

神经调节素 1 β 对氧糖剥夺/复氧诱导 PC12 细胞损伤的保护作用及其机制

孙珊珊¹ 于曦² 翟秋月² 于竹芹³

(1 山东大学齐鲁医院(青岛)神经内科,山东 青岛 266035; 2 青岛大学医学部中西医结合中心; 3 青岛大学医学院松山医院内科)

[摘要] 目的 探讨神经调节素 1 β (NRG1 β)对氧糖剥夺/复氧(OGD/R)诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用及其机制。方法 建立 PC12 细胞 OGD/R 模型,随机分为对照组(常规培养)、模型组(OGD/R 处理)以及干预组(给予 OGD/R 处理+NRG1 β 干预),采用细胞计数试剂盒(CCK-8)检测各组细胞的活力,采用荧光强度分析技术检测各组细胞活性氧(ROS)水平,采用荧光分光光度法检测各组细胞丙二醛(MDA)水平及还原型谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽(GSH/GSSG)吸光度比值,采用透射电镜观察各组细胞线粒体损伤情况,采用 Western blot 方法检测各组细胞中谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)的表达情况。结果 与对照组比较,模型组的细胞活力显著下降($t=25.76, P<0.01$),ROS 水平显著升高($t=12.43, P<0.01$),GSH/GSSG 吸光度比值显著降低($t=9.17, P<0.01$),MDA 水平显著升高($t=29.46, P<0.01$);与模型组比较,干预组的细胞活力显著升高($t=8.03, P<0.01$),ROS 水平显著降低($t=10.34, P<0.01$),GSH/GSSG 吸光度比值显著升高($t=15.71, P<0.01$),MDA 水平显著降低($t=2.96, P<0.05$)。透射电镜结果显示,与对照组相比,模型组线粒体损伤增加,NRG1 β 干预后减缓了线粒体损伤。Western blot 方法显示,模型组 GPX4 表达水平较对照组显著降低($t=23.06, P<0.01$),而干预组较模型组显著升高($t=6.07, P<0.05$)。结论 NRG1 β 可通过影响铁死亡关键蛋白 GPX4 的表达,缓解 OGD/R 诱导的 PC12 细胞损伤。

[关键词] 神经调节蛋白 1;PC12 细胞;铁死亡;谷胱甘肽过氧化物酶;氧糖剥夺/复氧

[中图分类号] R329.2

[文献标志码] A

PROTECTIVE EFFECT OF NEUREGULIN1 β ON OXYGEN-GLUCOSE DEPRIVATION/REOXYGENATION-INDUCED PC12 CELL INJURY AND ITS MECHANISM SUN Shanshan, YU Xi, ZHAI Qiuyue, YU Zhuqin (Department of Neurology, Qilu Hospital of Shandong University (Qingdao), Qingdao 266035, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the protective effect of neuregulin1 β (NRG1 β) on PC12 cell injury induced by oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) and its mechanism. **Methods** OGD/R models of PC12 cells were established and randomly divided into control group (routinely cultured), model group (OGD/R-treated), and intervention group (treated with OGD/R and intervened by NRG1 β). The cell viability of each group was measured by cell counting kit-8. The levels of reactive oxygen species (ROS) were measured by fluorescence intensity analysis. The levels of malondialdehyde (MDA) and the absorbance ratio of reduced glutathione/oxidized glutathione (GSH/GSSG) were measured by fluorescence spectrophotometry. Mitochondrial damage in each group was observed under a transmission electron microscope. The expression of glutathione peroxidase 4 (GPX4) was measured by Western blot. **Results** Compared with the control group, the model group had significantly decreased cell viability ($t=25.76, P<0.01$), a significantly increased ROS level ($t=12.43, P<0.01$), a significantly decreased absorbance ratio of GSH/GSSG ($t=9.17, P<0.01$), and a significantly increased MDA level ($t=29.46, P<0.01$). Compared with the model group, the intervention group showed significantly increased cell viability ($t=8.03, P<0.01$), a significantly decreased ROS level ($t=10.34, P<0.01$), a significantly increased absorbance ratio of GSH/GSSG ($t=15.71, P<0.01$), and a significantly decreased MDA level ($t=2.96, P<0.05$). Transmission electron microscopy results showed that mitochondrial damage was increased in the model group compared with the control group, and NRG1 β intervention alleviated mitochondrial damage. Western blot analysis showed that the GPX4 protein expression was significantly lower in the model group than in the control group ($t=23.06, P<0.01$), and significantly higher in the intervention group than in the model group ($t=6.07, P<0.05$). **Conclusion** NRG1 β can alleviate PC12 cell injury induced by OGD/R through regulating the expression of GPX4, a key protein of ferroptosis.

