

二氢杨梅素对铁过载导致的海马神经元细胞损伤的保护作用及其机制

隋云杰 马泽刚

(青岛大学基础医学院生理学与病理生理学系, 山东 青岛 266071)

[摘要] 目的 探讨二氢杨梅素(DMY)对枸橼酸铁铵(FAC)导致的原代海马神经元细胞损伤的保护作用及其机制。方法 取出生 24 h SD 乳鼠的原代海马神经元进行体外培养,使用 CCK-8 法检测不同浓度 DMY 处理后的原代海马神经元细胞的活性,确定 DMY 给药浓度。将原代海马神经元细胞分为对照组(H组)、100 mmol/L 浓度的 DMY 处理组(I组)、250 mmol/L 浓度的 FAC 处理组(J组)、100 mmol/L 浓度的 DMY 与 250 mmol/L 浓度的 FAC 共处理组(K组),使用流式细胞术检测各组细胞中活性氧(ROS)的含量,使用比色法检测各组细胞中丙二醛(MDA)的含量,采用 Western blot 方法检测各组细胞中的 NF-E2 相关因子 2(Nrf2)、血红素加氧酶-1(HO-1)和谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)蛋白的表达水平。结果 CCK-8 检测结果显示,在 DMY 浓度为 100 mmol/L 时,原代海马神经元细胞的存活率最高($F=9.95, P<0.05$),故以该浓度用于后续实验。与 H 组相比,J 组细胞中 ROS 和 MDA 含量明显升高($F=176.81, 523.35, P<0.05$);与 J 组相比,K 组细胞中 ROS 含量和 MDA 含量明显降低($F=18.21, 412.96, P<0.05$)。与 H 组相比,J 组细胞中 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白相对表达量明显降低($F=27.35\sim 81.32, P<0.05$);与 J 组相比,K 组细胞中的 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白相对表达量明显升高($F=8.74\sim 21.46, P<0.05$)。结论 DMY 可以缓解铁过载导致的原代海马神经元氧化应激损伤,其机制可能与其激活了原代海马神经元中的 Nrf2-HO-1/GPX4 通路有关。

[关键词] 二氢杨梅素;铁超负荷;海马;神经元;氧化性应激;NF-E2 相关因子 2;血红素加氧酶-1;谷胱甘肽过氧化物酶

[中图分类号] R284;R589.9;R349.1

[文献标志码] A

Protective effect of dihydromyricetin against hippocampal neuronal injury caused by iron overload and its mechanism

SUI Yunjie, MA Zegang (Department of Physiology and Pathophysiology, School of Basic Medicine, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the protective effect of dihydromyricetin (DMY) against injury of primary hippocampal neurons caused by ferric ammonium citrate (FAC) and its mechanism. **Methods** Primary hippocampal neurons were collected from 24-hour neonatal Sprague-Dawley rats for *in vitro* culture, and CCK-8 assay was used to measure the viability of primary hippocampal neurons treated with different concentrations of DMY and determine the administration concentration of DMY. Primary hippocampal neurons were divided into control group (H group), 100 mmol/L DMY treatment group (I group), 250 mmol/L FAC treatment group (J group), and 100 mmol/L DMY+250 mmol/L FAC treatment group (K group). Flow cytometry was used to measure the content of reactive oxygen species (ROS) in each group; colorimetry was used to measure the content of malondialdehyde (MDA) in each group; Western blot was used to measure the protein expression levels of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), and glutathione peroxidase 4 (GPX4) in each group. **Results** CCK-8 assay showed the highest viability of primary hippocampal neurons at the concentration of 100 mmol/L for DMY ($F=9.95, P<0.05$), and therefore, this concentration was used for subsequent experiments. Compared with the H group, the J group had significant increases in the content of ROS and MDA ($F=176.81, 523.35, P<0.05$), and compared with the J group, the K group had significant reductions in the content of ROS and MDA ($F=18.21, 412.96, P<0.05$). Compared with the H group, the J group had significant reductions in the relative protein expression levels of Nrf2, HO-1, and GPX4 ($F=27.35\sim 81.32, P<0.05$), and compared with the J group, the K group had significant increases in the relative protein expression levels of Nrf2, HO-1, and GPX4 ($F=8.74\sim 21.46, P<0.05$). **Conclusion** DMY can alleviate oxidative stress damage in primary hippocampal neurons due to iron overload, possibly by activating the Nrf2-HO-1/GPX 4 pathway in primary hippocampal neurons.

