



华中农业大学

HUAZHONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

# 博士学位论文

Ph D DISSERTATION

双酚 AF 对奶山羊子宫内膜上皮细胞的毒性影响及姜黄素的缓解作用和机制研究

Toxic Effects of bisphenol AF on endometrial epithelial cells of dairy goat and the alleviating effect and mechanism of curcumin

研究生: 刘明  
CANDIDATE: LIU MING  
学号: 2019302010014  
STUDENT NO.:

专业: 动物遗传育种与繁殖  
MAJOR: ANIMAL GENETICS, BREEDING  
AND REPRODUCTION SCIENCE

导师: 霍立军 教授

中国 武汉  
WUHAN, CHINA

二〇二四年六月

JUNE, 2024

# 华中农业大学博士学位论文

## 双酚 AF 对奶山羊子宫内膜上皮细胞的毒性影响及姜黄素的缓解作用和机制研究

Toxic Effects of bisphenol AF on endometrial epithelial cells of dairy goat and the alleviating effect and mechanism of curcumin

博士研究生：刘明

学号：2019302010014

指导教师：霍立军 教授

指导小组：杨利国 教授

苗义良 教授

李翔 副教授

梁爱心 副教授

周吉隆 副研究员

专业：动物遗传育种与繁殖 研究方向：动物生殖生理与生物技术

获得学位名称：农学博士 获得学位时间：2024年6月

华中农业大学动物科技学院动物医学院

二〇二四年六月

# 资助项目

**中央高校基本科研业务费专项资金  
(No.2662020DKPY011)资助**

**Fundamental Research Funds for the Central  
Universities (No. 2662020DKPY011)**

# 目 录

第一章 文献综述 .....	1
1.双酚 AF(BPAF)研究进展 .....	1
1.1 BPAF 的应用和污染现状 .....	1
1.2 BPAF 的生殖毒性研究 .....	2
2 程序性细胞死亡研究进展 .....	5
2.1 细胞凋亡 .....	5
2.2 铁死亡研究进展 .....	6
2.3 自噬 .....	10
2.4 内质网应激 .....	12
3.Nrf2 信号通路在氧化应激和铁死亡中的作用 .....	13
4.姜黄素研究进展 .....	14
4.1 姜黄素的抗氧化活性 .....	15
4.2 姜黄素的抗炎作用 .....	15
4.3 姜黄素在反刍动物生产中的应用 .....	16
4.4 姜黄素与生殖相关疾病 .....	16
5.研究目的与意义 .....	16
第二章 姜黄素通过 MAPK 和 Nrf2 通路缓解 BPAF 诱导的奶山羊 EECs 氧化应激和凋亡 .....	18
1.引言 .....	18
2.材料与方法 .....	18
2.1 实验材料 .....	18
2.2 实验方法 .....	21
2.3 数据分析 .....	32
3.结果 .....	33
3.1 BPAF 通过激活氧化应激诱导 EECs 凋亡 .....	33
3.2 姜黄素通过抑制氧化应激和 MAPK 通路缓解 BPAF 诱导的 EECs 凋亡 .....	40
4.讨论 .....	47
5.小结 .....	50
第三章 姜黄素通过抑制自噬和内质网应激缓解 BPAF 诱导的奶山羊 EECs 铁死亡 .....	51
1.引言 .....	51
2.材料与方法 .....	51
2.1 实验材料 .....	51

2.2 主要试剂.....	51
2.3 细胞培养和处理.....	52
2.4 GSH 含量检测:.....	53
2.5 铁离子含量测定.....	53
2.6 细胞总 mRNA 提取和实时荧光定量 PCR.....	54
2.7 蛋白提取和 Western blot .....	54
2.8 EECs 转染 siRNA .....	54
2.9 数据处理与分析.....	55
3.结果.....	56
3.1 BPAF 通过激活自噬和内质网应激诱导 EECs 铁死亡.....	56
3.2 姜黄素通过抑制自噬和内质网应激缓解 BPAF 诱导的 EECs 铁死亡 .....	64
3.3 PI3K/AKT/mTOR 通路被激活以对抗 BPAF 诱导的铁死亡.....	70
3.4 Nrf2/HO-1 通路被激活以对抗 BPAF 诱导的铁死亡 .....	74
4.讨论.....	79
5.小结.....	84
6.全文总结.....	84
6.1 结论.....	84
6.2 创新点.....	84
6.3 不足之处和下一步计划.....	85
参考文献.....	86

## 摘要

随着社会经济和工业的不断发展,环境污染越来越引起人们的重视。近年来,由于环境污染物对人类生殖健康的危害,使其在畜牧业中的影响受到越来越多的关注。最近的研究表明,由于环境和管理等方面的原因,在饲养过程中牲畜长期接触多种有害物质如农药、重金属和化学品等污染物,这可能导致家畜繁殖性能下降,甚至不育。然而,关于环境污染物对反刍动物生殖健康影响的研究仍然有限。

双酚 AF (Bisphenol AF, BPAF) 是双酚 A (Bisphenol A, BPA) 的替代物之一,已广泛用于工业上塑料产品的生产,在环境水资源、土壤和空气中也广泛存在,对人类和动物的生殖健康具有潜在的危害。近年来多项研究结果表明 BPAF 可以影响动物的配子发生进而干扰动物的生殖功能。子宫作为孕育胎儿的场所,在生殖过程中同样发挥着关键的作用,然而关于 BPAF 对子宫的潜在毒性影响还未见报道。

姜黄素是从姜黄根茎中分离得到的姜黄成分,具有显著的抗氧化和抗炎等特性,并且能够缓解多种环境污染物引起的细胞毒性。因此,本研究利用奶山羊子宫内膜上皮细胞 (Endometrial epithelial cells, EECs) 体外培养模型,首先探究了 BPAF 对 EECs 的细胞毒性影响,然后检测了姜黄素对 BPAF 诱导的细胞毒性的缓解功效,并深入揭示了 BPAF 对 EECs 的毒性影响途径及姜黄素的保护调控机制。主要研究结果如下:

### 1. BPAF 通过激活氧化应激诱导 EECs 凋亡

在培养液中添加不同浓度 (0、10、20、40、60 和 80  $\mu\text{M}$ ) 的 BPAF 处理 EECs 24 h,发现 BPAF 在 40  $\mu\text{M}$ -80  $\mu\text{M}$  时显著降低细胞活力 ( $P<0.001$ ),并在 20  $\mu\text{M}$ -80  $\mu\text{M}$  时显著降低线粒体膜电位 ( $P<0.01$ )。通过检测氧化应激相关指标发现,所有 BPAF 浓度均显著提高了活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 水平 ( $P<0.001$ ),且在 BPAF 为 40  $\mu\text{M}$ -80  $\mu\text{M}$  时丙二醛含量 (Malondialdehyde, MDA) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione Peroxidase, GSH-Px) 显著上升 ( $P<0.05$ ),但 SOD 活性显著降低 ( $P<0.01$ ),而过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 含量在 20  $\mu\text{M}$ -80  $\mu\text{M}$  时显著上升 ( $P<0.001$ )。此外,本研究也发现 BPAF 在 20  $\mu\text{M}$ -80  $\mu\text{M}$  时显著诱导凋亡相关蛋白 Bax 和  $\gamma$ -H2AX 蛋白的表达 ( $P<0.05$ ),Cytochrome C 在 BPAF 浓度为 10  $\mu\text{M}$ -60  $\mu\text{M}$  时显著上升 ( $P<0.05$ ),但抗凋亡蛋白 Bcl-2 在 40  $\mu\text{M}$ -80  $\mu\text{M}$  时显著降低 ( $P<0.001$ )。进一步研究发现, BPAF 激活了 MAPK (Mitogen-activated protein kinase, MAPK)

和 Nrf2 通路，显著增加了 p-ERK1/2、p-P38、p-JNK、Nrf2、HO-1 和 NQO1 蛋白表达 ( $P < 0.01$ )。这些结果表明一定浓度的 BPAF 可能通过激活 MAPK 通路，诱导 EECs 氧化应激、干扰抗氧化系统功能，从而引起细胞活力下降并诱导细胞凋亡。

## 2. 姜黄素通过抑制氧化应激和 MAPK 通路缓解 BPAF 诱导的 EECs 凋亡

为了探究姜黄素能否缓解 BPAF 对 EECs 的细胞毒性影响，用 1.25  $\mu\text{M}$ 、2.5  $\mu\text{M}$  和 5  $\mu\text{M}$  姜黄素预处理 EECs 2 h，然后用 60  $\mu\text{M}$  BPAF 处理 EECs 24 h 后进行检测。结果表明姜黄素浓度在 2.5  $\mu\text{M}$  时显著抑制 BPAF 诱导的细胞活力降低和线粒体膜电位损伤 ( $P < 0.05$ )，同时，姜黄素通过维持抗氧化系统平衡，显著降低 BPAF 诱导的 MDA 和 ROS 升高 ( $P < 0.001$ )，抑制 BPAF 对凋亡相关蛋白 Bax、Cytochrome C 和  $\gamma\text{-H2AX}$  表达的诱导升高效应，维持抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平稳定。此外，研究也发现姜黄素显著抑制 BPAF 对 EECs 中 MAPK 通路的激活效应 ( $P < 0.05$ )，并以负反馈方式恢复 Nrf2 通路表达。这些结果表明姜黄素可以通过多种途径有效保护 EECs 免受 BPAF 诱导的细胞毒性影响。

## 3. BPAF 通过激活自噬和内质网应激诱导 EECs 铁死亡

为了进一步探究 BPAF 对 EECs 的影响，本研究深入检测了 BPAF 处理 EECs 24 h 后对铁死亡、自噬和内质网应激的影响。研究发现 BPA 以剂量依赖性方式显著诱导铁死亡通路相关分子表达 ( $P < 0.05$ )，如 FTH1、GPX4、COX2 和 FAACL4 蛋白及 *NCOA4* mRNA，同时显著诱导 GSH 含量升高 ( $P < 0.001$ )。综合前述 ROS 和 MDA 的结果，提示 BPAF 诱导了 EECs 细胞铁死亡。此外，BPAF 处理还显著激活了自噬相关蛋白如 ATG5、Beclin1、LC3 和 P62 的表达 ( $P < 0.05$ )，促进了自噬体和溶酶体融合相关基因 *VAMP8* mRNA 表达 ( $P < 0.001$ )。这些结果提示 BPAF 处理激活了 EECs 自噬。然后，本研究用铁死亡抑制剂验证 BPAF 是否诱导了 EECs 铁死亡。研究结果发现，铁死亡抑制剂 Fer-1 预处理显著抑制了 BPAF 诱导的细胞活力降低 ( $P < 0.001$ ) 和 MDA 的升高 ( $P < 0.05$ )，并抑制 GPX4、COX2 和 FAACL4 的表达升高。此外，自噬抑制剂氯喹 (Chloroquine, CQ) 预处理也显著提升了细胞活力，并且 CQ 和 3-MA (3-Methyladenine, 3-MA) 均抑制了 BPAF 诱导的自噬和铁死亡相关蛋白和 *VAMP8* mRNA 表达水平的升高。这些结果表明 BPAF 诱导了 EECs 自噬依赖性铁死亡。进一步研究发现 BPAF 处理还可以显著激活内质网应激相关蛋白 GRP78、p-PERK、CHOP 和 ATF4 表达 ( $P < 0.05$ )，在用内质网抑制剂 4-苯基丁酸 (4-Phenylbutyric acid, 4-PBA) 处理 EECs 后，显著提升了细胞活力 ( $P < 0.01$ )，

并显著抑制 BPAF 诱导的 LC3 和 P62 表达 ( $P < 0.01$ ) 以及铁死亡相关蛋白激活如 FTH1、GPX4、COX2 和 FAACL4 ( $P < 0.01$ ), 表明 BPAF 通过激活内质网应激诱导 EECs 铁死亡。综上所述, BPAF 处理可能通过激活自噬和内质网应激, 诱导 EECs 发生铁死亡。

#### 4. 姜黄素通过抑制自噬和内质网应激缓解 BPAF 诱导的 EECs 铁死亡

为了探究姜黄素在缓解 BPAF 诱导 EECs 铁死亡方面的保护功效, 本研究用姜黄素预处理 EECs 后再用 BPAF 诱导铁死亡。研究结果表明, 姜黄素预处理显著抑制了 BPAF 诱导的 GPX4、COX2 和 FAACL4 蛋白表达升高 ( $P < 0.001$ )。这些结果表明姜黄素可能通过抑制铁死亡缓解 BPAF 对 EECs 的细胞毒性。此外, 姜黄素预处理还可以显著抑制 BPAF 诱导的自噬相关蛋白 ATG5、Beclin1、LC3 和 P62 表达 ( $P < 0.01$ ) 及 VAMP8 mRNA 水平的升高 ( $P < 0.05$ )。这些结果提示姜黄素可以通过抑制自噬缓解 BPAF 诱导 EECs 铁死亡。进一步研究发现, 姜黄素和 CQ 预处理均可显著抑制 BPAF 诱导的 NCOA4 mRNA 和 FTH1 表达水平升高 ( $P < 0.01$ ), 降低铁离子含量 ( $P < 0.05$ )。此外, DFOM 处理细胞显著提升了细胞活力 ( $P < 0.01$ ), 并显著抑制了铁死亡相关蛋白表达 ( $P < 0.05$ ), 这些结果表明姜黄素通过抑制铁蛋白自噬, 维持细胞铁稳态, 缓解了 BPAF 诱导的 EECs 铁死亡。姜黄素预处理显著抑制了 BPAF 诱导的内质网应激相关蛋白 ATF6、GRP78、p-PERK、CHOP 和 ATF4 表达水平升高 ( $P < 0.05$ )。结合上述 4-PBA 抑制实验结果, 表明姜黄素可能通过抑制内质网应激缓解 BPAF 诱导的铁死亡。

#### 5. PI3K/AKT/mTOR 和 Nrf2/HO-1 通路被激活以对抗 BPAF 诱导的铁死亡

为了探究 PI3K/AKT/mTOR 和 Nrf2/HO-1 通路在 BPAF 诱导的 EECs 铁死亡中的作用, 本研究对其进行了检测, 结果发现 BPAF 处理显著激活 EEC 中的 PI3K/AKT/mTOR 和 Nrf2/HO-1 通路 ( $P < 0.05$ ), 而姜黄素预处理可以显著抑制上述通路的激活 ( $P < 0.05$ )。为了进一步探究姜黄素预处理对 BPAF 诱导上述信号通路激活的保护效应, 本研究用 PI3K 抑制剂 LY294002 处理细胞, 结果发现抑制 PI3K 通路加剧了 BPAF 诱导的细胞损伤和自噬激活 ( $P < 0.01$ ), 但显著抑制了铁死亡相关蛋白表达 ( $P < 0.01$ )。敲低 Nrf2 使细胞活力进一步减低 ( $P < 0.01$ ), MDA 含量显著上升 ( $P < 0.01$ ), 表明敲低 Nrf2 加剧了细胞损伤, 但自噬和铁死亡相关蛋白在敲低 Nrf2 后显著降低 ( $P < 0.01$ )。与 Nrf2 敲低结果一致, HO-1 敲低同样加剧了细胞活力的降低 ( $P < 0.05$ ), 但 COX2 和 FAACL4 进一步上升 ( $P < 0.05$ )。这些结果表明 PI3K/AKT/mTOR 通路和

Nrf2/HO-1 通路的激活有助于抵御 BPAF 诱导的铁死亡发生,姜黄素可能通过负反馈方式恢复 PI3K/AKT/mTOR 和 Nrf2/HO-1 通路激活,降低自噬和铁死亡相关蛋白表达。

综上所述,本研究探究了 BPAF 对 EECs 的毒性影响以及姜黄素的缓解效果和作用机制。一方面 BPAF 通过氧化损伤和激活 MAPK 通路诱导了 EECs 凋亡。另一方面, BPAF 通过自噬和内质网应激途径诱导 EECs 铁死亡。姜黄素通过抑制 ROS 和 MDA,恢复抗氧化稳态,抑制 P38 和 ERK 信号通路,缓解了 BPAF 诱导的凋亡。同时,通过抑制 PERK 和 ATF6 通路以及自噬相关蛋白 ATG5、Beclin1、LC3 缓解 BPAF 诱导的内质网应激和自噬,降低 EECs 中铁离子含量,恢复铁稳态,进而抑制了 BPAF 诱导的铁死亡。研究结果丰富了 BPAF 对反刍动物繁殖健康的潜在影响和毒性机制,揭示了姜黄素缓解 BPAF 毒性的调控机制,为预防 BPAF 导致的相关疾病提供了潜在的预防策略和借鉴。

**关键词:** BPAF; 姜黄素; 奶山羊; 子宫内膜上皮细胞; 凋亡; 氧化应激; 铁死亡; 自噬; 内质网应激;

## Abstract

With the continuous development of social and economy, environmental contaminants have attracted more and more attention. In recent years, the impact of environmental pollutants in the livestock sector has received more and more attention due to their harmful effects on human reproductive health. Recently studies have shown that many livestock are becoming infertile or reduced fertility due to reasons associated with environmental and management reasons during the feeding process. However, research on the effects of environmental pollutants on ruminant fertility remains limited.

Bisphenol AF (BPAF), one of the substitutes for bisphenol A (BPA), has been widely used in the production of industrial plastic products, and is also widely present in many environmental mediums such as water, soil and air, which has potential harm to human and animal reproductive health. In recent years, a number of studies have shown that BPAF can disturb the formation of gametes and impairs reproductive health. Uterus, as the place where fetuses growth and development, also plays a key role in the reproductive process. However, there are few reports on the effects of BPAF on uterine toxicity.

Curcumin is a turmeric component isolated from the rhizome of turmeric. Numerous studies have reported that curcumin possesses antioxidant and anti-inflammatory properties and it can alleviate the cytotoxicity caused by various environmental pollutants. However, it is unclear whether curcumin could relieve the cell injury caused by BPAF. Therefore, in this study, we used caprine endometrial epithelial cell line as an in vitro model of uterus to explore the potential effects of BPAF on uterine function, and to determine whether curcumin exerts a protective effect on BPAF-induced cell damage and to probe the potential molecular mechanism.

### 1. BPAF induces apoptosis by activating oxidative stress in EECs

EECs were treated with different concentrations of BPAF (0, 10, 20, 40, 60 and 80  $\mu\text{M}$ ) for 24 h. The results showed that viability of cells significantly decreased when BPAF at 40  $\mu\text{M}$ -80  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.001$ ), while mitochondrial membrane potential significantly decreased at 20  $\mu\text{M}$ -80  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.01$ ). Oxidative stress-related indicator was detected and found that all tested concentrations of BPAF significantly raised the Reactive oxygen

species (ROS) levels ( $P < 0.001$ ), while the content of Malondialdehyde (MDA) and Glutathione Peroxidase (Glutathione Peroxidase, GSH-Px) were significantly elevated ( $P < 0.05$ ), and Superoxide dismutase (SOD) content were significantly decreased when BPAF at 40  $\mu\text{M}$ -80  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.01$ ), and (Catalase, CAT) content was significant improvement at 20 $\mu\text{M}$ -80  $\mu\text{M}$  BPAF( $P < 0.001$ ). In addition, it was also found that BPAF significantly upregulated the expression of apoptosis-related proteins Bax and  $\gamma$ -H2AX at 20  $\mu\text{M}$ -80  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.05$ ), and the level of Cytochrome C expression was significantly raised when BPAF concentration at 10 $\mu\text{M}$ -60  $\mu\text{M}$ ( $P < 0.05$ ). The anti-apoptotic protein Bcl-2 was significantly decreased at 40 $\mu\text{M}$  -80  $\mu\text{M}$  ( $P < 0.001$ ). Further study found that BPAF activates the MAPK (Mitogen activated protein kinase, MAPK) and Nrf2 pathways. The protein expressions of P-ERK1/2, P-P38, P-JNK, Nrf2, HO-1 and NQO1 were significantly increased ( $P < 0.01$ ). These results suggested that a range of BPAF concentration may induce oxidative stress of EECs by activating MAPK pathways, interfere the function of the antioxidant system, and thus cause the decrease of cell viability and induce cell apoptosis.

## **2. Curcumin alleviates BPAF-induced apoptosis of EECs by inhibiting oxidative stress and MAPK pathway**

In order to explore whether curcumin could alleviate the cytotoxic effects of BPAF on EECs, EECs were pretreated with curcumin at 1.25, 2.5 and 5  $\mu\text{M}$  for 2 h, and then incubated with 60  $\mu\text{M}$  BPAF for 24 h. The results showed that curcumin could markedly inhibit reduced cell viability and mitochondrial membrane potential damage induced by BPAF when the concentration was 2.5 $\mu\text{M}$  ( $P < 0.05$ ), at the same time, curcumin significantly reduce the MDA and ROS levels induced by BPAF by maintaining antioxidant system balance ( $P < 0.001$ ), Meanwhile, Curcumin could attenuated BPAF-induced apoptosis by inhibition expression of apoptosis-related proteins Bax Cytochrome c and  $\gamma$ -H2AX and elevated the expression of Bcl-2. In addition, curcumin significantly inhibited the activation of BPAF on MAPK pathway in EECs ( $P < 0.05$ ), and restored the expression of Nrf2 pathway in a negative feedback manner. These results suggest that curcumin could effectively protect EECs from BPAF-induced cytotoxicity through multiple pathways.

### 3. BPAF induces ferroptosis through activation of autophagy and endoplasmic reticulum stress in EECs

To probe the effect of BPAF on EECs, this study examined the ferroptosis, autophagy and endoplasmic reticulum stress after BPAF treatment of EECs for 24h. The results showed that BPAF significantly induced the expression of ferroptosis pathway-related factors ( $P < 0.05$ ), such as FTH1, GPX4, COX2, FACL4 proteins and *NCOA4* mRNA in a dose-dependent manner, and also significantly induced the increase of GSH activity ( $P < 0.001$ ). Combining the results of ROS and MDA mentioned above, these results demonstrated that BPAF induced ferroptosis in EECs. Additionally, autophagy-related proteins expression were also activated after treated with BPAF, such as ATG5, Beclin1, LC3 and P62 ( $P < 0.05$ ), and promoted the mRNA expression of autophagosome and lysosomal fusion related gene *VAMP8* ( $P < 0.001$ ). These results suggested that BPAF treatment activates autophagy. Then, ferroptosis inhibitors Fer-1 was used to verify whether BPAF induce ferroptosis in EECs. The results showed that pretreatment with Fer-1 significantly inhibited BPAF-induced cell viability reduction ( $P < 0.001$ ) and MDA increase ( $P < 0.05$ ), and inhibited GPX4, COX2, and FACL4 level. In addition, pretreatment with autophagy inhibitor Chloroquine (CQ) significantly improved cell viability, CQ and (3-Methyladenine, 3-MA) inhibited the increase of autophagy and ferroptosis-related protein expression and *VAMP8* mRNA levels induced by BPAF. These results suggest that BPAF induced autophagy-dependent ferroptosis in EECs. Further studies showed that the expression of Endoplasmic reticulum stress (ER stress)-related proteins, such as GRP78, P-PERK, CHOP and ATF4 were significantly upregulated ( $P < 0.05$ ), indicating that BPAF activated ER stress in EECs. Treatment of the EECs with endoplasmic reticulum inhibitor 4-Phenylbutyric acid (4-PBA) significantly increased cell viability ( $P < 0.01$ ), and significantly inhibited the expression of LC3 and P62 and the activation ferroptosis-related proteins such as FTH1, GPX4, COX2 and FACL4 induced by BPAF ( $P < 0.01$ ), suggesting that BPAF induced EECs ferroptosis by activating ER stress. In conclusion, BPAF-induced ferroptosis in EECs through activation autophagy and ER stress.

### 4. Curcumin alleviates BPAF-induced EECs ferroptosis by inhibiting autophagy and

## ER stress

In order to explore the protective effect of curcumin alleviating BPAF-induced ferroptosis in EECs. EECs were pretreated with curcumin and then incubated with BPAF to induce ferroptosis. The results showed that curcumin pretreatment significantly inhibited the expression of GPX4, COX2 and FACLA protein induced by BPAF ( $P < 0.001$ ). These results suggest that curcumin relieves BPAF-induced cytotoxicity of EECs by inhibiting ferroptosis. In addition, curcumin pretreatment significantly inhibited the expression of autophagy-related proteins ATG5, Beclin1, LC3 and P62 ( $P < 0.01$ ) and VAMP8 mRNA ( $P < 0.05$ ) level induced by BPAF. These results suggested that curcumin could alleviate BPAF-induced EECs ferroptosis by inhibiting autophagy. Further studies showed that curcumin or CQ pretreatment could significantly inhibit the increase of NCOA4 mRNA and FTH1 expression level induced by BPAF ( $P < 0.01$ ), and reduce iron content ( $P < 0.05$ ). Treatment with DFOM significantly improved cell viability ( $P < 0.01$ ) and inhibited ferroptosis related protein expression ( $P < 0.05$ ). These results indicated that curcumin alleviated BPAF-induced ferroptosis in EECs by inhibiting ferritinophagy and maintaining iron homeostasis in EECs. Curcumin pretreatment significantly inhibited the expression levels of ER stress-related proteins ATF6, GRP78, p-PERK, CHOP and ATF4 induced by BPAF ( $P < 0.05$ ). Combined with the results of 4-PBA pretreatment, it was suggested that curcumin could alleviate BPAF-induced ferroptosis by inhibiting ER stress.

## 5.The PI3K/AKT/mTOR and Nrf2/HO-1 pathways was activated to combat BPAF-induced ferroptosis

In order to explore the role of PI3K/AKT/mTOR and Nrf2/HO-1 in BPAF-induced ferroptosis of EECs, these pathways were examined in this study and found that BPAF treatment significantly activated the PI3K/AKT/mTOR and Nrf2/HO-1 pathway in EECs ( $P < 0.05$ ). However, curcumin pretreatment can significantly inhibit the activation of the above pathways ( $P < 0.05$ ). In order to further explore the protective effect of curcumin pretreatment on BPAF-induced activation of the above signaling pathway, cells were treated with PI3K inhibitor LY294002. The results showed that inhibition of PI3K pathway exacerbated BPAF-induced cell injury and autophagy activation ( $P < 0.01$ ), but

significantly inhibited the expression of ferroptosis-related proteins ( $P<0.01$ ). Nrf2 knockdown exacerbates BPAF-induced cell viability decreased ( $P<0.01$ ) and MDA content ( $P<0.01$ ), indicating that Nrf2 knockdown exacerbated cell damage, but autophagy and ferroptosis-death related proteins were significantly reduced after Nrf2 knockdown ( $P<0.01$ ). Consistent with Nrf2 knockdown results, HO-1 knockdown also exacerbated the decrease in cell viability ( $P<0.05$ ). However, the expression of COX2 and FACLA further enhanced ( $P<0.05$ ). These results suggested that the activation of PI3K/AKT/mTOR and Nrf2/HO-1 pathways contribute to resist the BPAF-induced ferroptosis, and curcumin reducing the expression of autophagy and ferroptosis-related proteins by restores the activation of PI3K/AKT/mTOR and Nrf2/HO-1 pathways in a negative feedback manner.

In summary, this study explored the toxic effects of BPAF on EECs and the alleviating effect and mechanism of curcumin. On the one hand, BPAF induces apoptosis of EECs through oxidative damage and activation MAPK pathway. On the other hand, BPAF induces EECs ferroptosis through autophagy and endoplasmic reticulum stress pathways. Curcumin alleviates BPAF-induced apoptosis by inhibiting ROS and MDA, restoring antioxidant homeostasis, inhibiting P38 and ERK signaling pathways. At the same time, curcumin attenuated BPAF-induced ferroptosis by inhibiting PERK and ATF6 pathways and autophagy-related proteins ATG5, Beclin1 and LC3, reduced iron content and restored iron homeostasis in EECs. The results enrich the potential effects of BPAF on reproductive health of ruminants and the mechanism of toxicity, reveal the regulatory mechanism of curcumin in alleviating BPAF toxicity, and provide potential preventive strategies and references for the prevention of BPAF-related diseases.

