ 的产生。Tet1(tet methylcytosine dioxygenase 1)与 DNA 甲基化/去甲基化相关,AD 与 DNA 甲基化和组蛋白乙酰化模式的改变有关。研究发现,临床前 AD 和晚期 AD 患者海马和海马旁脑回(hippocampus/parahippocampal gyrus,HPG)中 Tet1 水平显著升高[33]。本研究发现,50 Hz 磁场暴露后 Neuro2a/APP(695)细胞内 Tet1 mRNA 表达明显增加[$\log_2$(FoldChange)=1.625,且P<0.05],提示 50 Hz 磁场暴露可能会干扰 Neuro2a/APP(695)的 DNA 甲基化过程。Mgll(monoglyceride lipase)是一种水解酶,能分解内源性大麻素 2-花生四烯基甘油(2-AG)生成花生四烯酸(ARA),是 AD 等神经退行性疾病的潜在靶点。既往研究发现 Mgll 在 3xTg-AD 小鼠体内的积累减少了新生神经元的发生,并扰乱了空间记忆,或许可作为 AD 患者早期的生物标志物[34]。本研究发现,50 Hz 磁场暴露后 Neuro2a/APP(695)细胞内 Mgll mRNA 表达明显增加[$\log_2$(FoldChange)=1.608,且P<0.05],提示 50 Hz 磁场暴露可能会抑制细胞 APP 的代谢、Aβ 的生成和神经发生功能。乙酰胆碱酯酶(ACHE)是神经递质乙酰胆碱水解酶的关键酶,也是大多数临床上用于治疗阿尔茨海默病的药物靶点。AD 病人脑脊液和 APPsw 转基因小鼠脑组织中乙酰胆碱浓度均明显降低[35-36]。已有的文献表明,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[37]。本研究发现,50 Hz 磁场暴露后 Neuro2a/APP(695)细胞内 Ache mRNA 表达明显增加[$\log_2$(FoldChange)=1.148,且 P<0.05],提示 50 Hz 磁场暴露可能会加重 Neuro2a/APP(695)细胞胆碱能神经功能的紊乱。Rap1gap2(RAP1 GTPase activating protein 2)编码 GTP 酶激活蛋白,可激活鸟嘌呤-核苷酸结合蛋白 Rap1。有研究发现 48 h 1 800 MHz 射频电磁辐射可增加 Rap1GAP 的蛋白表达,对神经轴突生长产生不利影响[38]。本研究发现,50 Hz 磁场暴露后 Neuro2a/APP(695)细胞内 Rap1gap2 mRNA 表达增加[$\log_2$(FoldChange)=1.071,且 P<0.05],提示 50 Hz 磁场暴露可能会抑制 Neuro2a/APP(695)细胞的轴突生长。Hmgcs2(3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2)是一种线粒体酶,有研究发现过表达 Hmgcs2 的 HT22(小鼠海马神经)细胞 APP 水平显著降低,表明 Hmgcs2 在治疗 AD 方面具有潜在的价值[39]。本研究发现,50 Hz 磁场暴露后 Neuro2a/APP(695)细胞内 Hmgcs2 mRNA 表达增加[$\log_2$(FoldChange)=1.054,且 P<0.05],提示 50 Hz 磁场暴露可能会抑制 Neuro2a/APP(695)细胞的 APP 代谢。

3.3 ELF-MF 暴露与 AD 的关系

本研究 KEGG 结果显示差异基因涉及的通路包括糖胺聚糖生物合成-硫酸软骨素/皮肤素、磷酸戊糖途径、果糖和甘露糖代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、肝素、不饱和脂肪酸的生物合成、Wnt 信号通路和 Notch 信号通路,值得注意的是 Notch 信号通路也是下调差异表达基因涉及的显著 GO 功能富集通路之一。有研究显示,硫酸分子如硫酸皮肤素、软骨素-4-硫酸盐、葡聚糖硫酸盐和聚戊聚糖硫酸盐都显著促进了 β 淀粉样蛋白原纤维的形成(3 d 后增加了 2 倍以上),表明 50 Hz 磁场暴露会加重 β 淀粉样蛋白变性[40]。磷酸戊糖途径、果糖和甘露糖代谢是体内糖代谢的主要途径,芬兰一项研究通过对代谢途径的数据分析发现磷酸戊糖途径的上调与 AD 的病变有关[41]。另有 JOHNSON

