

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

朱茂林 朱煌

上海交通大学医学院附属新华医院眼科 200092

通信作者:朱煌, Email: drzhuhuang@163.com

【摘要】 目的 通过高通量测序技术分析极低频电磁场(ELF-EMFs)辐射干扰小鼠成纤维细胞后转录组的变化情况,并筛选出可能参与 ELF-EMFs 调控成纤维细胞生长的相关通路及基因。方法 将小鼠 NIH/3T3 细胞分为电磁辐射组和正常对照组,电磁辐射组细胞置于 0.2 mT、50 Hz 的电磁辐射系统中,正常对照组置于同等条件未通电的相同线圈系统中,于细胞培养箱中培养 24 h 后收集细胞,提取 RNA。采用第 2 代高通量测序技术对 2 个组进行转录组测序,对筛选的差异基因进行基因功能注释及信号通路数据库分析。筛选出部分高表达基因进行实时荧光定量 PCR 验证。结果 本次转录组测序共鉴定出 17 980 个基因,筛选出 140 个有显著差异的基因,其中上调 120 个,下调 20 个。差异基因富集在酶的催化活性、细胞代谢过程、生物调控、生物合成等方面。京都基因与基因组百科全书分析结果显示,差异基因主要涉及 55 条通路,富集显著的 10 条通路集中于氨酰基-tRNA 的生物合成、血小板活化、神经营养蛋白信号通路、肾素-血管紧张素系统等,与细胞的生物合成密切相关,进一步从中筛选出可能参与细胞辐射后应激的差异基因,包括有丝分裂原激活的蛋白激酶 12(MAPK12)、神经营养性酪氨酸激酶受体 3 型(NTRK3)、2 型血管紧张素 II 受体(AGTR2)、血管内皮生长因子(VEGF)等。实时荧光定量 PCR 结果显示,电磁辐射组 MAPK12、NTRK3、AGTR2、VEGF mRNA 相对表达量分别为 2.389 ± 0.003 、 2.481 ± 0.350 、 2.354 ± 0.081 和 1.559 ± 0.110 ,明显高于正常对照组的 1.011 ± 0.190 、 1.011 ± 0.180 、 1.007 ± 0.150 、 1.008 ± 0.153 ,差异均有统计学意义($t = 12.540$ 、 6.309 、 13.710 、 3.078 ,均 $P < 0.05$)。结论 ELF-EMFs 干扰小鼠成纤维细胞后,MAPK12、NTRK3、AGTR2、VEGF 等基因表达明显上调,主要涉及神经营养蛋白信号通路、肾素-血管紧张素系统等通路,这部分基因及通路可能是 ELF-EMFs 影响成纤维细胞的主要途径。

【关键词】 电磁辐射; 极低频电磁场; 成纤维细胞; 信号通路; 基因组; 生物信息学

基金项目:上海市自然科学基金项目(17411950206)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200905-00633

Bioinformatics analysis of transcriptome sequencing after the interference of extremely low frequency electromagnetic field in mouse fibroblasts

Zhu Maolin, Zhu Huang

Department of Ophthalmology, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China

Corresponding author: Zhu Huang, Email: drzhuhuang@163.com

【Abstract】 Objective To analyze the changes in the transcriptome of mouse fibroblasts after exposure to extremely low frequency electromagnetic fields (ELF-EMFs) using next-generation sequencing technology, and to screen out related pathways and genes that might be involved in the regulation of fibroblast growth by ELF-EMFs.

Methods The mouse NIH/3T3 cells were divided into the radiation group and the normal control group. The cells in the radiation group were placed in a 0.2 mT, 50 Hz electromagnetic radiation system, and the cells in the normal control group was placed in the same coil system under the same conditions without power. After 24-hour culture in a cell incubator, RNA was extracted. The next-generation high-throughput sequencing technology was used to sequence the transcriptomes of the two groups, and perform gene function annotation and signal pathway database analysis on the selected differential genes. Some highly expressed genes were screened out and verified by real-time fluorescent quantitative PCR. **Results** A total of 17 980 genes were identified in the transcriptome sequencing, and there were 140 significantly differentially expressed genes (DEGs), of which 120 were up-regulated and 20 were down-regulated.

DEGs were enriched in enzyme catalytic activity, cell metabolism process, biological regulation, biosynthesis and so

on. According to the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes analysis, the DEGs mainly involved 55 pathways, among which the most enriched 10 pathways were aminoacyl-tRNA biosynthesis, platelet activation, neurotrophin signaling pathway, renin-angiotensin system, etc., closely related to cell biosynthesis. The DEGs that might be involved in the post-irradiation stress of cells were further screened out, including mitogen activated protein kinase 12 (MAPK12), neurotrophic tyrosine kinase receptor type 3 (NTRK3), angiotensin II receptor type 2 (AGTR2), vascular endothelial growth factor (VEGF), etc. Real-time fluorescent quantitative PCR results showed that the relative expression levels of MAPK12, NTRK3, AGTR2, VEGF mRNA in the radiation group were 2.389 ± 0.003 , 2.481 ± 0.350 , 2.354 ± 0.081 , 1.559 ± 0.110 , respectively, which were significantly higher than 1.011 ± 0.190 , 1.011 ± 0.180 , 1.007 ± 0.150 , 1.008 ± 0.153 , respectively in the normal control group ($t = 12.540, 6.309, 13.710, 3.078$; all at $P < 0.05$). **Conclusions** After the mouse fibroblasts were interfered with ELF-EMFs, the expression levels of MAPK12, NTRK3, AGTR2, VEGF and other genes are significantly up-regulated, which mainly involve neurotrophin signaling pathway, renin-angiotensin system and other pathways. These genes and pathways may be the main way that ELF-EMFs affect fibroblasts.