**Keywords:** BPAF; curcumin; caprine endometrial epithelial cells; apoptosis; oxidative stress; ferroptosis; autophagy; endoplasmic reticulum stress

## 缩略词（Abbreviation）

缩略词	英文全称	中文全称
Abbreviation	English name	Chinese name
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor-1	凋亡蛋白酶活化因子 1
BPAF	Bisphenol AF	双酚 AF
CUR	Curcumin	姜黄素
DHODH	Dihydroorotate dehydrogenase	二氢羟酸脱氢酶
DMT1	Divalent metal transporter 1	二价金属转运体
EECs	Endometrial epithelial cells	子宫内膜上皮细胞
ER stress	Endoplasmic reticulum stress	内质网应激
FACL4	CoA by acyl-CoA synthetase long-chain Family member 4	辅酶 a 由酰基辅酶 a 合成酶长链 家族成员 4
FPN1	Ferroportin 1	膜铁转运蛋白
GCH1	GTP cyclohydrolase 1	GTP 环水解酶 1
HO-1	Heme oxygenase 1	血红素加氧酶 1
LPCAT3	Lysophosphatidylcholineacyltransferase 3	溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶
LIP	Labile iron pool	不稳定铁池
Nrf2	Nuclear factor-E2-related factor 2	核因子 E2 相关因子 2
NCOA4	Nuclear receptor coactivator 4	核受体共激活因子 4
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	丝裂原激活蛋白激酶
PLOOH	Phospholipid hydroperoxides	磷脂氢过氧化物
PUFAs	Polyunsaturated fatty acids	多不饱和脂肪酸
UPR	Unfolded protein response	未折叠蛋白反应

## 第一章 文献综述

近年来, 由于环境污染物的不断增加以及对人类和动物带来的有害影响被不断发现, 人们越来越多的关注环境污染物对动物繁殖性能和繁殖力的毒性影响。在饲养过程中, 很多牲畜长期处于金属、除草剂、农药、化学品或天然污染物等污染环境, 可能引起牲畜生育力降低, 流产或不育 (Guvvala et al 2020)。然而, 环境污染物对反刍动物繁殖性能影响的研究仍然较少。环境污染物在日常环境中无处不在, 这些污染物通过空气、饮用水、土壤和饲料等途径进入口腔 (Lymberopoulos et al 2000)、子宫 (Oskam et al 2005) 和乳房 (Jiang et al 2021c), 对牲畜健康构成威胁。多种动物实验表明, 污染物的大剂量急性或小剂量的慢性接触会导致包括生殖功能在内的多器官/系统的损伤和生殖细胞功能受损和死亡 (Keshavarzi et al 2015)。此外, 环境污染物对性腺的内分泌干扰作用会影响配子的生成和类固醇生成, 从而扰乱动物正常的生殖系统和健康, 降低动物的生殖效率 (Mathur and D'Cruz 2011, Musachio et al 2024)。尽管短期接触这些环境污染物不会导致动物死亡, 但长期低浓度接触或当其在体内蓄积并超过安全浓度时, 牲畜体内的正常细胞代谢过程可能会被打乱, 并对生育力和健康产生长期不利影响 (Poppenga 2000)。因此, 了解环境中存在的主要污染物以及它们如何影响动物的健康和生殖能力是至关重要的, 这样才能最大限度地减少、避免和预防污染物带来的不良影响。

### 1. 双酚 AF (BPAF) 研究进展

#### 1.1 BPAF 的应用和污染现状

内分泌干扰物是通过干扰内源性激素生物合成、代谢、信号传导或作用来干扰内分泌稳态, 从而导致人类和动物偏离正常的生殖和稳态控制的外源性物质 (Gore et al 2015b)。双酚类化合物作为一种化学合成品, 具有类雌激素的作用, 被认为是一种新型的内分泌干扰物 (Waring et al 2018), 广泛应用于聚碳酸酯塑料、环氧树脂等聚合物的合成和塑料瓶、医疗设备、水瓶、食品容器、玩具以及其他产品的生产 (Chen et al 2016, Song et al 2012)。人类接触双酚类化合物的主要途径是通过受污染的食物和饮料 (Vandenberg et al 2007), 此外, 呼吸和皮肤接触也被确定为潜在的接触途径 (Reale et al 2021)。双酚 A (BPA) 是一种最常用和研究最广泛的双酚类化合物, 广泛用于聚碳酸酯塑料和食品包装, 在过去的几十年, 已有大量研究表明 BPA 会对人类和动物生殖健康产生危害 (Fujimoto et al 2011, Li et al 2011, 王尹强 et al 2023)。

如 BPA 被报道与多种不良生殖健康结果有关，包括睾丸组织损伤和生殖细胞凋亡、抑制卵母细胞成熟，月经周期不规则等（代雁凌，Machtinger and Orvieto 2014）。因此，考虑到 BPA 潜在的健康风险，自 2011 年以来，欧盟、美国和中国已经禁止了在某些产品中对 BPA 使用，特别是在婴幼儿产品中，以避免在胎儿和新生儿时期接触到 BPA (Jin et al 2020, Liao et al 2012)。尽管有越来越多的证据表明它们是潜在的内分泌干扰物，但双酚类似物在塑料工业中的应用却急剧增加，并且由于其结构相似，因此研究 BPA 替代品的生物安全性对于评估其在人类和动物日常生活中的安全使用具有重要意义。

BPAF 是 BPA 的类似物，在氟聚合物和氟弹性体的生产中被广泛用作交联试剂，并在聚酰亚胺、聚酰胺、聚酯、聚碳酸酯和食品接触聚合物等许多聚合物的生产中作为单体 (Akahori et al 2008, LaFleur and Schug 2011)。近年来，随着 BPAF 在环境中的广泛存在和分布，使其成为一种新兴的环境污染物 (Liu et al 2021)，其安全风险也得到人们越来越多的重视。多种证据表明，在许多环境介质中，都可以检测到 BPAF 的存在，如室内灰尘含量为 739 (ng/g dw) 和水中含量为 15300 (ng/L) (LaFleur and Schug 2011)。此外，在其他不同的环境介质中也发现了 BPAF 的存在，如纸质和化妆类产品 (Chen et al 2016) 以及食品中 (Česen et al 2016)，甚至在生物样品中也发现了 BPAF 的存在，如成年人血液 (Jin et al 2018)，胎儿脐带血平均浓度为 0.073 (ng/mL) (Ihde et al 2018)，母乳 0-0.052 (ug/L) (Niu et al 2017) 以及尿液 0.173 ng/ml (Yang et al 2014b)。相关分析研究表明，BPAF 具有与 BPA 相似的化学活性结构，且 BPAF 具有比 BPA 更强的雌激素活性 (Maruyama et al 2013)。体外和体内研究也证明 BPAF 的雌激素活性要强于 BPA (Li et al 2012, Mesnage et al 2017, Mu et al 2018)。此外，BPAF 比 BPA 更容易在生物中积累，且更难降解 (Maruyama et al 2013, Zhou et al 2020b)。因此，广泛的接触和 BPAF 的持续存在引起了人们对其潜在不利影响的关注。然而，关于 BPAF 的毒性数据仍然有限，特别是对于大型反刍动物繁殖功能的影响。

## 1.2 BPAF 的生殖毒性研究

### 1.2.1 BPAF 对子宫的影响

子宫是雌性动物生殖的重要器官，在受精、着床、胚胎发育等妊娠过程中发挥着重要作用 (Konno et al 2000)。成年动物的子宫由两种组织构成，即子宫内膜和子

宫肌层。子宫内膜包括间质细胞和上皮细胞 (Sone et al 2013), 在卵巢激素的作用下, 其生长、分化和变性呈周期性变化。子宫内膜异常与许多疾病的发生有着密切关系, 如不孕症、子宫内膜增生、子宫内膜癌和子宫内膜异位症等, 这些疾病的发生会严重影响动物生殖健康 (Hong and Choi 2018)。子宫是内分泌干扰物的重要作用靶点之一 (Gore et al 2015a), 内分泌干扰物会破坏正常的子宫结构和功能, 导致生殖功能障碍和子宫内膜异位症的发生 (Jones et al 2018)。Wu 等研究表明, 环境相关 BPAF 浓度会增加子宫患病风险, 改变子宫内膜形态, 如增加腺体数量、降低上皮高度等, 改变子宫的免疫稳态, 诱发子宫内膜异位症和子宫内膜萎缩, 而子宫腺的增加会导致生殖能力降低。此外, BPAF 还会干扰免疫反应和人类疾病的关键通路表达, 最终导致子宫表型的改变, 甚至持续到子宫内膜癌的发生和发展, 导致不良的子宫结局 (Wu et al 2023)。这些结果表明 BPAF 暴露可能导致子宫形态异常的发生率增加, 从而对生殖健康产生不利影响。BPAF 暴露除对母体本身健康产生危害外, 还会通过改变子宫内环境稳态影响后代的发育, 如子宫内接触 BPAF 可通过产生氧化应激, 降低 SIRT1/PGC1 $\alpha$  信号等途径诱导雄性胎儿的间质细胞功能紊乱和多核性腺细胞发生率的增加, 从而对男性生殖器官构成潜在威胁 (Tian et al 2022)。

### 1.2.2 BPAF 对睾丸功能的影响

睾丸是维持雄性生殖能力的关键器官, 通过合成睾酮和产生雄性配子来维持雄性生殖功能 (Silva et al 2016)。睾酮是由睾丸间质中的间质细胞通过类固醇生成过程合成和分泌的, 它对雄性生殖系统的发育和睾丸中的精子发生起着关键作用 (Ye et al 2011)。Feng 等研究表明 BPAF 会导致血清睾酮水平降低, 黄体生成素和卵泡刺激素水平升高。BPAF 还会使大鼠睾丸组织中抑制素 B、雌激素受体和黄体生成素受体的 mRNA 水平明显降低 (Feng et al 2012)。Yu 等研究发现 BPAF 显著降低间质细胞数量, 诱导活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 并降低超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD) 水平, 增加丙二醛 (Malonyldialdehyde, MDA) 含量, 同时诱导凋亡和自噬, 抑制间质细胞的再生 (Yu et al 2022b)。一项体内和体外研究表明, BPAF 暴露以剂量依赖性方式损伤血睾屏障完整性, 并引发精子 DNA 损伤和 ROS 产生, 降低精子数量和质量。进一步研究发现, 这可能是由于 BPAF 激活 ERK/MAPK (Mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路导致肌动蛋白调节蛋白功能障碍, 从而破坏睾丸支持细胞为精子发生创造的特殊微环境, 损害细胞骨

架结构和紧密连接的通透性 (Wu et al 2019)。除直接接触 BPAF 会对雄性生育能力造成损伤外，间接暴露于 BPAF 环境同样会对雄性生殖功能造成负面影响。一项产前接触 BPAF 实验表明，产前暴露于 BPAF 会通过 Aim2-NF- $\kappa$ B-IFNs 信号通路引起成年雄性睾丸的先天和适应性免疫反应，降低精子质量和活力，导致雄性子代生殖功能障碍 (Xue et al 2023)。

### 1.2.3 BPAF 对卵巢颗粒细胞和卵母细胞的影响

颗粒细胞通过产生类固醇和性激素受体在卵泡发育中起关键作用 (Albertini et al 2001, Chang et al 2016, Pelusi et al 2008)。颗粒细胞功能受损不仅导致类固醇激素分泌受损，还会导致卵泡发育障碍 (Das et al 2008, Fan et al 2008, Matsuda et al 2012)，而 BPAF 暴露可会导致以颗粒细胞凋亡为特征的卵泡闭锁和死亡，并降低卵巢重量 (Ye et al 2011)，体外研究也证实，BPAF 通过雌激素受体 ER $\beta$  和 ROS-ASK1-JNK 轴途径以剂量依赖性方式诱导了人颗粒细胞的 ROS 和凋亡的发生 (Huang et al 2021)，这表明 BPAF 会通过损伤颗粒细胞对女性生殖健康产生危害。在妊娠期间接触 BPAF 会引起减数分裂起始延迟，增加细胞错配修复蛋白的数量，诱导卵母细胞非整倍体的发生和 DNA 氧化，进而影响胎儿的卵子发生 (Abdallah et al 2023a)。体内研究表明，小鼠灌喂 300  $\mu$ g/kg/d BPAF 14 到 28 天后，会导致卵巢组织形态改变，并改变了参与卵巢疾病发生的差异表达基因和转录因子 (Yue et al 2023)。BPAF 不仅会对卵巢和颗粒细胞产生有害影响，同样会影响卵母细胞的体外成熟，一项体外研究表明，BPAF 会诱导卵母细胞 ROS 和 DNA 损伤增加，并通过影响微管组织中心扰乱纺锤体形态 (Ding et al 2017)。此外，以往的研究表明，相较于卵母细胞，卵巢颗粒细胞往往对 BPAF 更加敏感，即使在卵母细胞不受影响的影响下，也会以较低的浓度引发卵巢颗粒细胞的凋亡和氧化应激 (Huang et al 2021)，从而间接影响卵母细胞的成熟和发育。综上所述，BPAF 以不同的调节作用和作用机制干扰了颗粒细胞和卵泡发育的生物学功能，从而对雌性动物生殖系统产生危害。

### 1.2.4 BPAF 对乳腺的影响

乳腺是合成和分泌乳汁以及哺乳后代的重要器官，许多激素和生长因子参与了乳腺组织的发育和调控，而模拟或干扰内源性激素作用的环境化学物质会干扰正常的乳腺发育 (Rudel et al 2011)。一项产前 BPAF 处理对雌性小鼠乳腺发育和长期健康的研究表明，BPAF 会导致小鼠乳腺早熟，并且更容易发生自发的肿瘤前上皮病变

和炎症 (Tucker et al 2018), 此外, 在人乳腺癌细胞中, 即使是纳摩尔浓度的 BPAF 也可以作为 ER $\alpha$  激动剂, 并通过诱导 ER $\beta$ 1 发挥抗雌激素化合物的作用 (Okazaki et al 2018, 卢芬 et al 2021)。Lei(2019)研究表明, BPAF 在纳摩尔浓度下可以提高细胞内 ROS 和 Ca<sup>2+</sup>水平, 并通过激活 G 蛋白偶联受体介导的 PI3K/AKT 和 ERK 通路和 ER $\alpha$ , 促进 MCE-7 细胞增殖 (Lei et al 2021)。

## 2 程序性细胞死亡研究进展

### 2.1 细胞凋亡

细胞凋亡是指基因通过不同信号通路调控的程序性细胞死亡方式, 通过内源性途径 (线粒体途径) 和外源性途径 (死亡受体途径) 发生, 是正常发育和维持组织稳态所必需的重要生理过程 (Fuchs and Steller 2011, Obeng 2021, Taylor et al 2008)。但是, 当机体接触到有毒有害的物质或处于不利环境中时, 也会引发不可逆的凋亡, 当细胞凋亡失去控制时, 可导致多种疾病, 包括癌症、自身免疫性疾病和神经退行性疾病等 (Carson and Ribeiro 1993)。凋亡具有典型的形态学特征, 如细胞膜收缩, 染色质凝聚、核固缩、细胞器水解、凋亡小体的形成、细胞收缩等 (Taylor et al 2008)。凋亡机制的核心成分在整个进化过程中都是保守的, 包括 Bcl-2, 凋亡蛋白酶活化因子 1 (Apoptotic protease-activating factor-1, Apaf-1) 和半胱氨酸蛋白酶 (Caspase) 家族成员 (Budihardjo et al 1999)。Caspase 是一种休眠的原酶, 在蛋白水解激活后获得切割细胞内关键底物的能力, 从而导致与细胞凋亡相关的形态和生化特征的改变 (Boice and Bouchier-Hayes 2020, Kesavardhana et al 2020)。此外, 在多种刺激引起的细胞凋亡中, 线粒体通过释放细胞色素 C (Cytochrome C) 在协调 Caspase 激活中发挥关键作用 (Nezic et al 2020)。Bcl-2 蛋白家族通过控制线粒体细胞色素 C 的释放, 参与细胞凋亡调节。在多种细胞毒性作用下, Bcl-2 或 Bcl-xL 的过度表达可阻止线粒体释放细胞色素 C、Caspase 活化和细胞凋亡 (Fesik 2000)。而 Bax 可被死亡信号激活, Bax 插入线粒体外膜后, 线粒体迅速释放细胞色素 C。进一步研究表明, Bax 和 Bcl-2 可以通过对通透性转换孔的开关调控细胞色素 C 的释放 (Jürgensmeier et al 1998, Rossé et al 1998)。综上所述, 这些数据表明 Bax 或 Bcl-2 样蛋白通过调控细胞色素 C 的释放, 参与对凋亡的调控。

细胞凋亡的发生与多种信号通路存在着错综复杂的关系, 以往研究证明, MAPK 家族是参与调控细胞的增殖、凋亡和多种应激反应的关键通路, 如 P38 通路、ERK1/2

通路和 JNK 信号通路 (Guo et al 2020)。此外，MAPK、PI3K/AKT/mTOR 和 AMPK 等通路还可以通过自噬等代谢途径参与对细胞凋亡的调控 (Klionsky et al 2016)。除细胞凋亡之外，其他途径也参与了程序性细胞死亡，如细胞焦亡和铁死亡。特别是铁死亡在疾病中的作用和机制近年来引起了人们的广泛关注。

## 2.2 铁死亡研究进展

铁死亡是一种新发现的由细胞膜上脂质过氧化物的过量产生驱动的铁依赖性细胞死亡方式，它在形态、代谢、生化和基因表达上都不同于其他种类的调控性细胞死亡。(Dixon et al 2012, Doll et al 2017 Yang et al 2014a)，铁死亡的一个典型特征是致死性的脂质过氧化物的产生和积累，这与氧化应激系统和抗氧化防御系统之间的平衡有关 (Jiang et al 2021b)。当细胞内铁死亡防御系统不足以抵消细胞产生的脂质过氧化物时，就可能会导致细胞膜上脂质过氧化物的过度积累以及随之而来的细胞膜破裂，并最终导致铁死亡 (Kraft et al 2020a , Yang et al 2014a)。这种调控机制明显不同于其他几种已知的细胞死亡形式，如 Caspase 途径介导的细胞凋亡和 Gasdermin-D 介导的以细胞焦亡为核心的调控性细胞死亡 (Galluzzi et al 2018)。

### 2.2.1 铁死亡发生机制

在铁死亡发现以来的十几年中，对铁死亡的发生机制进行了大量的研究，并取得了飞速的发展。铁死亡的发生涉及多种代谢途径，其中脂质和铁代谢是最重要的途径，无限制的脂质过氧化是铁死亡的标志 (Jiang et al 2021b) (图 1)。

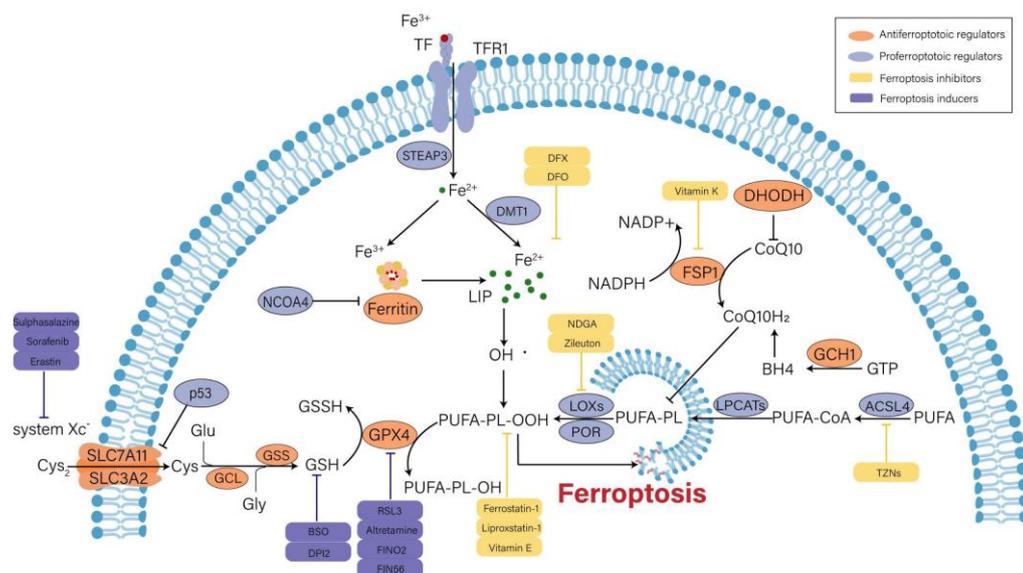


图 1 铁死亡发生机制 (Wang et al 2023)

Fig. 1 Mechanism of ferroptosis

### 2.2.1.1 脂质代谢途径

铁死亡的发生是由脂质过氧化引起的，但并不是所有的脂质都能参与过氧化反应。脂质组学分析表明，含有多不饱和脂肪酸的磷脂，特别是质膜中含有花生四烯酸或肾上腺酸的磷脂酰乙醇胺和磷脂酰胆碱最容易发生铁死亡相关的过氧化反应 (Kagan et al 2017, Yang and Stockwell 2016)。

多不饱和脂肪酸 (Polyunsaturated fatty acids, PUFAs) 诱导铁死亡发生主要分为两个步骤：(1) 游离 PUFA 被激活并结合到质膜中形成 PUFA 磷脂，游离 PUFAs 的激活需要 FAACL4 和 LPCAT3 的催化。(2) PUFA 磷脂的脂质过氧化反应。

具体来将，游离的细胞质 PUFAs 在 FAACL4 催化下，生成 PUFA-CoA，随后与质膜中的磷脂结合。如 FAACL4 催化花生四烯酸和肾上腺酸与 CoA 连接，生成的 PUFA-CoAs 与质膜中的磷脂结合，最终由 LPCAT3 并入磷脂酰胆碱或磷脂酰乙醇胺 (Dixon et al 2015, Doll et al 2017)。磷脂酰乙醇胺-花生四烯酸和磷脂酰乙醇胺-肾上腺酸在脂氧合酶和 PEs 结合蛋白 1 (PEs binding protein 1, PEBP1) 共同作用下，在质膜处诱导脂质过氧化 (Shah et al 2018)。脂质氧化的主要产物是磷脂氢过氧化物 (Phospholipid hydroperoxides, PLOOH) 和 MDA (Conrad and Pratt 2019)。一旦 PLOOH 没有被自由基清除剂或抗氧化系统迅速清除，就会发生链式反应，PUFA-PLs 与升高的不稳定铁池 (Labile iron pool, LIP) 产生芬顿反应生成烷氧基和过氧基自由基，然后进一步催化 PLOOH 生产，最终导致铁死亡的发生 (Mishima and Conrad 2022)。

### 2.2.1.2 铁代谢途径

顾名思义，“铁死亡”这一术语之所以被创造，正是因为它对铁的依赖性 (Dixon et al 2012)。铁是人类生存所必须的微量元素，除运输和储存氧气外，还参与了线粒体中的氧化磷酸化、DNA 生物合成、氧化磷酸化和许多代谢氧化还原反应的催化作用等生物过程 (Arredondo and Núñez 2005)。在生物体系中，铁主要以两种离子形式存在，即三价铁 ( $\text{Fe}^{3+}$ ) 和亚铁 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (Daher et al 2017)。进入细胞中的铁大部分被结合到蛋白质中或被铁蛋白储存，铁蛋白是一种由铁蛋白轻链和铁蛋白重链组成的储铁蛋白复合物，而剩余的相对较少的游离铁构成 LIP。具体的讲，首先，细胞外铁 ( $\text{Fe}^{3+}$ ) 与转铁蛋白结合，并通过转铁蛋白受体 1 进入核内体，在核内体中，酸性 PH 促进转铁蛋白受体和  $\text{Fe}^{3+}$  的解离，然后  $\text{Fe}^{3+}$  被金属还原酶还原为  $\text{Fe}^{2+}$ ，并

通过二价金属转运体从核内体/溶酶体转运到细胞质中，形成 LIP。最后，多余的铁通过铁转运蛋白输出细胞外，与含铁蛋白结合，或由铁蛋白结合并储存为  $Fe^{3+}$  (Anandhan et al 2020) (图 2)。在正常情况下，细胞通过协调铁的摄取、利用、储存和输出来维持 LIP 的相对稳定 (Chen et al 2020b)，过量的游离、氧化还原活性铁水平可以通过芬顿反应促进活性氧的产生，导致脂质过氧化物的不断增加，并引发铁死亡。细胞中的铁主要以  $Fe^{3+}$  的形式储存在铁蛋白中，然而当铁蛋白被过度水解时，与铁蛋白结合的铁就会被释放为游离铁，并通过芬顿反应引起氧化损伤，引发铁死亡。核受体共激活因子 4 (Nuclear receptor coactivator 4, NCOA4) 通过与铁蛋白重链相互作用，在铁蛋白降解过程中发挥关键作用，这一过程被称为铁蛋白自噬 (Mancias et al 2014a)。因此，通过敲低或抑制 NCOA4 可以阻断铁蛋白自噬，减少 LIP 的水平，达到抑制铁死亡的目的。铁不仅通过引发非酶促的 Fenton 反应直接过氧化 PUFA-PLs (Conrad and Pratt 2019, Gaschler and Stockwell 2017)，还可以作为参与脂质过氧化酶如花生四烯酸脂氧合酶和细胞色素 P450 氧化还原酶合成的必要辅助因子 (Koppula et al 2021, Yang et al 2016)。因此，维持细胞铁稳态对细胞的存活是必不可少的 (Chen et al 2015)。

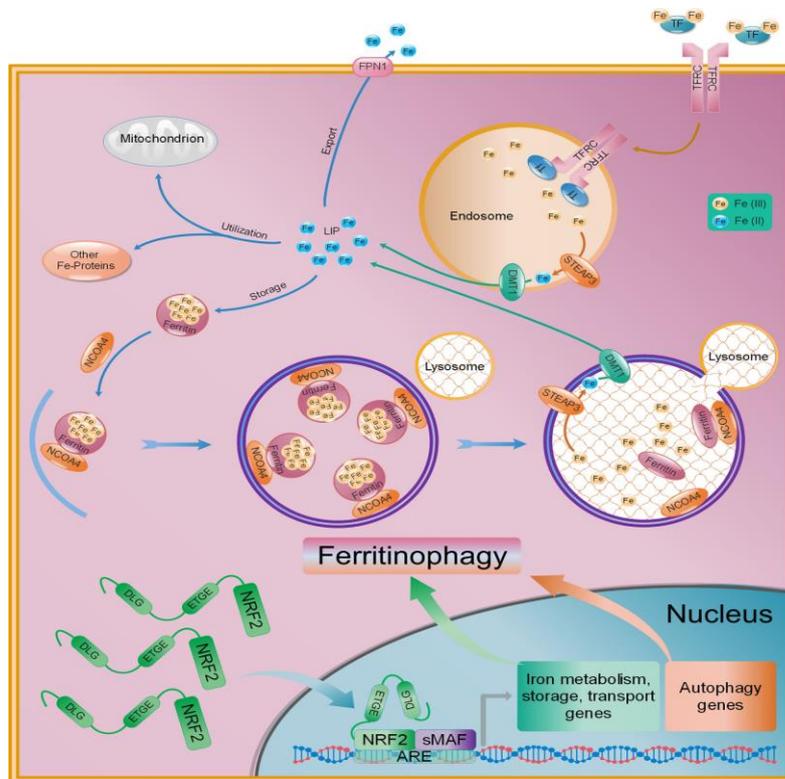


图 2 铁代谢及铁蛋白自噬以及与 Nrf2 的调控关系 (Angeli et al 2017)

Fig 2 Iron metabolism and ferritinophagy and their regulation by Nrf2

### 2.2.2 铁死亡防御机制

在长期的进化过程中，细胞已经进化出几种铁死亡防御系统，它们可以帮助清除过量的脂质过氧化物，维持细胞稳态。铁死亡的主要原因是通过催化活性铁生成特定的 PLOOH，而 GPX4 是主要的 PLOOH 中和酶 (Angeli et al 2014b, Dixon et al 2012, Friedmann)，因此，Xc<sup>-</sup>/GSH/GPX4 系统中的任何一个受到干扰都可能导致细胞的铁死亡，该轴的最上游部分是系统 Xc<sup>-</sup>，这是一种由轻链亚基 (Light-chain subunit, SLC7A11) 和重链亚基 (Heavy-chain subunit, SLC3A2) 组成的二硫异二聚体 (Conrad and Sato 2012)，广泛分布于细胞膜磷脂双层的氨基酸转运蛋白，正常情况下，它可以支持细胞通过胱氨酸/谷氨酸反向转运体以 1:1 的比例交换细胞内谷氨酸和细胞外胱氨酸，捕获的胱氨酸在进入细胞后会被还原为半胱氨酸，参与谷胱甘肽 (Glutathione, GSH) 的合成 (Dixon et al 2012)。作为一种抗氧化三肽，GSH 是细胞内的一种抗氧化剂，参与酶和非酶反应，有助于维持细胞内过氧化氢的正常水平。在生理条件下，细胞通过 GPX4 对抗脂质过氧化，GPX4 是一种必需的硒蛋白，可将脂质过氧化氢 (Lipid hydroperoxides, L-OOH) 转化为无毒的脂质醇 (Lipid alcohols, L-OH)，从而阻断有害脂质过氧化物引起的细胞铁死亡 (Seiler et al 2008)。因此，通过使用一些药物如 Erastin (Dixon et al 2012)、Sorafenib 或 Sulfasalazine (Louandre et al 2013) 抑制溶质载体家族 7 成员 11 可导致 GSH 缺乏和 GPX4 失活，触发脂质过氧化引起的嗜铁细胞死亡。通过敲除 GPX4 可诱导铁死亡途径引起急性肾衰竭 (Friedmann Angeli et al 2014a)，在小鼠胚胎成纤维细胞中敲除 SLC7A11 或 GPX4 基因可导致细胞铁死亡的发生 (Seiler et al 2008)。这些发现表明 SLC7A11- GSH-GPX4 抗氧化轴在铁死亡中的关键作用。除 GPX4 可以发挥铁死亡抗氧化作用外，近几年也发现了一些独立于 GPX4 的铁死亡防御系统，如铁死亡抑制蛋白 1 (Ferroptosis suppressor protein 1, FSP1)，GTP 环水解酶 1 (GTP cyclohydrolase 1, GCH1) 和二氢羟酸脱氢酶 (Dihydroorotate dehydrogenase, DHODH)。FSP1 通过催化 CoQ10 再生为其还原形式 CoQ10-H2 来防止铁死亡，CoQ10-H2 是一种有效的线粒体和脂质过氧化自由基捕获抗氧化剂 (Doll et al 2019)。GCH1 主要通过产生亲脂性抗氧化剂四氢生物蝶呤 (BH4) 和重塑脂膜环境来增加 CoQ10H2 和消耗 PUFAs 以抑制铁死亡 (Kraft et al 2020b)。此外，DHODH 是一种位

