

基于代谢组学和转录组学筛选丙泊酚致神经毒性关键基因的研究

李慎风 庄翌 刁玉晶 曹宏 王寿世

(青岛大学附属青岛市中心医院麻醉与围术期医学科, 山东 青岛 266042)

[摘要] **目的** 通过代谢组学和转录组学联合分析方法筛选丙泊酚致神经毒性的关键基因。**方法** 以 0、25、50、75、100 mg/L 的丙泊酚培养 HT22 细胞(分别为 Ctrl 组、P25 组、P50 组、P75 组、P100 组)24 h, 采用 CCK-8 实验检测各组细胞的活性。收集各组处理 24 h 后 HT22 细胞提取 RNA 和代谢物, 进行代谢物检测和转录组分析。对提取的各组 HT22 细胞代谢物进行液相色谱-质谱(LC-MS)分析、差异代谢物分析、趋势分析, 筛选出关键代谢物。对提取的各组 HT22 细胞 RNA 进行测序序列比对分析、差异基因分析, 筛选出差异基因。对上述筛选出的关键代谢物和差异基因进行加权基因共表达分析(WGCNA)和蛋白质相互作用网络(PPI)分析, 获得丙泊酚致神经毒性的关键基因。**结果** 各组 HT22 细胞的细胞活性随丙泊酚浓度的升高而下降($t=11.40\sim 97.25, P<0.05$)。对提取的各组 HT22 细胞代谢物进行 LC-MS 分析, 共检测到 2 701 种代谢物, 进一步经差异分析和趋势分析, 得到 49 种关键代谢物。对提取的各组 HT22 细胞 RNA 进行序列比对分析, 各组 HT22 细胞的测序序列数量能够满足数据分析需要, Ctrl 组与 P25 组、P50 组、P75 组、P100 组间的差异基因分别为 1 254、4 695、4 923 和 5 031 个。对关键代谢物以及差异基因进行 WGCNA 分析和 PPI 分析, 共筛选出了 15 种关键基因, 分别为 *NTNG2*、*ENG*、*SEMA4G*、*JAG2*、*FGF11*、*SERPINE1*、*GDF15*、*GADD45G*、*F3*、*NGF*、*FGF21*、*PGF*、*EGFL7*、*SEMA6D*、*LRFN1*。**结论** 丙泊酚所导致的神经毒性的关键基因可能包含 *NTNG2*、*ENG*、*SEMA4G*、*JAG2*、*FGF11*、*SERPINE1*、*GDF15*、*GADD45G*、*F3*、*NGF*、*FGF21*、*PGF*、*EGFL7*、*SEMA6D* 以及 *LRFN1*。筛选出的这些基因为后续丙泊酚致神经毒性的分子机制研究提供了理论基础, 同时也为丙泊酚的神经毒性预防用药和治疗用药的开发提供了研究方向。

[关键词] 海马; 神经元; 二异丙酚; 神经系统; 毒性作用; 代谢组学; 转录组

[中图分类号] R614; R971.2

[文献标志码] A

SCREENING FOR KEY GENES INVOLVED IN PROPOFOL-INDUCED NEUROTOXICITY BASED ON METABOLOMICS AND TRANSCRIPTOMICS LI Shenfeng, ZHUANG Zhao, DIAO Yujing, CAO Hong, WANG Shoushi (Department of Anesthesia and Perioperative Medicine, Qingdao Central Hospital Affiliated to Qingdao University, Qingdao 266042, China)

[ABSTRACT] **Objective** To screen for the key genes involved in propofol-induced neurotoxicity based on metabolomics and transcriptomics. **Methods** HT22 cells were cultured with propofol at concentrations of 0, 25, 50, 75, and 100 mg/L for 24 h and were established as Ctrl, P25, P50, P75, and P100 groups, respectively, and CCK-9 assay was used to measure cell viability in each group. HT22 cells were collected after 24 h of treatment to extract RNA and metabolites for metabolite detection and transcriptome analysis. The extracted HT22 cell metabolites were analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS), differentially expressed metabolites, and trend analysis to obtain the key metabolites. The RNA of HT22 cells was analyzed by sequence alignment and differentially expressed genes to obtain the differentially expressed genes. Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) and protein-protein interaction (PPI) analysis were performed for the above key metabolites and differentially expressed genes to obtain the key genes involved in propofol-induced neurotoxicity. **Results** The viability of HT22 cells decreased with the increase in propofol concentration ($t=11.40-97.25, P<0.05$). LC-MS was performed for the metabolites of HT22 cells and a total of 2 701 metabolites were identified, and 49 key metabolites were obtained through further differential analysis and trend analysis. A sequence alignment analysis of the extracted HT22 cell RNA showed that the number of sequences in each group of HT22 cells could meet the requirements for data analysis, and there were 1 254 differentially expressed genes between the Ctrl group and the P25 group, 4 695 differentially expressed genes between the Ctrl group and the P50 group, 4 923 differentially expressed genes between the Ctrl group and the P75 group, and 5 031 differentially expressed genes between the Ctrl group and the P100 group. WGCNA and PPI analyses were performed for the key metabolites and the differentially expressed genes, and a total of 15 key genes were obtained, namely *NTNG2*, *ENG*, *SEMA4G*, *JAG2*, *FGF11*, *SERPINE1*, *GDF15*, *GADD45G*, *F3*, *NGF*, *FGF21*, *PGF*, *EGFL7*, *SEMA6D*, and *LRFN1*. **Conclusion** The key genes involved in propofol-