[KEY WORDS] Dihydromyricetin; Iron overload; Hippocampus; Neurons; Oxidative stress; NF-E2-related factor 2; Heme oxygenase-1; Glutathione peroxidase

[收稿日期] 2023-12-02; [修订日期] 2024-03-12

[基金项目] 山东省自然科学基金项目(ZR2022MH018)

[通讯作者] 马泽刚, Email: mazegang2000@163.com

铁是人体必需的微量元素,但过量的铁会引起铁过载,从而导致不良反应^[1]。随着年龄的增长或不良饮食习惯等多种原因,铁过载会发生在人体多

个器官中,大脑中的海马体是铁过载的高发区域之一,铁过载会引起海马神经元发生氧化应激,进而引发癫痫、记忆衰退等,严重时甚至会引起阿尔兹海默症(Alzheimer's disease, AD)等一系列神经退行性疾病^[1-2]。目前临床治疗铁过载的方法主要有铁螯合剂药物治疗或放血治疗。铁螯合剂药物治疗会使人体产生多种不良反应,如呕吐、腹泻、关节疼痛等,放血治疗适用对象有限,仅适用于非贫血患者^[3],因此寻找安全且有效的治疗手段是临床治疗铁过载的迫切需要。大量研究表明,姜黄素、大黄素等天然物质可以有效抑制铁过载造成的细胞损伤,维持机体铁稳态^[4-5],其他植物来源的天然黄酮类化合物是否有类似的作用还有待验证。

江西盛产的藤茶在我国药用历史悠久,其提取物二氢杨梅素(DMY)可以缓解包括帕金森综合征(PD)和 AD 在内的多种神经退行性疾病的症状^[6]。然而关于 DMY 对铁过载导致的海马神经元损伤是否具有保护作用尚不明确。本研究通过枸橼酸铁铵(FAC)构建 SD 大鼠原代海马神经元铁过载模型,观察 DMY 对铁过载致乳鼠海马神经元氧化应激损伤的影响。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

出生 24 h 的健康 SD 乳鼠,体质量为 3~6 g,总共 60 只,全部购买于青岛大任富城畜牧有限公司。DMEM/F-12 培养基购自美国 Hyclone 公司,青链霉素混合液购买于苏州新赛美生物科技有限公司,CCK-8、B27 无血清添加剂购自美国 Gibco 公司,DMY 购买于上海阿拉丁生化科技股份有限公司,FAC、二甲基亚砜(DMSO)、多聚赖氨酸购买于美国 Sigma 公司,兔抗 NF-E2 相关因子 2(Nrf2)、兔抗血红素加氧酶-1(HO-1)、兔抗谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)、兔抗 β -actin 及 HRP 标记山羊抗兔 IgG 购自杭州华安生物有限公司,三色预染蛋白 Marker 购自上海雅酶生物医药科技有限公司,2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)购买于安徽白鲨生物科技有限公司,SDS 聚丙烯酰胺凝胶、ECL 发光液购买于武汉塞维尔生物技术有限公司,丙二醛(MDA)检测试剂盒购自北京索莱宝生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 原代海马神经元细胞的培养 取出生 24 h SD 乳鼠共 10 只,置于液氮中急冻 5 s 使其休克。

随后使用体积分数 0.75 乙醇溶液浸泡消毒后,浸入预冷的 DMEM/F-12 培养基中,完整地取出乳鼠全脑,分离出左右脑的海马体并除去脉络丛。剪碎 10 只小鼠的海马体,置于胰蛋白酶中消化 5 min,加入含体积分数 0.1 的 FBS 的 DMEM/F-12 培养基中终止消化。吹散组织,用 70 μ m 网筛过滤后收集于离心管中,以 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液。使用细胞计数板调整原代海马神经元细胞密度为 7×10^8 个/L,置于混合培养液(DMEM/F-12 培养基中加入含体积分数 0.02 的 B27 无血清添加剂和体积分数 0.01 的青霉素-链霉素)中,于 37 $^{\circ}$ C、含体积分数 0.05 的 CO₂ 的培养箱中培养,每 3 d 进行一次半换液。7 d 之后通过显微镜进行观察,当海马神经元细胞胞体丰满,光晕明显,突起增粗、变长,并连接成错综复杂的神经网络时,提示细胞成熟,可用于后续实验。实验重复 6 次,每次取 10 小鼠。