[Key words] Electromagnetic radiation; Extremely low frequency electromagnetic fields; Fibroblasts; Signaling pathways; Genome; Bioinformatics

Fund program: Natural Science Foundation of Shanghai (17411950206)

DOI:10.3760/cma.j.cn115989-20200905-00633

极低频电磁场 (extremely low frequency electromagnetic fields, ELF-EMFs) 辐射是一种频率低于 300 Hz 的非电离辐射, 各类电力传输系统、日常使用的各种电子设备均释放出不同能量的 ELF-EMFs^[1-3]。日常生活中人们使用电子产品的时间越长, 眼与 ELF-EMFs 接触的时间和累积剂量也越大。在眼的生长发育过程中, 眼部的成纤维细胞起着重要作用, 巩膜重塑、眼眶构建、脉络膜的发育与成纤维细胞的生物学行为有关, 电子产品的过度使用可能会对成纤维细胞造成影响, 从而促进眼部疾病的发生^[4]。目前, ELF-EMFs 对成纤维细胞行为的影响尚未明确。mRNA 是一种重要的基因表达载体, 承载着转录到翻译的功能^[5]。随着技术的创新和发展以及高通量测序技术的广泛应用, 可以使用生物信息学方法对不同样本之间的生物学进程、分子功能和细胞组分进行分析^[6]。本研究拟对成纤维细胞受 ELF-EMFs 干扰后基因的差异表达和一些关键信号通路及可能参与细胞辐射后应激的差异基因 mRNA 表达量的变化进行分析和总结, 为相关眼病的发病机制研究提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 NIH/3T3 细胞系 (FH0380) 购于上海富衡生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM 高糖培养基 (葡萄糖质量浓度为 4 500 mg/L)、澳洲胎牛血清、质量分数 0.25% 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸 (ethylenediamine tetra acetic acid, EDTA) 消化液、磷酸盐缓冲液 (phosphate

buffered saline, PBS)、青链霉素溶液、Trizol 试剂、TruSeq 链式 mRNA 文库制备试剂盒 (美国 Thermo Fisher 公司); RNA 逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 试剂盒 (日本 Takara 公司)。Agilent2200 生物分析仪 (美国安捷伦公司); 倒置相差显微镜 (日本 Nikon 公司); 低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及分组 NIH/3T3 细胞接种培养在 6 孔细胞培养板上, 以 DMEM 高糖培养基为常规培养基, 置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中, 隔天换液。待细胞生长至 80%~90% 融合, 使用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液在 37 °C 培养箱中消化 1 min, 以 1:4 比例传代, 倒置相差显微镜下观察细胞形态。待细胞生长至 70%~80%, 更换培养液, 将细胞分为电磁辐射组和正常对照组, 每组各 3 个生物学重复样本。根据前期预实验结果^[7] 设置辐射剂量和时间, 电磁辐射组细胞置于 0.2 mT、50 Hz 的电磁辐射系统中, 正常对照组置于同等条件未通电的相同线圈系统中, 于细胞培养箱中培养 24 h 后收集细胞, 提取 RNA。

1.2.2 ELF-EMFs 辐射系统的建立 使用本课题组前期自制的磁场辐照系统^[7], 由周长 60 cm、高度 8 cm、168 匝的 Helmholtz 线圈和变压器构成, 其中 3 个线圈相互串联后叠放并与细胞培养箱外的变压器相连。使线圈所在空间产生一个恒定、均匀的 50 Hz 正弦磁场辐照区, 该辐射系统所产生的磁场用电磁辐射分析仪测定。在细胞受磁场辐照时, 培养皿中心位于辐照系统的中心轴上。

1.2.3 总 RNA 提取 细胞培养 24 h, 电磁辐射组和

正常对照组分别清除培养基,加入适量 PBS 快速冲洗细胞,用 Trizol 试剂抽提细胞中的总 RNA,采用 Agilent 2200 检测 RNA 质量,质检合格的样品用于进一步测序、生物学分析及实时荧光定量 PCR 检测。

1.2.4 文库构建质检和测序 采用 TruSeq 链式 mRNA 文库制备试剂盒为每个 RNA 样品构建 cDNA 文库。将 RNA 溶于无酶水中,用 Oligo dT 磁珠、RNA 结合缓冲液、洗涤液及 Tris 进行重悬和清洗,得到纯化后的 mRNA,并将其片段化为 200~500 bp。以切割的 RNA 片段为模版,进行第 1 链和第 2 链 cDNA 合成。dUTP 混合物用于第 2 链 cDNA 合成,可去除第 2 链。将该 cDNA 片段末端修复,并加上 polyA 尾。纯化连接的 cDNA 产物,并用尿嘧啶 DNA 糖基化酶处理以除去第 2 链 cDNA。通过 PCR 富集纯化的第 1 链 cDNA 以创建 cDNA 文库。选出合格的片段后,扩增 15 个循环,再次纯化得到最终文库。采用 Agilent 2200 对构建的文库进行质检。本文库中,300 bp ≤ 库主峰长 ≤ 600 bp,质量浓度 ≥ 2 ng/μl,峰型单一,没有杂峰,符合后续上机要求。采用基于 Illumina HiSeqXTen 测序平台的第 2 代高通量测序技术,对这些文库进行 150 bp 的配对末端测序。