induced neurotoxicity may include *NTNG2*, *ENG*, *SEMA4G*, *JAG2*, *FGF11*, *SERPINE1*, *GDF15*, *GADD45G*, *F3*, *NGF*, *FGF21*, *PGF*, *EGFL7*, *SEMA6D*, and *LRFN1*. These genes provide a theoretical basis for the subsequent research on the molecular

[收稿日期] 2023-05-14; **[修订日期]** 2023-07-28

[基金项目] 山东省医药卫生科技发展计划项目(202004-111322)

[通讯作者] 王寿世, Email: wangshoushi1226@126.com

mechanism of propofol-induced neurotoxicity and research directions for the development of preventive and therapeutic drugs for propofol-induced neurotoxicity.

[KEY WORDS] Hippocampus; Neurons; Propofol; Nervous system; Toxic actions; Metabolomics; Transcriptome

丙泊酚因为麻醉起效快、患者苏醒迅速及副作用少而在临床上被广泛使用^[1]。近年来,研究表明,长期或多次使用丙泊酚,特别是对发育期动物,具有诱发严重的神经毒性并影响其大脑发育的可能^[2-3]。2016 年 12 月美国食品和药物管理局发布警告称,孕晚期的孕妇以及 3 岁以下儿童长时间(超过 3 h)或频繁使用全身麻醉药,可能导致胎儿或儿童脑发育异常,批准丙泊酚仅用于≥2 个月儿童的麻醉维持和≥3 岁儿童的麻醉诱导^[4]。但目前关于丙泊酚致神经毒性的具体机制并不完全明确。本研究通过代谢组学和转录组学联合分析,筛选丙泊酚致神经毒性的关键基因,为后续丙泊酚致神经毒性的分子机制研究提供理论基础,也为丙泊酚的神经毒性预防用药和治疗用药的开发提供研究方向。

1 材料和方法

1.1 不同浓度丙泊酚对 HT22 细胞活性的影响

将小鼠海马神经细胞 HT22 细胞(上海雅吉生物科技有限公司)放置于含体积分数 0.10 的 FBS 和 100 kU/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 DMEM 中,37 °C 下于含体积分数 0.05 的 CO₂ 环境中进行培养。当细胞密度达 80%~90%时接种于 96 孔板中,每孔约 5 000 个细胞。培养 24 h 细胞贴壁后,弃去原培养液,分别加入含有 0、25、50、75、100 mg/L 丙泊酚(Ctrl 组、P25 组、P50 组、P75 组、P100 组)的 DMEM。丙泊酚货号:KM7Q-3CMN。每个浓度设置 3 个复孔,同时再设置一组无细胞孔板作为空白组。将各组细胞继续培养 24 h,换液为含有 10%的 CCK-8 溶液培养基,37 °C 下孵育 2.5 h,用酶标仪检测波长 450 nm 处各孔吸光度值,以吸光度值表示细胞活性。细胞活性=(实验组吸光度值-空白组吸光度值)/(对照组吸光度值-空白组吸光度值)×100%。

1.2 各组 HT22 细胞中代谢物和 RNA 的提取

将 HT22 细胞接种于直径 10 cm 细胞培养皿中,使用含有体积分数 0.10 的 FBS 和 100 kU/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养基,37 °C 下于含体积分数 0.05 CO₂ 的细胞培养箱中培养。当细胞密度达到 60%~70%时,弃去原培养基,更换为含不同浓度丙泊酚(Ctrl 组、P25 组、P50 组、P75 组、P100 组)的新鲜 DMEM 培养基。移入培养箱内