1.2.2 药物配置 将 DMY 溶于 DMSO 中,配置浓度为 10 mol/L 的储存液。FAC 置于 DMEM/F-12 培养基中,配置浓度为 10 mol/L 的培养液。后续使用时再分别将 DMY 与 FAC 稀释成所需浓度。

1.2.3 CCK-8 实验筛选 DMY 的适宜浓度 将浓度为 10 mol/L 的 FAC 稀释至 250 mmol/L,并将浓度为 10 mol/L 的 DMY 稀释为 0.1、1、10、100 及 200 mmol/L。将成熟的原代海马神经元细胞接种于 96 孔板中,每孔约 5 000 个,分为 A~G 组。A 组细胞在混合培养液中培养 24 h, B 组细胞在混合培养液中加入 250 mmol/L 浓度 FAC 培养 24 h, C~G 组细胞混合培养液中分别加入 250 mmol/L 浓度的 FAC 和 0.1、1、10、100、200 mmol/L 浓度的 DMY,培养 24 h。弃去原培养液以后,每孔加入 200 μ L 的 CCK-8 混合工作液(混合培养液与 CCK-8 工作液的比例为 9:1),在培养箱中孵育 2 h。将酶标仪的发射波长设为 450 nm,使用双蒸水调零,检测每孔中 CCK-8 工作液的吸光度值,计算各组细胞的细胞存活率。细胞存活率=(各组细胞的吸光度值/A 组细胞的吸光度值) \times 100%。根据各组的细胞存活率,选择最适宜的浓度用于后续实验。

1.2.4 细胞分组和处理 将成熟原代海马神经元细胞接种于 6 孔板中,每孔约 80 000 个,分为 H~K 组。H 组细胞在混合培养液之中培养 24 h, I~K 组细胞分别于混合培养液之中加入 100 mmol/L 浓度 DMY、250 mmol/L 浓度 FAC、100 mmol/L 浓度 DMY+250 mmol/L 浓度 FAC,培养 24 h。

1.2.5 细胞中 ROS 水平的检测 将 6 孔板中培养

24 h 的 H~K 组细胞弃去原培养液,使用 PBS 清洗 3 次,每孔加入 1 mL 含 10 mmol/L DCFH-DA 的 PBS,移至培养箱中避光孵育 30 min,吸去原培养液,再以 PBS 清洗 3 次后,每孔中加入 1 mL PBS 制成细胞悬液,以 200 目网筛过滤后,置于流式试管中涡旋振荡,充分混合均匀。将流式细胞仪的激发波长设为 495 nm,发射波长设为 529 nm,设置检测细胞数量为 10 000 个,使用流式细胞术检测各组细胞的 ROS 水平。先将 H 组细胞相对荧光强度设置为 25%,随后使用流式细胞仪检测 I~K 组细胞的相对荧光强度,以此计算各组细胞的 ROS 水平。

1.2.6 细胞中 MDA 水平的检测 将 6 孔板中培养 24 h 的 H~K 组细胞弃去原培养液,使用 PBS 清洗 3 次,每孔中加入 300 μ L 提取液制成细胞悬液,移至 EP 管中,使用超声破碎仪(功率 200 W)进行破碎,重复 30 次,每次时长 3 s,两次破碎间隔 10 s。然后 4 $^{\circ}$ C 下 8 000 r/min 离心 10 min,取上清液 100 μ L 置于另一 EP 管中,加入 100 μ L 检测液。以 100 μ L 蒸馏水+100 μ L 检测液为空白组。将空白组和各样本组均 100 $^{\circ}$ C 加热 60 min,冰上冷却后,常温 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,使用酶标仪测定波长 532 nm 和 600 nm 处的吸光度(A)值,并采用相关的公式计算各组细胞当中 MDA 的含量。MDA 含量(nmol/ 10^7 cell)= $107.5 \times \Delta A$,其中 $\Delta A = (A_{532\text{测定}} - A_{532\text{空白}}) - (A_{600\text{测定}} - A_{600\text{空白}})$ 。