等[42]研究证明,大脑的果糖代谢过度激活会导致 AD。Wnt 信号通路是一种相对保守的信号机制,在细胞增殖、组织稳态和中枢神经系发育过程中发挥重要作用,并且参与调控着多种疾病的病理机制。Wnt 信号通路功能障碍与 AD 有关,Wnt 信号通路的激活抑制了 AD 的发展。Dickkopf 相关蛋白 1(Dickkopf-1,Dkk1)是一种分泌型糖蛋白,是 Wnt/β-catenin 信号通路的内源性抑制因子,Dkk1 的异常表达会改变经典的 Wnt/β-catenin 信号通路中相关蛋白和基因的表达,大脑中高水平的 Dkk1 会增加患 AD 的风险[43]。Dickkopf 相关蛋白(Dickkopf-3,3Dkk3)是 Wnt 信号通路的调节器,在 AD 小鼠中,Dkk3 的转基因表达改善了学习、记忆和运动活动的异常,减少了淀粉样蛋白的沉积,并改善了葡萄糖摄取缺陷[44]。本研究发现,50 Hz 磁场暴露后 Neuro2a/APP(695)细胞内 Dkk1 和 Dkk3 mRNA 表达明显增加[Dkk1:$\log_2$(FoldChange)=1.624,Dkk3:$\log_2$(FoldChange)=1.181,且 $P<0.05$],提示 50 Hz 磁场暴露可能影响 Wnt 信号通路。Notch 信号通路是介导细胞和细胞之间直接接触的主要信号通路之一,调控了多细胞机体的细胞凋亡、增殖和分化,与阿尔茨海默病有关的 PS1 和 APP 也在 Notch 信号传导途径中起重要作用[45-46]。功能网络分析结果表明差异显著的上调基因 Zfhx4[$\log_2$(FoldChange)=3.665,且 $P<0.05$],可能也参与了 Notch 信号通路[47]。另一项研究认为过度激活 Notch 信号可降低 Snai2 的表达,而表达 Snai2 的肌上皮细胞(myoepithelial cell,ME)的行为可能受 Notch 信号调控[48]。除了 Notch 信号通路,Snai2 与 Wnt 信号通路也有关联,有研究认为 Snai2 是由 Wnt 信号诱导表达的,阻断 Wnt 信号会导致 Snai2 表达减少,本研究发现,50 Hz 磁场暴露后 Neuro2a/APP(695)细胞内 Snai2 mRNA 表达下降[$\log_2$(FoldChange)=-1.109,且 $P<0.05$],表明 50 Hz 磁场暴露可能影响 Notch 和 Wnt 信号[49]。AD 多发于老年人,国外一项针对老年人的研究发现,与健康患者的脑相比,AD 患者脑中的不饱和脂肪酸显著降低[50],高梅梅等[51]对人的血清代谢物分析发现,精氨酸和脯氨酸代谢通路可能与阿尔茨海默病相关。肝素对 APP 代谢相关酶和阿尔茨海默病引起的神经炎症存在着重要影响,有研究利用 β-淀粉样蛋白损伤的神经元样细胞作为细胞模型,证明了肝素可通过调节 APP 代谢和 β-淀粉样蛋白引起的补体系统激活抑制 β-淀粉样蛋白引起的对神经元样细胞的损伤[52]。既往研究未发现这些通路与极低频电磁场之间的关系,除了以上通路,本研究还发现的上调通路如脂肪酸延长,下调的通路 Hippo 信号通路、黏附连接等通路可能在极低频电磁辐射对 Neuro2a/APP(695)细胞影响中也发挥作用。