继续培养 24 h。实验重复 3 次,收集 3 次实验的 HT22 细胞样本,转移至 1.5 mL EP 管中,-80 °C 冰箱保存。委托广州基迪奥生物技术有限公司提取各组细胞样本中的代谢物和 RNA,用于后续分析。

1.3 各组 HT22 细胞中代谢物的代谢组学分析

1.3.1 液相色谱-质谱(LC-MS)分析 使用 QT-OF/MS-6550 质谱仪(美国 Aglient 公司)、1290 Infinity LC 超高效液相色谱仪(美国 Aglient 公司)对各组 HT22 细胞中提取出的代谢物进行检测。使用 Proteo Wizard 软件对 LC-MS 检测到的代谢物的种类和数量进行分析,结果以环形图表示。

1.3.2 差异代谢物分析 使用 R 软件的 limma 包对各组 HT22 细胞代谢物进行差异代谢物分析,获得差异代谢物的种类和数量,绘制火山图。

1.3.3 代谢物含量的趋势分析 使用 OmicShare Tools (<https://www.omicshare.com/tools>)对各组 HT22 细胞代谢物含量进行趋势分析。获得同趋势代谢物,即各浓度组与 Ctrl 组相比,细胞代谢物均有上升趋势或均有下降趋势的代谢物。将差异代谢物和同趋势代谢物取交集,得到关键代谢物。

1.4 各组 HT22 细胞 RNA 的转录组学分析

1.4.1 序列比对分析 对提取出的各组 HT22 细胞中的 RNA 构建 cDNA 文库,使用 Illumina HiSeq Xten 高通量测序仪上机测序。使用 HISAT2 软件以小鼠基因组作为参考系,进行测序序列比对分析,获得各组 HT22 细胞中的测序序列数量,并计算总映射(定位到基因组上全部的序列数占有有效序列)及其百分比和多个映射(在参考序列上有多个比对位置的序列)及其百分比。

1.4.2 差异基因分析 使用 Stringtie 重构转录本,对基因表达水平进行定量分析。基于各组 HT22 细胞中基因表达量,使用 R 软件的 limma 包分析获得各浓度组与 Ctrl 组的差异基因,并绘制火山图。

1.5 代谢组学和转录组学的联合分析

1.5.1 加权基因共表达分析(WGCNA) 将小鼠基因组按照基因表达相似性分为 29 个模块,同一模块内的基因表达相似性接近。使用 R 软件的 WGCNA 包以小鼠基因组为参考系,以关键代谢物的二级分类为表型,使用 Pearson 相关分析探究小鼠基因组各模块和 HT22 细胞关键代谢物之间的相关性,以聚类热图形式表示。提取与关键代谢物有显

著相关的小鼠基因组模块中全部基因,即相关基因。

1.5.2 蛋白质-蛋白质相互作用网络(PPI)分析 使用 R 软件将上面 WGCNA 分析获得的相关基因与转录组学分析获得的差异基因取交集,得到差异相关基因。为了解基因之间的功能关系,将差异相关基因所编码的蛋白通过 STRING 数据库(<https://string-db.org/>)和 Cytoscape 软件(3.4.0 版)进行 PPI 可视化分析,筛选出基因功能关系密切的关键基因。

1.6 统计学方法

采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行数据分析,呈正态分布的计量资料两组简单比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 Bonferroni 方法,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。基因及代谢物表达量的计算采用 FPKM 法。采用 R 软件的 limma 包进行两组间代谢物含量和基因表达水平差异分析,将错误发现率 $P < 0.05$ 和差异倍数绝对值(|Fold Change|) ≥ 1 作为差异代谢物和差异基因的筛选标准。

2 结果

2.1 各组 HT22 细胞活性比较

Ctrl 组、P25 组、P50 组、P75 组、P100 组 HT22 细胞的活性分别达到(100.70 ± 1.25)%、(81.36 ± 1.43)%、(70.76 ± 1.27)%、(30.37 ± 0.72)%、(10.27 ± 0.86)%,各组间比较差异有显著性($F = 3\ 221.00$, $P < 0.05$),进一步行各组间 HT22 细胞活性两两比较,差异均具有显著性,并呈现剂量依赖性下降($t = 11.40 \sim 97.25$, $P < 0.05$)。

2.2 各组 HT22 细胞中代谢物的代谢组学分析

2.2.1 LC-MS 分析 LC-MS 分析结果显示,从各组 HT22 细胞代谢物中共检测到 2 701 种代谢物,其中属于二级分类的有 620 种,一级分类的有 23 种,占比最多的是苯及其取代衍生物,见图 1。环形图中不同颜色代表不同代谢物一级分类,色块长度表示其所占比例;Class 代表所检测到的代谢物的一级分类。