于线粒体内的铁死亡抑制剂，其功能类似于 FSP1，通过促进线粒体 CoQ10 向 CoQ10-H2 的转化而起作用 (Mao et al 2021)。

### 2.2.3 铁死亡与生殖疾病

众所周知，新生命的诞生需要一系列复杂的繁殖事件。一些研究者发现多种铁死亡相关基因在动物生殖中表达并发挥重要作用。一些生殖相关疾病如自发性早产、子宫内膜异位症、胎盘缺氧等被证实与铁死亡和铁死亡相关基因的异常表达有关 (Beharier et al 2020, Beharier et al 2021, Li et al 2021d, Ng et al 2019)。在胚胎发育过程中需要大量的铁，为了满足母亲和不断增加的代谢需求，确保胎儿的正常生长和发育。妊娠期间母体每日对铁的需求量增加至 1000 mg 以上 (Sangkhae et al 2023)。铁的缺乏会导致不良的妊娠结局，如子宫生长迟缓、新生儿出生体重降低和婴儿神经和免疫功能受损等 (Powers et al 2017)。到目前为止，大量研究致力于预防缺铁性贫血的发生，然而，有研究发现在铁充足且非贫血的女性中，过量的铁补充也可能会增加其它生殖疾病的风险，如子宫内膜异位症，这是由过量铁摄入或高铁状态引起的 (Li et al 2021d, Ng et al 2019)。过量的铁摄入会增加胚胎和胎盘中的铁水平，为铁死亡发生创造条件 (Sangkhae et al 2023)。因此，越来越多的研究者认为一些生殖疾病可能与过量的铁摄入有关，而经铁死亡抑制剂治疗后，相关疾病会得到缓解，这为人类一些生殖疾病的治疗和预防提供了新的思路。

## 2.3 自噬

最近的研究表明，自噬和铁死亡具有共同的调节因子 (Kang and Tang 2017)。在选择性自噬中，由于铁蛋白在自噬过程中被降解，从而增加了细胞中铁离子释放，最终导致细胞死亡的发生 (Hou et al 2016)。自噬是维持细胞内稳态的主要降解和再循环过程之一，它的功能是清除错误折叠的蛋白质和有缺陷或受损的细胞器等，它们被运送到溶酶体后会被降解为核苷酸、氨基酸、脂肪酸等物质，然后再进行循环利用 (Kaur and Debnath 2015)。细胞中有三种形态和机制各不相同的自噬类型，包括巨噬、微自噬和分子伴侣介导的自噬 (Xie and Klionsky 2007)，其中巨自噬是主要的和研究较为广泛的自噬类型，因此通常的自噬一般指的是巨自噬 (Glick et al 2010)。这种由溶酶体介导的细胞自我消化和再循环过程，能够帮助细胞在饥饿和应激时提供必须的能量来源，维持细胞基础代谢和生存，同时对受损细胞器的清除也有利于维持细胞稳态和控制细胞器的质量和数量 (Mizushima and Komatsu 2011，

Netea-Maier et al 2016)。此外，自噬在调节细胞生长、分化、肿瘤抑制和程序性死亡等生理过程中也起着重要作用 (Kuma et al 2017)。过度的自噬或自噬不足会导致多种疾病的发生，如癌症、心血管疾病、阿尔兹海默症等 (Eshraghi et al 2021, Gustafsson 2015, Orogo and Li et al 2020b)。在正常生理状态下，基础自噬有助于维持细胞平衡。然而在细胞受到饥饿、病原体侵袭，缺氧或暴露于有毒分子等细胞内外其他因素刺激时，自噬就会被激活以促进细胞生存，但过度的自噬会促进细胞死亡，特别是选择性自噬和溶酶体活性受损可能促进铁嗜性细胞死亡。(Baehrecke 2005, Hou et al 2016, Mizushima et al 2008)。

自噬过程主要包括自噬的诱导、自噬小体的组装和形成、自噬小体与溶酶体融合生成自噬溶酶体等过程，以及自噬溶酶体中内容物的降解和再循环利用等密切相关的几个步骤 (Hansen and Johansen 2011, Mizushima 2007)。在营养物质或生长因子缺乏时，AMPK 会被激活并导致 mTOR 信号受到抑制，随后非 c-51 样自噬激活激酶 1 (Unc-51-like autophagy-activating kinase 1, ULK1) 激活并磷酸化 Beclin-1，导致磷脂酰肌醇 3-激酶催化亚基 3 型 (Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3 (PIK3C3, 也称 VPS34) 的激活和吞噬体的形成 (Russell et al 2013)。VPS34 可以在细胞膜生成磷脂酰肌醇 (3, 4, 5) - 三磷酸 (phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate, PI3P)，并最终成为吞噬泡。PI3P 通过招募蛋白以延伸吞噬体。吞噬体的延伸需要磷脂酰乙醇胺 (Phosphatidylethanolamine, PE) 脂化 LC3 结合，其形成是由 ATG5 和 ATG7 等多种 ATG 蛋白组成的两个“泛素样偶联系统”催化的 (Klionsky and Schulman 2014)。吞噬体延长直到膜融合，产生自噬体，细长吞噬体的关闭标志着成熟自噬体的形成，最终与溶酶体融合形成自噬溶酶体，导致货物降解和营养物质和代谢物的再循环。

PI3K/AKT/ mTOR 通路是自噬的关键调控因子，其中 mTOR 是自噬负性调控的中心检查点 (Wullschleger et al 2006)。一般来说，I 类 PI3K 激活会抑制自噬，PI3K 通过 AKT 激活 mTOR，其中 mTORC1 通过磷酸化 ULK1 复合物中的 ULK1 和 Atg13，以及 VPS34 复合物中的 Atg14，降低 ULK1 和 VPS34 的活性，抑制自噬的起始 (Hosokawa et al 2009)。而 III 类 PI3K 通过与 Beclin-1 形成复合物，调控其他 ATG 蛋白活性和自噬前体结构，促进自噬的发生 (Edinger and Thompson 2003)。

自噬降解是一个选择性的过程，通过自噬受体蛋白靶向不同的货物。泛素结合蛋白 P62，也被称为 SQSTM1，是一种自噬货物受体，通过其 C 端泛素关联结构域与

泛素化货物结合，并通过其 LC3 相互作用区域（LC3-interacting region, LIR）与 LC3 相互作用，引导受损的细胞器或多泛素蛋白到自噬体中降解，这一过程使 P62 也被自噬特异性降解 (Lee et al 2017, Komatsu et al 2007, ), 这个过程可以通过 III 类 PI3K 抑制剂或消耗 Atg12 蛋白同源物来抑制 (Kim et al 2008)。

## 2.4 内质网应激

近年来，越来越多的研究表明，内质网应激参与了多种因素诱导的铁死亡过程 (Tang et al 2021b)。如内质网应激可以通过增加 HO-1 表达促进溃疡性结肠炎和香烟烟雾诱导的铁死亡 (Chang et al 2018b, Tang et al 2021b)，相反，铁死亡过程中产生的 ROS 会通过 PERK/eIF2 $\alpha$  途径激活内质网应激 (Dixon et al 2014)

内质网是一种多功能细胞器，在多种生理过程中起着重要作用，参与细胞内蛋白质和脂质合成、蛋白质加工和成熟以及钙稳态等细胞过程，并有助于自噬体的产生。在一些病理或生理条件下，如细胞氧化应激、钙稳态丧失、炎症细胞因子和环境有害物质等多种因素导致内质网稳态丧失和功能的破坏，促使未折叠蛋白在内质网腔内积累和聚集，这种现象被称为内质网应激（Endoplasmic reticulum stress, ER stress）(Cao and Kaufman 2014, Ma and Hendershot 2004, Zhang et al 2010)。为了恢复内质网稳态，内质网通过激活细胞内信号转导通路来响应应激，统称为未折叠蛋白反应（Unfolded protein response, UPR）(Bertolotti et al 2000, Ron and Walter 2007)。UPR 信号通路的起始和调控由三个主要分支组成，分别为肌醇需求酶 1（Inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$ , IRE1）、内质网应激蛋白激酶 RNA 样 ER 激酶 (Protein kinase RNA-like ER kinase, PERK) 和激活转录因子 6（Transcription factor 6, ATF6）(Reddy et al 2003)，这些蛋白在与 GRP78 结合的情况下处于失活状态，一旦发生内质网应激，BiP/GRP78 伴侣与内质网腔内积累的未折叠蛋白结合，并触发传感器-BiP 复合物的解离，导致 GRP78/BiP 与 PERK、IRE1 和 ATF6 分离，最终激活 UPR，以改善内质网的应激状态 (Bertolotti et al 2000, Oikawa et al 2009) (图 3)。这些调控机制可以减少内质网中错误折叠蛋白质的积累和减少新蛋白质的合成，帮助细胞修复损伤和适应环境改变，同时也会对细胞促生存机制以及细胞分裂、增殖、代谢和死亡等活动产生影响。(Hetz 2012, Merksamer and Papa 2010, Walter and Ron 2011, )。然而，当 UPR 无法解决不可逆的内质网损伤时，细胞就会启动凋亡程序。此外，多项研究证明了内质网应激与自噬在机制上的相互联系，其中内质网应激的三个关键

通路 IRE1 $\alpha$ 、PERK 和 ATF6 $\alpha$  分别以不同的方式参与了对自噬的诱导和调控 (Høyer-Hansen and Jäättelä 2007, Hayashi-Nishino et al 2009, Rashid et al 2015)。

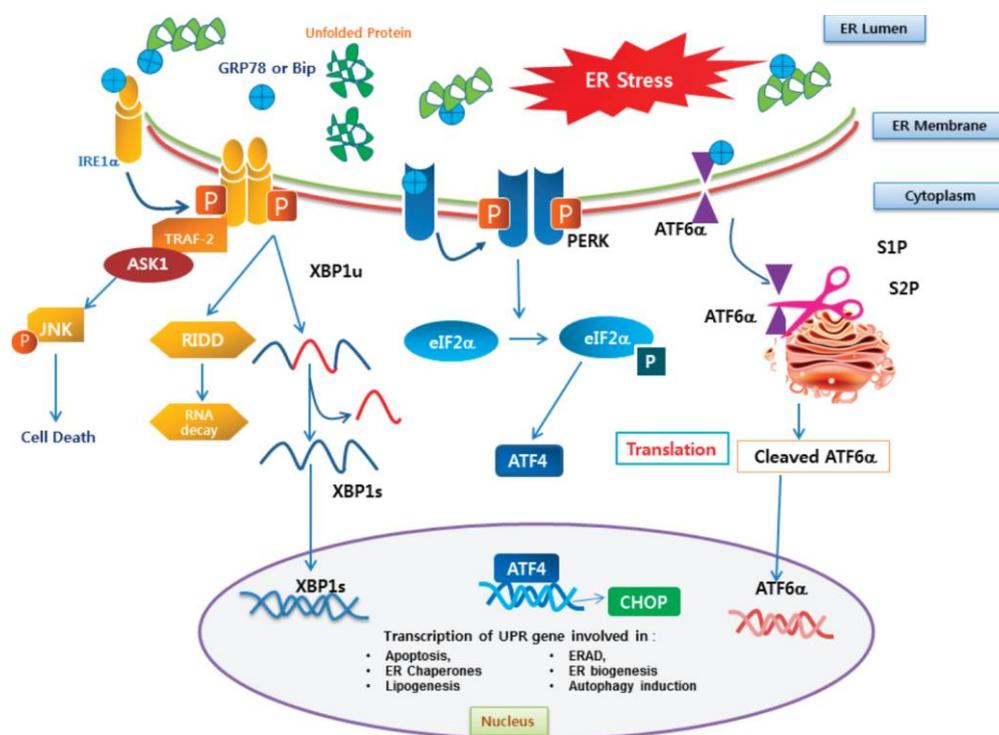


图 3 内质网应激信号通路图 (Kabir et al 2018)

Fig. 3 Schematic overview of UPR signaling.

### 3.Nrf2 信号通路在氧化应激和铁死亡中的作用

ROS 是所有需氧生物在常规氧代谢过程中产生的有害副产物，包括超氧阴离子自由基、羟基自由基和过氧化氢等 (Chiurchiù and Maccarrone 2011)，主要产生于线粒体电子传递链中 (Zorov et al 2014)。在正常情况下，细胞内氧化剂和和抗氧化剂之间的氧化还原状态处于平衡状态。然而，当一些内部或外界因素如物理或化学制剂打破这种平衡，则会导致氧化应激的产生。为了维持细胞的氧化还原稳态，生物体进化出一套抗氧化系统来防止 ROS 的过度积累和修复氧化损伤，在这其中，有两个重要的转录因子调控通路分别是核因子-红细胞 2 相关因子-抗氧化反应元件和芳烃受体-异种反应元件信号通路 (Hayes et al 2009)。Nrf2 被认为是细胞抗氧化损伤的主要调节因子，可以调控数百个基因的表达，其中大多数编码抗氧化/解毒酶 (Loboda et al 2016)。在正常生理条件下，Nrf2 与 Keap1 以非活性复合物的形式存在

于细胞质中。当发生氧化应激或其他病理刺激时，Nrf2 从 Keap1 中分离出来，并转运到细胞核中，随后与抗氧化基因启动子上的抗氧化反应元件结合，如血红素加氧酶-1（Heme oxygenase-1, HO-1）和 SOD、GSH 等，并激活其转录 (Liu et al 2018, Shaw and Chattopadhyay 2020)。此外，Nrf2 还可以通过调控氧化还原蛋白家族如硫氧还蛋白（Thioredoxin, TRX）、过氧化物还蛋白（Peroxiredoxins, PRDX）和硫氧还蛋白（Sulfiredoxin, SRXN）来维持细胞氧化还原的稳态 (Shaw and Chattopadhyay 2020)。除 Keap1 外，多种蛋白激酶，如 MAPK、蛋白激酶 C（Protein kinase C, PKC）和 PI3K，也参与并诱导了 Nrf2 的磷酸化和 Nrf2 转录 (Baird and Dinkova-Kostova 2011)。

Nrf2 除维持细胞氧化还原稳态外，近年来还被证明在铁死亡中发挥保护作用。Nrf2 通过编码一些蛋白和酶可以抑制脂质过氧化引发的铁死亡。根据他们的功能可以分为三大类，铁代谢，活性中间体的解毒和 GSH 的合成和代谢。在铁死亡中 FTL 和 FTH1 负责铁离子的储存、铁转运蛋白负责铁离子的输出，HO-1 负责催化血红素转化为胆绿素，这些蛋白都受到 Nrf2 的调控，表明 Nrf2 在铁稳态中发挥关键作用 (Harada et al 2011, Kerins and Ooi 2018b)。GPX4 是脂质过氧化物的清除剂，可以清除细胞内过量的脂质过氧化物，而 SLC7A11 是 GPX4 上游谷胱甘肽转运体的重要成分，并促进细胞内 GSH 的合成，GSH 是 GPX4 的前体，而这些基因受到 Nrf2 的调控 (Osburn et al 2006)。因此，Nrf2 在脂质过氧化和铁死亡的发生过程中发挥关键调控作用，Nrf2 的敲低可能增加铁死亡的敏感性 (Li et al 2021c)。除了铁和血红素，Nrf2 对中间代谢的代谢产物也发挥调控关系，其中许多代谢物对活性中间体的分解代谢、解毒以及 NADPH 的再生都很重要，在铁死亡中，FSP1 通过 NADPH 催化 CoQ10 的再生，抑制脂质过氧化物，抵抗铁死亡 (Bersuker et al 2019)。

#### 4.姜黄素研究进展

姜黄素是一种多酚性黄色物质，提取自植物的根茎，是姜黄(姜黄科姜黄属)的主要活性成分。这种类型植物的特征是橙色的结节状根茎，原产于印度，目前在包括东南亚、中国和拉丁美洲在内的世界其他几个地区都有种植 (Amalraj et al 2017, Carolina Alves et al 2019)，自古以来被广泛用于香料和食品防腐剂，甚至在疾病治疗中也被广泛使用，特别是在亚洲 (Araújo and Leon 2001, Hewlings and Kalman 2017)。因此，姜黄素受到了科学家们的特别关注。大量研究表明，姜黄素具有多种治疗特

性,包括抗癌、抗炎、抗氧化和伤口愈合等作用 (Dai et al 2016, Sandur et al 2007a, Tomeh et al 2019),此外,姜黄素在心血管、呼吸和神经退行性疾病,以及糖尿病和代谢综合征中也显示出有益作用 (Ghosh et al 2015, He et al 2015, Pivari et al 2019)。这种作用于多种分子途径的机制可能是由于姜黄素独特的化学结构,能够作用于多种分子靶点。在其生物学效应中,抑制活性氧的产生起着关键作用,尤其是对炎症性疾病。

#### 4.1 姜黄素的抗氧化活性

姜黄素之所以具备抗氧化特性,主要是由于其结构中的 $\beta$ -二酮基 (Priyadarsini et al 2003, Sandur et al 2007b)。Joe 和 Lokesh 的研究中表明姜黄素能够发挥其活性的主要机制是通过抑制超氧自由基、过氧化氢和一氧化氮自由基 (Joe and Lokesh 1994)。多项研究表明,姜黄素能够通过激活 Nrf2 的表达促进其下游抗氧化酶基因的表达,从而发挥抗氧化活性,如过氧化氢酶(Catalase, CAT)、SOD 和 HO-1 等 (Chen et al 2020a)。正是由于姜黄素的这种特性,使其能够减轻脂质过氧化反应,对肝脏损伤和肥胖、糖尿病、心血管等疾病起到一定的治疗作用 (Xing et al 2011)。研究表明,姜黄素通过 AKT/Nrf2 通路抑制氧化应激,发挥神经保护作用,从而起到脑保护作用 (Wu et al 2013)。Li et al 发现姜黄素通过调控 AMPK 通路降低 ROS 引发的内质网应激,从而发挥神经保护作用 (He et al 2015)。姜黄素可以靶向 Nrf2,通过 Nrf2/HO-1/GPX4 信号通路抑制铁死亡,从而减少肝豆状核变性中引起的氧化应激。Li 等人发现了类似的结果,姜黄素可以通过激活 GSK3b-Nrf2 通路保护成骨细胞免受氧化应激诱导的功能障碍 (Li et al 2020a)。这些研究表明,姜黄素可以通过不同机制对疾病发挥治疗作用。

#### 4.2 姜黄素的抗炎作用

炎症是多种慢性疾病的主要驱动因素,包括神经退行性疾病、自身免疫疾病、心血管疾病、肺疾病、代谢性疾病和肿瘤性疾病 (Aggarwal et al 2007)。姜黄素在与多种炎症相互作用过程中,表现出良好的抗炎活性。氧化应激是诱发慢性炎症和疾病的重要因素,并增加促炎细胞因子的合成和分泌,如核因子- $\kappa$ B (Nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ),进而触发 MAPK 的级联信号通路。姜黄素通过抑制氧化应激和随后的炎症反应,减少 TNF $\alpha$  的产生和各种类型细胞中由 TNF $\alpha$  介导的细胞信号传导。

### 4.3 姜黄素在反刍动物生产中的应用

众所周知，热应激的产生会严重影响动物的繁殖性能和健康，特别是在夏季。姜黄素由于具有清除氧化自由基、提高免疫应答和抗细胞凋亡的作用，已被广泛用作畜牧业的饲料添加剂。Jiang 等发现在湖羊在夏季摄入一定的姜黄素可以提高湖羊的抗氧化能力，并促进脂质代谢和睾丸发育，有利于抵抗热应激带来的不利影响。进一步研究发现，姜黄素还可以抑制睾丸细胞凋亡，显著提高睾丸器官指数、血清睾酮含量，这为姜黄素在绵羊生产中的应用提供了科学依据 (Jiang et al 2019)。牛乳腺炎是一种由多种病原体感染乳腺组织而引起的炎症反应，而姜黄素能够降低脂多糖诱导的牛乳腺上皮细胞 ROS 的积累和炎症细胞因子的表达并降低细胞凋亡率，这可能与姜黄素激活 Nrf2 通路以及 NF- $\kappa$ B 炎症和 caspase/Bcl2 凋亡通路的失活有关 (Li et al 2021b)。Salman 等研究发现，在公牛精液扩张器中添加一定剂量的姜黄素，可降低精子总异常率，为膜功能完整性提供保护作用，并提高精子的抗氧化能力。另一项研究表明，经姜黄素预处理后，霍尔什蒂公牛冷冻精液中的精子运动、活力和能量没有显著影响，但精子细胞质中的 ROS 含量显著降低，从而减少了 ROS 对精子造成的损伤 (Salman et al 2021)。

### 4.4 姜黄素与生殖相关疾病

来自体内和体外的研究表明，姜黄素可以有效降低生殖相关疾病的发生，如妊娠期糖尿病、子宫内膜异位症、多囊卵巢综合征，以及天然和化学毒性物质引起的损害等，都受到姜黄素的积极调节 (Kamal et al 2021)。研究表明姜黄素可以减轻子宫内膜异位症相关的促炎环境，有效抑制 TNF- $\alpha$  诱导的异位子宫内膜基质细胞中白细胞介素-6 和白细胞介素-8 的分泌，阻断 NF- $\kappa$ B 的活化 (Hipólito-Reis et al 2022)。姜黄素还能通过抗炎症、抗细胞凋亡和抗氧化特性对卵巢相关疾病起到积极效果 (Yan et al 2018)。产后抑郁症同样对对母亲和后代都造成了严重的健康影响，Lopresti 和他的同事发现连续 8 周给重度抑郁症患者补充姜黄素可以减少抑郁和焦虑症状 (Lopresti et al 2014)。

## 5. 研究目的与意义

BPAF 的广泛使用和存在，使人们增加了其对人类和动物安全性的担忧，并且已有研究表明 BPAF 会增加子宫患病风险，并诱发子宫内膜异位症 (Wu et al 2023)。子宫是反刍动物胚胎着床和胎儿发育的重要器官，在怀孕期间，子宫的健康

发育和功能对母亲和胎儿的健康至关重要 (Konno et al 2000)。子宫是内分泌干扰物的重要靶点之一，环境污染物的存在会破坏正常的子宫结构和功能，导致生殖功能障碍 (Gore et al 2015a)。子宫内膜上皮细胞 (Endometrial epithelial cells, EECs) 是子宫内膜的主要细胞类型，EECs 的正常形态和功能对胚胎着床和胎盘功能至关重要，对维持雌性动物生殖健康功能至关重要 (LeBlanc 2012)。因此，本研究以奶山羊 EECs 为体外子宫模型，通过探究 BPAF 对奶山羊 EECs 的影响，揭示 BPAF 对子宫功能、胚胎着床和胎盘的潜在影响，同时，为了减轻 BPAF 可能对 EECs 的细胞毒性，本研究采用姜黄素预处理 EECs，以探究姜黄素是否对 BPAF 导致的细胞毒性具有保护作用并探讨其机制。

本研究的结果不仅可以揭示 BPAF 对反刍动物子宫健康的潜在危害，丰富 BPAF 毒性作用机制，还通过揭示姜黄素对 BPAF 毒性的缓解作用，为 BPAF 危害预防和临床应用提供了理论依据，也为反刍动物的健康养殖提供一定的参考价值。

## 第二章 姜黄素通过 MAPK 和 Nrf2 通路缓解 BPAF 诱导的奶山羊 EECs 氧化应激和凋亡

### 1. 引言

奶山羊是重要的经济和农业动物之一，可以为人类提供丰富的乳类和肉类，繁殖性能是奶山羊产业的一个重要经济特征 (Dubeuf et al 2004)。在繁殖过程中，导致妊娠失败的原因是多种多样的，其中环境因素越来越受到人们的重视。BPAF 作为新型的环境污染物，已经证明会通过氧化应激和凋亡等途径对人类和动物生殖系统产生危害 (Wu et al 2019)，然而，关于 BPAF 对反刍动物生殖能力，特别是子宫的影响仍然有限。此外，由于 BPAF 在多项研究中均表现出比 BPA 更强的毒性 (Cao et al 2017)，因此有必要寻找一种植物提取物以缓解 BPAF 对机体产生的损伤。

姜黄素一种从姜黄科姜黄中提取的疏水性多酚，具有广泛的生物活性，如抗氧化、抗炎和抗癌 (Dai et al 2016, Tomeh et al 2019)。姜黄素作为一种治疗剂，可以帮助细胞清除过量的 ROS，减少细胞凋亡，提高细胞的抗氧化能力，其机制与 Nrf2 密切相关 (Liu et al 2020, Shahcheraghi et al 2021)。然而，姜黄素对 BPAF 诱导的 EECs 损伤是否具有保护作用仍有待探究。因此，本研究以奶山羊 EECs 为体外模型，通过研究 BPAF 对 EECs 的毒性影响，以探讨其在奶山羊子宫功能、胚胎着床和胎盘方面的潜在影响，同时为减轻 BPAF 对 EECs 的毒性，利用姜黄素预处理 EECs，以探究姜黄素是否对 BPAF 诱导的细胞损伤具有保护作用并揭示其机制。

### 2. 材料与amp;方法

#### 2.1 实验材料

本实验所用 EECs 来自西北农林科技大学。

##### 2.1.1 主要仪器设备

本实验用到的主要仪器设备如表 2-1 所示。

表 2-1 主要仪器设备

Table 2-1 Main apparatus

仪器设备名称	型号、规格	生产厂家
Name of apparatus	Type	Manufacturer
电热恒温水浴锅	GD120	英国 Grant 公司
台式离心机	Mikro-20	美国 Mikro 公司
冷冻离心机	Centrifuge 5810	德国 Eppendorf 公司
多功能酶标仪	PE EnSpire	美国 PE 公司
电泳槽	DYY-III	北京六一仪器厂
稳压稳流电泳仪	DYY-2	北京六一仪器厂
微量移液器	1mL 200 mL 10 mL 2.5 mL	德国 Eppendorf 公司
超纯水仪	WaterPro	美国 LABCONCO 公司
制冰机	AF 103 AS	武汉梯热爱生物科技有限公司
荧光定量 PCR 仪	IQ5	美国 Bio-Rad 公司
超低温冰箱	DW-86L66	海尔公司
超净工作台	SW-CJ-2D	苏州净化公司
电子天平	BL1500	德国 Sartorius 公司
细胞计数板	1450011	美国 BIO-RAG 公司
程序降温盒	BS-02-CFC	Biosharp
CO <sub>2</sub> 培养箱	BB15 型号	德国 Hera cell 公司

### 2.1.2 主要试剂

本实验所用抗体除  $\beta$ -actin 购自 Abclona (AC004) 和 HO-1 购自景杰生物 (PTM-6478) 外, 其余抗体 Bax (T40051)、Bcl-2 (T40056)、Cytochrome C (T55734)、 $\gamma$ -H2AX (T56572)、JNK (T40073)、P-JNK (T40074)、ERK (T40071)、p-ERK (AP0485)、P38 (T55600)、p-P38 (TP56391)、Nrf2 (T55136) 和 NQO1 (T56710) 均购自 Abmart。本实验用到的其余试剂如表 2-2 所示。

表 2-2 主要试剂

Table 2-2 Main reagents

试剂名称	货号	生产厂家
Name of reagent	Catalog number	Manufacturer
胰酶细胞消化液	C0203-500ml	碧云天
青霉素-链霉素	C0222	碧云天
脱脂奶粉	PS112	雅酶
姜黄素	C110685-20mg	阿拉丁
线粒体膜电位检测试剂盒	C2006	碧云天
蛋白裂解液	P0013B	碧云天
甲醇（分析纯）	10014118	上海国药集团化学试剂
抗体稀释液	PS119L	雅酶
苯甲基磺酰氟（PMSF）	G2008	塞维尔生物
反转录试剂盒	R223-01	南京诺唯赞生物科技公司
磷酸酶抑制剂 A/B 液	G2007/1 /G2007/2	塞维尔生物
二甲基亚砷（DMSO）	67-68-5	美国 Sigma
胎牛血清（FBS）	10270106	Gibco
甘氨酸（Glycine）	1275GR500	赛国生物科技
三羟甲基氨基甲烷（Tris-base）	1115GR500	赛国生物科技
十二烷基硫酸钠（SDS）	3250	赛国生物科技
氯化钠（NaCl）	10019318	上海国药集团化学试剂
三色预染蛋白 Marker	WJ103	Abclonal
即用型 BCA 蛋白定量试剂盒	ZJ102	雅酶
总 SOD 活性检测试剂盒	S0101S	南京建成
Bisphenol AF	BPA-AF-N	百灵威科技
CAT 测定试剂盒	A007-1-1	南京建成
Cell Counting kit-8（CCK-8）	CK04	日本同仁公司
DMEM/F-12 1:1（1×）	SH30023.01	HyClone
ECL 化学发光底物试剂盒	BL523B	Biosharp
GSH-PX 测定试剂盒	A005-1-2	南京建成
GSH 测定试剂盒	A006-2-1	南京建成
MDA 测定试剂盒	A003-1-2	南京建成
PAGE 凝胶快速制备试剂盒 10%和 12%	PG212/PG213	雅酶
QuickShuttle-Basic 转染试剂	KX0110041	苏州博奥龙科技有限公司
ROS 检测试剂盒	S0033S	碧云天
SDS-PAGE Sample Loading buffer5×	RM00001	Abclonal