本研究通过对极低频电磁辐射后的 Neuro2a/APP(695)细胞进行转录组学研究,全面分析了极低频电磁辐射可能造成的生物学功能影响,为进一步的机制研究提供了线索和依据。但本实验后续没有对有关通路的相关基因进行 qPCR 验证,这是我们的不足。希望本研究发现的新通路能为后续相关的研究做出铺垫,为人类尽早阐明阿尔茨海默病的发病机制提供帮助,为阿尔茨海默病的治疗打下基础。

参考文献:

[1] 王伟, 王博, 李鑫, 等. 基于 GB、IEC、ANSI 标准比对及 50Hz/60Hz 变压器温升试验方法研究[J]. 电工技术, 2022(1): 96-98. DOI: 10.19768/j.cnki.dgjs.2022.01.028. WANG W, WANG B, LI X, *et al*. Research on temperature rise test method of 50 Hz/60 Hz transformer based on GB, IEC and ANSIstandard[J]. Electr Eng, 2022(1): 96-98. DOI: 10.19768/j.cnki.dgjs.2022.01.028.

[2] WERTHEIMER N, LEEPER E. Electrical wiring configurations and childhood cancer[J]. Am J Epidemiol, 1979, 109(3): 273-284. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a112681.

[3] BEHARI J, RAJAMANI P. Electromagnetic field exposure Effects(ELF-EMF and RFR) on fertility and reproduction [OL]. [2012-11]. https://bioinitiative.org/wp-content/uploads/pdfs/sec18_2012_Exposure_Effects_Fertility_Reproduction.pdf.

[4] LI D K, ODOULI R, WI S, *et al*. A population-based prospective cohort study of personal exposure to magnetic fields during pregnancy and the risk of miscarriage[J]. Epidemiology, 2002, 13(1): 9-20. DOI: 10.1097/00001648-200201000-00004.

[5] LI D K, YAN B, LI Z, *et al*. Exposure to magnetic fields and the risk of poor sperm quality[J]. Reprod Toxicol, 2010, 29(1): 86-92. DOI: 10.1016/j.reprotox.2009.09.004.

[6] CHEN Y F, HONG L, ZENG Y, *et al*. Power frequency magnetic fields induced reactive oxygen species-related autophagy in mouse embryonic fibroblasts[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2014, 57: 108-114. DOI: 10.1016/j.biocel.2014.10.013.

[7] KIM J, HA C S, LEE H J, *et al*. Repetitive exposure to a 60-Hz time-varying magnetic field induces DNA double-strand breaks and apoptosis in human cells[J]. Biochem Biophys

Res Commun, 2010, 400(4): 739-744. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.08.140.

[8] KIM J, YOON Y, YUN S, *et al*. Time-varying magnetic fields of 60 Hz at 7 mT induce DNA double-strand breaks and activate DNA damage checkpoints without apoptosis[J]. Bioelectromagnetics, 2012, 33(5): 383-393. DOI: 10.1002/bem.21697.

[9] VIANALE G, REALE M, AMERIO P, *et al*. Extremely low frequency electromagnetic field enhances human keratinocyte cell growth and decreases proinflammatory chemokine production[J]. Br J Dermatol, 2008, 158(6): 1189-1196. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2008.08540.x.

[10] WOLF F I, TORSELLO A, TEDESCO B, *et al*. 50-Hz extremely low frequency electromagnetic fields enhance cell proliferation and DNA damage: possible involvement of a redox mechanism[J]. Biochim Biophys Acta BBA Mol Cell Res, 2005, 1743(1/2): 120-129. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2004.09.005.

[11] JADIDI M, FIROOZABADI S M, RASHIDY-POUR A, *et al*. Acute exposure to a 50 Hz magnetic field impairs consolidation of spatial memory in rats[J]. Neurobiol Learn Mem, 2007, 88(4): 387-392. DOI: 10.1016/j.nlm.2007.07.010.

[12] LAI J S, ZHANG Y M, LIU X F, *et al*. Effects of extremely low frequency electromagnetic fields (100 μT) on behaviors in rats[J]. NeuroToxicology, 2016, 52: 104-113. DOI: 10.1016/j.neuro.2015.11.010.