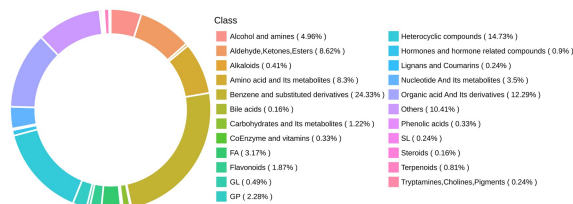


图 1 代谢物种类和数量的环形图

2.2.2 差异代谢物分析

Ctrl 组与 P50 组间的差异代谢物共有 21 个,其中上调的 6 个,下调的 15 个(图 2B);Ctrl 组与 P75 组间的差异代谢物共有 27 个,其中上调的 6 个,下调的 21 个(图 2C);Ctrl 组与 P100 组间的差异代谢物共有 67 个,其中上调的 55 个,下调的 12 个(图 2D)。

2.2.3 趋势分析 各浓度组与 Ctrl 组相比,随丙泊酚浓度升高均持续上升的代谢物共有 208 种,没有发现随丙泊酚浓度升高均持续下降的代谢物。与上面获得的所有差异代谢物取交集,共得到 49 种关键代谢物。

2.3 各组 HT22 细胞中 RNA 的转录组学分析

2.3.1 序列比对分析 RNA 序列比对分析结果显示,Ctrl 组、P25 组、P50 组、P75 组及 P100 组总有效序列数分别为 46 308 970、42 145 574、39 362 782、45 367 077、46 692 981;总映射及其百分比分别为 42 232 951(91.20%)、39 633 550(94.04%)、35 152 896(89.30%)、42 430 229(93.53%)、44 139 716(94.53%),多个映射及其百分比分别为 3 537 096(7.64%)、2 459 613(5.84%)、3 369 032(8.56%)、2 685 366(5.92%)、2 271 619(4.86%)。各组总映射百分比 $> 70\%$,多个映射百分比均 $< 10\%$,说明各组 HT22 细胞的测序序列数量符合要求,能够满足数据分析需要。

2.3.2 差异基因分析 Ctrl 组与 P25 组的差异基因共有 1 254 个,其中上调的 1 130 个,下调的 124 个(图 3A);Ctrl 组与 P50 组的差异基因共有 4 695 个,其中上调的 2 544 个,下调的 2 151 个(图 3B);Ctrl 组与 P75 组的差异基因共有 4 923 个,其中上调的 2 324 个,下调的 2 599 个(图 3C);Ctrl 组与 P100 组间的差异基因共有 5 031 个,其中上调的 2 704 个,下调的 2 327 个(图 3D)。

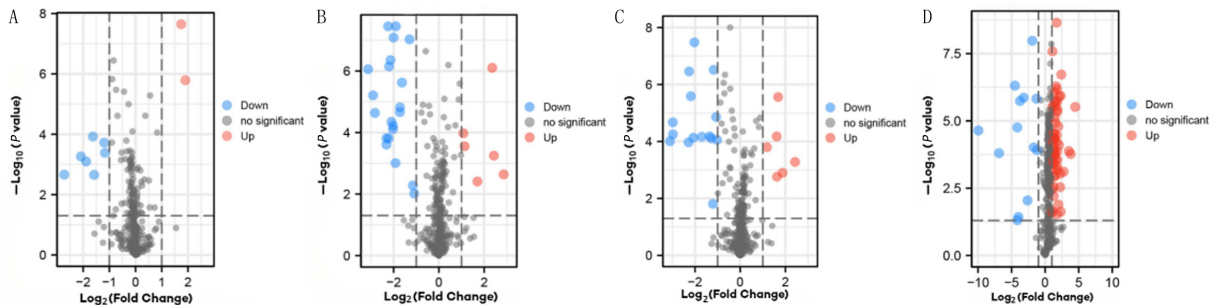
2.4 代谢组学和转录组学联合分析

2.4.1 小鼠基因组和 HT22 细胞关键代谢物的 WGCNA 分析 WGCNA 分析结果显示,小鼠的基因组模块当中 navajowhite2、darkolivegreen 模块与 HT22 细胞关键代谢物呈正相关,floralwhite、white 模块与 HT22 细胞关键代谢物呈负相关(图 4)。上面 4 个小鼠基因组模块当中共包含有 5 698 个相关基因。