[KEY WORDS] Neuregulin-1;PC12 Cells; Ferroptosis; Glutathione peroxidase; Oxygen-glucose deprivation/reoxygenation

随着世界人口的老齡化,缺血性卒中的发病率逐年增加^[1]。目前普遍认为,脑缺血后血液供应恢复对于挽救缺血区受损组织、降低缺血性卒中患者

的残疾率和病死率至关重要。然而,再灌注也会引起一系列细胞应激反应,加重神经血管损伤,导致血-脑屏障破坏和神经细胞死亡,造成脑缺血再灌注损伤^[2-4]。据报道,神经调节素 1 β (NRG1 β)在大脑海马、大脑皮质、梨状皮质等部位均有表达,可减轻脑卒中后的脑损伤^[5-6]。本课题组的前期研究发现,

[收稿日期] 2023-09-19; **[修订日期]** 2023-10-13

[基金项目] 青岛大学医疗集团科研专项(2021-36)

[通讯作者] 于竹芹,Email:yuzhuq2008@163.com

NRG1 β 可通过调节大鼠脑缺血再灌注损伤后缺血半影区神经细胞的 JNK 和 Cdk5 信号转导通路发挥神经保护作用^[7-8]。最新研究表明,缺血半影区神经细胞铁死亡与脑缺血再灌注损伤密切相关^[9-10]。GUAN 等^[11]指出,香芹酮可通过增强缺血半影区神经细胞谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)的表达来抑制铁死亡,从而修复缺血再灌注损伤引起的海马神经元损伤。因此,抑制铁死亡可能是干预脑缺血再灌注损伤的潜在治疗方法。基于上述研究,本研究将构建 PC12 细胞氧糖剥夺/复氧(OGD/R)模型,旨在探讨 NRG1 β 对 OGD/R 诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

PC12 细胞系购自上海 iCell 公司;CCK-8 试剂盒、ROS 荧光检测试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒、还原型谷胱甘肽(GSH)试剂盒、氧化型谷胱甘肽(GSSG)试剂盒、RIPA 裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司,BCA 蛋白定量试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司, β -actin 抗体购自武汉 Proteintech 公司,GPX4 抗体购买于成都正能生物有限公司。

1.2 OGD/R 模型构建及细胞分组

将 PC12 细胞接种于 96 孔板中,待汇合度达到 70%~80%时将原培养基(改良型 RPMI 培养液+体积分数 0.10 的马血清+体积分数 0.05 的胎牛血清+10 g/L 双抗)更换为无糖 RPMI-1640 培养液,转移至厌氧盒中(含体积分数 0.94 N₂、体积分数 0.01 O₂和体积分数 0.05 CO₂)继续培养 6 h 完成氧糖剥夺后,更换为原培养基置于培养箱复氧(O₂体积分数 0.21)培养 48 h。然后将 PC12 细胞分为对照组、模型组和干预组,每组均设置 2 个复孔,实验重复 3 次。对照组使用原培养基培养 72 h,模型组在复氧培养结束后,更换为原培养基处理 48 h,干预组同样更换为原培养基并且加入 NRG1 β (终浓度 10 nmol/L)处理 48 h。

1.3 各组细胞形态观察及活力检测

细胞 OGD/R 48 h 后,将孔板直接置于倒置显微镜下,观察各组细胞的细胞形态。各组细胞处理结束后,以 PBS 洗涤孔板中的细胞 2 次,然后每孔中按照 10:1 加入细胞培养液和 CCK8 检测液,置于培养箱 37 °C 下孵育 90 min。使用酶标仪测定波长 450 nm 处各孔的吸光度值,计算各组细胞的细

胞活力。细胞活力=(实验组吸光度均值-空白组吸光度均值)/(对照组吸光度均值-空白组吸光度均值) \times 100%。

1.4 细胞中活性氧(ROS)水平检测

各组细胞处理结束后,以 PBS 洗涤细胞 2 次,然后每孔按 DCFH-DA 和 PBS 1:1 000 比例加入稀释好的 DCFH-DA 工作液(终浓度为 10 μ mol/L) 100 μ L,置于培养箱 37 °C 下孵育 20 min 后,用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次,设置酶标仪(激发波长 488 nm,发射波长 525 nm,检测波长 450 nm),检测各组细胞的荧光强度,以荧光强度来表示细胞中 ROS 水平。