[13] BARSAM T, MONAZZAM M R, HAGHDOOST A A, *et al*. Effect of extremely low frequency electromagnetic field exposure on sleep quality in high voltage substations[J]. J Environ Health Sci Engineer, 2012, 9(1): 15. DOI: 10.1186/1735-2746-9-15.

[14] HUANG J L, TANG T T, HU G C, *et al*. Association between exposure to electromagnetic fields from high voltage transmission lines and neurobehavioral function in children[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e67284. DOI: 10.1371/journal.pone.0067284.

[15] 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.

[16] BAI W F, XU W C, FENG Y, *et al*. Fifty-Hertz electromagnetic fields facilitate the induction of rat bone mesenchymal stromal cells to differentiate into functional neurons[J]. Cytotherapy, 2013, 15(8): 961-970. DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.03.001.

[17] JUNG I S, KIM H J, NOH R, *et al*. Effects of extremely low frequency magnetic fields on NGF induced neuronal differentiation of PC12 cells[J]. Bioelectromagnetics, 2014, 35(7): 459-469. DOI: 10.1002/bem.21861.

[18] TASSET I, MEDINA F J, JIMENA I, *et al*. Neuroprotective effects of extremely low-frequency electromagnetic fields on a Huntington's disease rat model: effects on neurotrophic factors and neuronal density[J]. Neuroscience, 2012, 209: 54-63. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.02.034.

[19] 聂淑雅, 贾建平. 阿尔茨海默病研究的常用细胞模型[J]. 中华医学杂志, 2022, 102(5): 385-388. DOI: 10.3760/cma.j.cn112137-20210702-01494.
NIE S Y, JIA J P. Common cell models for Alzheimer's disease research[J]. Natl Med J China, 2022, 102(5): 385-388. DOI: 10.3760/cma.j.cn112137-20210702-01494.

[20] 吴玉韶. 认知症老年人照护服务需求亟待满足[J]. 中国国情国力, 2021(10): 1. DOI: 10.13561/j.cnki.zggqgl.2021.10.001.
WU Y S. The demand for care services for the elderly with cognitive impairment needs to be met urgently[J]. China Natl Cond Strength, 2021(10): 1. DOI: 10.13561/j.cnki.zggqgl.2021.10.001.

[21] ALISON BRUNIER, ANDREI MUCHNIK. World failing to address dementia challenge[OL]. [2021-9]. https://www.who.int/news/item/02-09-2021-world-failing-to-address-dementia-challenge.

[22] DOMINICI L, VILLARINI M, FATIGONI C, *et al*. Genotoxic hazard evaluation in welders occupationally exposed to extremely low-frequency magnetic fields (ELF-MF)[J]. Int J Hyg Environ Health, 2011, 215(1): 68-75. DOI: 10.1016/j.ijheh.2011.07.010.

[23] HAVAS M. When theory and observation collide: can non-ionizing radiation cause cancer?[J]. Environ Pollut, 2017, 221: 501-505. DOI: 10.1016/j.envpol.2016.10.018.

[24] MCCANN J, DIETRICH F, RAFFERTY C. The genotoxic potential of electric and magnetic fields: an update[J]. Mutat Res Mutat Res, 1998, 411(1): 45-86. DOI: 10.1016/S1383-5742(98)00006-4.

[25] VERSCHAEVE L, WAMBACQ S, ANTHONISSEN R, *et al*. Co-exposure of ELF-magnetic fields and chemical mutagens: an investigation of genotoxicity with the SOS-based VITOTOX test in *Salmonella typhimurium*[J]. Mutat Res Toxicol Environ Mutagen, 2016, 795: 31-35. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2015.11.003.

[26] VIJAYALAXMI, PRIHODA T J. Genetic damage in mammalian somatic cells exposed to extremely low frequency electro-magnetic fields: a meta-analysis of data from 87

publications (1990 - 2007)[J]. Int J Radiat Biol, 2009, 85(3): 196-213. DOI: 10.1080/09553000902748575.

[27] ZHANG D, ZHANG Y, ZHU B Y, *et al*. Resveratrol may reverse the effects of long-term occupational exposure to electromagnetic fields on workers of a power plant[J]. Oncotarget, 2017, 8(29): 47497 - 47506. DOI: 10.18632/oncotarget.17668.