2.4.2 差异相关基因的 PPI 分析 相关基因与所有差异基因取交集,共得到 88 个差异相关基因。PPI 分析结果显示,有 15 种蛋白之间关系密切,其

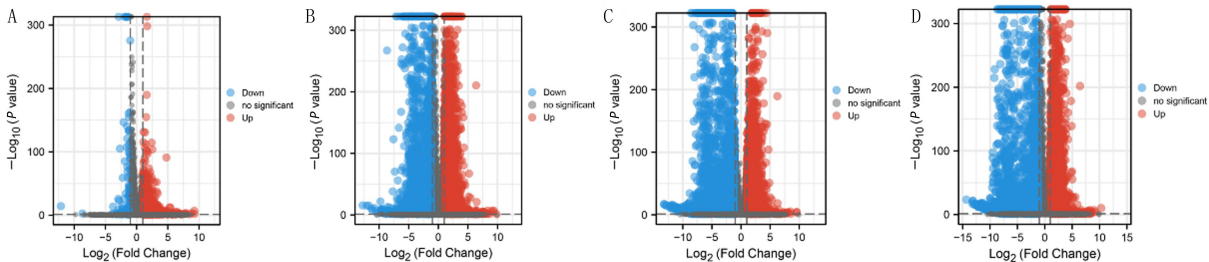
所对应的基因分别为 *NTNG2*、*ENG*、*SEMA4G*、*JAG2*、*FGF11*、*SERPINE1*、*GDF15*、*GADD45G*、

F3、*NGF*、*FGF21*、*PGF*、*EGFL7*、*SEMA6D*、*LR-FN1*，即为关键基因。



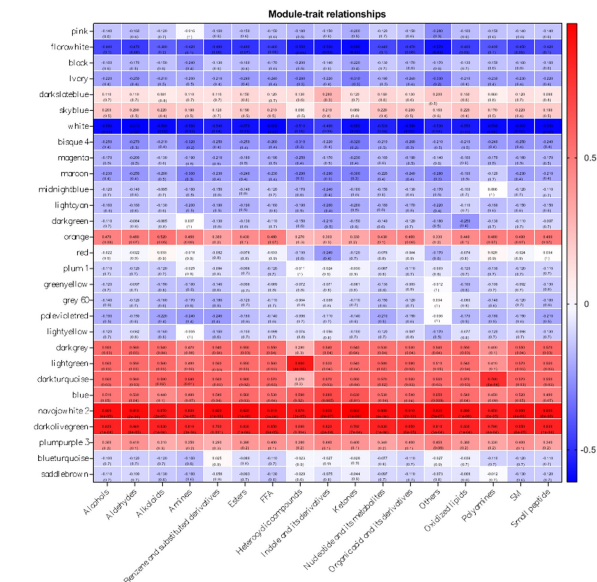
A、B、C、D 分别为 Ctrl 组与 P25 组、P50 组、P75 组、P100 组的差异代谢物分析；绿色表示下调，灰色表示无统计学差异，红色表示上调

图 2 Ctrl 组与各浓度组间的差异代谢物的火山图



A、B、C、D 分别为 Ctrl 组与 P25、P50 组、P75 组、P100 组的差异基因分析；红色表示上调，蓝色表示下调

图 3 Ctrl 组与各浓度组间差异基因的火山图



横坐标代表 HT22 细胞代谢物的 2 级分类，纵坐标为小鼠基因组的 29 个模块；图中的括号外数值代表 Pearson 相关系数，绝对值越接近 1 代表相关性越强；括号内数值代表 P 值， $P < 0.05$ 有统计学差异。红色代表模块基因与各类代谢物呈正相关，蓝色代表各类模块基因与代谢物呈负相关

图 4 小鼠基因组模块与 HT22 细胞关键代谢物的相关性分析聚类热图

3 讨论

丙泊酚已有 30 余年的临床应用史，目前是临床中最常用的静脉麻醉药物，主要用于患者的麻醉诱

导和维持。然而丙泊酚应用于患儿时，对处于发育期患儿大脑的安全性一直存在争议^[5]。近年多项研究表明丙泊酚对啮齿类、斑马鱼、恒河猴等发育期动物可产生神经毒性，导致神经元死亡和长期的神经行为损伤^[3, 6-7]。然而关于丙泊酚致神经毒性的关键基因以及分子机制尚不明确，因此了解丙泊酚致神经毒性的关键基因及其相关分子机制至关重要。