### 2.1.3 主要实验试剂的配制

(1) 细胞培养液: 在 DMEM/F-12 培养液中加入 10 % FBS、100 U/mL 青霉素、100 ng/mL 链霉素, 混匀后分装至 50 mL 离心管, 在 4°C 冰箱保存备用。

(2) 细胞冻存液: 按照所需用量, 分别向离心管中加入 50 % FBS、40 % 细胞培养液和 10 % DMSO, 混匀后使用。

(3) 细胞裂解液: 按照实验用量, 分别向 RIPA 裂解液中加入 10 % PMSF, 10 % Cocktail, 10 % 磷酸酶蛋白酶抑制剂 A 和 B (现配现用)。

(4) BPAF 浓储液配制: 向装有 50 mg BPAF 粉末的包装瓶中加入 1.487 mL DMSO, 配制成浓度为 100 mM 的浓储液, 在室温下避光保存备用。

(5) 姜黄素浓储液配制: 向装有 20 mg 姜黄素粉末的包装瓶中加入 1.086 mL DMSO, 配制成浓度为 50 mM 的储备液, 抽取 50 mM 的储备液 20  $\mu$ L 加入离心管中, 再向其加入 180  $\mu$ L DMSO, 涡旋混匀, 使其终浓度为 5 mM, 配制完成后, 分装保存于 -80 °C 冰箱备用。

#### (6) Western blot 实验相关试剂配制

电泳液: 分别称取 Tris base 15.1 g、Glycine 94 g 和 SDS 5 g 乘至容量瓶中, 加入超纯水定容至 1 L, 配制成 5 $\times$  的电泳缓冲液。

转膜缓冲液: 分别称取 Tris base 58.13 g、Glycine 29.28 g 和 SDS 3.7 g 至容量瓶中, 加入超纯水定容至 1 L, 配制成 10 $\times$  的转膜缓冲液。在使用时, 按照 70% 超纯水, 10 % 转膜液 (10 $\times$ ) 和 20 % 甲醇, 将 10 $\times$  转膜缓冲液稀释至 1 $\times$ 。

TBS 和 TBST 配制: 分别称取 Tris base 60.55 g、NaCl 8.775 g 至容量瓶中, 加入超纯水定容至 1 L, 配制成 10 $\times$  的 TBS 溶液。

TBST: 向 100 mL 10 $\times$  TBS 中加入 900 mL 纯水, 使其稀释为 1 $\times$ , 然后加入 1 mL 吐温 20。

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 EECs 细胞复苏与传代培养

将装有 EECs 的冻存管从液氮罐中取出, 迅速投入 37°C 水浴锅中, 摇晃溶解后, 然后在无菌操作台中转移至 10 mL 离心管中, 加入等体积的培养液, 混匀后 1500 r/min 离心 5 min, 然后弃掉培养液, 再向细胞沉淀中加入 3 mL 含有 10% FBS 的

DMEM/F12 1:1 培养液，轻轻捶打混匀，均匀的铺在细胞培养皿中（6 cm 中皿），然后移至（5 % CO<sub>2</sub>，37 °C）培养箱中，次日观察生长情况。

### 2.2.2 细胞冻存

待中皿细胞生长至 80 % 左右，消化离心，收集细胞，向离心管中加入 1mL 配制好的细胞冻存液，然后轻微吹打混匀，转移至细胞冻存管中，然后将冻存管放入程序降温盒中，随后将降温盒放入-80 超低温冰箱，过夜后，取出冻存管转移至液氮罐中长期保存。

### 2.2.3 细胞处理

根据实验目的，将细胞传到不同的培养板中，待细胞贴壁过夜后，将含有不同浓度的 BPAF（0、10、20、40、60 和 80 μM）的培养液加入细胞中，培养 24 h，然后进行下一步实验。在缓解实验中，为了探究姜黄素对 BPAF 的保护作用，首先用不同浓度的姜黄素（0、1.25、2.5、5、10 和 20 μM）预处理细胞 2 h 后弃掉，然后加入 60 μM BPAF 培养 24 h。在所有细胞处理过程中，为保证细胞培养条件一致，会根据各组添加 DMSO 体积，对包括对照组在内的处理组补加相应体积的 DMSO，以排除 DMSO 对细胞的影响。

### 2.2.4 细胞活力的测定

将 EECs 细胞接种到 96 孔板中，每孔细胞数量约为 10<sup>4</sup> 个，96 孔板外围添加一圈培养基，以防止有细胞孔的培养基蒸发。过夜贴壁后，按照不同实验进行特定处理，处理 24 h 后，在避光条件下每孔加入 10 μL CCK8，然后用锡纸将 96 孔板包裹，放入 37°C 培养箱中孵育 2.5 h，用酶标仪检测 450 nm 波长的吸光度，并进行分析计算。

### 2.2.5 ROS 的测定

用 ROS 检测试剂盒对细胞 ROS 进行检测。根据说明书，按照 1:1000 比例用无血清培养液稀 DCFH-二乙酸酯（DCFH-diacetate, DCFH-DA），使终浓度为 10 微摩尔/升。将细胞铺在 6 孔板中，细胞处理结束后，弃掉培养液，加入配制好的 DCFH-DA，使其能够充分覆盖细胞，然后将六孔板放置于 37 °C 培养箱中，孵育 20 min 后拿出。用无血清 F12 培养基清洗细胞 3 次，以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。清洗结束后，每孔加入适当的 F12 无血清培养基，用荧光显微镜进行拍照。

在用酶标仪检测细胞 ROS 过程中,将处理后的细胞收集至 10 mL 离心管,加入稀释后的 DCFH-DA, 37 °C 培养箱内孵育 20 min。每隔 3-5 min 颠倒混匀一下,使探针和细胞充分接触。孵育结束后,用无血清 F12 培养基清洗 3 次,去除未进入细胞的 DCFH-DA,用酶标仪对荧光强度进行检测。

## 2.2.6 线粒体膜电位检测

用线粒体膜电位检测试剂盒对细胞线粒体膜电位进行检测。在开始检测前,先对 JC-1 染色工作液进行配制:

**1. JC-1 染色工作液的配制:**根据实验目的计算 JC-1 染色工作液需要量,按照每 50  $\mu$ l JC-1 (200 $\times$ ) 加入 8 mL 超纯水的比例稀释 JC-1。剧烈 Vortex 充分溶解并混匀 JC-1,然后再加入 2 mL JC-1 染色缓冲液 (5 $\times$ ),混匀后即为 JC-1 染色工作液。

### 2. 检测步骤:

(1) 将细胞接种到 6 孔板中,细胞处理结束后,弃掉培养液,用 PBS 清洗 3 次,清洗结束后加入 1 mL 含血清的培养液,然后加入 1 mL JC-1 工作液,充分混匀,放置于细胞培养箱中 37 °C 避光孵育 20 min。

(2) 在孵育期间,配制清洗缓冲液,根据所需用量,按照 1 mL JC-1 染色缓冲液 (5 $\times$ ) 加入 4 mL 蒸馏水的比例,配制适量的 JC-1 染色缓冲液 (1 $\times$ ),并放置于冰上备用。

(3) 孵育结束后,弃掉上清,用 JC-1 染色缓冲液 (1 $\times$ ) 洗涤 2 次。

(4) 加入 2 mL 培养液覆盖细胞。

(5) 用荧光显微镜对细胞进行拍照。

### 3. 在用酶标仪检测 JC-1 荧光强度实验中,则按照以下步骤进行:

(1) 将处理后的细胞收集至离心管中,用 0.5 mL 培养液重悬细胞。

(2) 加入 0.5 mL 的 JC-1 染色工作液,颠倒混匀,培养箱中 37 °C 避光孵育 20 min。

(3) 孵育结束后,600g 4 °C 离心 5 min,弃上清。

(4) 用 JC-1 缓冲液 (1 $\times$ ) 洗涤 2 次,加入 1 mL JC-1 染色缓冲液 (1 $\times$ ),重悬细胞,600g °C 离心 5 min,沉淀细胞,弃上清。然后再重读该操作 1 次。

(5) 再用适量 JC-1 染色缓冲液 (1 $\times$ ) 重悬后,按照每孔 100  $\mu$ L 体系加入 96 孔板中,用酶标仪进行检测。

## 2.2.7 抗氧化酶相关指标测定

### 2.2.7.1 GSH-PX 含量测定

(1) 样品制备：将细胞铺至六孔板中，处理结束后，用 PBS 清洗 2 遍，消化离心，将细胞收集至离心管中，向细胞沉淀中加入 250  $\mu$ L PBS，用超声破碎仪对细胞进行破碎，取上清待测。

(2) 按照说明书操作步骤依次将以下试剂添加至 5 mL 离心管中，具体添加方式如下表所示：

(1) 酶促反应：

	非酶管	酶管
1mmol/L(mL)	0.2	0.2
待测样品(mL)		0.2
37°C 水浴预温 5min		
试剂一应用液(mL)	0.1	0.1
37°C 水浴准确反应 5min		
试剂二应用液(mL)	2	2
待测样品(mL)	0.2	

将上述试剂添加完成后，3500 rpm 离心 10 min，取上清 1 mL 进行显色反应

(2) 显色反应：

	空白管	标准管	非酶管	酶管
GSH 标准品应用液 1 (mL)				
20 $\mu$ mol/L GSH 标准液 (mL)		1		
上清液 (mL)			1	1
试剂三应用液 (mL)	1	1	1	1
试剂四应用液 (mL)	0.25	0.25	0.25	0.25
试剂五应用液 (mL)	0.05	0.05	0.05	0.05

(3) 将上述试剂添加完成后，混匀，室温静置 15min，每孔添加 200 $\mu$ L 至 96 孔板中，测定 412nm 的吸光值。

(4) 将数据代入公式，并根据蛋白浓度计算 GSH-PX 含量。

### 2.2.7.2 CAT 含量测定

(1) 样品制备：将细胞铺至六孔板中，处理结束后，用 PBS 清洗 2 次，消化离心后将细胞收集至离心管中，加 150  $\mu$ L PBS，用超声破碎仪对细胞进行破碎。破碎结束后，4000 r/min 离心 10 min，取上清待测。

(2) 按照以下步骤将各试剂添加至离心管中。

	对照管	测定管
上清液		0.05
试剂一 (37 $^{\circ}$ C 预温) (mL)	1.0	1.0
试剂二 (37 $^{\circ}$ C 预温) (mL)	0.1	0.1
立即混匀，并在 37 准确反应 1min		
试剂三 (mL)	1.0	1.0
试剂四 (mL)	0.1	0.1
上清液 (mL)	0.05	

(3) 按照上述步骤添加完成后，混匀，按照每孔 200  $\mu$ L 添加至 96 孔板中，检测 405 nm 处的吸光值。

(4) 将数据代入公式，根据蛋白浓度计算细胞中 CAT 含量。

### 2.2.7.3 SOD 含量测定

(1) 样品制备：将细胞传至六孔板中，过夜贴壁后，根据实验目的处理 24 h，弃掉培养液，用 PBS 清洗 3 次，按照每 100 万细胞加入 100-200  $\mu$ L SOD 样品制备液制备样品，适当吹打，放置 25 min，以充分裂解细胞。裂解结束后，将样品移至 1.5 mL 离心管中，4  $^{\circ}$ C 12000 g 离心 5 min，抽取部分上清用做蛋白浓度检测，剩余样品作为待测样品。

(2) WST-8/酶工作液的配制：按照每个反应 160  $\mu$ L 的体积进行配制，包括 151  $\mu$ L SOD 检测缓冲液、8  $\mu$ L WST-8/酶和 1  $\mu$ L 酶溶液，均匀混合，即可配制成 160  $\mu$ L WST-8/酶工作液。根据待测样品数量，计算 WST-8/酶工作液需要的总的体积。现配现用，配制好的 WST-8/酶在 4  $^{\circ}$ C 进行保存。

(3) 反应启动工作液的配制：把试剂盒中的反应启动液 (40 $\times$ ) 融解后混匀，按照

每 1uL 反应启动液 (40×) 加入 39uL SOD 检测缓冲液的比例进行稀释, 混匀后即成为反应启动工作液。根据待检测样品(包括标准品)的数量, 配制适量的反应启动工作液。现配现用, 配制好的反应启动工作液可先置于 4°C 或冰浴保存。

(4) 样品测定: 使用 96 孔板对样品孔和空白孔进行测定, 并按下表依次加入待测样品和其它各种溶液。加入反应启动工作液后充分混匀。具体操作如下表所示:

	样品	空白对照 1	空白对照 2
待测样品	20μL	-	-
SOD 检测缓冲液	-	20 μL	40μL
WST-8/酶工作液	160μL	160μL	160μL
反应启动工作液	20μL	20μL	-

(5) 按照说明书方法添加结束后, 在培养箱中 37°C 孵育 30 min。利用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度。按照说明书公式计算细胞 SOD 活力。

#### 2.2.7.4 MDA 含量测定

(1) 样品制备: 将细胞传至六孔板, 处理结束后, 收集细胞至离心管中, 弃上清, 按照每 500 万细胞加入 1mL 提取液, 超声破碎细胞后, 8000 g 4°C 离心 10 min, 取上清置于冰上待测。

(2) 试剂添加: 按照以下步骤依次将试剂添加至离心管中。

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
MDA 检测工作液	300	300
蒸馏水		100
样本	100	
试剂三	100	100

(3) 按照表中步骤添加完成后, 均匀混合, 然后将离心管中混合液在 100°C 水浴锅中保温 60 min, 然后在冰浴中冷却, 10000 g, 常温离心 10 min。抽取上清液中 200 μL 添加至 96 孔板中, 测定各样本在 532 nm 和 600 nm 处的吸光值。

(4) 将数据代入公式, 测定各样品蛋白浓度, 计算各组 MDA 含量。

#### 2.2.8 细胞凋亡检测

(1) 将细胞传至六孔板中, 过夜贴壁后, 根据实验目的处理 24 h, 把每个处理孔培

养液吸至相应的 10 mL 离心管中，用 PBS 洗涤贴壁细胞一次，加入 500  $\mu$ L 胰酶（不含 EDTA），待轻轻吹打可以使贴壁细胞吹打下来时，吸除胰酶细胞消化液。将旧培养液加到对应的六孔板中，终止消化，然后转移至 10 mL 离心管中。旧培养液的加入一方面可以收集已经悬浮的发生凋亡或坏死的细胞，另一方面培养液中的血清可以终止胰酶对细胞的消化，残留的胰酶会消化并降解后续加入的 Annexin V-FITC，导致染色失败。

（2）1000 g 离心 5 min，弃上清，收集细胞，用 PBS 轻轻重悬细胞并计数。

（3）根据细胞数量，抽取 10 万重悬的细胞，1000 g 离心 5 min，弃上清，加 195  $\mu$ L Annexin V-FITC 结合液，重悬细胞。

（4）加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC，轻轻混匀。

（5）加入 10  $\mu$ L 碘化丙啶染色液，轻轻混匀。

（6）室温避光孵育 10-20 min，随后置于冰浴中，在孵育过程中，重悬细胞 2-3 次以使细胞充分染色。

（7）送至流式细胞仪进行检测，最后用 Flow Jo 软件对结果进行分析。

### 2.2.9 引物设计

从 NCBI 上查阅奶山羊目的基因序列，并在上海生工生物完成引物设计。利用 NCBI 中 Primer BLAST 工具对引物特异性进行初步确认，随后在武汉擎科创新生物科技有限公司进行引物合成，具体引物信息如表 2-3 所示：

表 2-3 目的基因引物序列

Table 2-3 Primer sequence of target genes

基因名称	PubMed no.	序列(5'→3')	产物大小
Gene names		Sequence of primer	Length (bp)
<i>HO-1</i>	NM_001285567.1	Forward: AATATCGCCAGTGCCACCAAGTTC Reverse: GTTGAGCAGGAAGGCGGTCTTG	120
<i>Keap1</i>	XM_018051052.1	Forward: CATCCGCCACTCGTTTCTCTCTG Reverse: TTGACCCAGTTGATGCAGGC	101
<i>NQO1</i>	XM_005692193.3	Forward: CACTCTGCACTTCTGTGGCTTCC Reverse: CAGGCGTTTCTTCCATCCTTCCAG	112
<i>Nrf2</i>	XM_018054369.1	Forward: GCCCAGTCTTCAATGCTCCTTCTC Reverse: TTCCTCCCAAAGTCTGCTCAATGTCC	113
<i>β-actin</i>	XM_018039831.1	Forward: GATCTGGCACCACACCTTCT Reverse: GGGTCATCTTCTCACGGTTG	110

## 2.2.10 细胞总 RNA 提取

传统法（Trizol 试剂抽提法）提取细胞总 RNA 步骤如下：

(1) 将细胞传至六孔板，贴壁过夜后，对细胞进行处理，24 h 后弃掉培养液，用 PBS 清洗 3 次，去除残留的培养液，向每个细胞孔中加入 500 μL Trizol，置于冰上裂解 5 min，以便使核蛋白与核酸分离，释放 RNA。

(2) 裂解结束后将裂解液转移至无 RNA 酶离心管中，加入 100 μL 氯仿，充分乳化，用涡旋仪震荡 15 s 后，室温静置 5 min。

(3) 将离心管放入离心机，12000 g，4℃离心 10 min，在超净台中抽取上清至新的无酶离心管中，向离心管中加入与上清液等体积的异丙醇，上下颠倒，轻轻混匀，室温静置 10 min，然后 12000 g 4℃离心 10 min。

(4) 弃上清液，沿管壁向沉淀中加入 500 μL 75% 的乙醇，清洗沉淀，轻晃离心管，使块状沉淀悬浮即可，然后 7500 g，4℃离心 5 min，然后再重复该步骤 1 次。

(5) 弃上清，轻微抽取，以防止抽掉沉淀，室温静置 5-10 min，使沉淀干燥，随后

加入适量 DEPC 水（约 30 $\mu$ L），在-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

（6）抽取 1  $\mu$ L 样品，利用超紫外分光光度计检测样品浓度和质量。

（7）RNA 反转录根据所测 RNA 浓度进行反转录 cDNA，反转录步骤按照试剂盒的说明方法。首先是基因组 DNA 去除：每个样品抽取 1 $\mu$ g RNA，添加 4 $\mu$ L 4 $\times$ gDNA wiper Mix，再添加 RNase-free ddH<sub>2</sub>O 到 16 $\mu$ L，用移液器轻轻吹打混匀，42  $^{\circ}$ C 反应 2 min，然后是逆转录反应，向管中加入 4 $\mu$ L 5 $\times$  HiScript II qRT SuperMix II，用移液器轻轻吹打混匀，然后进行逆转录反应，将反应条件设置为 50 $^{\circ}$ C 15min，85  $^{\circ}$ C 5s。完成上述步骤后，可根据实验需求对样品进行稀释，随后可立即用于 qPCR 反应。如果短期内使用可将样品放置于-20 $^{\circ}$ C，若长期保存，则分装后保存于-80 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

### 2.2.11 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

实验利用定量试剂盒（Abclonal），在 Bio-Rad CFX384 仪器上进行。每个样品均设置 3 个重复，PCR 扩增体系如下表所示：

试剂 Reagent	体积 ( $\mu$ L) Volume
蒸馏水	2 $\mu$ L
SYBR Green real time PCR Master Mix	5 $\mu$ L
Forward Primer(5 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ L
Reverse Primer(5 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ L
cDNA	2 $\mu$ L
总体积	10 $\mu$ L

PCR 扩增反应条件如下表所示：

温度	时间	
95 $^{\circ}$ C	5 min	
95 $^{\circ}$ C	30 sec	
56 $^{\circ}$ C	30 sec	35 个循环
72 $^{\circ}$ C	30 sec	
72 $^{\circ}$ C	5 min	
16 $^{\circ}$ C	5 min	

## 2.2.12 蛋白提取和浓度测定

### 1. 蛋白提取

将细胞接种至六孔板中，处理后的细胞用 PBS 清洗 3 遍，然后每孔加入 150  $\mu\text{L}$  细胞裂解液，置于冰上，裂解 20 min 后，用细胞刮板将贴壁细胞刮下，以便于细胞充分裂解，然后继续在冰上裂解 20 min，然后再用细胞刮板刮取细胞，随后将裂解的蛋白转移至 1.5 mL 离心管中，用超声破碎仪对细胞进行破碎，破碎结束后将蛋白裂解液在 4  $^{\circ}\text{C}$  离心机中 12000 r/min 离心 5-10 min，取一部分上清对蛋白浓度进行检测。计算上清液体积，加入上清液体积 1/4 的蛋白上样缓冲液，使上样缓冲液稀释至 1 $\times$ ，然后混匀，用封口膜封闭离心管口，然后将离心管放入沸水中煮 5 min，使其充分变性。蛋白样煮沸结束后，用离心机进行离心和混匀，使管壁上的水分沉积，随后将蛋白样品放置于 -20 $^{\circ}\text{C}$  保存，如果长期使用则放置于 -80 $^{\circ}\text{C}$  冰箱。

### 2. 蛋白浓度检测

本实验使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒对蛋白浓度进行检测，具体步骤如下：

- (1) 计算所需显色工作液总量，按照说明书将试剂 A 液和 B 液按照 50:1 的比例配制成显色工作液，充分混匀。
- (2) 将进行检测的蛋白样品按照每孔 5  $\mu\text{L}$ ，每个处理 3 个重复加至 96 孔板中，然后再补加 15  $\mu\text{L}$  PBS。
- (3) 试剂盒中蛋白标准品（0、125、250、500、750、1000、1500 和 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）各抽取 20  $\mu\text{L}$  加入 96 孔板中。
- (4) 将配制好的显色工作液按照每孔 200  $\mu\text{L}$  加入需要检测的孔中。
- (5) 添加完成后，将 96 孔板放置于 37 $^{\circ}\text{C}$  培养箱内孵育 30 min，然后用酶标仪检测 563 nm 处的 OD 值。根据检测结果绘制蛋白浓度标准曲线，计算样品中的蛋白浓度。

## 2.2.13 Western Blot

### 1. 制胶

- (1) 装好垂直板电泳槽模具。
- (2) 根据实验蛋白大小，选用 7.5 %、10 % 或 12 % 凝胶快速制备试剂盒。
- (3) 抽取试剂盒中下层胶溶液和下层胶缓冲液各 2.5 mL 加至 10 mL 离心管中，混匀。然后加入 60  $\mu\text{L}$  促凝剂，再次混匀，随后注入制胶玻璃板中，然后加入无水乙醇，以保证分离胶液面与地平线平行。结束后，在室温下静置 0.5-1 h，下层胶凝固

后, 弃掉无水乙醇, 蒸馏水冲洗干净, 再用滤纸吸干胶面及两玻璃板表面残留水分。

(4) 抽取上层胶溶液和彩色上层胶缓冲液各 0.75 mL 至 5 mL 离心管中, 混匀后加入 30  $\mu$ L 促进剂, 混匀, 加入制胶玻璃板中, 随后插入梳齿, 室温放置 0.5-1 h, 拔掉梳齿即可用于电泳实验。

2.电泳: 将制好胶的玻璃板安装在电泳槽中, 向电泳槽内灌入 1 $\times$ Tris-gly-SDS 电泳液, 淹没中间室, 并漫过点样孔。根据测定后的蛋白浓度, 向每个点样孔加入 20  $\mu$ g 蛋白样品, Marker 孔加入 5  $\mu$ L, 点样结束后, 先用 80 V 电泳 30 min, 然后再转换为 120 V 继续电泳, 待样品中溴酚蓝移动至 Marker 位置最下端时即可结束电泳, 准备转膜。

### 3.转膜

(1) 小心撬开玻璃板, 将蛋白胶从玻璃板取出, 放入装有转膜液的容器中。

(2) 根据蛋白胶的大小, 裁剪同样大小的 PVDF 膜, 置于甲醇中激活 2 min 后, 即可用于转膜实验。

(3) 准备好转膜需要用到的实验材料, 包括转膜夹子, 海绵垫和滤纸, 将转膜夹子黑面朝下, 白面朝上, 放置于实验台上, 然后从下往上依次按照海绵垫+滤纸+蛋白胶+PVDF 膜+滤纸+海绵的顺序防置, 放置完成后轻轻合上转膜夹子。在整个操作过程中, 要注意 PVDF 膜于蛋白胶之间不能出现气泡, 如果出现气泡, 要用玻璃棒撵出, 否则会影响转膜效果。把安装好的转膜夹子插入转膜槽内, 加入提前在 4  $^{\circ}$ C 冰箱预冷的 1 $\times$ 转膜缓冲液, 使其淹没转膜夹子, 盖上盖子, 将电泳槽放入适当的容器中, 并在外围塞满冰块, 以吸收转膜过程中释放的大量的热。随后设置 200 mA 恒流, 时间 90 min。

4.封闭: 转膜结束后, 将取出的 PVDF 膜放入含有适量 5% 脱脂奶粉的封闭蛋白盒中, 在室温条件下于摇床上封闭 2 h。

5. 一抗孵育: 封闭结束后, 倒掉脱脂奶粉, 并用 TBSF 清洗 PVDF 膜 3 次, 每次 5 min, 随后含有各目蛋白的 PVDF 膜条带放入含有对应抗体的一抗稀释液中, 4  $^{\circ}$ C 孵育 14 h 左右。

6. 二抗孵育: 回收一抗稀释液, 用 TBST 将各目的条带清洗 3 次, 每次 10 min。清洗结束后, 加入适量的二抗稀释液, 室温孵育 2 h。

7.显影: 二抗孵育结束后, 弃掉二抗稀释液, 用 TBST 将 PVDF 膜清洗 3 次, 每次 10 min, 最后加入干净的 TBST 浸没 PVDF 条带。在膜清洗期间, 配制显影液, 按

照说明书，根据实验所需用量，将显影液 A 液和 B 液按照 1:1 比例配制混匀，在显影过程中，均匀的将配制好的显影液浸没在 PVDF 膜上，随后放入显影仪器内进行显影并保存图像。

8.灰度值分析：利用 ImageJ 软件对蛋白条带结果进行灰度值分析。

## 2.3 数据分析

使用 GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Inc., La Jolla, CA, USA) 和 SPSS 17.0 (Chicago, IL, USA) 统计分析软件，采用 Two-tailed Student's t-tests 来分析两组之间的差异，采用单因素方差分析(ANOVA)多组间显著性差异。所有数据均用“平均值”±标准差来表示。每个实验均进行 3 次独立的生物学重复。数据差异显著性标注：“\*”代表差异显著， $P < 0.05$ ；“\*\*”代表差异显著， $P < 0.01$ ，“\*\*\*”代表差异极显著， $P < 0.001$ 。

### 3. 结果

#### 3.1 BPAF 通过激活氧化应激诱导 EECs 凋亡

##### 3.1.1 BPAF 诱导 EECs 活力降低

为了检测 BPAF 对 EECs 的毒性影响,本实验用不同浓度的 BPAF (0、10、20、40、60 和 80  $\mu\text{M}$ ) 处理细胞 24h 后进行检测。如图 2-1 所示,与对照组相比,BPAF 处理导致细胞形态发生改变,包括细胞收缩,粘附减少,数量降低,融合度降低,细胞死亡数量增加。CCK8 结果表明,BPAF 以浓度依赖性的方式降低了 EECs 活力,与对照组相比,BPAF 在 40  $\mu\text{M}$  时显著降低了细胞活力 ( $P<0.001$ ),使细胞活力降低至 80% 左右,而在 60  $\mu\text{M}$  时细胞活力降低至 50%-60%。

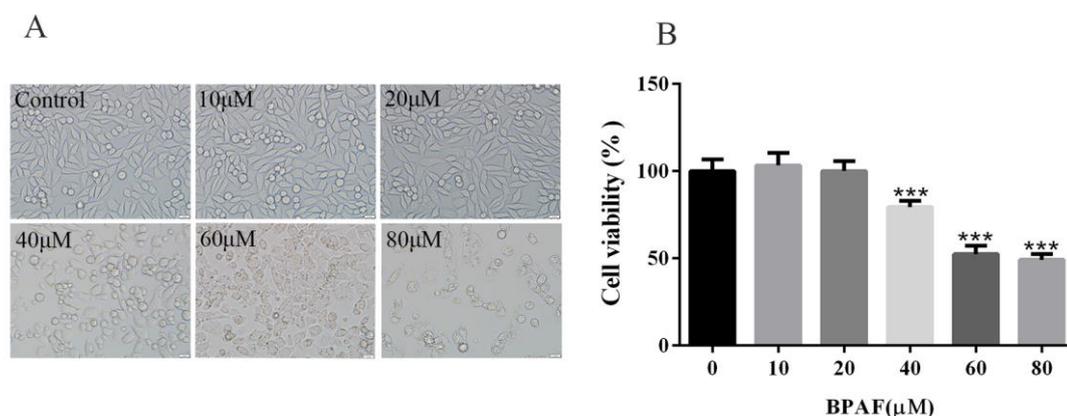


图 2-1 BPAF 对 EECs 活力的影响

图注: (A) 不同浓度的 BPAF 处理 EECs 24 h 对细胞形态的影响。标尺=20  $\mu\text{m}$ 。(B) 不同浓度的 BPAF 处理 EECs 24 h 对细胞活力的影响。\*\*\* $P<0.001$  (与对照组相比)。

Fig.2-1 Effects of BPAF on EECs viability

Note: (A) The representative images of cell morphology of EECs treated with different concentrations of BPAF for 24 h. Scale bar = 20  $\mu\text{m}$  (B) Cell viability of EECs treated with different concentrations of BPAF for 24 h. \*\*\* $P<0.001$  (compared with control group).