1.2.5 培养细胞中转录组基因表达量测定 将高通量测序数据的基因组比对结果转换为基因表达量,根据 RNA Mapping 结果和基因组注释文件,将电磁辐射组和正常对照组的 6 个样本采用 HTSeq 算法统计每个基因的表达情况。将测序序列(clean data)比对到测序物种(NCBI Taxonomy ID:10090)对应的参考基因组(mm10)上,确定测序序列在基因组上的定位情况。采用 RPKM (Reads Per Kilobase Million Reads) 及 FPKM (Fragments Per Kilobase Million Reads) 对基因的表达值进行标准化。

1.2.6 差异基因分析及筛选 采用 EdgeR 算法过滤差异表达的基因,经过显著分析和错误发现率(false discovery rate, FDR)分析后,遵循以下标准对 mRNA 进行筛选:表达差异倍数 \log_2 Fold Change > 0.585 或 < -0.585, FDR < 0.05。通过差异基因筛选结果中的差异倍数以及差异的统计学显著性结果,在火山图中对基因表达的差异分布情况进行展示,获得显著差异基因的数量、显著上/下

调基因的数量及差异程度信息。采用基因表达聚类图直观呈现多样本多个基因的全局表达量变化,表达多样本或多基因表达量的聚类关系。

1.2.7 基因功能注释和相关通路分析 基于数据库,将分析得到的差异基因分别从生物学进程、分子功能和细胞组分 3 个层面进行基因本体论(Gene Ontology, GO)注释,得到基因参与的所有 GO,采用 Fisher 检验计算每个 GO 的显著性水平(P 值),从而筛选出差异基因富集的显著性 GO。关注 P 值 < 0.05 的相关基因。将筛选出的差异基因基于京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)数据库进行通路注释,得到差异基因参与的所有通路条目,采用 Fisher 检验计算 Pathway 的显著性水平(P 值),从而筛选出差异基因富集的显著性通路条目。

1.2.8 实时荧光定量 PCR 法检测差异基因的表达 按照 RNA 逆转录试剂盒步骤将提取的 RNA 逆转录合成 cDNA。将获取的 cDNA 分别加入各引物的反应体系中进行实时荧光定量 PCR,有丝分裂原激活的蛋白激酶 12(mitogen activated protein kinase 12, MAPK12)、神经营养性酪氨酸激酶受体 3 型(neurotrophic tyrosine kinase receptor type 3, NTRK3)、2 型血管紧张素 II 受体(angiotensin II receptor type 2, AGTR2)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、β-肌动蛋白(β-actin) PCR 引物序列见表 1,反应体系为 20 μl。反应条件:95 °C 预变性 1 min;95 °C 变性 15 s,60 °C 退火及延伸 34 s,循环 40 次。扩增后进行熔解

表 1 PCR 引物序列
Table 1 PCR primer sequence

引物名称	引物序列(5'-3')	片段长度(bp)
MAPK12	正向:CGCCGTGTACCAAGACCTG	19
	反向:GAGGCGCAACTCTCTGTAGG	20
NTRK3	正向:TCCTTGCCGAGCCAAAGTGTAG	21
	反向:TCCTTGAGATGTCCGTAATGTTG	23
AGTR2	正向:CGCAACTGGCACCAATGAG	19
	反向:AGGGAGGGTAGCCAAAAGGAG	21
VEGF	正向:AGGAGTACCCCGACGAGATAGA	22
	反向:CACATCTGCTGTGCTGTAGGAA	22
β-actin	正向:CGTTGACATCCGTAAGACC	20
	反向:TCAGTAACAGTCCGCCTAGAAG	22

注:PCR:聚合酶链式反应;MAPK:有丝分裂原激活的蛋白激酶;NTRK:神经营养性酪氨酸激酶受体;AGTR:血管紧张素 II 受体;VEGF:血管内皮生长因子;β-actin:β-肌动蛋白

Note:PCR:polymerase chain reaction;MAPK:mitogen activated protein kinase;NTRK:neurotrophic receptor tyrosine kinase;AGTR:angiotensin II receptor;VEGF:vascular endothelial growth factor

曲线分析。以 β -actin 为内参照,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各目的基因 mRNA 相对表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计学软件对数据进行统计分析。计量资料数据经 K-S 检验证实呈正态分布,以 $mean \pm SD$ 表示。本次分析选用的差异筛选算法为 EdgeR。EdgeR 是基于负二项分布的统计方法,采用 TMM 算法进行标准化,采用多组实验的精确统计模型进行基因差异表达鉴定的算法。以 $FDR < 0.05$ 表示差异有统计学意义。组间数据比较采用独立样本 t 检验。2 个组各个样本基因表达水平的相关性分析采用 Pearson 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RNA 对比

比对到小鼠参考基因组的 reads 数占比 (Mapped Rate) 均高于 90%,在本实验结果中,未见存在显著异常的染色体富集,未受到污染,结果可靠性良好。