本研究中 CCK-8 实验检测结果显示，随丙泊酚浓度升高，HT22 细胞活性显著下降，提示丙泊酚对 HT22 细胞存在神经毒性，且其毒性作用随丙泊酚浓度的升高而升高。对不同浓度丙泊酚处理 HT22 细胞 24 h 后，提取各组细胞中的代谢物进行代谢组学分析，LC-MS 分析显示，共检测到 2 701 种代谢物；进一步对这 2 701 种代谢物进行各组间差异分析和趋势分析，最终获得了 49 种关键代谢物。对不同浓度丙泊酚处理 HT22 细胞 24 h 后，提取细胞中的 RNA 进行转录组学分析，获得 Ctrl 组和各浓度组之间的差异基因。最后进行代谢组学和转录组学的联合分析，以小鼠基因组为参考系，以关键代谢物为表型，进行 WGCNA 分析，筛选出相关基因；将差异基因与相关基因取交集，得到 88 个差异相关基因。为进一步了解基因之间功能联系，筛选出关键基因，对这 88 个基因所编码的蛋白进行 PPI 分析，发现 15 个基因(*NTNG2*、*ENG*、*SEMA4G*、*JAG2*、

FGF11、*SERPINE1*、*GDF15*、*GADD45G*、*F3*、*NGF*、*FGF21*、*PGF*、*EGFL7*、*SEMA6D*、*LRFN1*) 所编码蛋白之间关系密切,即为本研究最终获得的关键基因。

NGF 对神经元的发育、分化和存活起着关键作用。为了探索 *NGF* 在丙泊酚致神经毒性中的作用,研究发现,*NGF* 可通过 *Rac1* 信号通路对体外培养的新生大鼠海马神经元发挥神经保护作用,从而减轻丙泊酚诱导的海马神经元凋亡^[8]。*NTNG2* 编码膜锚定蛋白 *netrin-G2*,敲低小鼠 *NTNG2* 基因会导致小鼠神经元形态严重受损以及皮质神经元迁移障碍^[9],使小鼠在学习、记忆、视觉和运动功能方面存在明显缺陷^[10]。*FGF11* 属于成纤维细胞生长因子信号蛋白家族,可能参与神经系统的发育和功能的维持^[11-12]。研究显示,在有机磷导致的中国珍稀米诺鱼的神经毒性研究中,*FGF11* 发挥了重要作用^[13]。*F3* 是一种糖基磷脂酰肌醇锚定的糖蛋白,参与神经元发育、突触维持和神经元网络的形成,可能影响神经元凋亡和 β -淀粉样蛋白(A β)的产生^[14]。*EGFL7* 是表皮生长因子样蛋白家族的成员,在神经系统中,*EGFL7* 通过 Notch 通路促进神经干细胞形成神经元^[15]。用分泌 *EGFL7* 的间充质干细胞治疗新生小鼠缺血缺氧性脑损伤,能够改善其运动功能^[16]。*SERPINE1* 是纤溶酶原激活抑制剂,能够阻断纤溶酶原向纤溶酶的转化,在中枢神经系统中对于神经元的迁移、成熟突触的连接等过程起着重要作用^[17]。纤维蛋白溶解系统能够调节中枢神经系统内的炎症和退行性事件。小鼠大脑中长期升高的 *SERPINE1* 水平可能通过抑制纤溶酶依赖性的 A β 的降解,引起 A β 的累积,进而促进其阿尔兹海默症的进展^[18]。*GDF15* 是转化生长因子- β 超家族的一员,研究证明 *GDF15* 可通过 p62-Keap1-Nrf2 信号通路抑制脊髓损伤后神经元氧化应激依赖性铁死亡,减轻神经损伤,从而促进脊髓损伤小鼠运动功能恢复^[19]。*FGF21* 能够通过其多种代谢调节作用和抗炎作用改善肥胖诱导的小鼠认知功能障碍和焦虑样行为^[20]。*PGF* 是一种血管生成因子,在病理条件下可发挥神经营养和神经保护的作用^[21]。以上的研究均表明,*NTNG2*、*FGF11*、*F3*、*EGFL7*、*SERPINE1*、*GDF15*、*FGF21*、*PGF* 基因均在神经损伤的过程中发挥着重要作用,但这些基因在丙泊酚致神经毒性的研究中尚未见相关报道,结合本研究的筛选结果,它们可能是丙泊酚致神经毒性的关键基因。