##### 3.1.2 BPAF 诱导 EECs 线粒体膜电位降低

为了检测 BPAF 对 EECs 线粒体膜电位的影响,本实验用 JC-1 对细胞进行染色,其中红色荧光越强代表线粒体膜电位越高,绿色荧光越强则代表线粒体损伤越大。如图 2-2 所示,对照组显示出了更强的红色荧光,表明有更高的线粒体膜电位,而 BPAF 80  $\mu\text{M}$  处理组明显降低了细胞的红色荧光,同时提升了细胞的绿色荧光,表明线粒体功能受到了损伤(图 2-2A)。为了进一步验证 BPAF 对 EECs 线粒体膜电位的

影响，本实验利用酶标仪对线粒体膜电位荧光强度进行了检测，结果表明，BPAF 在 20  $\mu\text{M}$  时显著降低了线粒体膜电位 ( $P<0.01$ )，随后线粒体膜电位随着 BPAF 浓度的增加而降低 (图 2-2B)。这些结果表明 BPAF 处理会导致 EECs 线粒体膜电位去极化和功能失调。

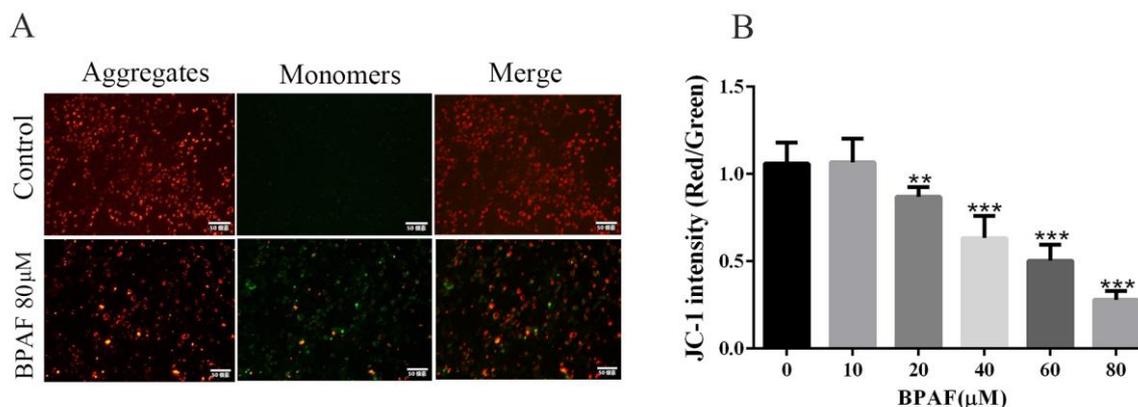


图 2-2 BPAF 对 EECs 线粒体膜电位的影响

图注：(A) 利用荧光显微镜观察 BPAF 对 EECs 线粒体膜电位的影响。红色荧光代表正常细胞中 JC-1 的聚合物，绿色荧光代表被破坏线粒体膜电位的 JC-1 单体。标尺=50  $\mu\text{m}$ 。(2) 利用酶标仪检测 BPAF 对 EECs 线粒体膜电位的影响。\*\* $P<0.01$ ，\*\*\* $P<0.001$  (与对照组相比)。

Fig. 2-2 The effect of BPAF on mitochondrial membrane potential in EECs

Note: (A)The effect of BPAF on mitochondrial membrane potential in EECs. Red fluorescence represents JC-1 aggregates in normal cell, green fluorescence represents JC-1 monomeric in damaged mitochondria. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ . (B)The effect of BPAF on mitochondrial membrane potential of EECs was detected by microplate reader. \*\* $P<0.01$  and \*\*\*  $P<0.001$  (compared with control group).

### 3.1.3 BPAF 诱导 EECs 中 ROS 的产生

线粒体是细胞 ROS 的主要来源，线粒体功能受损会加剧 ROS 的产生，因此本实验利用试剂盒中 DCFH-DA 探针对 ROS 进行了荧光染色，DCFH-DA 进入细胞后在酯酶作用下水解生成 DCFH，而细胞内 ROS 可使 DCFH 生成有荧光的 DCF。因此，DCF 的荧光强度可以反映细胞内 ROS 水平。从图 2-3A 可以看到，与对照组相比，BPAF 处理组增强了 EECs 中 ROS 荧光强度，酶标仪结果表明，BPAF 在不同浓度均显著诱导了 ROS 的产生(图 2-3B,  $P<0.001$ )。这表明 ROS 的产生可能是 BPAF 诱导的细胞死亡机制之一。

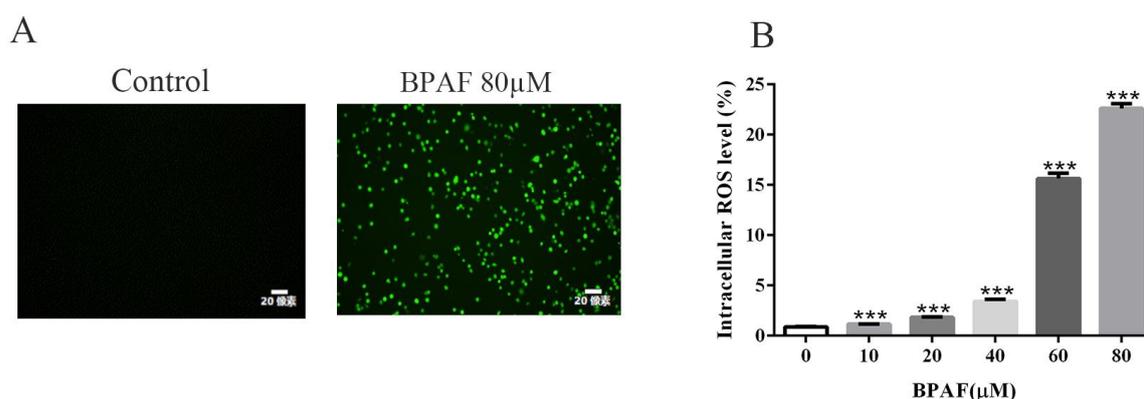


图 2-3 BPAF 对 EECs 的 ROS 的影响

图注：(A) 利用荧光显微镜观察 BPAF 对 EECs ROS 的影响，绿色荧光代表二氯荧光素 (Dichlorofluorescein, DCF) 强度，其荧光强度与细胞内 ROS 成正比。标尺=20 μm。(B) 利用酶标仪检测 BPAF 对 EECs ROS 的影响。\*\*\* $P < 0.001$  (与对照组相比)。

Fig. 2-3 Effects of BPAF on ROS in EECs

Note: (A) The effect of BPAF on ROS in EECs was observed by fluorescence microscopy, green fluorescence represents dichlorofluorescein (DCF) intensity, which is proportional to intracellular ROS. Scale bar = 20 μm. (B) The effect of BPAF on ROS in EECs was detected by microplate reader. \*\*\* $P < 0.001$  (compared with control group).

### 3.1.4 BPAF 扰乱 EECs 抗氧化稳态

为了进一步探究 ROS 产生的原因，本实验对抗氧化相关指标 GSH-Px、CAT、SOD 和 MDA 含量进行了检测。结果表明，与对照组相比，细胞中 GSH-Px 和 CAT 活性随着 BPAF 浓度的升高而升高，其中 GSH-Px 活性在 40 μM-80 μM 时显著上升 ( $P < 0.05$ )，CAT 活性在 20 μM-80 μM 时显著上升 ( $P < 0.001$ )，且 MDA 含量也随着 BPAF 浓度的升高而升高，并在 40 μM-80 μM 时达到显著水平 ( $P < 0.001$ )；而 SOD 活性则显示出相反的趋势，在该浓度范围显著降低 ( $P < 0.01$ )。这些结果表明，ROS 的过量产生扰乱了氧化系统和抗氧化系统之间的平衡，并导致了氧化应激的产生(图 2-4 A-D)。

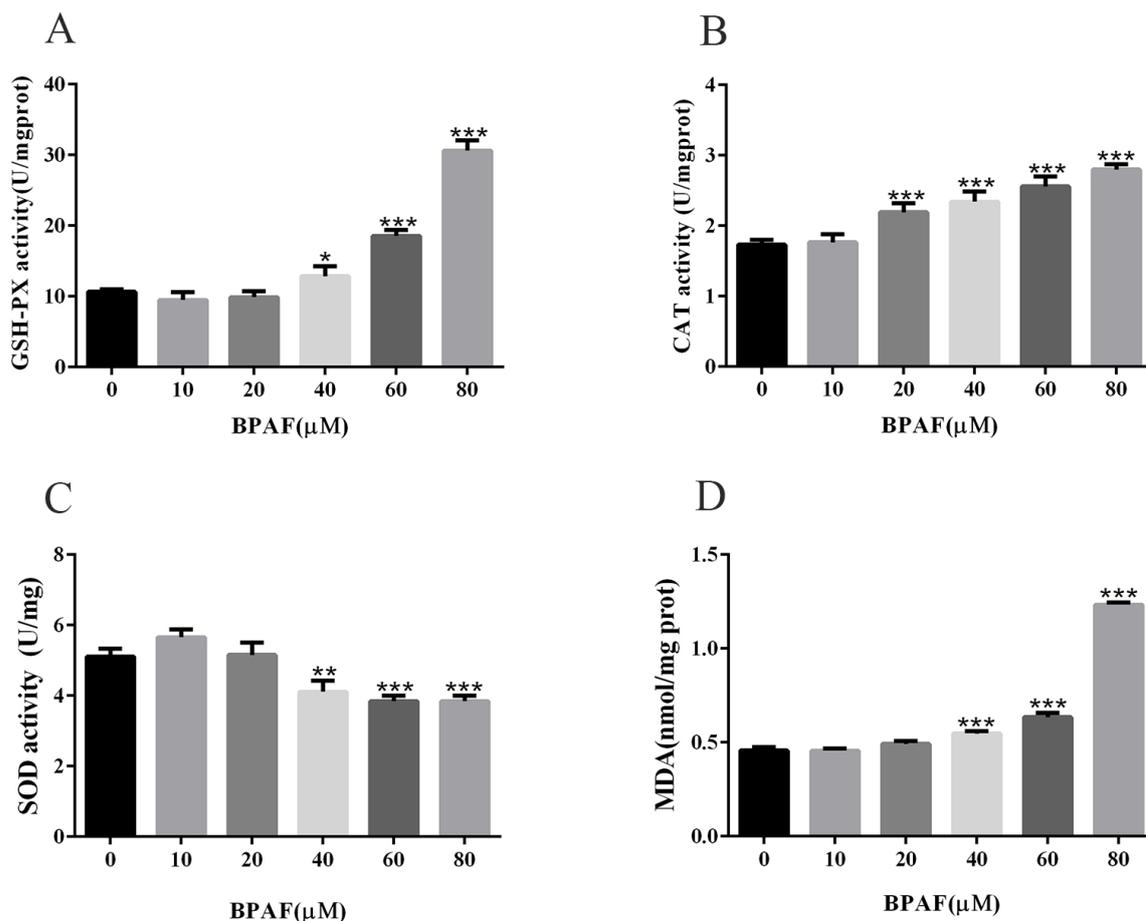


图 2-4 BPAF 对 EECs 抗氧化相关因子的影响

图注：BPAF 处理对 EECs 中 GSH-Px (A)、CAT (B)、SOD (C) 和 MDA (D) 活性的影响。

\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (与对照组相比)。

Fig.2-4 Effects of BPAF on antioxidant-related factors of EECs

Note: Effects of BPAF treatment on GSH-Px (A), CAT (B), SOD (C) and MDA (D) activity in EECs.

\*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  (compared with control group).

### 3.1.5 BPAF 激活 EECs 中 Nrf2 通路

Nrf2 是维持细胞内氧化还原稳态以抵抗氧化损伤的关键调节因子，可通过编码下游抗氧化基因的表达发挥抗氧化作用。因此，为了进一步探究 BPAF 对 EECs 抗氧化机制的影响，本研究对 Nrf2 及其下游基因和蛋白表达进行了检测。结果表明，BPAF 在 60 μM 和 80 μM 时显著提升了 *Nrf2*, *Keap1* 和 *HO-1* mRNA 的表达，但对 *NQO1* mRNA 无显著影响 (图 2-5A,  $P < 0.01$ )。Western Blot 结果显示出与 mRNA 水平相似的结果，BPAF 以剂量依赖性显著增强了 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平 (图 3-5B,  $P < 0.01$ )，而 NQO1 在 80 μM 时显著升高 (图 2-5B,  $P < 0.01$ )，这些结果表

明 BPAF 诱导了 Nrf2 通路激活。

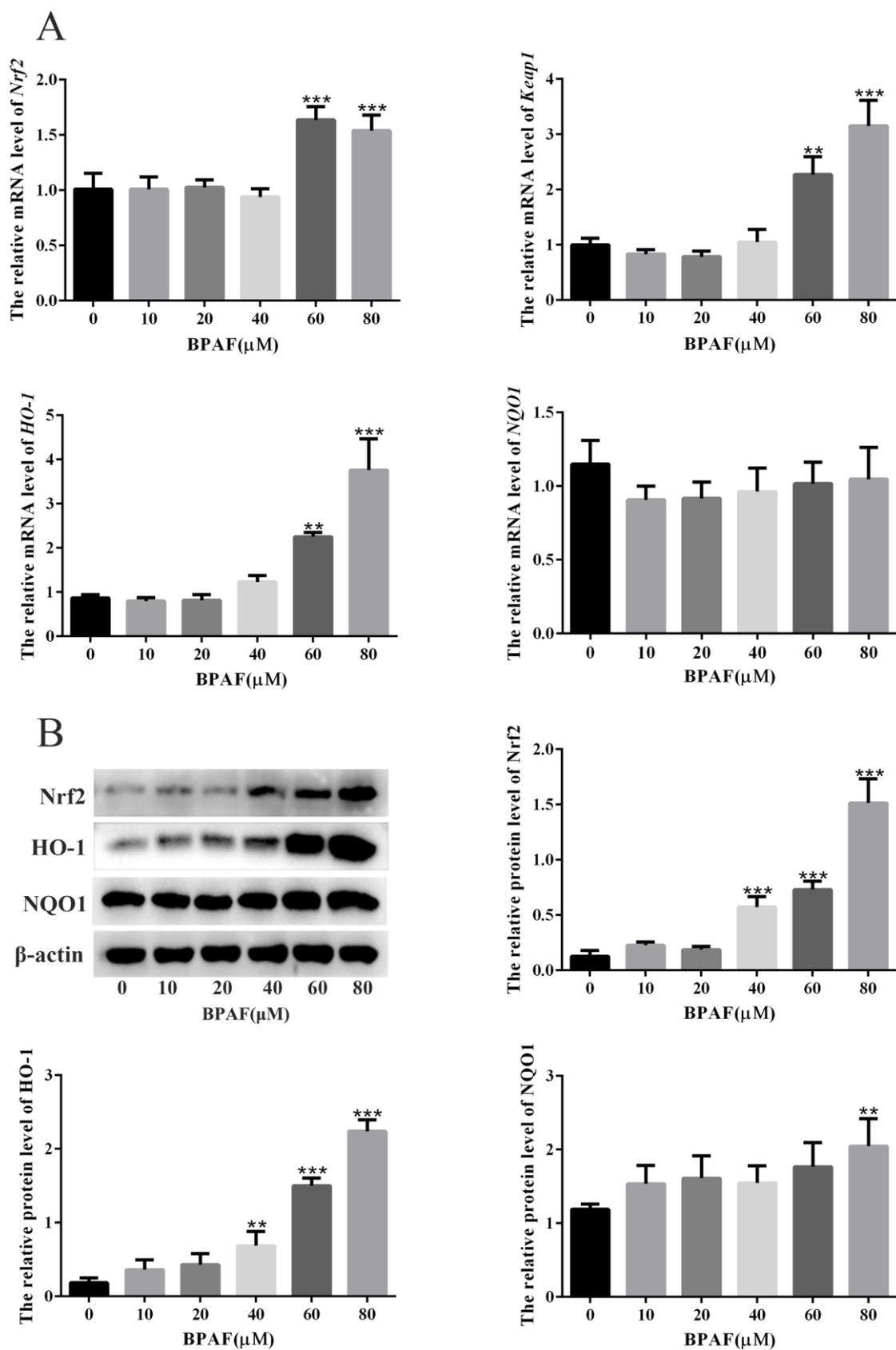


图 2-5 BPAF 对 EECs Nrf2 通路的影响

图注：(A) 实时荧光定量 PCR 检测 BPAF 对 *Nrf2*、*Keap1*、*HO-1* 和 *NQO1* mRNA 水平的影响。  
 (B) Western blot 检测 BPAF 对 Nrf2 通路蛋白表达的影响，并对 Nrf2、HO-1 和 NQO1 的蛋白表达进行灰度值分析。**\*\* $P < 0.01$** ，**\*\*\* $P < 0.001$** （与对照组相比）。

Fig. 2-5 Effects of BPAF on Nrf2 pathway of EECs

Note: (A) The effects of BPAF on *Nrf2*, *Keap1*, *HO-1* and *NQO1* mRNA levels were determined by Quantitative Real-Time RT-PCR. (B) Western blot analysis was performed to detect the effect of BPAF on Nrf2 pathway protein expression, and the protein expressions of Nrf2, HO-1 and NQO1 were analyzed with gray values. **\*\* $P < 0.01$**  and **\*\*\* $P < 0.001$**  (compared with control group).

### 3.1.6 BPAF 诱导 EECs 凋亡相关蛋白表达

为了探究 BPAF 对 EECs 凋亡的影响，本研究对凋亡相关蛋白进行了检测，结果表明 BPAF 在 20  $\mu\text{M}$  时显著提升了促凋亡蛋白 Bax 表达水平 ( $P < 0.05$ )，并随着 BPAF 浓度的增加而升高，Cytochrome C 在 BPAF 浓度为 10  $\mu\text{M}$ -60  $\mu\text{M}$  时显著提升 ( $P < 0.05$ )。相反，抗凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白表达水平随着 BPAF 浓度的增加呈降低趋势，并在 40  $\mu\text{M}$ -80  $\mu\text{M}$  时达到显著水平 ( $P < 0.001$ )。由于 DNA 过度损伤可能诱导细胞凋亡，因此本研究同样对  $\gamma\text{-H2AX}$  蛋白表达水平进行了检测，与其它促凋亡蛋白一致，BPAF 同样促进了  $\gamma\text{-H2AX}$  蛋白的表达，并在 20  $\mu\text{M}$ -80  $\mu\text{M}$  时显著升高 ( $P < 0.05$ )，这些结果表明 BPAF 诱导了 EECs 凋亡（图 2-6）。

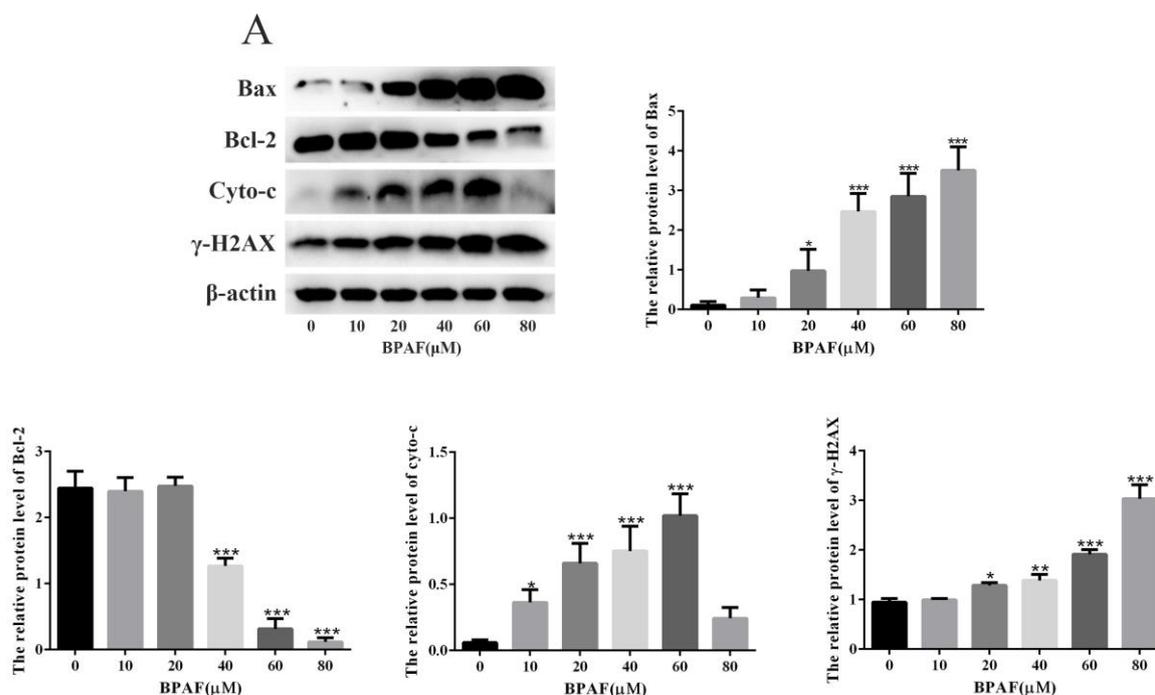


图 2-6 BPAF 对 EEC 凋亡相关蛋白表达的影响

图注：(A) Western blot 检测 BPAF 对凋亡相关蛋白表达的影响，并对 Bax, Bcl-2, Cytochrome C 和  $\gamma$ -H2AX 的蛋白表达进行灰度值分析。\* $P$ <0.05, \*\*\* $P$ <0.001 (与对照组相比)。

Fig. 2-6 Effects of BPAF on expression of apoptosis-related proteins in EECs

Note: (A) Western blot was used to detect the effects of BPAF on apoptosis-related protein expression, and the protein expressions of Bax, Bcl-2, Cytochrome C and  $\gamma$ -H2AX were analyzed with gray values. \* $P$ <0.05 and \*\*\* $P$ <0.001 (compared with control group).

### 3.1.7 BPAF 激活 EECs 中 MAPK 通路

MAPK 通路是调控细胞增殖和凋亡的主要信号通路，为了进一步探究 BPAF 诱导 EECs 细胞凋亡的机制，本研究对 MAPK 通路相关蛋白进行了检测，结果表明 BPAF 在 40  $\mu$ M-80  $\mu$ M 诱导了 p-ERK1/2 蛋白水平的显著增加 ( $P$ <0.01)，而 p-P38 和 p-JNK 蛋白表达水平在 60  $\mu$ M 和 80  $\mu$ M 时显著增加 ( $P$ <0.01)。这些结果表明 BPAF 可能通过激活 MAPK 通路诱导了 EECs 凋亡 (图 2-7)。

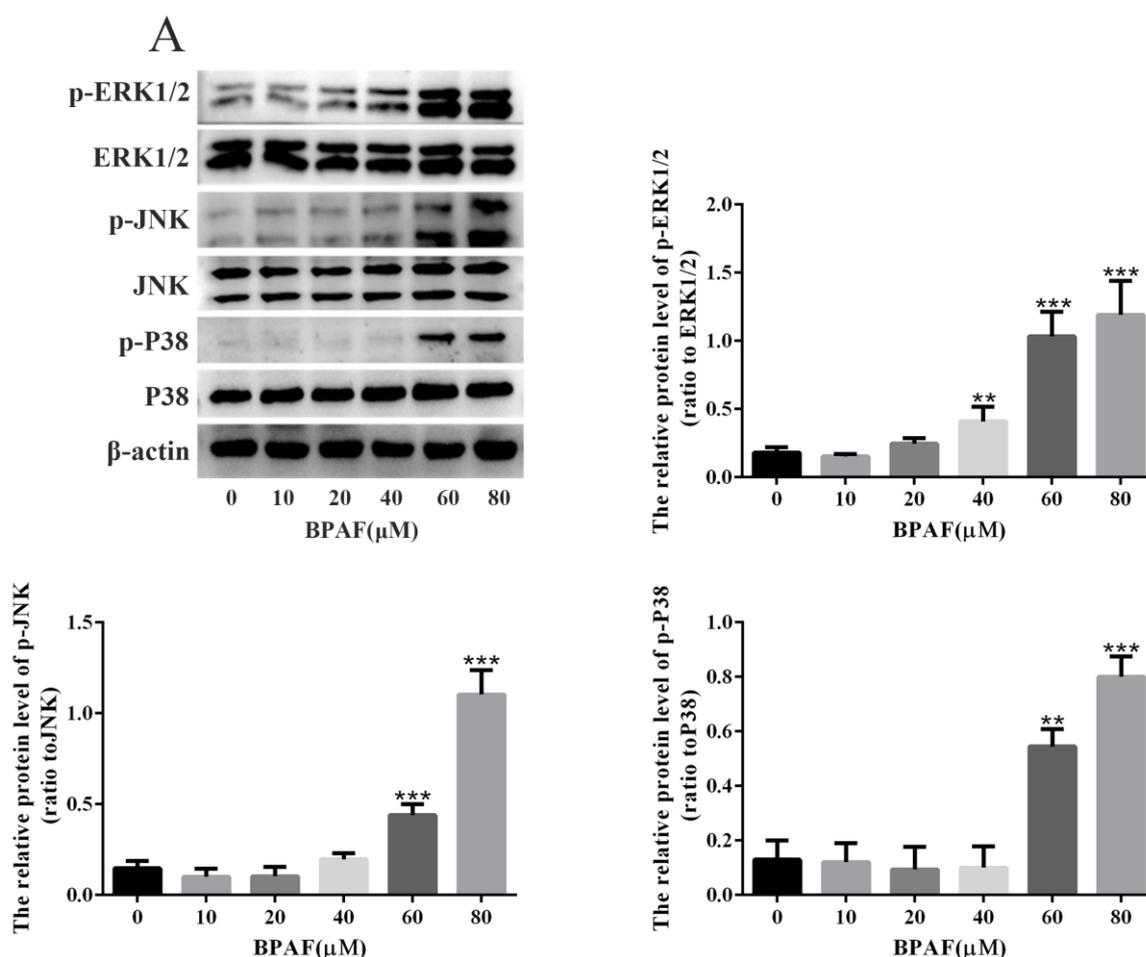


图 2-7 BPAF 对 EECs MAPK 通路的影响

图注：(A) Western blot 检测 BPAF 对 MAPK 通路相关蛋白表达的影响，并对 p-Erk1/2、p-P38 和 p-JNK 的蛋白表达进行灰度值分析。 $**P<0.01$ ， $***P<0.001$ （与对照组相比）。

Fig. 2-7 Effects of BPAF on EECs MAPK pathway

Note: (A) Western blot analysis was performed to detect the effect of BPAF on the expression of MAPK pathway-related proteins, and the protein expressions of p-ERK1/2, p-P38 and p-JNK were analyzed with gray values.  $**P<0.01$  and  $***P<0.001$  (compared with control group).