1.5 细胞中 MDA 水平的检测和 GSH/GSSG 吸光度比值的计算

各组细胞处理结束后,首先加适量 RIPA 充分裂解细胞,然后按照试剂盒说明书的要求,分别配置 MDA 和 GSH/GSSG 检测所需试剂,并按照要求依次加入相关试剂。反应完成后,以酶标仪分别测定 532 nm(MDA)和 560 nm(GSH/GSSG)波长处的吸光度值,并绘制相应的标准曲线,计算各组细胞中 MDA 的相对含量和 GSH/GSSG 吸光度比值。

1.6 透射电镜观察各组细胞的超微结构

各组细胞处理结束后,将 96 孔板置于 25 g/L 的戊二醛中 4 °C 下固定过夜,再经 10 g/L 的锇酸处理 2 h,以 PBS 洗涤细胞 3 次,每次 20 min;梯度乙醇脱水后,置于丙酮中渗透,于包埋板中完成包埋。采用超薄切片机将包埋烘干好的样品以 50 nm 厚切片后置于铜网上,硝酸铅和醋酸铀染色,透射电子显微镜下观察各组细胞的超微结构。

1.7 Western blot 方法检测细胞中 GPX4 蛋白相对表达水平

各组细胞处理结束后,加适量 RIPA 裂解液充分裂解细胞,加入 5 \times SDS 煮沸后变性处理,BCA 法检测蛋白的浓度。根据配胶试剂盒说明书配制 10%凝胶,加入 10~20 μ L 各组细胞提取的蛋白样品,100 V 恒压电泳后,120 V 恒压转膜;然后依次用脱脂奶粉进行封闭和 β -actin 及 GPX4 一抗孵育,次日,以辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)二抗孵育 2 h 后显影。应用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值。以同一标本的 β -actin 为内参照,目的蛋白与 β -actin 条带灰度值的比值即为目的蛋白相对表达量,试验重复 3 次,结果取均值。

1.8 统计分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,计量资

料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,3 组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Dunnett t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有显著意义。

2 结果

2.1 3 组细胞形态及活力比较

OGD/R 48 h 后,倒置显微镜下观察发现,对照组 PC12 细胞呈圆形或不规则形贴壁生长,细胞透亮,生长速度较快(图 1A);模型组细胞生长缓慢,可见部分死亡后漂浮的细胞(图 1B);与模型组相比,干预组细胞生长状态和速度均有改善(图 1C)。对照组、模型组和干预组细胞活力分别为 91.09 ± 1.44 、 62.18 ± 2.49 、 71.69 ± 2.35 ,3 组比较差异有显著性($F = 48.031, P < 0.01$);与对照组相比,模型组细胞活力显著降低($t = 25.76, P < 0.01$);与模型组相比,干预组细胞活力显著升高($t = 8.03, P < 0.05$)。