2.2 转录组表达量的分析

根据基因在样本中 FPKM 密度分布图和 FPKM 分布箱线图可见测序样本中以中等表达的基因为主,低表达和高表达的基因占比很少,整体基因表达状况良好。电磁辐射组和正常对照组各自 3 个样本间的相关系数 (r) 在 0.95~1.00 (图 1)。

2.3 电磁辐射组与正常对照组中基因表达差异分析

在本次转录组测序中,共鉴定出 17 980 个基因,筛选出遵循表达差异倍数的共 140 个显著差异基因,其中 120 个差异基因上调,差异较大的上调基因有

Neat1、*ND6*、*MAPK12*、*Tle2* 等,多与氨基酸转运、NADH-泛醌氧化还原酶链、溶质载体家族、细胞黏附分子等功能活动相关;20 个下调的基因多与泛素蛋白连接酶、选择素、真核翻译延伸因子等功能活动相关 (图 2)。样本的双向类聚分析结果可见电磁辐射组与正常对照组的相关性和均一性较好 (图 3)。

2.4 基因功能分析及与 ELF-EMFs 有关的通路筛选

通过 GO 分析,从生物学进程来看,差异基因富集在翻译的延长、活性氧生物合成过程的调控、生长板软骨细胞发育、黑色素生物合成过程的调节、醛固酮分泌等方面;从分子功能来看,差异基因富集在三重密码子-氨基酸衔接子活性、1,2-二羟基萘双加氧酶活性等方面;从细胞组分来看,差异基因富集在阳离子通道配合物、线粒体丙酮酸脱氢酶复合物、血小板 α 颗粒膜、纤维状胶原三聚体等方面。KEGG 分析显示差异基因主要涉及 55 条通路,其中富集显著的 10 条通路集中于氨酰基-tRNA 的生物合成、血小板活化、神经营养蛋白信号通路、肾素-血管紧张素系统等,与细胞的生物合成密切相关 (图 4)。在以上通路中,结合 GO 分析, *Col27a1*、*MAPK12*、*NTRK3*、*B4galnt1*、*AGTR2* 等基因改变明显,其中 *MAPK12* 和 *AGTR2* 在多条通路中均有涉及,这 2 个基因在 ELF-EMFs 作用后改变显著。

2.5 2 个组 MAPK12、NTRK3、AGTR2 和 VEGF mRNA 相对表达量比较

电磁辐射组 *MAPK12*、*NTRK3*、*AGTR2* 和 *VEGF* mRNA 的相对表达量均明显高于正常对照组,2 个组比较差异均有统计学意义 ($t = 12.540$ 、 6.309 、 13.710 、 3.078 ,均 $P < 0.05$) (表 2)。

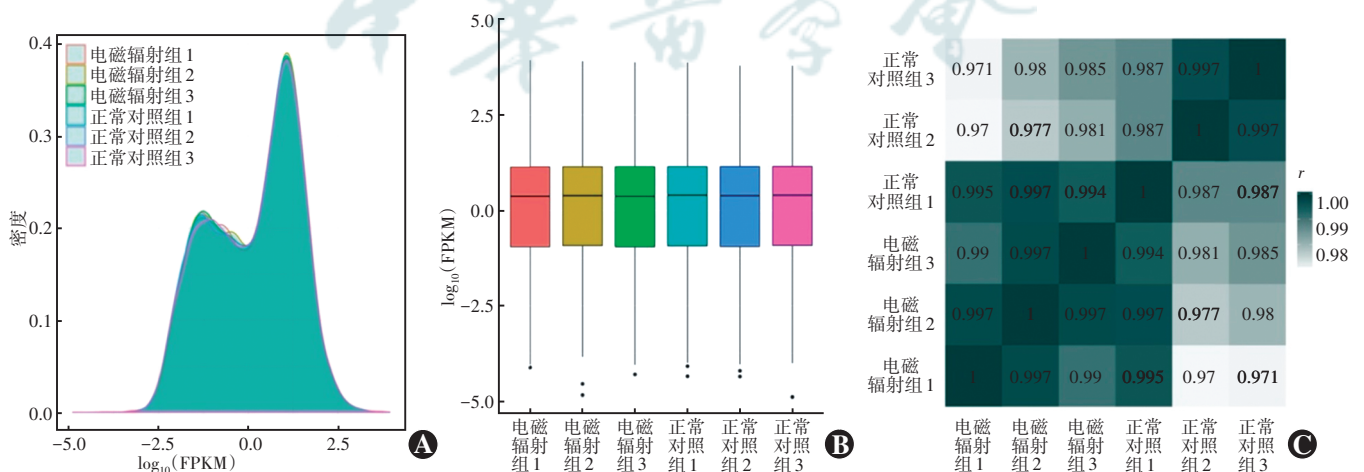


图 1 ELF-EMFs 作用后 2 个组的转录组表达量 A: 基因的 FPKM 密度分布图 B: 基因的 FPKM 分布箱线图 C: 样本间基因表达水平相关性颜色深浅代表 Pearson 相关性系数的高低,颜色越深,相关性越好

Figure 1 Transcriptome expression levels of the two groups after exposure to ELF-EMFs A: FPKM density distribution map of genes B: Gene FPKM distribution boxplot C: Correlation matrix showing correlation coefficients between samples Deeper color represented higher correlation FPKM: Fragments Per Kilobase Million Reads