## 3.2 姜黄素通过抑制氧化应激和 MAPK 通路缓解 BPAF 诱导的 EECs 凋亡

### 3.2.1 姜黄素缓解 BPAF 诱导的细胞毒性

在上述结果中，BPAF 在 60  $\mu\text{M}$  时使细胞活力降低至 50%-60%，且该浓度显著诱导了凋亡相关蛋白和通路的激活，因此本实验选用 60  $\mu\text{M}$  进行后续实验。为了探究姜黄素对 BPAF 诱导的细胞损伤的保护作用，本研究首先用不同浓度姜黄素（0、1.25、2.5、5、10 和 20  $\mu\text{M}$ ）处理 EECs 24 h。结果表明，姜黄素在 10  $\mu\text{M}$  时显著降低了 EECs 细胞活力（图 2-8A， $P<0.001$ ），因此，本实验选用 0、1.25、2.5 和 5  $\mu\text{M}$  进行后续缓解实验。结果表明，姜黄素在 2.5  $\mu\text{M}$  时显著提升了细胞活力（图 2-8B， $P<0.05$ ）。因此，本研究在后续实验中选用 2.5  $\mu\text{M}$  以进一步探究其缓解作用和机制。

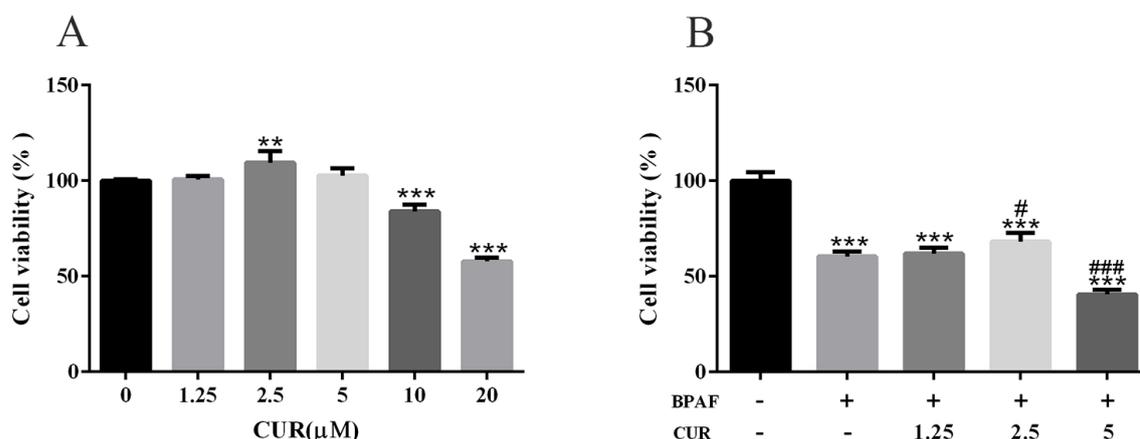


图 2-8 姜黄素缓解 BPAF 诱导的细胞毒性

图注：(A) 不同浓度姜黄素处理 EECs 24 h 对细胞活力的影响。(B) 用 1.25、2.5 或 5  $\mu\text{M}$  姜黄素预处理 EECs 对 BPAF 诱导的细胞毒性的影响。 $**P<0.01$ ， $***P<0.001$ （与对照组相比）； $\#P<0.05$ ， $###P<0.001$ （与 BPAF 组相比）。

Fig 2-8. Curcumin alleviates BPAF-induced cytotoxicity

Note: (A) Cell viability of EECs treated with different concentration of curcumin for 24 h. (B) Cell viability of EECs pretreated with 1.25, 2.5 or 5  $\mu$ M curcumin before BPAF treatment. \*\* $P$ <0.01 and \*\*\* $P$ <0.001 (compared with control group); # $P$ <0.05 and ### $P$ <0.001 (compared with BPAF group).

### 3.2.2 姜黄素缓解 BPAF 诱导的 EECs 凋亡

为了进一步揭示姜黄素对 BPAF 诱导的 EECs 损伤的缓解作用，利用流式细胞术对细胞凋亡率进行了检测，结果表明，与对照组相比，BPAF 处理组细胞凋亡率显著增加 ( $P$ <0.001)，而姜黄素预处理组显著降低 (图 2-9A,  $P$ <0.01)。此外，Western Blot 结果表明，姜黄素预处理显著降低了 BPAF 诱导的 Bax、Cytochrome C 和  $\gamma$ -H2AX 蛋白表达 (图 2-9B,  $P$ <0.01)，而 Bcl-2 蛋白表达水平显著增加 (图 2-9B,  $P$ <0.001)，这表明姜黄素可能通过线粒体凋亡途径抑制了 BPAF 诱导的 EECs 凋亡。

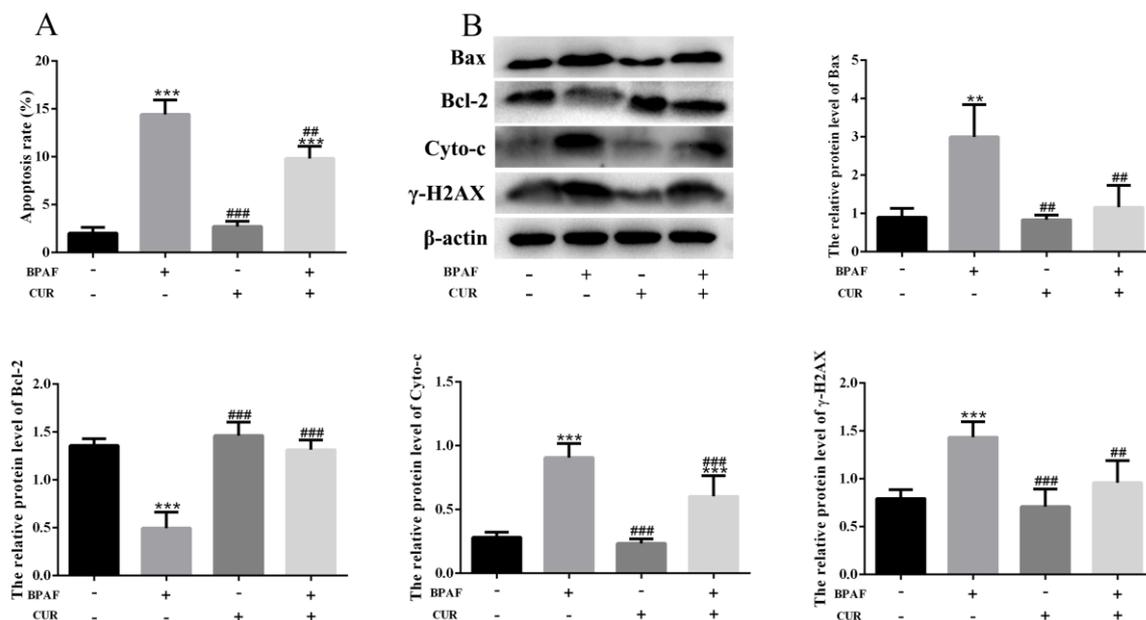


图 2-9 姜黄素缓解 BPAF 诱导的细胞凋亡

图注: (A) 用细胞流式仪分析 EECs 凋亡率。(B) Western blot 检测 Bax、Bcl-2、Cytochrome C 和  $\gamma$ -H2AX 的蛋白表达，并对其灰度值进行分析。\*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001 (与对照组相比); ### $P$ <0.01 and ### $P$ <0.001 (与 BPAF 组相比)。

Fig. 2-9 Curcumin alleviates EECs apoptosis induced by BPAF

Note: (A) The apoptosis rate of EECs analyzed by flow cytometry. (B) The expressions of Bax, Bcl-2, Cytochrome C and  $\gamma$ -H2AX were detected by Western blot and gray values were analyzed  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$  (compared with control group);  $##P<0.01$  and  $###P<0.001$  (compared with BPAF group).

### 3.2.3 姜黄素抑制 BPAF 诱导的氧化应激

ROS 的产生在氧化应激和细胞凋亡中发挥着关键作用，本研究中，与 BPAF 单独处理组相比，姜黄素预处理显著抑制了 BPAF 诱导的 ROS 产生和 MDA 含量（图 2-10A-C,  $P<0.001$ ）。此外，抗氧化相关指标检测结果表明，与 BPAF 单独处理组相比，姜黄素预处理显著提升 SOD 含量，而 GSH-Px 含量显著减低（图 2-10D-E,  $P<0.001$ ）。这些结果表明，姜黄素可能通过维持 EECs 的氧化还原稳态，抑制 BPAF 诱导的氧化应激。

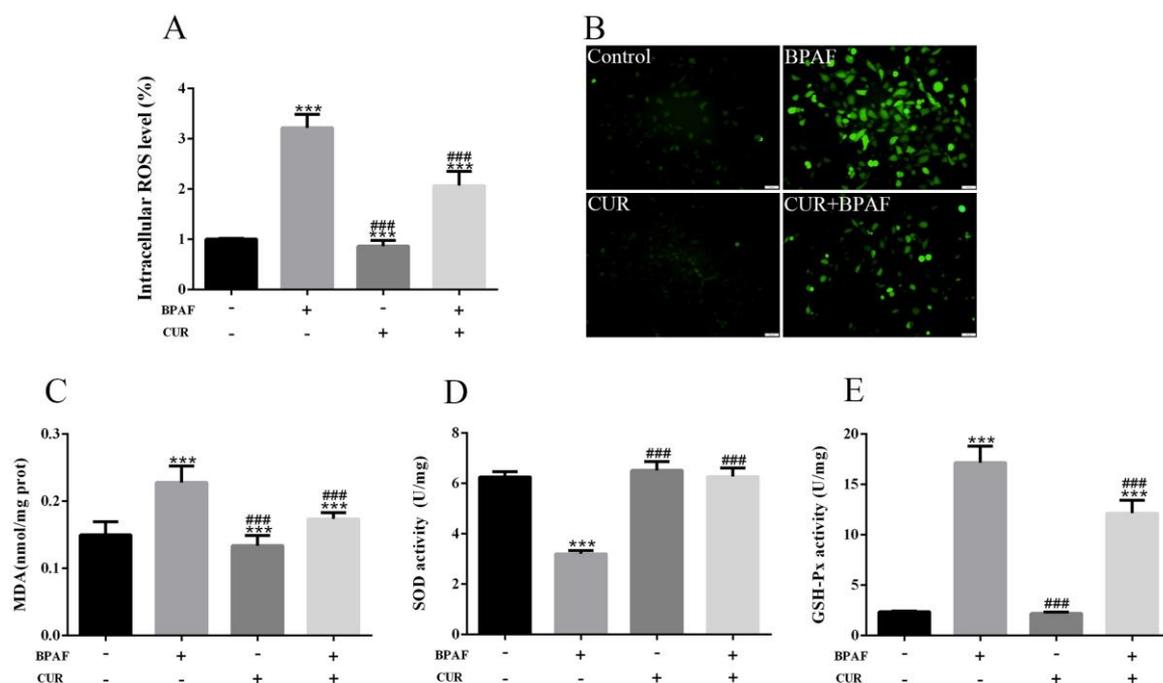


图 2-10 姜黄素缓解 BPAF 诱导的氧化应激

图注：(A) EECs 的相对 ROS 水平。(B) EECs 中 ROS 的代表性图像，绿色荧光代表二氯荧光素 (Dichlorofluorescein, DCF) 强度，其荧光强度与细胞内 ROS 成正比。标尺=50  $\mu$ m。(C) EECs 中 MDA 的含量。(D) EECs 中 SOD 活性的变化。(E) EECs 中 GSH-Px 活性的变化。 $***P<0.001$  (与对照组相比);  $###P<0.001$  (与 BPAF 组相比)。

Fig.2-10 Curcumin alleviates BPAF-induced oxidative stress

Note: (A)The relative ROS level in EECs. (B) The representative images of ROS in EECs. Green fluorescence represents dichlorofluorescein (DCF) intensity, which is proportional to intracellular ROS. Scale bar = 50  $\mu$ m.(C) The MDA content in EECs. (D) The SOD activity in EECs. (E) The GSH-Px activity in EECs. \*\*\* $P$ <0.001 (compared with control group); ### $P$ <0.001 (compared with BPAF group).

### 3.2.4 姜黄素抑制 BPAF 诱导的 EECs 线粒体膜电位降低

与对照组相比，BPAF 显著降低了线粒体膜电位 ( $P$ <0.001)，而姜黄素处理增强了 EECs 红色荧光强度，显著提升了线粒体膜电位 ( $P$ <0.001)。这些结果表明姜黄素在 BPAF 处理中通过保护线粒体功能发挥细胞保护作用。

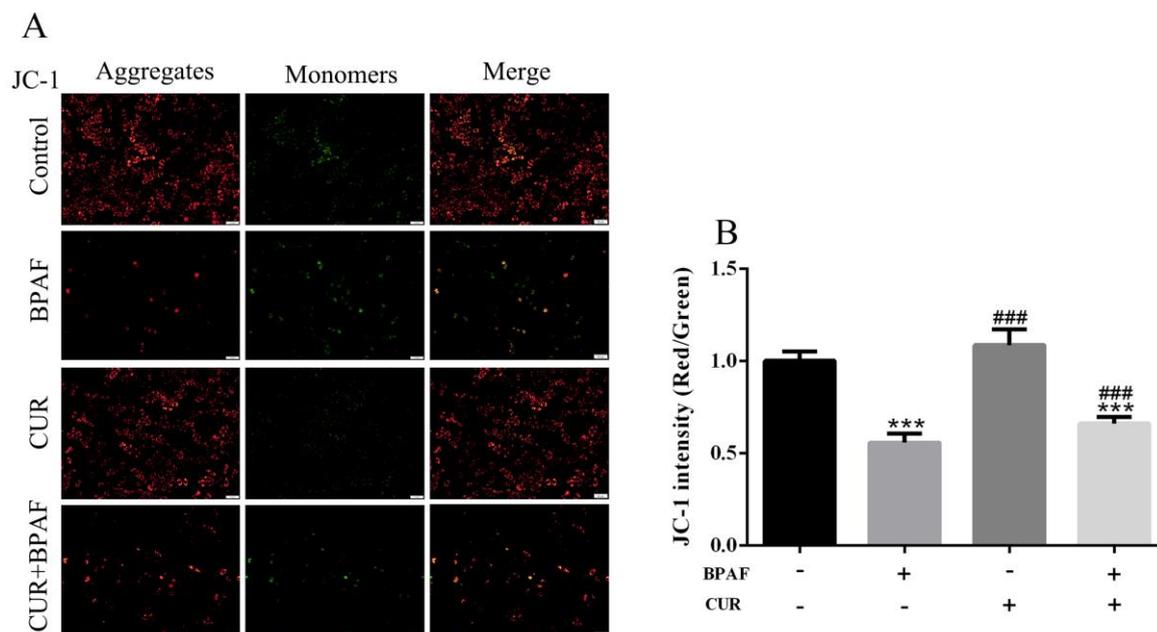


图 2-11 姜黄素对 BPAF 诱导的 EECs 线粒体膜电位损伤的影响

图注：(A) EECs 中 JC-1 荧光染色的代表性图像，红色荧光代表正常线粒体中 JC-1 的聚合物，绿色荧光代表被破坏线粒体膜电位的 JC-1 单体。标尺=50  $\mu$ m (B) 酶标仪检测 EECs 中线粒体膜电位。标尺= $\mu$ m 。\*\*\* $P$ <0.001 (与对照组相比); ## $P$ <0.01, ### $P$ <0.001 (与 BPAF 组相比)。

Fig 2-11 Effect of curcumin on BPAF induced loss of mitochondrial membrane potential in EECs

Note: (A). The representative images of JC-1 fluorescent intensity in EECs. Red fluorescence represents JC-1 aggregates in normal mitochondria, green fluorescence indicates JC-1 monomeric in damaged mitochondria. Scale bar = 50  $\mu$ m. (B). The value of mitochondrial membrane potential in EEC was detected by microplate reader. \*\*\* $P$ <0.001 (compared with control group); ## $P$ <0.01, ### $P$ <0.001 (compared with BPAF group).

### 3.2.5 姜黄素抑制 BPAF 诱导的 MAPK 通路激活

为了探究 MAPK 通路是否参与了姜黄素对 BPAF 诱导的细胞凋亡中的保护作用，本研究对 MAPK 通路相关蛋白进行了检测。结果表明，BPAF 处理显著提高了 p-ERK1/2、p-P38 和 p-JNK 的磷酸化水平 ( $P<0.01$ )，而姜黄素预处理显著降低了 ERK1/2 和 P38 的磷酸化水平 ( $P<0.05$ )，但 P-JNK 无显著影响 ( $P>0.05$ )。这些结果表明，姜黄素可能通过抑制 ERK1/2 和 P38 通路缓解 BPAF 诱导的细胞凋亡。

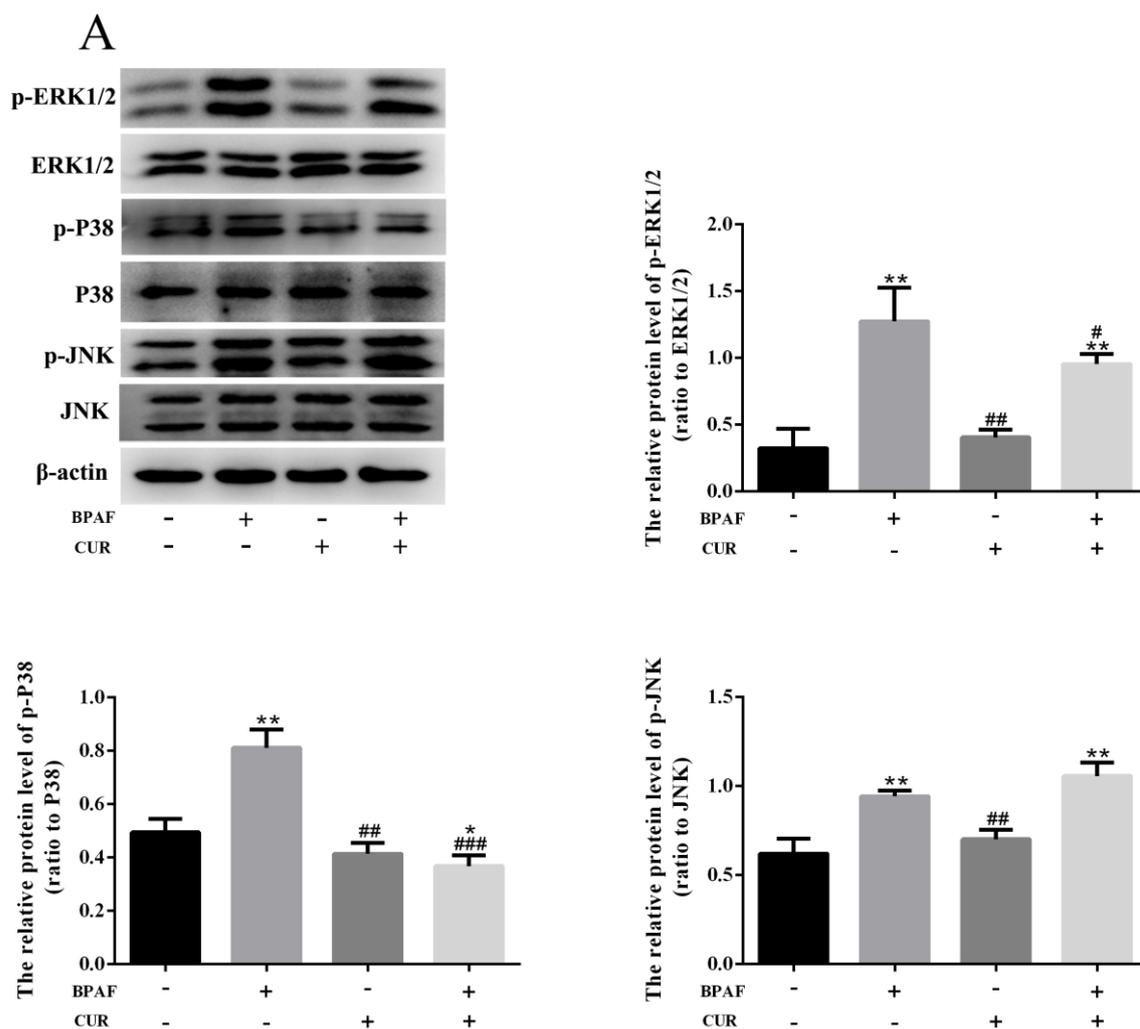


图 2-12 姜黄素抑制 BPAF 诱导的 MAPK 通路激活

图注：(A) Western blot 检测 MAPK 通路蛋白表达并用 Image J 软件分析蛋白的相对表达水平。

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  (与对照组相比); # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ , ### $P<0.001$  (与 BPAF 组相比)。

Fig.2-12 Curcumin inhibits BPAF-induced MAPK pathway activation

Note: (A). The expression of MAPK pathway protein was detected by Western blot and analyzed by

Image J software. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  (compared with control group); # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  and ### $P < 0.001$  (compared with BPAF group).

### 3.2.6 姜黄素抑制 BPAF 诱导的 Nrf2 通路激活

为了进一步探究姜黄素如何保护 EECs 抵抗 BPAF 诱导的细胞毒性,本研究对抗氧化通路相关蛋白和 mRNA 水平进行检测,如图所示,与对照组相比,BPAF 处理显著提高了 EECs 中 *Nrf2*、*Keap1* 和 *HO-1* mRNA 水平 ( $P < 0.001$ ),而姜黄素预处理显著降低了 *Nrf2*、*Keap1* 和 *HO-1* mRNA 水平 ( $P < 0.01$ ),但 *NQO1* mRNA 水平显著升高 ( $P < 0.05$ )。在 Western Blot 结果中,*Nrf2*、*HO-1* 和 *NQO1* 的蛋白表达水平显示出与 mRNA 水平相似的趋势,姜黄素同样显著降低了 *Nrf2* 和 *HO-1* 蛋白表达 ( $P < 0.05$ ),而 *NQO1* 显著上升 ( $P < 0.05$ )。这表明姜黄素可能通过 *Nrf2*/*HO-1* 途径保护 EECs 免受 BPAF 处理引起的氧化应激。

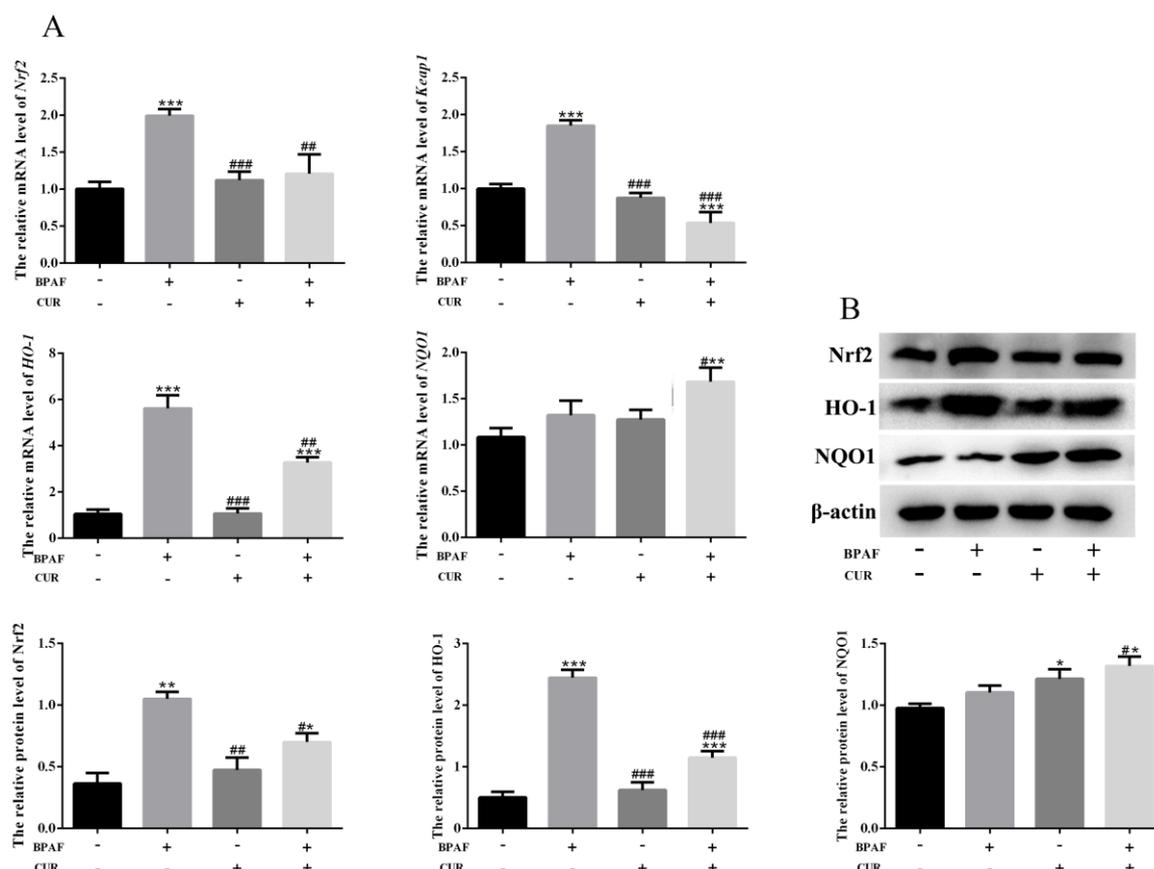


图 2-13 姜黄素对 BPAF 诱导的 Nrf2 通路激活的影响

图注: (A) 实时荧光定量检测 EECs 中 *Nrf2*、*Keap1*、*HO-1* 和 *NQO1* mRNA 相对表达水平。(B) Western blot 检测 Nrf2 通路相关蛋白表达水平。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (与对照组相比); # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  (与 BPAF 组相比)。

Fig.2-13 Effects of Curcumin on BPAF-induced Nrf2 pathway activation in EECs

Note: (A) The relative mRNA expression levels of *Nrf2*, *Keap1*, *HO-1* and *NQO1* in EECs were quantitatively determined by qRT-PCR. (B) The Nrf2 pathway-related proteins were detected by Western blot. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  (compared with control group); # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  and ### $P < 0.001$  (compared with BPAF group).

## 4. 讨论

作为 BPA 的替代物, BPAF 已广泛应用于塑料和其他工业产品中, 由于其具有较强的雌激素活性和生殖毒性 (Akahori et al 2008), 暴露于 BPAF 可引起多种细胞的氧化应激, 如扰乱抗氧化防御, 导致细胞凋亡等 (Gu et al 2020, Huang et al 2020)。然而, BPAF 对 EECs 的毒性作用尚不清楚。本研究从氧化应激、凋亡和 MAPK 等途径探讨了 BPAF 介导的 EECs 毒性的潜在机制。此外, 我们还研究了姜黄素预处理是否对 BPAF 诱导的细胞损伤具有保护作用。本研究结果表明, BPAF 暴露导致 EECs 细胞活力显著降低和线粒体功能障碍, 并引发了 ROS 生成的增加, 导致了细胞凋亡, 而姜黄素可通过抑制 MAPK 通路和氧化应激缓解 BPAF 诱导的凋亡。

线粒体在诱导细胞凋亡中发挥重要作用, 而细胞凋亡与氧化应激密切相关 (Xiong et al 2014)。氧化应激状态下, 线粒体外膜通透性增加, 线粒体释放细胞凋亡相关因子如 Cytochrome C 进入细胞质, 引发下游 Caspase 级联反应, 导致细胞凋亡 (Maity et al 2022)。Bax 和 Bcl-2 可能通过调节线粒体膜通透性影响细胞凋亡 (Desagher and Martinou 2000)。先前的体内和体外研究表明, BPAF 可诱导多种细胞产生氧化应激并最终导致凋亡。例如, BPAF 会导致支持细胞 (Wu et al 2019) 和 HCM 细胞的活力降低 (Gu et al 2020), 提高 Bax, 降低 Bcl-2 的表达诱导 KGN 细胞凋亡 (Huang et al 2021)。此外, BPAF 还会引起睾丸线粒体膜电位的降低和 Cytochrome C 的增加 (Yu et al 2022b), 这表明 BPAF 在多种细胞中引发的凋亡的产生。在本研究中也出现了类似的结果, BPAF 处理显著降低了 EECs 细胞活力, 然而姜黄素预处理逆转了这一趋势, 表明姜黄素对 BPAF 诱导的细胞损伤具有保护作用。此外, 我们还发现 BPAF 显著增加了 ROS 和细胞凋亡率的产生, 这可能是通过线粒体死亡途径引起的。在本研究中 BPAF 暴露导致了 EECs 线粒体功能障碍, Bax 和 Cytochrome C 表达升高, Bcl-2 表达降低, 而姜黄素预处理显著抑制了这一趋势, 相似的结果也在其他研究中报道。例如, 姜黄素已被证明可以防止三氧化二砷诱导的鸭肾细胞凋亡 (Wu et al 2021) 和玉米赤霉烯酮诱导的 TM3 细胞凋亡 (Chen et al 2020a)。据我们所知, 这是第一次发现姜黄素对 BPAF 诱导的细胞凋亡和损伤具有保护作用, 这可能意味着姜黄素对 BPAF 引起的其他受损细胞也有保护作用, 如 BPAF 诱导的睾丸损伤和卵巢 DNA 氧化 (Abdallah et al 2023b)。此外, 内质网应激通路也被证明可以激活凋亡通路, 导致细胞凋亡 (Liu et al 2016)。研究表明姜黄素可通过内质网应激缓