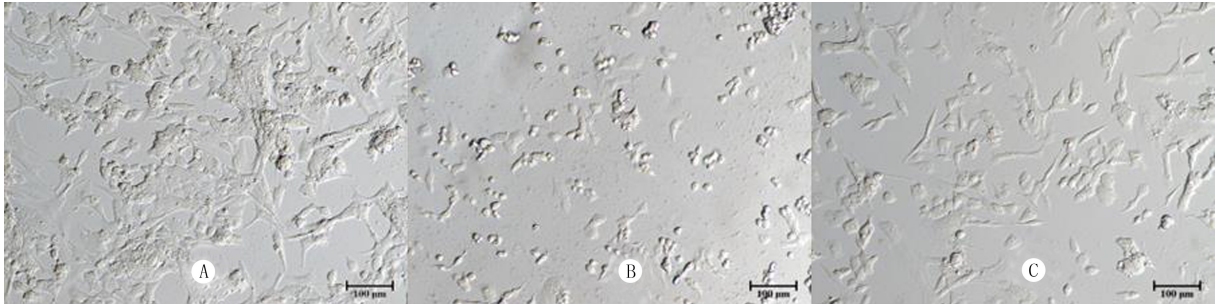
2.2 3 组细胞中 ROS、MDA 水平及 GSH/GSSG 吸光度比值比较

荧光显微镜下观察显示,对照组细胞中绿色荧

光较弱(图 2A),模型组细胞中绿色荧光较亮(图 2B),干预组细胞中绿色荧光变暗(图 2C)。酶标仪检测结果显示,3 组 PC12 细胞中 ROS、MDA 水平及 GSH/GSSG 吸光度比值比较具有显著差异($F = 7.118 \sim 58.724, P < 0.05$);模型组细胞中 ROS 水平较对照组显著升高($t = 12.43, P < 0.01$),干预组细胞的 ROS 水平较模型组显著降低($t = 10.34, P < 0.01$),模型组细胞 GSH/GSSG 吸光度比值较对照组显著降低($t = 9.17, P < 0.01$),干预组较模型组显著升高($t = 15.71, P < 0.01$);模型组细胞中 MDA 水平相较于对照组显著升高($t = 29.46, P < 0.01$),干预组较模型组则显著降低($t = 2.96, P < 0.05$)。见表 1。

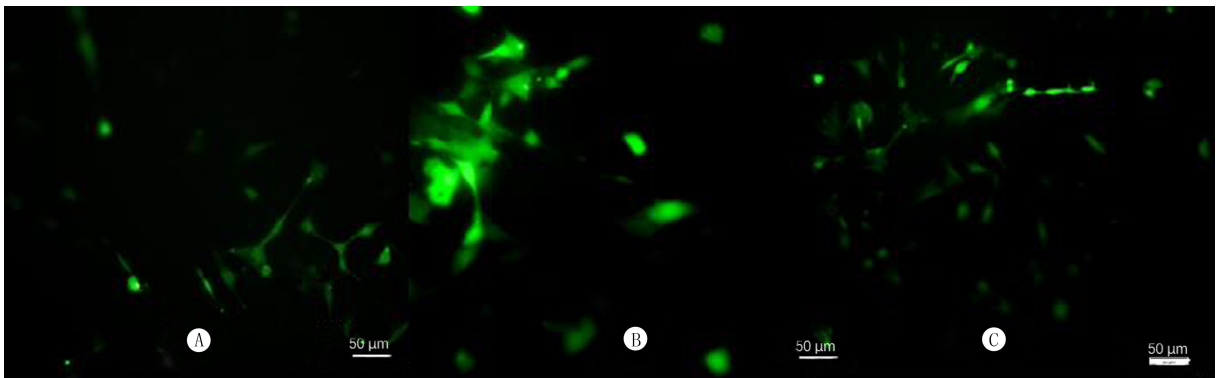
表 1 3 组细胞中 ROS、MDA 水平及 GSH/GSSG 吸光度比值比较($n = 6, \bar{x} \pm s$)

分组	ROS(A)	MDA	GSH/GSSG 吸光度比值
对照组	1.52 ± 0.06	0.084 ± 0.008	3.17 ± 0.35
模型组	2.00 ± 0.07	0.249 ± 0.016	2.07 ± 0.09
干预组	1.76 ± 0.03	0.194 ± 0.064	3.17 ± 0.20