[28] 秦雅鑫, 宋琦, 殷樱, 等. 电磁场在转录水平对胚胎干细胞源性神经前体细胞凋亡相关基因的影响[J]. 第四军医大学学报, 2008, 29(10): 876-879. DOI: 10.3321/j.issn: 1000-2790.2008.10.004.
QIN Y X, SONG Q, YIN Y, *et al*. Effect of electromagnetic fields on transcript levels of apoptosis-related genes in embryonic stem cell-derived neural progenitor cells[J]. J Fourth Mil Med Univ, 2008, 29(10): 876-879. DOI: 10.3321/j.issn: 1000-2790.2008.10.004.

[29] 朱茂林, 朱煌. 极低频电磁场辐射干扰后小鼠成纤维细胞转录组测序的生物信息学分析[J]. 中华实验眼科杂志, 2021, 39(8): 686 - 692. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200905-00633.
ZHU M L, ZHU H. Bioinformatics analysis of transcriptome sequencing after the interference of extremely low frequency electromagnetic field in mouse fibroblasts[J]. Chin J Exp Ophthalmol, 2021, 39(8): 686 - 692. DOI: 10.3760/cma.j.cn115989-20200905-00633.

[30] NAIMA C, AGATHE M, PATRICE R, *et al*. AβPP-induced UPR transcriptomic signature of glial cells to oxidative stress as an adaptive mechanism to preserve cell function and survival[J]. Curr Alzheimer Res, 2018, 15(7): 643-654.

[31] ZHANG Y, CHEN D D, ZHANG M, *et al*. Treadmill training attenuate STZ-induced cognitive dysfunction in type 2 diabetic rats via modulating Grb10/IGF-R signaling[J]. Brain Res Bull, 2022, 181: 12 - 20. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2022.01.007.

[32] CHAPUIS J, VINGTDEUX V, CAMPAGNE F, *et al*. Growth arrest-specific 1 binds to and controls the maturation and processing of the amyloid-beta precursor protein[J]. Hum Mol Genet, 2011, 20(10): 2026-2036. DOI: 10.1093/hmg/ddr085.

[33] BRADLEY-WHITMAN M A, LOVELL M A. Epigenetic changes in the progression of Alzheimer's disease[J]. Mech Ageing Dev, 2013, 134(10): 486-495. DOI: 10.1016/j.mad.2013.08.005.

[34] SYAL C, KOSARAJU J, HAMILTON L, *et al*. Dysregulated expression of monoacylglycerol lipase is a marker for anti-diabetic drug metformin-targeted therapy to correct impaired neurogenesis and spatial memory in Alzheimer's disease[J]. Theranostics, 2020, 10(14): 6337-6360. DOI: 10.7150/thno.44962.

[35] 贾建平, 贾健民, 周卫东, 等. 阿尔茨海默病和血管性痴呆患者脑脊液中乙酰胆碱和胆碱检测及其临床意义[J]. 中华神经科杂志, 2002, 35(3): 168-170. DOI: 10.3760/j.issn: 1006-7876.2002.03.013.
JIA J P, JIA J M, ZHOU W D, *et al*. The detection of cerebrospinal fluid acetylecholine and choline in patient with Alzheimer's disease and vascular dementia and their clinical significance[J]. Chin J Neurol, 2002, 35(3): 168-170. DOI: 10.3760/j.issn: 1006-7876.2002.03.013.

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

[37] 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.

[38] LI Y Q, DENG P, CHEN C H, *et al*. 1, 800 MHz radiofrequency electromagnetic irradiation impairs neurite outgrowth with a decrease in Rap1-GTP in primary mouse hippocampal neurons and Neuro2a cells[J]. Front Public Health, 2021, 9: 771508. DOI: 10.3389/fpubh.2021.771508.

[39] HU L T, ZHU B L, LAI Y J, *et al*. $HMGCS_2$ promotes autophagic degradation of the amyloid-β precursor protein through ketone body-mediated mechanisms[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 486(2): 492-498. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.03.069.