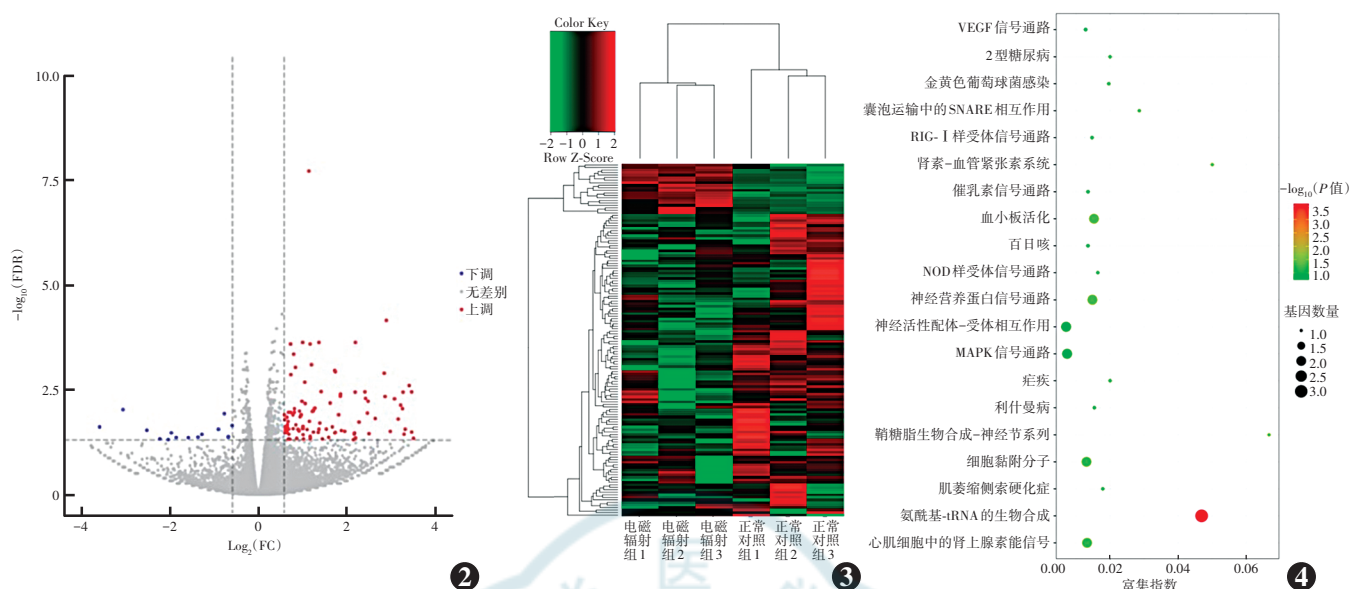


图 2 ELF-EMFs 作用后 2 个组差异基因火山图 虚线是差异基因筛选采用的阈值,虚线之外为显著差异基因;红色代表显著上调的差异基因,蓝色代表显著下调的差异基因,灰色代表非显著差异的基因 FDR:错误发现率;FC:差异倍数 **图 3** ELF-EMFs 作用后 2 个组基因表达聚类图 每个格子表示每个基因在不同样本中的 RPKM 值。红色代表该基因在中位数值标准化后,相对于中位数值表达较高;绿色代表基因相对于中位数值表达较低;颜色越深,越接近黑色代表越接近中位数值 **图 4** ELF-EMFs 作用后相关通路富集图 VEGF:血管内皮生长因子;NOD:核苷酸结合寡聚化结构域;MAPK:丝裂原活化蛋白激酶

Figure 2 Volcano plots displaying differentially expressed genes between the two groups after exposure to ELF-EMFs The dashed line was the threshold used for differentially expressed genes screening, and beyond the dashed line was the significantly differentially expressed genes; color red represented the significantly up-regulated genes, and color blue represented the significantly down-regulated genes, and color gray represented non-significantly differentially expressed genes FDR: false discovery rate; FC: fold change **Figure 3** Gene expression cluster diagram of the two groups after exposure to ELF-EMFs Each grid represented the RPKM value of each gene in different samples. Color red meant that the gene expression was higher than that of median after median normalization, and color green meant that the expression of the gene was lower than that of median after median normalization. The darker the color, the closer it was to color black, and the closer it was to median **Figure 4** Enrichment map of related pathways after exposure to ELF-EMFs VEGF: vascular endothelial growth factor; NOD: nucleotide-binding oligomerization domain; MAPK: mitogen-activated protein kinase

表 2 2 个组 MAPK12、NTRK3、AGTR2 和 VEGF mRNA 相对表达量比较 (mean±SD)

Table 2 Comparison of the relative expression levels of MAPK12, NTRK3, AGTR2 and VEGF mRNA between the two groups (mean±SD)

组别	样本量	不同基因 mRNA 相对表达量			
		MAPK12	NTRK3	AGTR2	VEGF
正常对照组	3	1.011±0.190	1.011±0.180	1.007±0.150	1.008±0.153
电磁辐射组	3	2.389±0.003	2.481±0.350	2.354±0.081	1.559±0.110
t 值		12.540	6.309	13.710	3.078
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:(独立样本 t 检验) MAPK:有丝分裂原激活的蛋白激酶;NTRK:神经营养性酪氨酸激酶受体;AGTR:血管紧张素 II 受体;VEGF:血管内皮生长因子