A: 对照组, B: 模型组, C: 干预组, 100 倍

图 1 各组细胞的形态观察



A: 对照组, B: 模型组, C: 干预组, DCFH-DA 荧光染色, 200 倍

图 2 3 组细胞中 ROS 水平比较

2.3 3 组细胞中线粒体损伤情况比较

透射电镜观察结果显示,对照组细胞中线粒体形态规则,结构完整,线粒体嵴排列有序(图 3A);和对照组及干预组相比,模型组线粒体损伤较重,表现

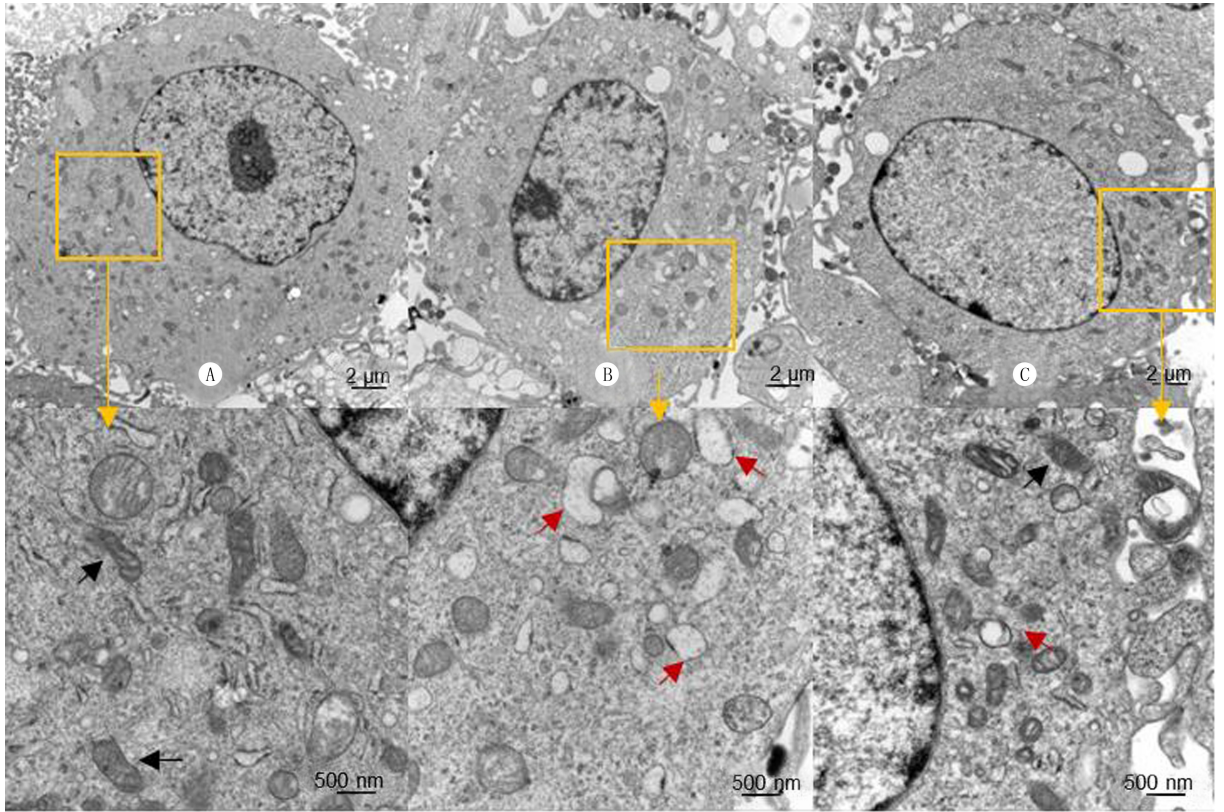
为线粒体内膜破裂,线粒体嵴消失(图 3B);与模型组相比,干预组线粒体损伤得到一定改善(图 3C)。

2.4 3 组细胞中 GPX4 蛋白相对表达水平比较

Western blot 方法检测显示,对照组、模型组和

干预组细胞中 GPX4 蛋白的相对表达水平分别为 1.58 ± 0.02 、 0.75 ± 0.07 、 1.09 ± 0.09 ，3 组比较差异具有显著性 ($F = 37.498$, $P < 0.05$)；模型组细胞中

GPX4 蛋白的相对表达水平较对照组显著降低 ($t = 23.06$, $P < 0.01$)，干预组细胞中 GPX4 相对表达水平较模型组显著升高 ($t = 6.07$, $P < 0.05$)。见图 4。



A: 对照组, B: 模型组, C: 干预组; 铅染色, 上排放大倍数 12 000 倍, 下排为上排黄色框中局部区域的放大(50 000 倍); 图中黑色箭头指示正常线粒体, 红色箭头指示损伤线粒体

图 3 3 组细胞中线粒体损伤情况比较

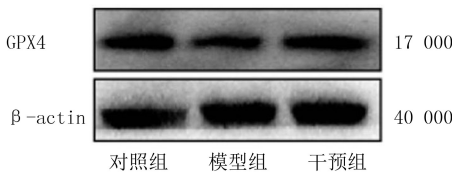


图 4 3 组细胞中 GPX4 蛋白相对表达水平比较

3 讨 论

既往研究显示, 脑缺血再灌注损伤是一个复杂病理生理过程, 是兴奋性毒性、钙失调、氧化应激、炎症反应和细胞凋亡等相互作用的结果^[12-13]。神经保护剂治疗可能是一种潜在的干预脑缺血再灌注损伤的策略。

NRG 属表皮生长因子家族, 通过激活 ErbBs 蛋白的受体酪氨酸激酶进行一系列信号转导, 从而发挥生物学作用。根据编码基因的不同, NRG 可以分为 NRG1~NRG4 4 种同分异构体^[14]。NRG1 β /ErbB4 信号传导与神经元迁移、轴突引导、神经胶质细胞发育、轴突髓鞘化、发育中的突触形成以及成人