1.2.7 Western blot 实验检测细胞中 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白的含量 取 H~K 组培养 24 h 的原代海马神经元细胞,使用 RIPA 裂解液将细胞充分裂解后,收集裂解液,然后 4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 30 min。将上清液转移至新的离心管中,加入 1/4 体积的 5 \times loading buffer,充分振荡混匀,煮沸 10 min,收集蛋白样本。通过 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,并转移到 PVDF 膜上。用体积分数 0.05 的脱脂牛奶在室温下封闭膜 2 h,一抗 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。再用辣根过氧化物酶标记的二抗在室温下与膜孵育 1 h,洗膜,随后在暗室中曝光显影。利用 Image J 软件分析蛋白灰度值,并以 β -actin 作为内参,计算各目的蛋白的相对表达量。

1.3 统计学处理

使用 SPSS 27.0 软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。细胞存活率的比较采用单因素方差分析,进一步两两比较使用 Turkey 法。不同分组间比较采用 2 \times 2 析因设计的方差分析。以

$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同浓度 DMY 对 FAC 处理的原代海马神经元细胞活力的影响

A~G 组原代细胞的存活率分别为(90.59 \pm 31.56)%、(37.06 \pm 9.99)%、(40.02 \pm 12.47)%、(59.62 \pm 25.20)%、(63.43 \pm 20.91)%、(67.78 \pm 22.89)%、(46.68 \pm 17.74)%。单因素方差分析的结果显示,各组比较差异具有显著意义($F = 9.95, P < 0.05$),其中 F 组的细胞存活率显著高于 B 组($P < 0.05$)。各实验组中 F 组原代海马神经元细胞的细胞存活率最高,以该浓度用于后续实验。

2.2 DMY 对 FAC 处理的原代海马神经元 ROS 水平的影响

H~K 组的 ROS 阳性细胞数量占细胞总数的比例分别为(24.78 \pm 2.16)%、(23.17 \pm 4.23)%、(65.03 \pm 4.32)%、(43.86 \pm 9.03)%。2 \times 2 析因设计的方差分析结果显示,FAC、DMY 及 DMY 与 FAC 的交互作用均对细胞内 ROS 的含量差异有显著影响($F_{\text{FAC}} = 176.81, F_{\text{DMY}} = 24.73, F_{\text{交互}} = 18.21, P < 0.05$)。单独效应结果显示,用 FAC 处理时,DMY 处理与不处理差别有统计学意义($F = 42.68, P < 0.05$),不用 FAC 处理时,DMY 处理与不处理差异无统计学意义($P > 0.05$);用 DMY 处理时,FAC 处理与不处理差异具有统计学意义($F = 40.77, P < 0.05$),不用 DMY 处理时,FAC 处理与不处理差异有统计学意义($F = 154.25, P < 0.05$),DMY 可明显降低 FAC 导致的 ROS 积累。

2.3 DMY 对 FAC 处理的原代海马神经元 MDA 水平的影响

H~K 组神经元细胞当中 MDA 含量分别为(2.08 \pm 0.14)、(2.00 \pm 0.04)、(6.48 \pm 0.07)、(4.51 \pm 0.16)nmol/ 10^7 cell。2 \times 2 析因设计方差分析结果显示,FAC、DMY 及 DMY 与 FAC 交互作用均对细胞内 MDA 的含量均有显著影响($F_{\text{FAC}} = 5 523.35, F_{\text{DMY}} = 484.87, F_{\text{交互}} = 412.96, P < 0.05$)。单独效应结果显示,用 FAC 处理时,DMY 处理与不处理差别有统计学意义($F = 896.39, P < 0.05$),不用 FAC 处理时,DMY 处理与不处理差别无统计学意义($P > 0.05$);用 DMY 处理时,FAC 处理与不处理差别有统计学意义($F = 1 457.88, P < 0.05$),不用 DMY 处理时,FAC 处理与不处理差别有统计学意义($F = 4 478.44, P < 0.05$),DMY 可明显降低 FAC