Note:(Independent-samples t test) MAPK:mitogen activated protein kinase;NTRK:neurotrophic tyrosine kinase receptor;AGTR:angiotensin II receptor;VEGF:vascular endothelial growth factor

3 讨论

基因调控贯穿整个眼部的生长发育过程,能够精确调控细胞功能的变化。日常生活中,我们接触电磁辐射的频率变高,累积剂量增大。电子产品使用时间变长,会使眼长期暴露在这些设备所发出的 ELF-EMFs 中^[8],关于 ELF-EMFs 的安全更加受到关注。近

年来,国际上从多个角度进行了大量关于人体和动物的调查及试验,研究 ELF-EMFs 对神经、免疫、生殖等系统功能的影响^[9-11]。也有多项研究发现 ELF-EMFs 对眼部健康有着不可忽略的影响^[12-13]。

近年来,美国模式培养物集存库对人胚胎眼巩膜成纤维细胞存在部分争议,而小鼠成纤维细胞与眼部多种成纤维细胞有着较类似的生物学功能,故在本研

究中使用小鼠成纤维细胞作为替代。本研究共检测到 17 980 个基因, 140 个有显著差异的基因, 其中上调表达基因 120 个, 下调表达基因 20 个。从 GO 生物学进程中可发现, 差异表达基因主要富集在细胞代谢过程和生物调控等方面; 从 GO 细胞组分来看, 大部分的差异表达基因富集在生物合成和分泌等方面; 从 GO 的分子功能来看, 差异表达基因主要富集在生物合成相关酶活性等方面。KEGG 分析结果显示, 差异基因涉及的通路中, 血小板活化、神经营养蛋白信号通路、肾素-血管紧张素系统最为显著, 提示 ELF-EMFs 调控小鼠成纤维细胞可能涉及以上相关通路的变化, *MAPK12*、*AGTR2*、*VEGF* 基因在以上通路中改变显著。现阶段普遍认为, *AGTR2* 在肾素-血管紧张素系统中起着非常重要的作用, 该基因除了在高血压和左心室肥厚重塑中作为重要的研究靶点之外^[14-16], 以 *AGTR2* 为靶标的肾素-血管紧张素系统的拮抗剂在糖尿病视网膜病变中有助于渐进改变视网膜细胞的环境, 从而保护视网膜^[17]。在通过激光光凝视网膜血管疾病的治疗中, *AGTR2* 是抑制 VEGF 诱导血管生成的候选靶标^[18]。最新的研究发现, 选择性激活 *AGTR2* 可以显著阻断血管紧张素 II、脂多糖和过氧化氢诱导的核因子- κ B 激活和炎性细胞因子的表达, 所以选择性激活 *AGTR2* 可能是视网膜疾病治疗的新途径^[19], 为眼科疾病的治疗提供了新的靶标。

但在本研究中, 经过 ELF-EMFs 处理后, *AGTR2* 和 *VEGF* 的表达均显著上调。*VEGF* 作为眼部疾病发生的重要基因, 在年龄相关性黄斑变性、中心性渗出性脉络膜视网膜病变等眼部疾病的发生过程中有重要作用。VEGF 表达水平升高提示 ELF-EMFs 对成纤维细胞的影响可能引发眼部各类疾病的发生。

MAPK 家族控制大量的细胞过程, 是真核生物对环境应激和炎症应答的保守机制之一。MAPK12 能够通过生长因子、促细胞分裂剂、激素、细胞因子等外部刺激诱导产生特定细胞应激, 从而应对各种外部刺激, 对于眼部外伤、年龄相关性黄斑变性、角膜内皮细胞增生有着重要作用^[20-22]。

成纤维细胞是机体完成生物学功能的重要组成部分, 是疏松结缔组织的主要细胞成分, 具有胶原形成、蛋白分泌、创伤修复等功能。在免疫耐受、组织修复等过程中有着重要作用^[23-24]。在机体受到损伤时, 伤口自然愈合是通过细胞外基质沉积引起的组织纤维化进行的, 但过度纤维化会引起一些不良反应, 甚至会引发一些新的疾病, 如系统性硬化^[25]。翼状胬肉的形成也与过度纤维化有着密切关系^[26], 通过药物处理, 可抑

制成纤维细胞的增生并促进细胞凋亡, 从而防治复发性翼状胬肉^[27]。成纤维细胞的多种功能在眼部疾病的发展过程中具有重要作用。虽然过度纤维化会影响角膜损伤后的修复^[28], 并与角膜上皮基底膜有着密切的关系^[29]; 但是在最新的一项研究中发现, 角膜上皮清创可以诱导细胞凋亡, 使角膜基质细胞衰老, 表现出非纤维化的表型, 可能参与角膜纤维化的自我限制^[30]。

本研究通过对转录组结果进行统计, 全面分析了 ELF-EMFs 对小鼠成纤维细胞生物学功能的影响, 为进一步的机制研究提供了方向。但本次测序仅为转录组测序, 无法对非编码 RNA 的调控进行分析和预测, 后续实验可进一步对电磁辐射后细胞进行全转录组测序, 得到更加全面的结果。