大脑突触的可塑性有关^[15]。NRG1 β 可以保护神经元免受缺血性损伤, 并且 NRG1 β 通过抑制促炎反应和 PI3K/Akt 信号通路发挥神经保护作用^[16]。本项目组前期的研究表明, 在大鼠脑缺血再灌注损伤模型中, NRG1 β 能够通过抑制缺血半影区神经细胞 Cdk5 信号通路, 降低神经元凋亡, 减小脑梗死体积, 改善大鼠的神经行为^[17]。

铁死亡是一种非凋亡形式的细胞死亡, 其特征是细胞内铁和脂质 ROS 积累。铁死亡的细胞形态学特征为线粒体萎缩, 线粒体嵴减少, 内膜压缩, 外膜破裂及细胞核完整, 其发生与铁、氨基酸和过氧化脂质的代谢过程有关^[18]。大量研究证明, 神经细胞铁死亡与缺血性脑卒中的病理生理过程密切相关, 抑制缺血半影区神经细胞铁死亡可以减轻脑卒中后继发性脑损伤, 提示铁死亡通路可能是脑卒中的潜在治疗靶点^[19]。此外, LAN 等^[20]研究发现, 中草药脑泰方化合物也可以通过调节转铁蛋白受体 1/2 价金属转运蛋白 1 以及溶质载体家族 7 成员 11/

GPX4 通路,减少缺血性卒中后的神经元铁死亡。值得注意的是,蒲公英醇通过诱导 Nrf2 核积累和铁死亡关键蛋白 GPX4 表达,可显著抑制 OGD/R 诱导的海马神经元中 ROS 和 MDA 的产生。由此推测,蒲公英醇可能是通过调节脑缺血再灌注损伤神经元中 Nrf2 信号通路而使其免受氧化应激和发生铁死亡^[19]。综上所述,神经细胞铁死亡可能是脑缺血再灌注损伤的重要机制,但 NRG1 β 是否通过调控铁死亡发挥脑细胞保护作用尚不清楚。

本研究结果显示,与对照组相比,模型组细胞活力下降,干预组细胞活力得到改善,这提示 NRG1 β 的干预治疗可以改善 PC12 细胞损伤;同时,荧光显微镜下观察和酶标仪检测结果显示,与模型组比较,经 NRG1 β 处理后,PC12 细胞的绿色荧光强度减弱,细胞中 MDA 水平显著下降,GSH/GSSG 吸光度比值显著升高。由于细胞中 ROS、MDA 水平和 GSH/GSSG 吸光度比值与细胞铁死亡密切相关,因此干预组在一定程度上改善了受损 PC12 细胞的铁死亡状况。线粒体损伤是细胞铁死亡的关键形态学特征,本研究又进一步对各组 PC12 细胞线粒体损伤情况进行检测,结果显示,干预组和模型组相比,线粒体损伤程度得到改善。本研究进一步检测了 PC12 细胞中抑制细胞铁死亡的关键蛋白 GPX4 的表达水平,结果显示,干预组 GPX4 的相对表达水平较模型组显著升高,从而进一步提示 NRG1 β 干预治疗可改善受损 PC12 细胞的铁死亡程度^[21]。

综上所述,本研究结果显示,NRG1 β 可以降低 OGD/R 模型 PC12 细胞的 ROS、MDA 水平以及 GSH/GSSG 吸光度比值,改善线粒体超微结构,上调细胞铁死亡关键蛋白 GPX4 的表达,表明 NRG1 β 干预治疗可能是通过影响受损 PC12 细胞的铁死亡关键蛋白 GPX4 的表达而发挥细胞保护作用的,本研究结果为探究 NRG1 β 治疗脑缺血再灌注损伤提供了实验依据。

作者声明:于竹芹、孙珊珊、翟秋月参与了研究设计;孙珊珊、于曦、翟秋月、于竹芹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] KATAN M, LUFT A. Global burden of stroke[J]. *Semin Neurol*, 2018,38(2):208-211.

[2] ZHAO H, SAPOLSKY R M, STEINBERG G K. Interrupting reperfusion as a stroke therapy: Ischemic postconditioning reduces infarct size after focal ischemia in rats[J]. *J Cereb Blood*

Flow Metab, 2006,26(9):1114-1121.