导致的 MDA 积累。

2.4 DMY 对 FAC 处理的原代海马神经元细胞中 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白相对表达量的影响

2×2 析因设计的方差分析结果显示, FAC 对细胞内 Nrf2、HO-1、GPX4 相对表达量有显著影响 ($F_{FAC} = 27.36 \sim 81.32, P < 0.05$), DMY 对细胞内 Nrf2、HO-1、GPX4 相对表达量有显著影响 ($F_{DMY} = 9.71 \sim 15.69, P < 0.05$), DMY 与 FAC 对细胞内 Nrf2、HO-1、GPX4 的相对表达量的影响存在交互效应 ($F_{交互} = 8.74 \sim 21.46, P < 0.05$)。单独效应结果显示, 用 FAC 处理时, DMY 处理与不处理差异有统计学意义 ($F = 23.92 \sim 30.02, P < 0.05$), 不用 FAC 处理时, DMY 处理与不处理差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 用 DMY 处理时, FAC 处理与不处理 Nrf2、HO-1 相对表达量差异具有统计学意义 ($F = 12.87, 9.62, P < 0.05$), 不用 DMY 处理时, FAC 处理与不处理差异有统计学意义 ($F = 33.51 \sim 93.16, P < 0.05$), DMY 显著缓解了 FAC 导致的原代海马神经元细胞中 Nrf2、HO-1、GPX4 表达量的降低。见图 1、表 1。

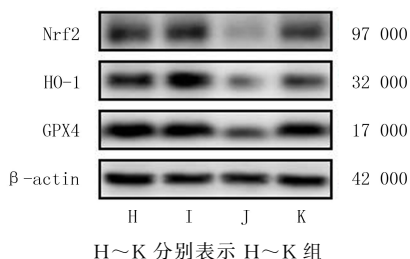


图 1 H~K 组细胞中 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白的相对表达量

表 1 H~K 组细胞中 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白的相对表达量比较 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

分组	Nrf2	HO-1	GPX4
H 组	0.26 ± 0.02	1.19 ± 0.07	3.02 ± 0.61
I 组	0.26 ± 0.03	1.13 ± 0.11	3.20 ± 0.45
J 组	0.13 ± 0.03	0.65 ± 0.10	1.54 ± 0.29
K 组	0.21 ± 0.01	0.95 ± 0.13	2.80 ± 0.35

3 讨 论

铁参与了细胞中许多正常的生理过程, 但当细胞中的铁过多时, 多余的铁会通过芬顿反应导致细胞产生氧化应激反应^[2]。海马体是神经系统中最主要的结构之一, 具有形成记忆和定位方向的功能^[7]。铁是海马体发挥功能所必需的微量元素, 但过量铁会对海马体中的海马神经元产生神经毒性。研究证实, 铁过载所致海马神经元氧化应激与包括 AD 在

内的多种神经系统疾病的产生与恶化有关^[8]。

目前治疗铁过载的方法均存在不同程度的局限性, 因此寻找新的治疗铁过载的方法是临床的迫切需要^[3]。随着近年来对中药资源的不断开发与利用, 相关研究发现许多植物来源的天然化合物治疗铁过载效果良好^[4-5]。DMY 是一种具有天然活性的黄酮类化合物, 具有抗氧化特性, 可通过调节细胞和机体的氧化应激反应预防和治疗中枢神经系统相关的多种疾病^[9-10]。如研究发现, DMY 可以通过调节氧化应激和抑制乙酰胆碱酯酶的活性缓解 D-半乳糖诱导的衰老小鼠的认知障碍; DMY 还可以通过调节 Akt/GSK-3 β 通路降低多巴胺能神经元的氧化应激, 缓解 PD 的症状^[11-12]。但 DMY 能否对铁过载致海马神经元氧化应激产生影响以及相关机制尚不明确。

本研究首先使用 CCK-8 实验检测了不同浓度 DMY 对 FAC 处理后的海马神经元细胞活力的影响, 结果表明 DMY 能以浓度依赖的方式缓解铁过载致海马神经元细胞活性的降低, 在 DMY 的浓度为 100 mmol/L 时, 对于铁过载致海马神经元细胞活性降低的缓解作用最强, 因此选用 100 mmol/L DMY 进行后续研究。

当细胞发生氧化应激时, 线粒体会在短时间内生成大量 ROS, 过多的 ROS 会损伤细胞中的膜结构, 产生大量的 MDA^[13-14]。本研究结果显示, 铁过载导致了海马神经元细胞中 ROS 水平和 MDA 含量升高, DMY 的处理抑制了铁过载导致的海马神经元中 ROS 水平和 MDA 含量的升高, 提示 DMY 可能是缓解了铁过载致海马神经元细胞氧化应激, 从而减轻了铁过载对海马神经元细胞损伤。