除此之外,既往的研究发现,*SEMA4G*、*JAG2*、*GADD45G*、*SEMA6D*、*LRFN*、*ENG* 基因在轴突引导^[22-23]、神经系统发育^[24-25]、新皮质形成^[26]等过程中均发挥重要作用,但尚未见这些基因与神经毒性或者神经损伤有关联的报道,结合本研究的筛选结果,这些基因可能是丙泊酚导致神经毒性的潜在靶点。

综上所述,通过代谢组学和转录组学联合分析,丙泊酚致神经毒性的关键基因为 *NTNG2*、*ENG*、*SEMA4G*、*JAG2*、*FGF11*、*SERPINE1*、*GDF15*、*GADD45G*、*F3*、*NGF*、*FGF21*、*PGF*、*EGFL7*、*SEMA6D*、*LRFN1*,为后续丙泊酚致神经毒性的分子机制研究提供了理论基础,同时也为丙泊酚的神经毒性预防和治疗用药的开发提供了研究方向。

作者声明:李慎风、庄翌参与了研究设计;李慎风、王寿世、刁玉晶、曹宏参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文,且均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] NISHIZAWA T, SUZUKI H. Propofol for gastrointestinal endoscopy[J]. United European Gastroenterol J, 2018, 6(6): 801-805.
- [2] WANG M Y, SUO L Y, YANG S, et al. CircRNA 001372 reduces inflammation in propofol-induced neuroinflammation and neural apoptosis through PIK3CA/akt/NF- κ B by miRNA-148b-3p[J]. J Investig Surg, 2021, 34(11):1167-1177.
- [3] CREELEY C, DIKRANIAN K, DISSEN G, et al. Propofol-induced apoptosis of neurones and oligodendrocytes in fetal and neonatal rhesus macaque brain[J]. Br J Anaesth, 2013, 110: i29-i38.
- [4] MALHOTRA A, YOSH E, XIONG M. Propofol's effects on the fetal brain for non-obstetric surgery[J]. Brain Sci, 2017, 7(8):107.
- [5] BOSNJAK Z J, LOGAN S, LIU Y N, et al. Recent insights into molecular mechanisms of propofol-induced developmental neurotoxicity: Implications for the protective strategies[J]. Anesth Analg, 2016, 123(5):1286-1296.
- [6] SHE Y J, XU H P, GAO Y, et al. Calcain-TRPC6 signaling pathway contributes to propofol-induced developmental neurotoxicity in rats[J]. Neuro Toxicology, 2023, 95:56-65.
- [7] JIANG N, LI X X, WANG Q, et al. Ecological risk assessment of environmentally relevant concentrations of propofol on zebrafish (*Danio rerio*) at early life stage: Insight into physiological, biochemical, and molecular aspects[J]. Chemosphere, 2023, 316:137846.
- [8] LI X Z, ZHAO Z F, HUANG L N, et al. The anti-apoptotic effect of nerve growth factor on propofol-induced neurotoxicity in hippocampal neurons is *Rac1* dependent[J]. Pharmazie, 2023, 78(1):1-6.

2018,73(12):706-710.

[9] HEIMER G, VAN WOERDEN G M, BAREL O, et al. Netrin-G2 dysfunction causes a rett-like phenotype with areflexia [J]. *Hum Mutat*, 2020,41(2):476-486.

[10] DIAS C M, PUNETHA J, ZHENG C, et al. Homozygous missense variants in NTNG2, encoding a presynaptic netrin-G2 adhesion protein, lead to a distinct neurodevelopmental disorder[J]. *Am J Hum Genet*, 2019,105(5):1048-1056.

[11] LUO Y Q, CAI J L, LIU Y, et al. Microarray analysis of selected genes in neural stem and progenitor cells[J]. *J Neurochem*, 2002,83(6):1481-1497.

[12] ZHANG X, BAO L, YANG L, et al. Roles of intracellular fibroblast growth factors in neural development and functions [J]. *Sci China Life Sci*, 2012,55(12):1038-1044.

[13] YUAN L, LI J, ZHA J, et al. Targeting neurotrophic factors and their receptors, but not cholinesterase or neurotransmitter, in the neurotoxicity of TDCPP in Chinese rare minnow adults (*Gobiocypris rarus*) [J]. *Environ Pollut*, 2016,208(Pt B): 670-677.

[14] GULISANO W, BIZZOCA A, GENNARINI G, et al. Role of the adhesion molecule F3/Contactin in synaptic plasticity and memory[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2017,81:64-71.

[15] HONG G J, KUEK V, SHI J X, et al. EGFL7: Master regulator of cancer pathogenesis, angiogenesis and an emerging mediator of bone homeostasis [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233 (11):8526-8537.