- [3] ARONOWSKI J, STRONG R, GROTTA J C. Reperfusion injury: Demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1997,17(10):1048-1056.
- [4] LI J, MA X S, YU W, et al. Reperfusion promotes mitochondrial dysfunction following focal cerebral ischemia in rats[J]. *PLoS One*, 2012,7(9):e46498.
- [5] RÖSLER T W, DEPBOYLU C, ARIAS-CARRIÓN O, et al. Biodistribution and brain permeability of the extracellular domain of neuregulin-1- β 1 [J]. *Neuropharmacology*, 2011, 61(8):1413-1418.
- [6] XU Z F, CROSLAN D R, HARRIS A E, et al. Extended therapeutic window and functional recovery after intraarterial administration of neuregulin-1 after focal ischemic stroke[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006,26(4):527-535.
- [7] JI Y Q, TENG L, ZHANG R, et al. NRG-1 β exerts neuroprotective effects against ischemia reperfusion-induced injury in rats through the JNK signaling pathway[J]. *Neuroscience*, 2017,362:13-24.
- [8] ZHANG R, LIU C, JI Y Q, et al. Neuregulin-1 β plays a neuroprotective role by inhibiting the Cdk5 signaling pathway after cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *J Mol Neurosci*, 2018,66(2):261-272.
- [9] XIE Y, HOU W, SONG X, et al. Ferroptosis: Process and function[J]. *Cell Death Differ*, 2016,23(3):369-379.
- [10] DOLL S, PRONETH B, TYURINA Y Y, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition[J]. *Nat Chem Biol*, 2017,13(1):91-98.
- [11] GUAN X Y, LI X L, YANG X J, et al. The neuroprotective effects of carvacrol on ischemia/reperfusion-induced hippocampal neuronal impairment by ferroptosis mitigation[J]. *Life Sci*, 2019,235:116795.
- [12] MOSKOWITZ M A, LO E H, IADECOLA C. The science of stroke: Mechanisms in search of treatments [J]. *Neuron*, 2010,67(2):181-198.
- [13] REN Y Q, MA X Q, WANG T T, et al. The cerebroprotein hydrolysate-I plays a neuroprotective effect on cerebral ischemic stroke by inhibiting MEK/ERK1/2 signaling pathway in rats[J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2021,17:2199-2208.
- [14] BURDEN S, YARDEN Y. Neuregulins and their receptors: A versatile signaling module in organogenesis and oncogenesis [J]. *Neuron*, 1997,18(6):847-855.
- [15] GUAN Y F, WU C Y, FANG Y Y, et al. Neuregulin 1 protects against ischemic brain injury via ErbB4 receptors by increasing GABAergic transmission [J]. *Neuroscience*, 2015, 307:151-159.
- [16] SHYU W C, LIN S Z, CHIANG, et al. Neuregulin-1 reduces ischemia-induced brain damage in rats[J]. *Neurobiol Aging*, 2004,25(7):935-944.
- [17] 南宝,王悦,朱琳,等. NRG1 β 对脑缺血再灌注大鼠 P35/P25 表达和细胞凋亡影响[J]. *青岛大学学报(医学版)*, 2021,57(6):892-896.