综上所述, 本研究发现 *MAPK12*、*AGTR2* 和 *VEGF* 基因对于 ELF-EMFs 作用后成纤维细胞应激有重要作用, 这 3 个差异表达基因可能影响或参与了成纤维细胞损伤修复的过程, 可作为探讨 ELF-EMFs 对眼部病变影响的候选靶标, 其具体的作用机制仍需进一步实验探讨。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Lai H. Exposure to static and extremely-low frequency electromagnetic fields and cellular free radicals [J]. *Electromagn Biol Med*, 2019, 38(4): 231-248. DOI:10.1080/15368378.2019.1656645.
- [2] Gajšek P, Ravazzani P, Grellier J, et al. Review of studies concerning electromagnetic field (EMF) exposure assessment in Europe: low frequency fields (50 Hz - 100 kHz) [J/OL]. *Int J Environ Res Public Health*, 2016, 13(9): 875 [2021-02-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27598182/>. DOI:10.3390/ijerph13090875.
- [3] Belyaev I, Dean A, Eger H, et al. EUROPAEM EMF Guideline 2016 for the prevention, diagnosis and treatment of EMF-related health problems and illnesses [J]. *Rev Environ Health*, 2016, 31(3): 363-397. DOI:10.1515/revheh-2016-0011.
- [4] Morgan IG, Ohno-Matsui K, Saw SM. Myopia [J]. *Lancet*, 2012, 379(9827): 1739-1748. DOI:10.1016/S0140-6736(12)60272-4.
- [5] Bustin SA, Benes V, Nolan T, et al. Quantitative real-time RT-PCR—a perspective [J]. *J Mol Endocrinol*, 2005, 34(3): 597-601. DOI:10.1677/jme.1.01755.
- [6] Field MA. Detecting pathogenic variants in autoimmune diseases using high-throughput sequencing [J]. *Immunol Cell Biol*, 2021, 99(2): 146-156. DOI:10.1111/imcb.12372.
- [7] 王洁, 崔杰锋, 朱煌, 等. 极低频电磁场作用下人胚胎眼膜成纤维细胞的分子病理改变 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2012, 30(5): 403-407. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.05.005. Wang J, Cui JF, Zhu H, et al. Molecular pathological changes of human fetal scleral fibroblasts following exposure to extremely low frequency electromagnetic field [J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2012, 30(5): 403-407. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2012.05.005.
- [8] Miah T, Kamat D. Current understanding of the health effects of electromagnetic fields [J/OL]. *Pediatr Ann*, 2017, 46(4): e172-e174 [2021-02-20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28414399/>. DOI:10.3928/19382359-20170316-01.
- [9] Ohayon MM, Stolc V, Freund FT, et al. The potential for impact of man-made super low and extremely low frequency electromagnetic fields on