Nrf2 是细胞抵御氧化应激的重要因子, 可调节细胞内的氧化-抗氧化系统, Nrf2 可直接影响细胞内的超氧化物歧化酶和体内一系列与抗氧化有关的因子, 维持机体氧化平衡^[15-17]。HO-1 在血红素代谢中至关重要, 可将血红素分解成胆绿素, 并且参与细胞中的铁代谢和氧化应激反应^[18-19]。GPX4 具有清除膜脂过氧化氢产物、调节脂质代谢和预防氧化应激的能力, 是细胞中参与氧化应激反应的重要调节因子^[20-22]。细胞中的 Nrf2-HO-1/GPX4 通路氧化应激密切相关, Nrf2 是细胞抗氧化系统的主要调控因子, 在介导铁代谢、脂质代谢和谷胱甘肽合成方面也发挥着关键的作用, HO-1 和 GPX4 均受到 Nrf2 的调控^[23-25]。有证据表明, Nrf2-HO-1/GPX4 通路广泛存在于神经系统中, 对神经系统正常运行

具有重要意义,如激活 Nrf2-HO-1/GPX4 通路可促进脑源性神经营养因子的表达,维持神经元形态,抑制氧化应激反应及铁死亡致神经系统疾病^[26-29]。为进一步明确 DMY 对铁过载致海马神经元氧化应激的影响,本研究通过 Western blot 实验检测了 H~K 组细胞中 Nrf2、HO-1 和 GPX4 蛋白的相对表达量,结果显示,FAC 的处理显著降低了海马神经元细胞中的 Nrf2、HO-1 和 GPX4 蛋白的表达量,而 DMY 抑制了铁过载导致的海马神经元中 Nrf2 以及 HO-1、GPX4 表达量的降低。本研究结果提示 DMY 可缓解铁过载致原代海马神经元氧化应激,其机制可能是 DMY 激活了海马神经元细胞中的 Nrf2-HO-1/GPX4 通路。

本研究结果显示,J 组细胞中的 Nrf2 和 HO-1 的相对表达量与 H 组相比显著降低,这表明在海马神经元细胞中,铁过载会抑制 Nrf2 和 HO-1 的表达。有研究显示,小鼠体内发生铁过载会激活肝细胞中 Nrf2 和 HO-1 的表达^[30]。分析两项研究不一致的原因,可能与海马神经元细胞与肝细胞的结构和功能不同有关,但具体原因还需要进一步验证。

综上所述,天然活性物质 DMY 可通过抑制铁过载致海马神经元细胞的氧化应激反应,减轻铁过载对原代海马神经元的损伤,其机制可能与激活了海马神经元细胞中的 Nrf2-HO-1/GPX4 通路有关。本研究为 DMY 治疗海马体铁过载的研究提供了细胞实验支持,但是否在动物或人体内也具有同样的作用,还有待进一步深入探讨。

伦理批准和动物权利声明:本研究涉及的所有动物实验已通过青岛大学医学部伦理委员会的审核批准(文件号 QDU-AEC-2024451)。所有实验过程均遵照科技部《实验动物管理条例》的条例进行。

作者声明:所有作者均参与了研究的设计,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] 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.

[2] YAN H F, ZOU T, TUO Q Z, et al. Ferroptosis: Mechanisms and links with diseases[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021,6(1):49.

[3] 郭丽银,王红祥.铁过载的诊治[J]. *临床内科杂志*, 2019,36(10):662-664.

[4] 王艳,孙照阳,任欣会,等.姜黄素通过 Nrf2/HO-1 通路抑制高糖诱导的 Neuro-2a 细胞铁死亡的作用[J]. *福建医科大学学报*, 2023,9(2):79-88.

[5] 周思聪,杨威,曾丽,等. 姜黄素对胶原诱导性关节炎大鼠的骨保护作用:基于抑制铁死亡和降解基质金属蛋白酶[J]. *南方医科大学学报*, 2023,43(10):1776-1781.

[6] 龙俊鹏,孙洋,刘莎莎,等. 二氢杨梅素神经保护作用研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2023,39(8):1422-1425.

[7] MOSER M B, MOSER E I. Functional differentiation in the hippocampus[J]. *Hippocampus*, 1998,8(6):608-619.

[8] WANG F X, WANG J D, SHEN Y, et al. Iron dyshomeostasis and ferroptosis: A new Alzheimer's disease hypothesis? [J]. *Front Aging Neurosci*, 2022,14:830569.