解玉米赤霉烯酮诱导的细胞凋亡 (Chen et al 2020a)。因此, 姜黄素缓解 BPAF 诱导的细胞凋亡的机制有待进一步研究。

氧化应激是一种导致细胞损伤的代谢功能障碍, 可由多种环境污染物引发, 如 PM<sub>2.5</sub> (Wang et al 2022b)和砷 (Wei et al 2020)。过量的 ROS 会破坏抗氧化能力, 引起线粒体损伤和遗传毒性, 导致细胞凋亡 (Uttara et al 2009)。线粒体是内源性 ROS 的主要来源, 线粒体功能障碍会导致氧化应激增加, 从而产生脂质过氧化反应, 而 MDA 是氧化损伤的指标之一 (Ott et al 2007)。在本研究中, BPAF 处理诱导线粒体功能损伤, 表明 BPAF 可能通过损伤线粒体功能引发了 ROS 的产生。SOD 和 GSH-Px 是体内必需的抗氧化酶, 通过清除 ROS 的产生来维持氧化还原平衡。据报道, BPAF 显著诱导大鼠睾丸和 KGN 细胞产生 ROS 和 MDA, 并导致抗氧化系统紊乱 (Huang et al 2021, Yu et al 2022b)。本研究同样证实了这一观察结果。我们发现 BPAF 暴露显著增加了 EECs 中 ROS 和 MDA 的产生, 同时抗氧化酶 SOD 的活性降低, 而 GSH-Px 的活性显著增加。结果表明, BPAF 可刺激 EECs 产生过量 ROS, 导致氧化还原失衡和细胞凋亡。已有研究表明, 植物提取物具有抑制氧化和提高抗氧化酶活性的作用, 如柱头甾醇 (Ali et al 2015)、生物碱和甾醇 (Aljarba et al 2021)等。然而, 姜黄素能否预防 BPAF 引起的氧化应激尚不清楚。在本研究中, 姜黄素可通过维持氧化还原稳态, 减轻了氧化应激导致的细胞损伤, 抑制了细胞凋亡。在其他研究中也有类似的发现, 表明姜黄素具有较高的抗氧化能力, 可减弱环境污染物引起的氧化应激, 维持氧化还原平衡。例如, 姜黄素可以通过抑制玉米赤霉烯酮引起的氧化来保护间质细胞 (Chen et al 2020a)。此外, 姜黄素也被证明可以通过调节氧化应激来防止三氧化二砷诱导的自噬和细胞凋亡 (Wu et al 2021)<sup>41</sup>。这些研究表明姜黄素在抑制氧化应激后, 会通过多种途径缓解细胞损伤。综上所述, 这些数据表明姜黄素通过抑制氧化应激和维持抗氧化稳态缓解了 BPAF 诱导的细胞凋亡。

Nrf2 被认为是细胞中抗氧化剂的关键细胞防御调节剂 (Nguyen et al 2009)。在正常情况下, Nrf2 通过在细胞质中与 Keap1 形成复合物而失活, 氧化应激发生时, Nrf2 与 Keap1 解离并易位到细胞核中, 激活细胞保护分子的表达, 如 NQO1、SOD 和 HO-1 (Akino et al 2018, Hayes and McMahon 2001, Mondal et al 2019)。多项研究发现姜黄素通过激活 Nrf2 通路对一些环境污染物诱导的细胞损伤发挥保护作用。如 Qi 等人发现姜黄素通过上调 Nrf2、HO-1 和 NQO1 的表达, 保护人滋养层 HTR8/SVneo 细胞免受氧化损伤 (Qi et al 2020)。然而在本研究中, Nrf2 及其下游靶点 HO-1 在

BPAF 诱导的损伤的细胞中持续上升，这与大多数已报到的结果是相反的。这可能是细胞生存的一种自我保护机制，在应对外界有害刺激时，通过提升抗氧化酶的表达以抵抗氧化应激，维持细胞抗氧化稳态，并且在其他研究中也发现，如脂多糖可以激活支气管上皮细胞中 Keap1-Nrf2/HO-1 通路 (Li et al 2021a)。据我们所知，这是首次发现 BPAF 可以激活 EECs 中的 Nrf2 通路。在本研究中，姜黄素通过增加 SOD 的活性以去除过量的 ROS 并维持细胞氧化还原稳态。同时，抗氧化酶 GSH-Px、Nrf2、HO-1 的降低表明细胞已经恢复到相对正常的状态，这也在一定程度上解释了姜黄素预处理后细胞凋亡降低的原因。

MAPK 信号通路参与细胞生长、分化、增殖和凋亡等生理过程的调控，是细胞中最重要的信号转导系统之一 (Cargnello and Roux 2012)，MAPK 信号通路的激活介导了氧化应激、细胞凋亡和炎症反应的产生 (Lei et al 2019, Vahdati Hassani et al 2017)。Nrf2 受到 MAPK 信号通路的调控 (Lee et al 2013)，这表明本实验中 Nrf2 通路可能通过调控 MAPK 通路发挥作用。已有研究表明 BPAF 通过激活 MAPK 通路诱导了人卵巢颗粒样肿瘤细胞凋亡，而 JNK 在这一过程中发挥了主要作用 (Huang et al 2020)。然而，MAPK 通路是否也参与 BPAF 诱导的 EECs 凋亡尚不清楚。本研究发现，ERK1/2、JNK 和 P38 的磷酸化被显著激活，这表明 MAPK 通路可能是姜黄素抑制 BPAF 诱导的细胞凋亡和氧化应激的潜在靶点。类似的发现如植物提取物藏红花素和原花青素 C1 已证明可以通过抑制 MAPK 通路的激活抵抗细胞凋亡和氧化应激从而发挥保护作用 (Song et al 2019, Vahdati Hassani et al 2017)。因此，我们进一步探索了姜黄素是否也能阻断 MAPK 的磷酸化，抑制 BPAF 诱导的 EECs 细胞凋亡。我们的研究表明，姜黄素显著抑制 ERK1/2 和 P38 的磷酸化。然而，JNK 的磷酸化并没有改变。其他研究也发现了类似的结果，例如 Geng 等人报道姜黄素通过抑制 JNK/P38 通路减弱 BPA 诱导的 HepG2 细胞的胰岛素抵抗 (Geng et al 2017)。Song 等人的研究表明原花青素 C1 通过阻断 ERK1/2 和 P38 的磷酸化，而不是通过 JNK 通路来抑制谷氨酸诱导的 HT22 细胞死亡 (Song et al 2019)<sup>65</sup>，这在一定程度上解释了姜黄素对细胞保护作用有限的原因。此外，在本研究中，虽然我们证明姜黄素通过抑制 ERK 和 P38 通路发挥保护作用，但 EECs 仍可能通过其他信号通路导致凋亡，具体机制仍需进一步研究。

## 5.小结

本研究以 EECs 为体外子宫模型，检测了 BPAF 对 EECs 氧化应激和细胞凋亡的影响，并探究了姜黄素对 BPAF 诱导的 EECs 氧化应激和凋亡的缓解作用及机制。结果如下：

- （1）BPAF 诱导 EECs 活力和线粒体膜电位降低，提升 ROS 和 MDA 含量，并扰乱细胞抗氧化系统。
- （2）EECs 可能通过激活 Nrf2 通路以对抗 BPAF 诱导的氧化应激。
- （2）BPAF 可能通过激活线粒体凋亡途径和 MAPK 通路诱导了 EECs 凋亡。
- （3）姜黄素可能通过抑制 ROS 和 MDA 的产生，维持 EECs 抗氧化系统平衡和抑制 MAPK 通路缓解 BPAF 诱导的细胞凋亡。

## 第三章 姜黄素通过抑制自噬和内质网应激缓解 BPAF 诱导的奶山羊 EECs 铁死亡

### 1. 引言

多项研究表明 BPAF 会导致细胞氧化应激和凋亡的发生 (Gu et al 2020), 然而有害物质往往通过多种途径对机体和细胞产生危害。在第二章结果中发现 BPAF 会降低 EECs 活力, 引发 ROS 和 MDA 产生, 并激活 Nrf2 通路, 这些指标同样参与了铁死亡的发生, 且已有研究报道 BPAF 诱导了自噬的发生 (Yu et al 2022a), 因此本研究推断 BPAF 可能同样诱导了 EECs 铁死亡的发生。

铁死亡是一种铁依赖性脂质过氧化产物过量积累引起的新型调节性细胞死亡。在铁死亡过程中, 释放的铁离子可以催化 Fenton 反应产生大量活性氧, 增强细胞损伤, 表明铁是铁死亡发生的必要因素 (Dixon et al 2012)。自噬通过降解铁蛋白在铁死亡过程中发挥着关键作用 (Hou et al 2016)。目前, 可以通过三种生物标志物来识别铁死亡的发生, 包括蛋白质标志物 (GPX4 和 COX-2), 脂质过氧化和 ROS (Jiang et al 2021a, Tang et al 2021a)。

因此, 本研究旨在探讨铁死亡是否参与 BPAF 诱导的 EECs 细胞损伤, 同时探究姜黄素能否缓解 BPAF 诱导的 EECs 铁死亡, 并揭示其作用机制。

### 2. 材料与方法

#### 2.1 实验材料

本实验所用实验材料同第二章 2.1, 包括细胞、仪器、试剂和耗材等。

#### 2.2 主要试剂

##### 2.2.1 主要抗体

本实验所用抗体 ATF6 (YA831) 和 ATF4 (HY-P80486) 购自 MedChemExpress (MCE), AKT (9272) 和 p-AKT (9271) 购自 Cell Signaling Technology (CST), mTOR (T55306) 购自英国 Biorbyt, 其余抗体 ATG5 (T55766)、LC3B (T55992)、Beclin1 (T55092)、P62 (T55546)、GPX4 (T56959)、FTH1 (T55648)、COX2 (T58852)、FACL4 (T510198)、GRP78 (A0241)、p-PERK (AP1501)、PERK (TP52759)、CHOP (T56694)、PI3K (T40115)、p-PI3K (T40116) 和 p-MTOR (T56571)

均购自于 Abmart，所有抗体稀释比例均为 1:1000。

## 2.2.2 主要抑制剂

本实验用到的主要抑制剂如表 2-1 所示。Ferrostatin-1 (Fer-1) 是一种铁死亡抑制剂，通过抑制脂质过氧化抑制铁死亡发生。Deferoxamine mesylate (DFOM) 是一种铁螯合剂，可减少组织和细胞中铁的积累。氯喹 (Chloroquine, CQ) 和 3-甲基腺嘌呤 (3-Methyladenine, 3-MA) 是两种自噬抑制剂，其中 CQ 通过阻断自噬体和溶酶体融合抑制自噬，而 LY294002 3-MA 通过抑制 PI3K 抑制自噬小体的形成，进而抑制自噬。4-Phenylbutyric acid (4-PBA) 是一种内质网应激抑制剂，可对内质网应激中三个主要通路 IRE1 $\alpha$ 、PERK 和 ATF6 的激活进行抑制。MHY1485 是一种 mTOR 激活剂，可激活 mTOR 蛋白的表达。Z-VAD-FMK 是一种 caspase 抑制剂，可阻断细胞凋亡。

表 2-1 主要抑制剂

Table 2-1 Main inhibitors

抑制剂名称	货号	实验浓度	生产厂家
Name of inhibitor	Catalog number	Treatment concentration	Manufacturer
CQ	HY-17589A	1.25 $\mu$ M	MCE
DFOM	HY-B0988	15 $\mu$ M	MCE
Fer-1	HY-100579	2.5 $\mu$ M	MCE
3-MA	HY-19312	5-10 $\mu$ M	MCE
4-PBA	HY-A0281	50-1000 $\mu$ M	MCE
LY294002	HY-10108	5-10 $\mu$ M	MCE
MHY1485	HY-B0795	20 $\mu$ M	MCE
Z-VAD-FMK	MB3313	1.25 $\mu$ M	美仑生物

## 2.3 细胞培养和处理

本实验细胞培养、姜黄素和 BPAF 处理同第二章实验方法中 2.2.1, 2.2.2 和 2.2.3。在抑制剂和 mTOR 激活剂处理过程中，用 Fer-1、DFOM、CQ、4-PBA、MHY1485 和 Z-VAD-FMK 预处理 12 h 后弃掉培养液，然后向细胞中加入含有 BPAF 和同样浓度抑制剂的培养液，继续培养 24 h，其中 3-MA 和 LY294002 预处理 4 h 即可，其余步骤与其他抑制剂一致。

## 2.4 GSH 含量检测:

(1) 将细胞培养在六孔板中, 处理结束后, 用 PBS 清洗 2 遍, 消化离心后将细胞收集至离心管中, 去除上清液, 向细胞沉淀中加入 300  $\mu$ L PBS 悬浮细胞, 用超声破碎仪破碎细胞后待测。

(2) 按照 1:1 的比例, 将细胞悬液和与试剂一进行混合, 3500 r/min 离心 10 min, 取上清液待测。

(3) 试剂配制:

GSH 标准品溶剂应用液配制: 根据实验用量, 按照标准品溶剂贮备液: 双蒸水 =1:9 的比例进行稀释。

1mmol/L GSH 标准品溶剂配制: GSH 分子量为 307, 每次测定前将 3.07 mg 的 GSH 标准品添加到 10 mL 的 GSH 溶剂应用液中, 混合均匀, 2  $^{\circ}$ C- 8  $^{\circ}$ C 保存 48 h。

20  $\mu$ Mol/L GSH 标准品溶液配制: 将 0.2 mL 1mmol/L GSH 标准溶液添加至 9.8 mL GSH 标准溶剂应用液中, 均匀混合, 现配现用。

(4) 按照说明书操作步骤依次对试剂进行添加, 具体添加方式如下表所示:

	空白孔	标准孔	测定孔
试剂一 ( $\mu$ L)	100		
20 $\mu$ mol/LGSH 标准品 ( $\mu$ L)		100	
上清液 ( $\mu$ L)			100
试剂三 ( $\mu$ L)	25	25	25
试剂二 ( $\mu$ L)	100	100	100

(5) 添加完成后, 轻微震荡孔板使其混合均匀, 静置 5 min 后, 用酶标仪测定 405 nm 处的吸光值, 代入公式进行计算, 并根据蛋白浓度计算 GSH 含量

## 2.5 铁离子含量测定

(1) 样品制备: 将细胞铺至 6 孔板中, 处理结束后, 用 PBS 清洗 2 次, 然后消化离心将细胞收集至离心管中, 按照每  $1 \times 10^6$  个细胞加入 0.2 mL 的试剂一, 混匀后置于冰上裂解 10 min, 然后 15000 g 离心 10 min, 取上清液待测。

(2) 按照以下步骤将各试剂添加至离心管中，混匀。

	标准孔	对照孔	测定孔
不同浓度	80		
标准品 (μL)			
待测样本 (μL)		80	80
试剂二 (μL)		80	
试剂三 (μL)	80		80

(3) 混匀，37°C 孵育 10 min，用酶标仪检测 593 nm 处的 OD 值，并根据细胞数量计算细胞铁离子含量。

## 2.6 细胞总 mRNA 提取和实时荧光定量 PCR

同第二章 2.2.9，2.2.10 和 2.2.11。本实验中 *NCOA4* 和 *VAMP8* 引物序列如表 2-2 所示。

表 2-2 目的基因引物序列

Table 2-2 Primer sequence of target genes

基因名称	PubMed no.	序列(5'→3')	产物大小
Gene names		Sequence of primer	Length (bp)
<i>NCOA4</i>	XM_018042234.1	Forward: TTGGAGCTTGCTATTGGTGGAGTTC Reverse: CTGTGAATCTGGGCTTTGACCTCTC	83
<i>VAMP8</i>	XM_018055378.1	Forward: CCACCTTCGCAACAAGACAGAG Reverse: AATCATCTTCACGTTCTTCCACCAG	101
<i>β-actin</i>	XM_018039831.1	Forward: GATCTGGCACCCACCTTCT Reverse: GGGTCATCTTCTCACGGTTG	110

## 2.7 蛋白提取和 Western blot

同第二章 2.2.12 和 2.2.13。

## 2.8 EECs 转染 siRNA

以 *Nrf2* 和 *HO-1* 编码区为靶点的短干扰 RNA (siRNA) 和干扰非靶向阴性对照均由苏州吉玛生物公司设计合成。*Nrf2*-siRNA 引物序列为:正义链 5'-GCACAACAG

CAGAAUUCAATT-3', 反义链 5'-UUGAAUUCUGCUGUUGUGCTT-3'。HO-1-siRNA 引物序列为:正义链 5'-GCAUCUUUGUACCACAUCUTT-3', 反义链: 5'-AGAUGUG GUACAAAGAUGCTT-3'。将 EECs 细胞传至六孔板中, 待细胞汇合度达到约 60% 时对细胞进行转染, 使用博奥龙 QuickShuttle 转染试剂对细胞进行转染, 具体步骤如下所示:

- (1) 在超净台中, 将 5  $\mu$ L 配制好的 siNrf2 加入 95 $\mu$ L PBS 中, 轻轻混匀。
- (2) 将 12  $\mu$ L 转染试剂加入 88  $\mu$ L PBS 中, 轻轻混匀。
- (3) 合并上述两溶液并混匀, 随后加入细胞培养液中, 轻摇细胞培养板使其与培养液充分混合, 将细胞放置培养箱培养 12 h。
- (4) 转染结束后, 弃掉含有 siRNA 的培养液, 加入含有 BPAF 的培养液继续培养 24 h, 处理结束后提取 RNA 或者蛋白样进行后续实验。

## 2.9 数据处理与分析

同第二章 2.3。

### 3.结果

#### 3.1BPAF 通过激活自噬和内质网应激诱导 EECs 铁死亡

##### 3.1.1BPAF 诱导 EECs 铁死亡

为了探究除凋亡外是否有其它细胞死亡途径参与了 BPAF 诱导的细胞损伤, 本研究使用凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK 对细胞进行预处理, 结果表明 Z-VAD-FMK 能够使细胞活力显著提升, 但提升效果有限 (图 3-1A,  $P<0.05$ ), 表明可能还有其他细胞死亡途径参与了 BPAF 诱导的细胞损伤。为了探究铁死亡是否参与了 BPAF 诱导的 EECs 细胞死亡, 本研究首先对铁死亡相关蛋白进行了检测。结果表明, 与对照组相比, BPAF 以剂量依赖性方式显著提高了 FTH1、xCT、GPX4、COX2 和 FAACL4 的表达 (图 3-1B,  $P<0.05$ )。同时对 *NCOA4* mRNA 水平进行检测, 结果表明 *NCOA4* 在 60  $\mu\text{M}$  和 80  $\mu\text{M}$  时显著上升 (图 3-1C,  $P<0.05$ )。此外, 在第二章结果 3.1.3 和 3.1.4 中已经表明 BPAF 处理可导致细胞 ROS 和 MDA 的显著增加 ( $P<0.001$ )。在本研究中, BPAF 处理在 40  $\mu\text{M}$  和 60  $\mu\text{M}$  时显著提高了 EECs 中的 GSH 水平 (图 3-1D,  $P<0.001$ ), 表明 BPAF 处理扰乱了 EECs 铁死亡防御系统。这些结果提示铁死亡可能参与了 BPAF 诱导的 EECs 死亡。为了进一步验证铁死亡在 BPAF 诱导的 EECs 损伤中的作用, 本研究探究了铁死亡抑制剂 Fer-1 对 BPAF 诱导的 EECs 死亡的影响, 结果表明, 与 BPAF 组相比, Fer-1 预处理可显著减轻 BPAF 诱导的细胞毒性, 显著提升细胞活力和 GSH 活性 (图 3-2A-B,  $P<0.05$ ), 降低 MDA 含量 (图 3-2C,  $P<0.05$ )。此外, 与 BPAF 相比, Fer-1 显著抑制了 GPX4、COX2 和 FAACL4 的表达 (图 3-2D,  $P<0.01$ )。综上所述, 这些结果表明 BPAF 诱导了 EECs 铁死亡。

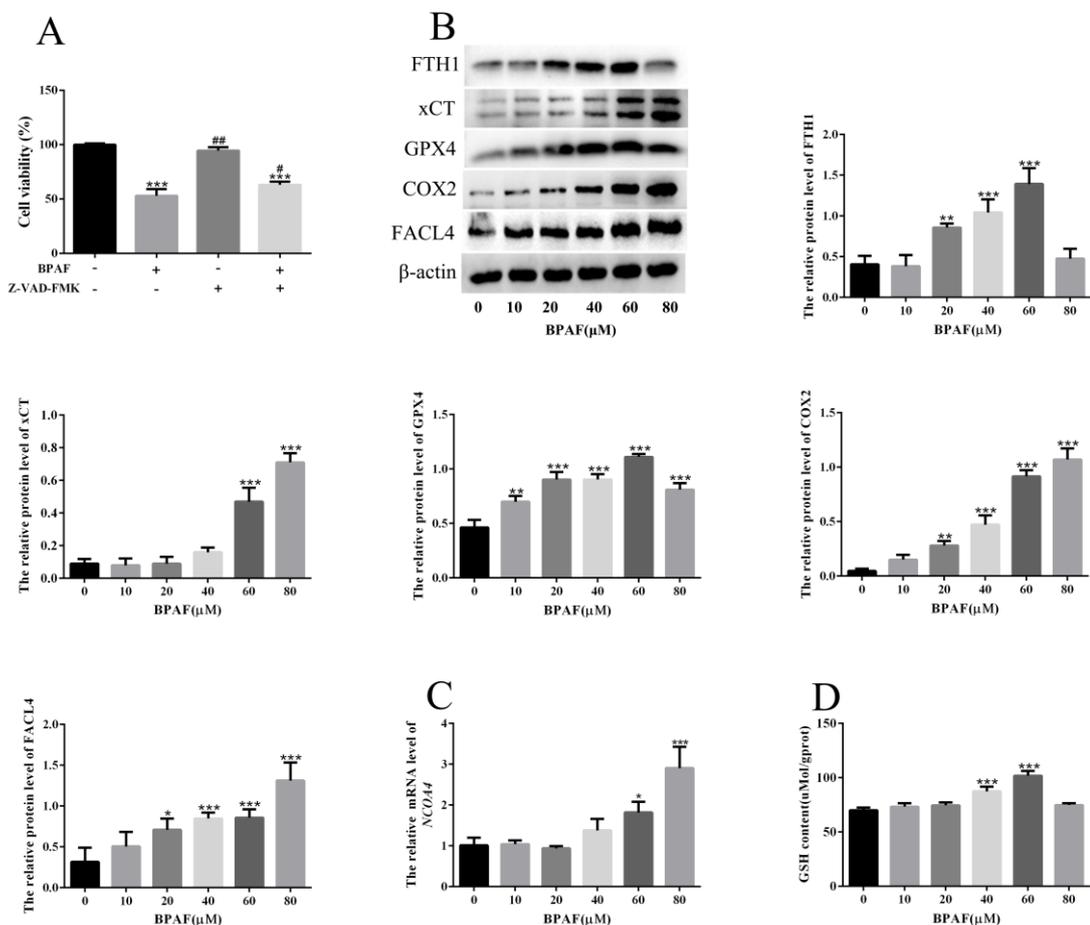


图 3-1 BPAF 诱导 EECs 铁死亡

图注：(A) Z-VAD-FMK 对 BPAF 处理后 EECs 细胞活力的影响。(B) Western blots 检测 FTH1、xCT、GPX4、COX2 和 FACL4 蛋白表达，并用灰度值进行相对定量。(C) 利用实时荧光定量 PCR 检测 *NCOA4* mRNA 水平。(D) BPAF 处理对 EECs 中 GSH 含量的影响。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (与对照组相比); # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  (与 BPAF 组相比)。

Fig. 3-1 BPAF induced ferroptosis in EECs

Note: (A) The cell viability in EECs following BPAF treatment with or without Z-VAD-FMK. (B) The protein expressions of FTH1, xCT, GPX4, COX2 and FACL4 were assessed by Western blots, and gray value was used for relative quantification. (C) The mRNA expression of *NCOA4* was analyzed by real-time PCR technology. (D) Effects of BPAF treatment on GSH content in EECs. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (compared with control group); # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  (compared with BPAF group).

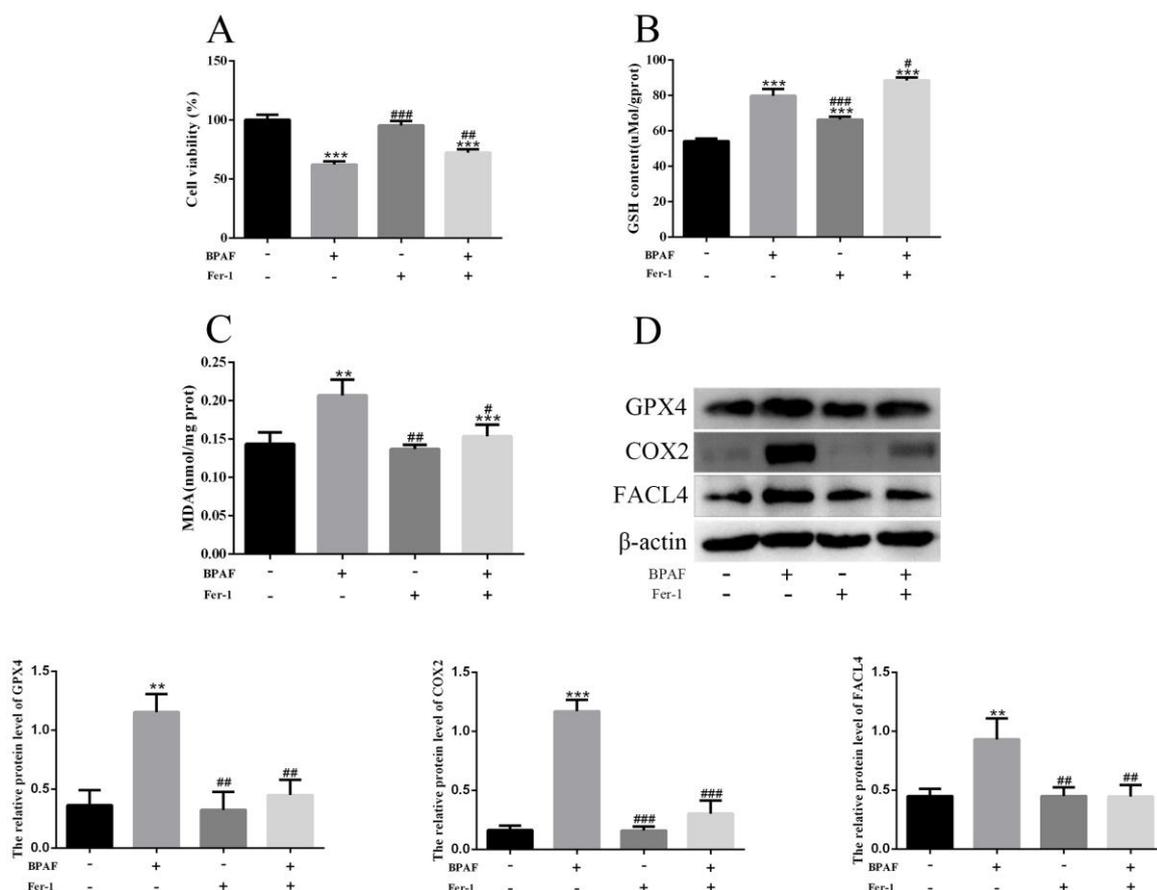


图 3-2 Fer-1 抑制 BPAF 诱导的 EECs 铁死亡

图注：(A) Fer-1 对 BPAF 处理后 EECs 细胞活力的影响。(B-C) Fer-1 对 BPAF 处理后 EECs 中 GSH 和 MDA 含量的影响。(D) Fer-1 对 BPAF 处理后铁死亡相关蛋白表达的影响。\*\*\* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.001$  (与对照组相比); # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  (与 BPAF 组相比)。

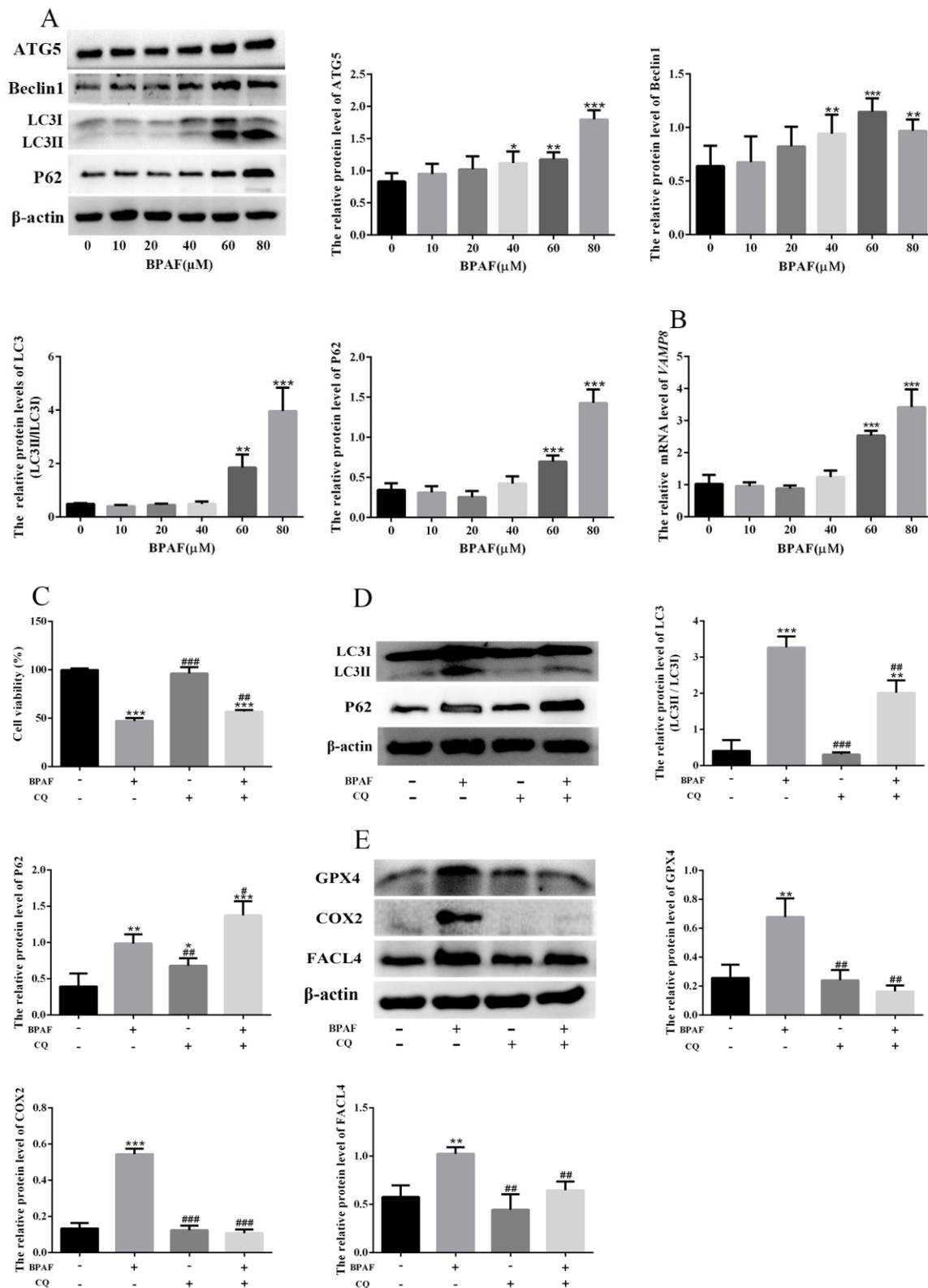
Fig. 3-2 Fer-1 inhibited EECs ferroptosis induced by BPAF

Note: (A) The cell viability in EECs following BPAF treatment with or without Fer-1. (B-C) The GSH and MDA contents in EECs following BPAF treatment with or without Fer-1. (D) Effects of Fer-1 on expression of ferroptosis-related protein after BPAF treatment. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (compared with control group); # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  (compared with BPAF group).