- sleep[J]. *Sleep Med Rev*, 2019, 47: 28–38. DOI: 10.1016/j.smrv.2019.06.001.
- [10] Mahaki H, Tanzadehpanah H, Jabarivasal N, et al. A review on the effects of extremely low frequency electromagnetic field (ELF-EMF) on cytokines of innate and adaptive immunity[J]. *Electromagn Biol Med*, 2019, 38(1): 84–95. DOI: 10.1080/15368378.2018.1545668.
- [11] Santini SJ, Cordone V, Falone S, et al. Role of mitochondria in the oxidative stress induced by electromagnetic fields; focus on reproductive systems[J/OL]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 5076271 [2021-02-21]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30533171/>. DOI: 10.1155/2018/5076271.
- [12] 孔繁琪, 朱煌, 冯婕好, 等. 极低频电磁辐射对豚鼠眼球发育的影响[J]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7(7): 3141–3144. DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.07.068.
- [13] 田甜, 朱煌, 蔡晓静, 等. 葛根素对极低频电磁辐射下 HFSF 细胞中 MMP-2 与 COL1A1 的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(36): 7001–7003. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.36.001.
- Tian T, Zhu H, Cai XJ, et al. Effect of puerarin on MMP-2 and COL1A1 in HFSF exposed to ELF-EMFs[J]. *Prog Modern Biomed*, 2015, 15(36): 7001–7003. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.36.001.
- [14] Katsi V, Maragkoudakis S, Marketou M, et al. The role of angiotensin-(1-7)/mas axis and angiotensin type 2 receptors in the central nervous system in cardiovascular disease and therapeutics; a riddle to be solved[J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2019, 17(4): 319–325. DOI: 10.2174/1570161117666181105154843.
- [15] Chow BS, Allen TJ. Angiotensin II type 2 receptor (AT2R) in renal and cardiovascular disease[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2016, 130(15): 1307–1326. DOI: 10.1042/CS20160243.
- [16] Xiao Y, Long WQ, Guan KP, et al. Role of angiotensin II type 2 receptor during electrophysiological remodeling of left ventricular hypertrophic myocardium in spontaneously hypertensive rats[J]. *J Am Soc Hypertens*, 2018, 12(1): 58–65. DOI: 10.1016/j.jash.2017.09.014.
- [17] Wilkinson-Berka JL, Fletcher EL. Angiotensin and bradykinin; targets for the treatment of vascular and neuro-glial pathology in diabetic retinopathy[J]. *Curr Pharm Des*, 2004, 10(27): 3313–3330. DOI: 10.2174/1381612043383179.
- [18] Wilson AS, Hobbs BG, Shen WY, et al. Argon laser photocoagulation-induced modification of gene expression in the retina[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44(4): 1426–1434. DOI: 10.1167/iov.02-0622.
- [19] Verma A, Zhu P, de Kloet A, et al. Angiotensin receptor expression revealed by reporter mice and beneficial effects of AT2R agonist in retinal cells[J/OL]. *Exp Eye Res*, 2019, 187: 107770 [2021-02-10]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31449794/>. DOI: 10.1016/j.exer.2019.107770.
- [20] Yao B, Wang S, Xiao P, et al. MAPK signaling pathways in eye wounds: multifunction and cooperation[J]. *Exp Cell Res*, 2017, 359(1): 10–16. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.06.024.
- [21] Kyosseva SV. Targeting MAPK signaling in age-related macular degeneration[J]. *Ophthalmol Eye Dis*, 2016, 8: 23–30. DOI: 10.4137/OED.S32200.
- [22] Joko T, Shiraishi A, Kobayashi T, et al. Mechanism of proliferation of cultured human corneal endothelial cells[J]. *Cornea*, 2017, 36 Suppl 1: S41–S45. DOI: 10.1097/ICO.0000000000001337.
- [23] Nitta T, Tsutsumi M, Nitta S, et al. Fibroblasts as a source of self-antigens for central immune tolerance[J]. *Nat Immunol*, 2020, 21(10): 1172–1180. DOI: 10.1038/s41590-020-0756-8.
- [24] Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. The role of cardiac fibroblasts in post-myocardial heart tissue repair[J]. *Exp Mol Pathol*, 2016, 101(2): 231–240. DOI: 10.1016/j.yexmp.2016.09.002.
- [25] Griffin MF, desJardins-Park HE, Mascharak S, et al. Understanding the impact of fibroblast heterogeneity on skin fibrosis[J/OL]. *Dis Model Mech*, 2020, 13(6): dmm044164 [2021-01-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32541065/>. DOI: 10.1242/dmm.044164.
- [26] Kim KW, Park SH, Kim JC. Fibroblast biology in pterygia[J]. *Exp Eye Res*, 2016, 142: 32–39. DOI: 10.1016/j.exer.2015.01.010.
- [27] 孙亚杰, 林婷婷, 何彦津, 等. 临床常用药物对体外培养的复发性翼状胬肉成纤维细胞的抑制效果比较[J]. *中华实验眼科杂志*, 2017, 35(6): 512–519. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.06.006.
- Sun YJ, Lin TT, He YJ, et al. A comparative study on the inhibitory effects of commonly used clinical drugs on *in vitro* fibroblasts from recurrent pterygium[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2017, 35(6): 512–519. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.06.006.
- [28] Gallego-Muñoz P, Ibañez-Frías L, Garrote JA, et al. Human corneal fibroblast migration and extracellular matrix synthesis during stromal repair: role played by platelet-derived growth factor-BB, basic fibroblast growth factor, and transforming growth factor-β1[J/OL]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2018, 12(2): e737–e746 [2021-02-25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27860426/>. DOI: 10.1002/term.2360.
- [29] 徐路星, 吴金玲, 王霜宁, 等. 角膜穿通伤早期角膜上皮基底膜的修复和再生过程[J]. *中华实验眼科杂志*, 2020, 38(2): 93–99. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2020.02.003.
- Xu LX, Wu JL, Wang SN, et al. Procedure for early corneal basement membrane repair and regeneration in corneal penetrating injury in rabbits[J]. *Chin J Exp Ophthalmol*, 2020, 38(2): 93–99. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2020.02.003.
- [30] Wang X, Qu M, Li J, et al. Induction of fibroblast senescence during mouse corneal wound healing[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2019, 60(10): 3669–3679. DOI: 10.1167/iov.19-26983.

(收稿日期: 2021-03-15 修回日期: 2021-06-27)

(本文编辑: 刘艳 施晓萌)

读者 · 作者 · 编者

本刊投稿方式

初次投稿作者请按照下列步骤投稿: 登陆中华医学会网站 (<http://www.cma.org.cn>) → 点击页面右上角的“注册” → 选项注册账号 → 返回首页 → 点击页面右下方的“申请成为杂志作者”成为本刊作者进行投稿。投稿时请使用 Word 格式(.doc 文件类型), 投稿后请注意自留原稿, 并保留论文相关的原始资料, 以备稿件修改补充所用。投稿后请从“业务中心”下载中华医学会系列杂志论文投送介绍信及授权书(中文版), 填写有关项目并请每位作者亲笔签字, 加盖第一作者单位公章后寄 2 份至本刊编辑部, 其中作者签名顺序和作者单位著录名称应与投稿时文章中著录的相一致, 如有变更应由每位作者同意并请通信作者告知编辑部。投稿请注意: (1) 在非公开刊物发表的稿件、学术会议交流的文章不属于一稿两投, 但投稿时应向编辑部说明, 非中文文字期刊已发表的文稿再次在本刊投稿须征得首次发表期刊和本刊编辑部的同意。(2) 作者须告知与该研究有关的利益冲突, 如该研究被某机构资金资助的声明等利益关系。(3) 如涉及保密问题, 需附有关部门审查同意发表的证明。

(本刊编辑部)