[9] ZHANG Q, WANG J, ZHANG H L, et al. Dihydromyricetin inhibits oxidative stress and apoptosis in oxygen and glucose deprivation/reoxygenation-induced HT22 cells by activating the Nrf2/HO-1 pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2021,23(6):397.

[10] MARTÍNEZ-CORIA H, MENDOZA-ROJAS M X, ARRIETA-CRUZ I, et al. Preclinical research of dihydromyricetin for brain aging and neurodegenerative diseases[J]. *Front Pharmacol*, 2019,10:1334.

[11] SUN C C, YIN Z P, CHEN J G, et al. Dihydromyricetin improves cognitive impairments in d-galactose-induced aging mice through regulating oxidative stress and inhibition of acetylcholinesterase[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2022,66(4):e2101002.

[12] REN Z X, ZHAO Y F, CAO T, et al. Erratum: Dihydromyricetin protects neurons in an MPTP-induced model of Parkinson's disease by suppressing glycogen synthase kinase-3 beta activity[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017,38(5):733.

[13] HIRST J, ROESSLER M M. Energy conversion, redox catalysis and generation of reactive oxygen species by respiratory complex I[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016,1857(7):872-883.

[14] WEI S M, HUANG Y M. Attenuation effect of salvianolic acid B on testicular ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022,2022:7680182.

[15] SORICE M, PROFUMO E, CAPOZZI A, et al. Oxidative stress as a regulatory checkpoint in the production of antiphospholipid autoantibodies: The protective role of NRF2 pathway [J]. *Biomolecules*, 2023,13(8):1221.

[16] GE M H, TIAN H, MAO L, et al. Zinc attenuates ferroptosis and promotes functional recovery in contusion spinal cord injury by activating Nrf2/GPX4 defense pathway[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2021,27(9):1023-1040.

[17] BOURDAKOU M M, FERNÁNDEZ-GINÉS R, CUADRADO A, et al. Drug repurposing on Alzheimer's disease through modulation of NRF2 neighborhood[J]. *Redox Biol*, 2023,67:102881.

[18] YANG S, OUYANG J, LU Y Q, et al. A dual role of heme oxygenase-1 in tuberculosis[J]. *Front Immunol*, 2022,13:842858.

[19] REN J, SU D, LI L X, et al. Anti-inflammatory effects of Aureusidin in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages via suppressing NF- κ B and activating ROS- and MAPKs-dependent Nrf2/HO-1 signaling pathways[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2020,387:114846.

- [8] MAS A M, HUARTE M. Long noncoding RNA signatures as cancer biomarkers[J]. *J Clin Oncol*, 2023,41(16):3059-3062.
- [9] APRILE M, COSTA V, CIMMINO A, et al. Emerging role of oncogenic long noncoding RNA as cancer biomarkers[J]. *Int J Cancer*, 2023,152(5):822-834.
- [10] YANG L Q, TANG L, MIN Q, et al. Emerging role of RNA modification and long noncoding RNA interaction in cancer[J]. *Cancer Gene Ther*, 2024,31(6):816-830.
- [11] ZHOU H H, HAO X P, ZHANG P, et al. Noncoding RNA mutations in cancer[J]. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2023,14(6):e1812.
- [12] CHEN L J, CHEN X, NIU X H, et al. LncRNAs in colorectal cancer: Biomarkers to therapeutic targets[J]. *Clin Chim Acta*, 2023,543:117305.
- [13] ENTEZARI M, TAHERIAZAM A, OROUEI S, et al. LncRNA-miRNA axis in tumor progression and therapy response: An emphasis on molecular interactions and therapeutic interventions [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2022, 154: 113609.
- [14] GHAFOURI-FARD S, SAFARZADEH A, HUSSEN B M, et al. Contribution of CRNDE lncRNA in the development of cancer and the underlying mechanisms[J]. *Pathol Res Pract*, 2023,244:154387.
- [15] GUAN X R, SUN Y Y, ZHANG C X. LncRNAs in blood cells: Roles in cell development and potential pathogenesis in hematological malignancies [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2022,180:103849.
- [16] HAN J J. LncRNAs: The missing link to senescence nuclear architecture[J]. *Trends Biochem Sci*, 2023,48(7):618-628.
- [17] CHEN J F, WANG Z H, WANG W, et al. SYT16 is a prognostic biomarker and correlated with immune infiltrates in glioma: A study based on TCGA data[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020,84:106490.
- [18] CHOLANGIOCARCINOMA WORKING GROUP. Italian Clinical Practice Guidelines on Cholangiocarcinoma-Part I: Classification, diagnosis and staging[J]. *Dig Liver Dis*, 2020, 52(11):1282-1293.
- [19] JANSSON H, OLTHOF P B, BERGQUIST A, et al. Outcome after resection for perihilar cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis: An international multicentre study[J]. *HPB*, 2021,23(11):1751-1758.
- [20] MANTRIPRAGADA S, CHAWLA A. Cholangiocarcinoma-part 2, tumoral and nontumoral mimics and imaging features helpful in differentiation[J]. *Curr Probl Diagn Radiol*, 2022,51(3):362-374.
- [21] RAHNEMAI-AZAR A A, WEISBROD A, DILLHOFF M, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: Molecular markers for diagnosis and prognosis[J]. *Surg Oncol*, 2017,26(2):125-137.
- [22] SARKIS Y, AL SOUEIDY A, KOURIE H R. Will advanced cholangiocarcinoma become a targetable malignancy? [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2021,159:103233.
- [23] 郭子豪,梁德森,裴铁民. 长链非编码 RNA 在肝内胆管癌中的研究状况 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(18):2511-2514.
- [24] 黄子越,陈旺明,康鹏程,等. 非编码 RNA 在胆管癌中的研究进展 [J]. *腹部外科*, 2021,34(6):474-478,487.
- [25] 毛俊,瞿巧莉,曾珍,等. 非编码 RNA 在胆管癌相关信号通路中的研究进展 [J]. *中国医药生物技术*, 2022,17(2):154-157.