[16] VAN VELTHOVEN C T, BRACCIOLI L, WILLEMEN H L, et al. Therapeutic potential of genetically modified mesenchymal stem cells after neonatal hypoxic-ischemic brain damage[J]. *Mol Ther*, 2014,22(3):645-654.

[17] VIVIEN D, BUISSON A. Serine protease inhibitors: Novel therapeutic targets for stroke? [J]. *J Cereb Blood Flow & Metab*, 2000,20:755-764.

[18] KUTZ S M, HIGGINS C E, HIGGINS P J. Novel combinato-

rial therapeutic targeting of PAI-1 (SERPINE1) gene expression in Alzheimer's disease[J]. *Mol Med Ther*, 2012,1(2): 106.

[19] XIA M J, ZHANG Q Y, ZHANG Y N, et al. Growth differentiation factor 15 regulates oxidative stress-dependent ferroptosis post spinal cord injury by stabilizing the p62-Keap1-Nrf2 signaling pathway[J]. *Front Aging Neurosci*, 2022,14: 905115.

[20] WANG Q Z, YUAN J, YU Z Y, et al. FGF21 attenuates high-fat diet-induced cognitive impairment via metabolic regulation and anti-inflammation of obese mice[J]. *Mol Neurobiol*, 2018,55(6):4702-4717.

[21] CHABALLE L, SCHOENEN J, FRANZEN R. Placental growth factor: A tissue modelling factor with therapeutic potentials in neurology? [J]. *Acta Neurol Belg*, 2011,111(1): 10-17.

[22] KIMURA M, TANIGUCHI M, MIKAMI Y, et al. Identification and characterization of zebrafish semaphorin 6D[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007,363(3):762-768.

[23] LI H Z, WU D K, SULLIVAN S L. Characterization and expression of sema4g, a novel member of the semaphorin gene family[J]. *Mech Dev*, 1999,87(1-2):169-173.

[24] MORIMURA N, INOUE T, KATAYAMA K I, et al. Comparative analysis of structure, expression and PSD95-binding capacity of Lrln, a novel family of neuronal transmembrane proteins[J]. *Gene*, 2006,380(2):72-83.

[25] STUMP G, DURRER A, KLEIN A L, et al. Notch1 and its ligands Delta-like and Jagged are expressed and active in distinct cell populations in the postnatal mouse brain[J]. *Mech Dev*, 2002,114(1-2):153-159.

[26] RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ P, FERNÁNDEZ-MESSINA L, OVEJERO-BENITO M C, et al. Growth arrest and DNA damage-inducible proteins (GADD45) in psoriasis [J]. *Sci Rep*, 2021,11:14579. (本文编辑 耿波 厉建强)

(上接第 327 页)

[14] GRAY J M, RASANAYAGAM S, ENGEL C, et al. State of the evidence 2017: An update on the connection between breast cancer and the environment[J]. *Environ Health*, 2017,16(1): 94.

[15] CHENG I, TSENG C C, WU J, et al. Association between ambient air pollution and breast cancer risk: The multiethnic cohort study[J]. *Int J Cancer*, 2020,146(3):699-711.

[16] KOUAL M, TOMKIEWICZ C, CANO-SANCHO G, et al. Environmental chemicals, breast cancer progression and drug resistance[J]. *Environ Health*, 2020,19(1):117.

[17] HAGER E, CHEN J G, ZHAO L. Minireview: Parabens exposure and breast cancer[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022,19(3):1873.

[18] BUJA A, PIERBON M, LAGO L, et al. Breast cancer primary prevention and diet: An umbrella review[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2020,17(13):4731.

[19] LEE J E. Diet before and after breast cancer[M]//Advances in Experimental Medicine and Biology. Singapore: Springer Singapore, 2021:545-566.

[20] TYAGI A, SHARMA S, WU K R, et al. Nicotine promotes breast cancer metastasis by stimulating N2 neutrophils and generating pre-metastatic niche in lung [J]. *Nat Commun*, 2021,12(1):474.

[21] JORDAHL K M, MALONE K E, BAGLIA M L, et al. Alcohol consumption, smoking, and invasive breast cancer risk after ductal carcinoma in situ [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2022,193(2):477-484.

[22] 刘芳盈,赵志强,孟超,等. 淄博市生活饮用水中硝酸盐暴露及其健康风险的时空分布特征[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2021,59(12):50-57.

[23] 李玲,李广益,赵宪,等. 2018 年淄博市居民健康素养现状及影响因素分析[J]. *预防医学论坛*, 2020,26(8):578-583.

(本文编辑 耿波 厉建强)