- [6] BROWN R S. Autoimmune thyroid disease: Unlocking a complex puzzle[J]. *Curr Opin Pediatr*, 2009,21(4):523-528.
- [7] INAMO Y. A 5-year-old boy with atrophic autoimmune thyroiditis caused by thyroid-stimulation blocking antibodies[J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2011,24(7-8):591-594.
- [8] TAKASU N, MATSUSHITA M. Changes of TSH-stimulation blocking antibody (TSBAB) and thyroid stimulating antibody (TSAb) over 10 years in 34 TSBAB-positive patients with hypothyroidism and in 98 TSAb-positive Graves' patients with hyperthyroidism: Reevaluation of TSBAB and TSAb in TSH-receptor-antibody (TRAb)-positive patients[J]. *J Thyroid Res*, 2012;182176.
- [9] 葛振江. 促甲状腺激素受体抗体检测在甲状腺疾病临床诊断及治疗中的价值[J]. *吉林医学*, 2015,36(6):1160-1161.
- [10] VITTI P, CHIOVATO L, FIORE E, et al. Use of cells expressing the human thyrotropin (TSH) receptor for the measurement of thyroid stimulating and TSH-blocking antibodies [J]. *Acta Med Austriaca*, 1996,23(1-2):52-56.
- [11] 周静. 以重组 TrxTSHRc、TrxTSHRn 蛋白为抗原 ELISA 检测人血清中 TRAb 含量[D]. 天津:天津医科大学, 2008;1-61.
- [12] ALLELEIN S, DIANA T, EHLERS M, et al. Comparison of a bridge immunoassay with two bioassays for thyrotropin receptor antibody detection and differentiation [J]. *Horm Et Metab*, 2019,51(6):341-346.
- [13] STRUJA T, JUTZI R, IMAHORN N, et al. Comparison of Five TSH-Receptor Antibody Assays in Graves' disease: Results from an observational pilot study[J]. *BMC Endocr Disord*, 2019,19(1):38.
- [14] LYTTON S D, SCHLUTER A, BANGA P J. Functional diagnostics for thyrotropin hormone receptor autoantibodies: Bioassays prevail over binding assays[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2018,23:2028-2043.
- [15] 何娟,刘戈力. 自身免疫甲状腺病患儿血清中甲状腺刺激性抗体及甲状腺刺激阻断性抗体检测的意义[J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2016,31(8):600-603.
- [16] MCLACHLAN S M, RAPOPORT B. Thyrotropin-blocking autoantibodies and thyroid-stimulating autoantibodies: Potential mechanisms involved in the pendulum swinging from hypothyroidism to hyperthyroidism or vice versa [J]. *Thyroid*, 2013,23(1):14-24.
- [17] BALUCAN F S, MORSHED S A, DAVIES T F. Thyroid autoantibodies in pregnancy: Their role, regulation and clinical relevance[J]. *J Thyroid Res*, 2013,182472.
- [18] LENZNER C, MORGENTHALER N G. The effect of thyrotropin-receptor blocking antibodies on stimulating autoantibodies from patients with Graves' disease[J]. *Thyroid*, 2003,13(12):1153-1161.
- [19] GONZALEZ-AGUILERA B, BETEA D, LUTTERI L, et al. Conversion to Graves disease from Hashimoto thyroiditis: A study of 24 patients[J]. *Arch Endocrinol Metab*, 2018,62(6):609-614.
- [20] KAMATH C, YOUNG S, KABELIS K, et al. Thyrotrophin receptor antibody characteristics in a woman with long-standing Hashimoto's who developed Graves' disease and pretibial myxoedema[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2012,77(3):465-470.
- [21] FURQAN S, HAQUE N U, ISLAM N. Conversion of autoimmune hypothyroidism to hyperthyroidism [J]. *BMC Res Notes*, 2014,7:489.
- [22] WONG M, INDER W J. Alternating hyperthyroidism and hypothyroidism in Graves' disease[J]. *Clin Case Rep*, 2018,6(9):1684-1688.
- [23] FRÖHLICH E, WAHL R. Thyroid autoimmunity: Role of anti-thyroid antibodies in thyroid and extra-thyroidal diseases [J]. *Front Immunol*, 2017,8:521.
- [24] BANO A, GAN E, ADDISON C, et al. Age may influence the impact of TRAbs on thyroid function and relapse-risk in patients with Graves disease[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2019,104(5):1378-1385.
- [25] CHIOVATO L, VITTI P, SANTINI F, et al. Incidence of antibodies blocking thyrotropin Effect In vitro in patients with euthyroid or hypothyroid autoimmune thyroiditis [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1990,71(1):40-45.
- [26] DIANA T, KRAUSE J, OLIVO P D, et al. Prevalence and clinical relevance of thyroid stimulating hormone receptor-blocking antibodies in autoimmune thyroid disease [J]. *Clin Exp Immunol*, 2017,189(3):304-309.
- [27] 满娜,李玉妹,滕卫平,等. 亚临床甲状腺功能减退症患者的自身免疫特征及预后影响因素[J]. *中华内科杂志*, 2005,44(8):621-622.
- [28] JOSHI K, ZACHARIN M. Hyperthyroidism in an infant of a mother with autoimmune hypothyroidism with positive TSH receptor antibodies[J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2018,31(5):577-580.

(本文编辑 耿波 厉建强)

(上接第 489 页)

- [18] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, et al. Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012,149(5):1060-1072.
- [19] STOCKWELL B R, FRIEDMANN ANGELI J P, BAYIR H, et al. Ferroptosis: A regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease[J]. *Cell*, 2017,171(2):273-285.
- [20] LAN B, GE J W, CHENG S W, et al. Extract of Naotaifang, a compound Chinese herbal medicine, protects neuron ferroptosis induced by acute cerebral ischemia in rats[J]. *J Integr Med*, 2020,18(4):344-350.
- [21] ZHAI Q Y, YE Y H, REN Y Q, et al. Neuroprotective effects of neural stem cells pretreated with neuregulin1 β on PC12 cells exposed to oxygen-glucose deprivation/reoxygenation[J]. *Neural Regen Res*, 2023,18(3):618-625.

(本文编辑 耿波 厉建强)