(本文编辑 范睿心 厉建强)

(上接第 313 页)

- [20] DENG H F, YUE L X, WANG N N, et al. Mitochondrial iron overload-mediated inhibition of Nrf2-HO-1/GPX4 assisted ALI-induced nephrotoxicity[J]. *Front Pharmacol*, 2021,11: 624529.
- [21] XU C X, SUN S G, JOHNSON T, et al. The glutathione peroxidase Gpx4 prevents lipid peroxidation and ferroptosis to sustain Treg cell activation and suppression of antitumor immunity[J]. *Cell Rep*, 2021,35(11):109235.
- [22] LIANG D G, FENG Y, ZANDKARIMI F, et al. Ferroptosis surveillance independent of GPX4 and differentially regulated by sex hormones[J]. *Cell*, 2023,186(13):2748-2764.e22.
- [23] ANANDHAN A, DODSON M, SHAKYA A, et al. NRF2 controls iron homeostasis and ferroptosis through HERC2 and VAMP8[J]. *Sci Adv*, 2023,9(5):eade9585.
- [24] SHEN B Y, ZHAO C X, WANG Y, et al. Aucubin inhibited lipid accumulation and oxidative stress via Nrf2/HO-1 and AMPK signalling pathways[J]. *J Cell Mol Med*, 2019,23(6): 4063-4075.
- [25] BEJARANO E, WEINBERG J, CLARK M, et al. Redox regulation in age-related cataracts: Roles for glutathione, vitamin C, and the NRF2 signaling pathway[J]. *Nutrients*, 2023, 15(15):3375.
- [26] YAO W, LIN S, SU J, et al. Activation of BDNF by transcription factor Nrf2 contributes to antidepressant-like actions in rodents[J]. *Transl Psychiatry*, 2021,11(1):140.
- [27] ZENG T, LI J J, XIE L P, et al. Nrf2 regulates iron-dependent hippocampal synapses and functional connectivity damage in depression[J]. *J Neuroinflammation*, 2023,20(1):212.
- [28] ZHENG X J, CHEN W L, YI J, et al. Author Correction: Apolipoprotein C1 promotes glioblastoma tumorigenesis by reducing KEAP1/NRF2 and CBS-regulated ferroptosis[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2024. doi: 10.1038/s41401-024-01271-2.
- [29] HUANG Y, WU H G, HU Y M, et al. Puerarin attenuates oxidative stress and ferroptosis via AMPK/PGC1 α /Nrf2 pathway after subarachnoid hemorrhage in rats[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022,11(7):1259.
- [30] WU A M, FENG B, YU J, et al. Fibroblast growth factor 21 attenuates iron overload-induced liver injury and fibrosis by inhibiting ferroptosis[J]. *Redox Biol*, 2021,46:102131.

(本文编辑 耿波)