[40] CASTILLO G M, LUKITO W, WIGHT T N, *et al*. The sulfate moieties of glycosaminoglycans are critical for the enhancement of β-amyloid protein fibril formation[J]. J Neurochem, 1999, 72(4): 1681-1687. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1999.721681.x.

[41] OREŠIČ M, HYÖTYLÄINEN T, HERUKKA S K, *et al*. Metabolome in progression to Alzheimer's disease[J]. Transl Psychiatry, 2011, 1(12): e57. DOI: 10.1038/tp.2011.55.

[42] JOHNSON R J, GOMEZ-PINILLA F, NAGEL M, *et al*. Cerebral fructose metabolism as a potential mechanism driving alzheimer's disease[J]. Front Aging Neurosci, 2020, 12: 560865. DOI: 10.3389/fnagi.2020.560865.

[43] GUO X Z, TANG P, LIU P, *et al*. Dkk1: a promising molecule to connect Alzheimer's disease and osteoporosis

[J]. Med Hypotheses, 2016, 88: 30-32. DOI: 10.1016/j.mehy.2015.12.023.

[44] ZHANG L, SUN C X, JIN Y X, *et al*. Dickkopf 3 (Dkk3) improves amyloid-β pathology, cognitive dysfunction, and cerebral glucose metabolism in a transgenic mouse model of alzheimer's disease[J]. J Alzheimer Dis, 2017, 60(2): 733-746. DOI: 10.3233/jad-161254.

[45] 王芙蓉. NOTCH 信号传导途径与阿尔茨海默病[J]. 国外医学:老年医学分册, 2002, 23(2):49.
WANG F Y. NOTCH signal transduction pathway and Alzheimer disease [J]. Foreign Med: Geriatr, 2002, 23(2): 49.

[46] 才岩. Wnt 信号传导通路在阿尔茨海默病中的研究进展[J]. 中国社区医师, 2016, 32(24): 13-13, 15. DOI: 10.3969/j.issn.1007-614x.2016.24.4.
CAI Y. Research progress of Wnt signal transduction pathway in alzheimer disease [J]. Chin Community Dr, 2016, 32(24): 13-13, 15. DOI: 10.3969/j.issn.1007-614x.2016.24.4.

[47] LU N H, WANG J Z, ZHU B J, *et al*. Whole-exome sequencing to identify novel mutations of nevoid basal cell carcinoma syndrome in a Chinese population[J]. Cancer Biomark, 2017, 21(1): 161-168. DOI: 10.3233/cbm-170541.

[48] YASUHARA R, KANG S Y, IRIÉ T, *et al*. Role of Snai2 and Notch signaling in salivary gland myoepithelial cell fate [J]. Lab Investig, 2022, 102(11): 1245-1256. DOI: 10.1038/s41374-022-00814-7.

[49] LI J J, PERFETTO M, MATERNA C, *et al*. A new transgenic reporter line reveals Wnt-dependent Snai2 re-expression and cranial neural crest differentiation in *Xenopus*[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 1-14. DOI: 10.1038/s41598-019-47665-9.

[50] WOOD AMY H R, CHAPPELL HELEN F, ZULYNIAK MICHAEL A. Dietary and supplemental long-chain omega-3 fatty acids as moderators of cognitive impairment and Alzheimer's disease[J]. Eur J Nutr, 2021, 61(2): 1-16.

[51] 高梅梅. 阿尔茨海默病及轻度认知功能障碍患者血清代谢组学研究[D]. 济南: 山东大学, 2017.
GAO M M. Study on serum metabonomics in patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment[D]. Jinan: Shandong University, 2017.

[52] 赵娜. 不同分子量和硫酸化程度肝素组分的抗阿尔茨海默病活性研究[D]. 济南: 山东大学, 2014.
ZHAO N. Study on anti-Alzheimer's disease activity of heparin fractions with different molecular weight and sulfated degree[D]. Jinan: Shandong University, 2014.

(**收稿**:2022-10-17;**修回**:2023-01-03)

(编辑 邓强庭)