### 3.1.2 BPAF 诱导 EECs 自噬依赖性铁死亡

铁死亡是一种自噬依赖性的细胞死亡方式，为了探究 BPAF 是否诱导了 EECs 自噬激活，本研究利用 Western Blot 对自噬相关蛋白进行了检测，结果表明，与对照组相比，BPAF 在 40  $\mu\text{M}$ -80  $\mu\text{M}$  时诱导了自噬相关蛋白 Beclin1 和 ATG5 的显著上升(图 3-3A ,  $P < 0.05$ ), LC3 则在 60  $\mu\text{M}$  和 80  $\mu\text{M}$  时显著提高(图 3-3A ,  $P < 0.01$ ),

表明 BPAF 诱导了自噬体的形成。随后对货物受体蛋白 P62 表达水平进行了检测, P62 水平可以在一定程度上反应自噬降解的程度, 结果表明, BPAF 在 60  $\mu\text{M}$  和 80  $\mu\text{M}$  时诱导了 P62 的显著增加 (图 3-3A,  $P<0.01$ )。为了进一步确定 BPAF 对 EECs 自噬的影响, 本研究对促进自噬体和溶酶体融合相关基因 *VAMP8* 进行了 qPCR 检测, 结果表明, 与对照组相比, BPAF 在 60  $\mu\text{M}$  和 80  $\mu\text{M}$  时显著增加了 *VAMP8* mRNA 表达水平 (图 3-3B,  $P<0.001$ ), 这些结果表明 BPAF 不仅诱导了自噬体的形成, 而且促进了细胞自噬体和溶酶体的融合, 增强了自噬流。为了探究 BPAF 诱导的自噬与铁死亡之间的关系, 本研究检测了自噬抑制剂 CQ 和 3-MA 对 BPAF 诱导的 EECs 铁死亡的影响, 结果表明, 与 BPAF 处理组相比, CQ 预处理显著提高了细胞活力 (图 3-3C,  $P<0.01$ ), 而 3-MA 使细胞活力进一步降低, 但并不显著 (图 3-3F,  $P>0.05$ )。由于 CQ 抑制了自噬体和溶酶体融合, 使 BPAF 对 P62 的诱导进一步显著上调 (图 3-2D,  $P<0.05$ ), 但 LC3 的表达显著降低 (图 3-3D,  $P<0.01$ ), 同时 CQ 显著抑制了 BPAF 诱导的铁死亡相关蛋白表达 (图 3-3E,  $P<0.01$ )。与 CQ 处理结果一致, 3-MA 同样显著抑制了 BPAF 诱导的 EECs 自噬和铁死亡相关蛋白表达 (图 3-3G,  $P<0.05$ )。综上所述, 这些结果表明 BPAF 诱导的自噬促进了 EECs 铁死亡。



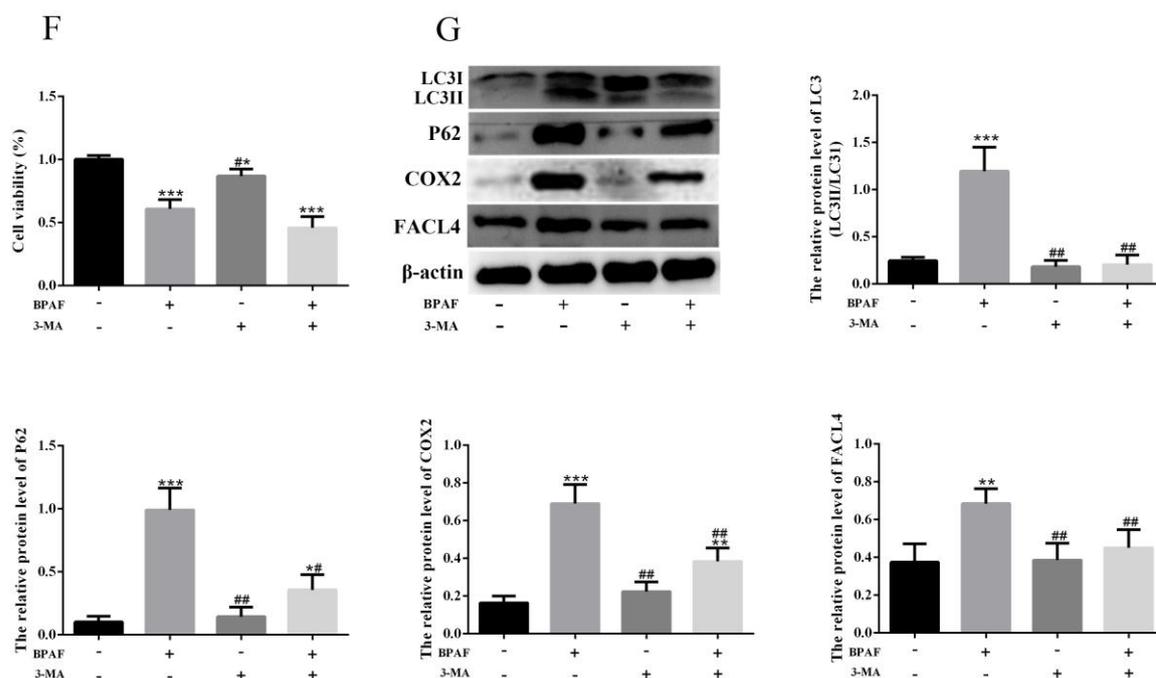


图 3-3 BPAF 诱导 EECs 自噬依赖性铁死亡

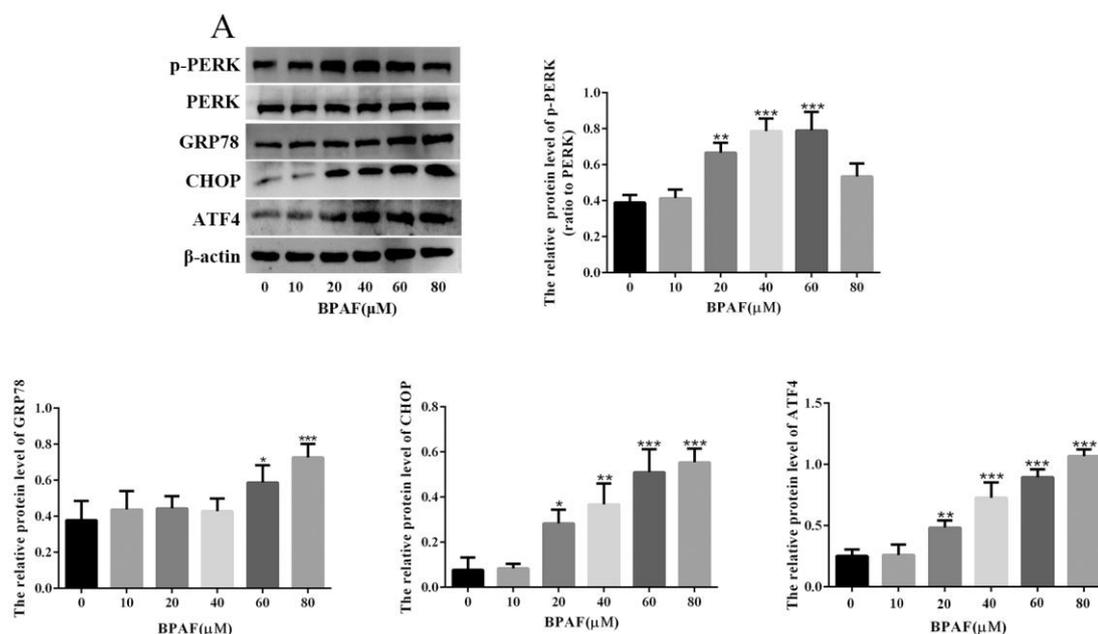
图注：(A) 用 Western blot 检测 ATG5、Beclin-1、LC3 和 P62 蛋白表达，并进行灰度值分析。(B) 实时 PCR 检测 *VAMP8* mRNA 水平。(C) CQ 对 BPAF 处理后 EECs 细胞活力的影响。(D-E) CQ 对 BPAF 处理后 P62、LC3、GPX4、COX2 和 FACL4 表达的影响。(F) 3-MA 对 BPAF 处理后 EECs 细胞活力的影响 (G) 3-MA 对 BPAF 处理后 LC3、P62、COX2 和 FACL4 表达的影响。\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ，\*\*\* $P < 0.001$ （与对照组相比）；# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ，### $P < 0.001$ （与 BPAF 组相比）。

Fig. 3-3 BPAF induced autophagy-dependent ferroptosis in EECs

Note: (A) The expression levels of Atg5, Beclin-1, LC3 and P62 in EECs were examined by Western blot, and gray value analysis was conducted. (B) The mRNA levels of *VAMP8* were measured by Real-time PCR. (C) The cell viability in EECs following BPAF treatment with or without CQ (D-E) Western blotting analysis of P62, LC3, GPX4, COX2, and FACL4 expression levels in EECs following BPAF treatment with or without CQ. (F) The cell viability in EECs following BPAF treatment with or without 3-MA (G) Western blotting analysis of P62, LC3, COX2, and FACL4 expression levels in EECs following BPAF treatment with or without 3-MA. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (compared with control group); # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  (compared with BPAF group).

### 3.1.3 BPAF 通过激活内质网应激诱导 EECs 铁死亡

已有研究表明内质网应激通过调控自噬参与对铁死亡的调控，为了进一步探究 BPAF 诱导的铁死亡发生机制。本研究对内质网应激相关蛋白做了检测，结果表明，与对照组相比，BPAF 在 20  $\mu\text{M}$ -60  $\mu\text{M}$  时显著提升 p-PERK 表达 ( $P<0.01$ )，20  $\mu\text{M}$ -80  $\mu\text{M}$  时显著提升了 CHOP 和 ATF4 蛋白表达 ( $P<0.05$ )，而 GRP78 则在 60  $\mu\text{M}$  和 80  $\mu\text{M}$  时显著提高 ( $P<0.05$ )，这些结果表明 BPAF 激活了 EECs 内质网应激（图 3-4A）。为了验证内质网应激是否参与了 BPAF 诱导的铁死亡，本研究检测了内质网抑制剂 4-PBA 处理对 BPAF 诱导的 EECs 自噬和铁死亡的影响，结果表明，与 BPAF 处理组相比，4-PBA 显著提高了细胞活力（图 3-4B， $P<0.01$ ），并显著抑制了内质网应激相关蛋白 GRP78、CHOP、ATF4 和 ATF6 的表达（图 3-4C， $P<0.05$ ）。此外，4-PBA 同样显著抑制了 BPAF 诱导的 LC3 和 P62 激活以及铁死亡相关蛋白 FTH1、GPX4、COX2 和 FAACL4 表达（图 3-4D-E， $P<0.01$ ）。这些结果表明 BPAF 可能通过激活内质网应激诱导 EECs 铁死亡。



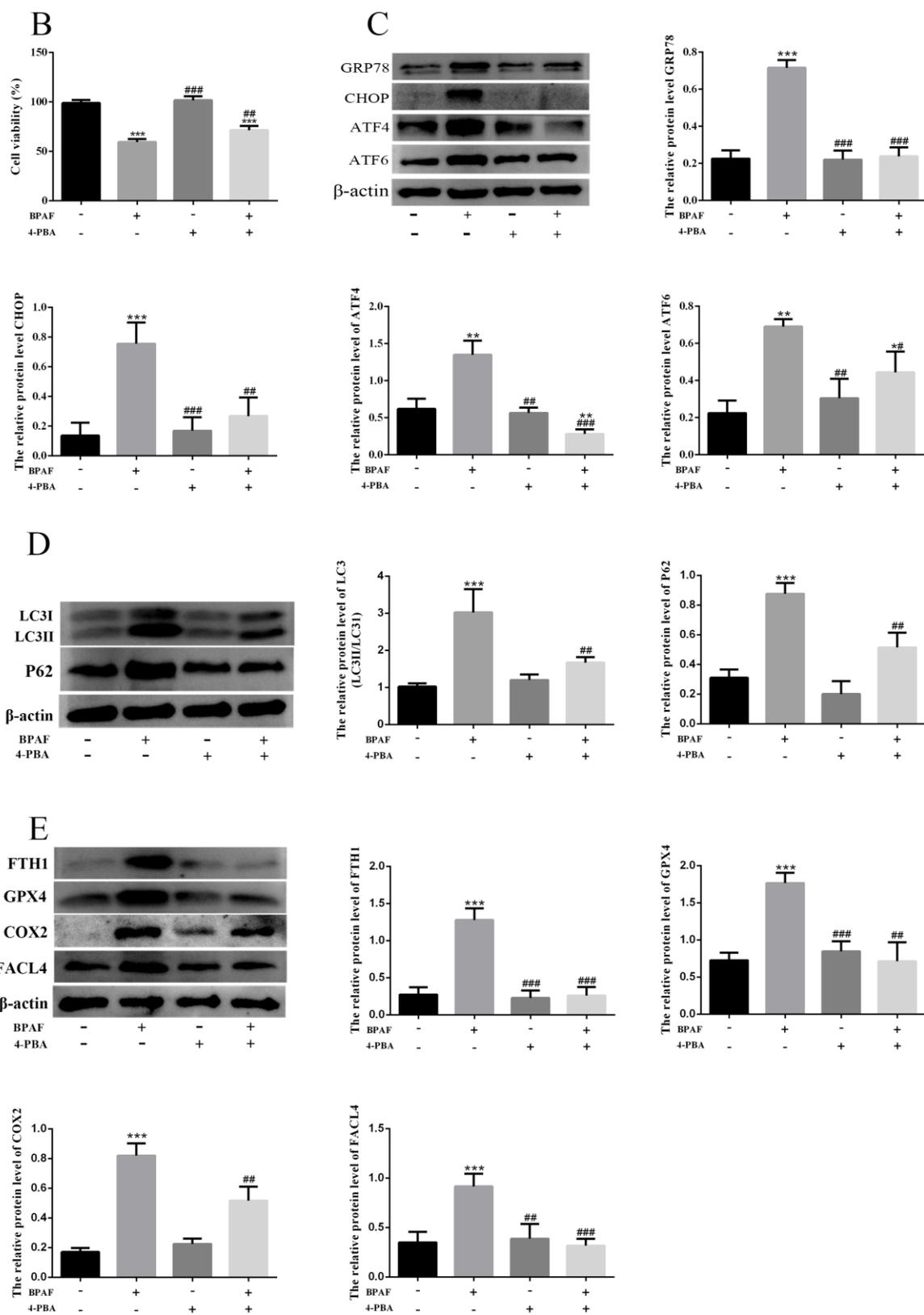


图 3-4 BPAF 通过激活内质网应激诱导 EECs 铁死亡

图注：(A) 用 Western blot 检测 p-PERK、PERK、GRP78、CHOP、ATF4 的蛋白表达，并进行灰度值分析。(B) 4-PBA 对 BPAF 处理后 EECs 细胞活力的影响。(C-E) Western blot 检测 4-PBA 对 BPAF 处理后 GRP78、CHOP、ATF4、ATF6、LC3、P62、FTH1、GPX4、COX2 和 FAACL4 蛋白表达的影响。\* $P<0.05$ ，\*\* $P<0.01$ ，\*\*\* $P<0.001$ （与对照组相比）；# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ ，### $P<0.001$ （与 BPAF 组相比）。

Fig. 3-4 BPAF induces ferroptosis in EECs by activating endoplasmic reticulum stress

Note: (A) The expression levels of p-PERK, PERK, GRP78, CHOP, ATF4 in EECs were examined by Western blot and gray value analysis was conducted. (B) The cell viability in EECs following BPAF treatment with or without 4-PBA. (C-E) Western blot analysis of GRP78, CHOP, ATF4, ATF6, LC3, P62, FTH1, GPX4, COX2 and FAACL4 expression levels in EECs following BPAF treatment with or without 4-PBA. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  (compared with control group). # $P<0.05$ , ## $P<0.01$ , ### $P<0.001$  (compared with BPAF group).

## 3.2 姜黄素通过抑制自噬和内质网应激缓解 BPAF 诱导的 EECs 铁死亡

### 3.2.1 姜黄素缓解 BPAF 诱导的 EECs 铁死亡

为了探究姜黄素能否缓解 BPAF (60  $\mu\text{M}$ ) 诱导的 EECs 铁死亡，本研究对姜黄素预处理后的 GSH 含量和铁死亡相关蛋白进行了检测，结果表明，与 BPAF 组相比，姜黄素处理后 GSH 进一步升高（图 3-5A， $P<0.001$ ），而 GPX4、FAACL4 和 COX2 蛋白表达显著降低（图 3-5B， $P<0.001$ ）。结合第二章中姜黄素显著抑制 BPAF 诱导的 ROS 和 MDA 含量结果（图 2-10 A-C， $P<0.001$ ），表明姜黄素可能通过抑制铁死亡缓解 BPAF 诱导的细胞损伤。

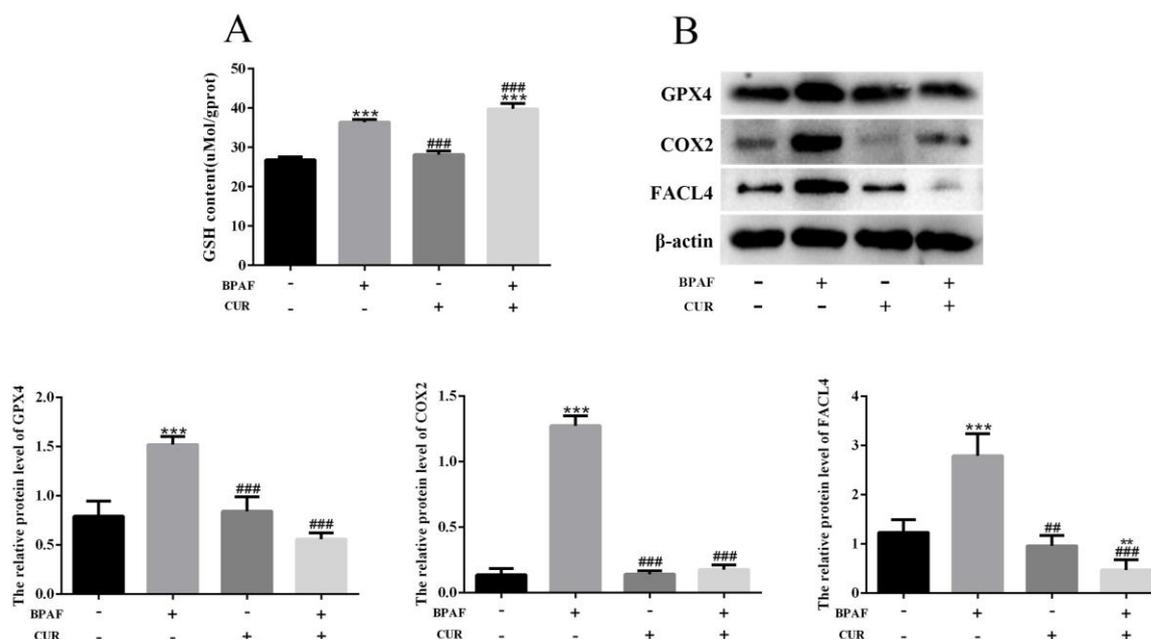


图 3-5 姜黄素缓解 BPAF 诱导的 EECs 铁死亡

图注：(A) EECs 中 GSH 含量。(B) Western blot 检测姜黄素对 BPAF 处理后 GPX4, COX2 和 FACL4 蛋白表达的影响。\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (与对照组相比); ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  (与 BPAF 组相比)。

Fig.3-5 Curcumin attenuated BPAF-induced ferroptosis in EECs

Note: (A) The content of GSH in EECs. (B) Western blot analysis of GPX4, COX2 and FACL4 expression levels in EECs following BPAF treatment with or without curcumin. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (compared with control group). ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  (compared with BPAF group).

### 3.2.2 姜黄素缓解 BPAF 诱导的自噬

为了进一步揭示姜黄素缓解铁死亡机制，本研究对自噬相关蛋白进行了检测，结果表明，与 BPAF 组相比，姜黄素预处理显著降低了 P62, LC3, Beclin1 和 ATG5 蛋白表达水平 (图 3-6A,  $P < 0.01$ )，此外，姜黄素同样抑制了 VAMP8 mRNA 水平 (图 3-6B,  $P < 0.05$ )。这些结果表明姜黄素抑制了 BPAF 诱导的自噬，阻断了自噬体和溶酶体融合。综上所述，这些结果表明姜黄素可能通过抑制自噬缓解 BPAF 诱导的 EECs 铁死亡。

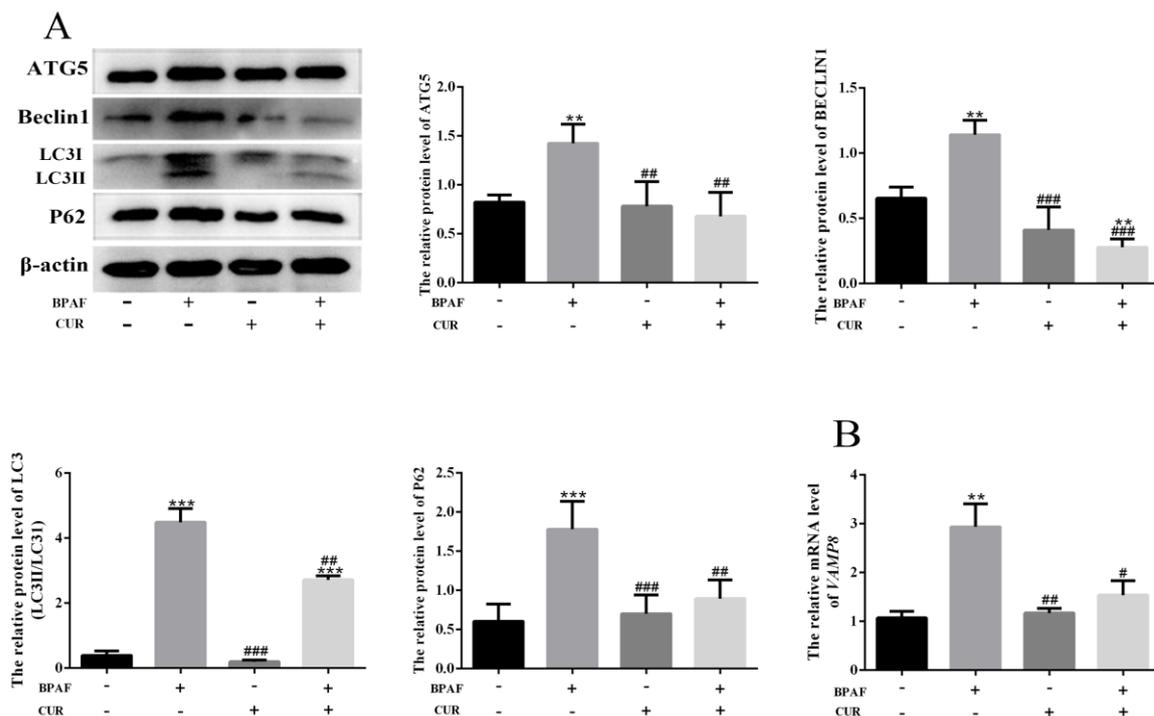


图 3-6 姜黄素通过抑制自噬缓解 BPAF 诱导的铁死亡

图注：（A）Western blot 检测姜黄素对 BPAF 处理后 P62, LC3, Beclin1 和 ATG5 蛋白表达的影响。（B）姜黄素对 BPAF 处理后 VAMP8 mRNA 表达的影响。 $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$ （与对照组相比）； $##P<0.01$ ,  $###P<0.001$ （与 BPAF 组相比）。

Fig.3-6 Curcumin attenuated BPAF exposure-induced ferroptosis by inhibiting autophagy

Note: (A) Western blot analysis of P62, LC3, Beclin1, and ATG5 expression levels in EECs following BPAF treatment with or without curcumin. (B) Effect of curcumin on VAMP8 mRNA expression after BPAF treatment.  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$  (compared with control group);  $##P<0.01$ ,  $###P<0.001$  (compared with BPAF group).

### 3.2.3 姜黄素缓解 BPAF 诱导的内质网应激

为了探究姜黄素能否抑制 BPAF 诱导的内质网应激。本研究检测了姜黄素处理后内质网应激相关蛋白表达的变化。结果表明，与 BPAF 组相比，姜黄素预处理显著抑制了 p-PERK、GRP78、CHOP、ATF4 和 ATF6 蛋白表达（图 3-7A,  $P<0.05$ ），结合本章结果 3.1.3 中 4-PBA 抑制内质网应激显著降低 BPAF 诱导的自噬和铁死亡，表明姜黄素可能通过抑制内质网应激介导的自噬缓解 BPAF 诱导的铁死亡。

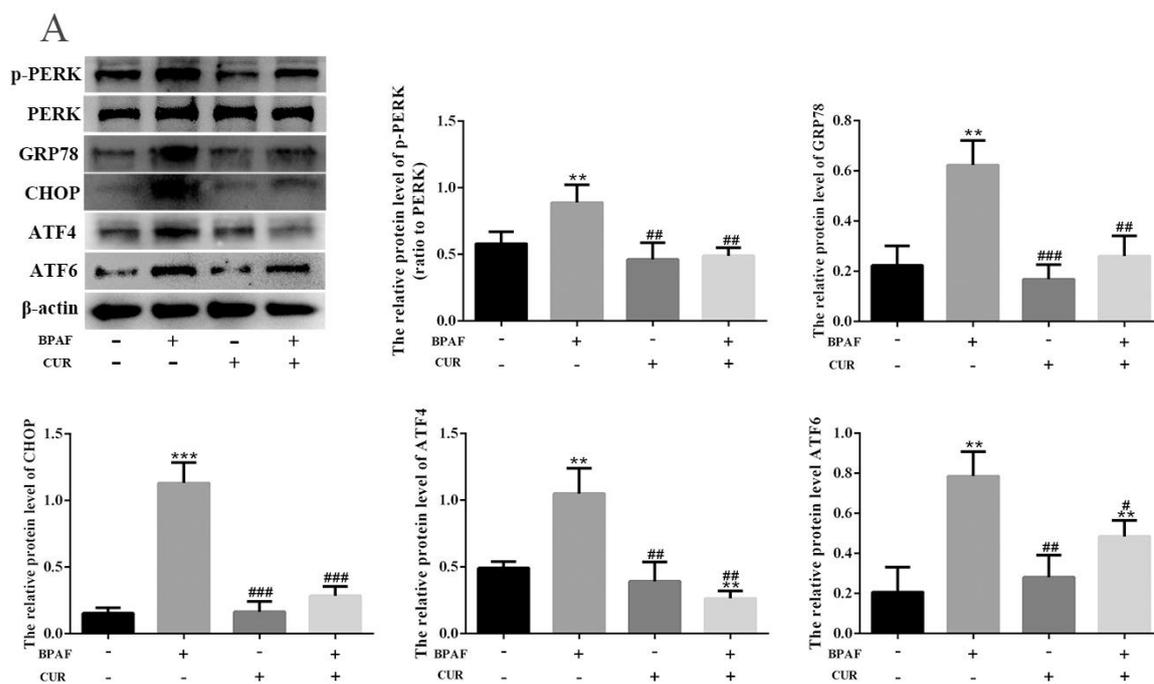


图 3-7 姜黄素缓解 BPAF 诱导的内质网应激

图注：(A) Western blot 检测姜黄素对 BPAF 处理后 p-PERK、GRP78、CHOP、ATF4 和 ATF6 蛋白表达的影响。\*\* $P < 0.01$ ，\*\*\* $P < 0.001$ （与对照组相比）；# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ，### $P < 0.001$ （与 BPAF 组相比）。

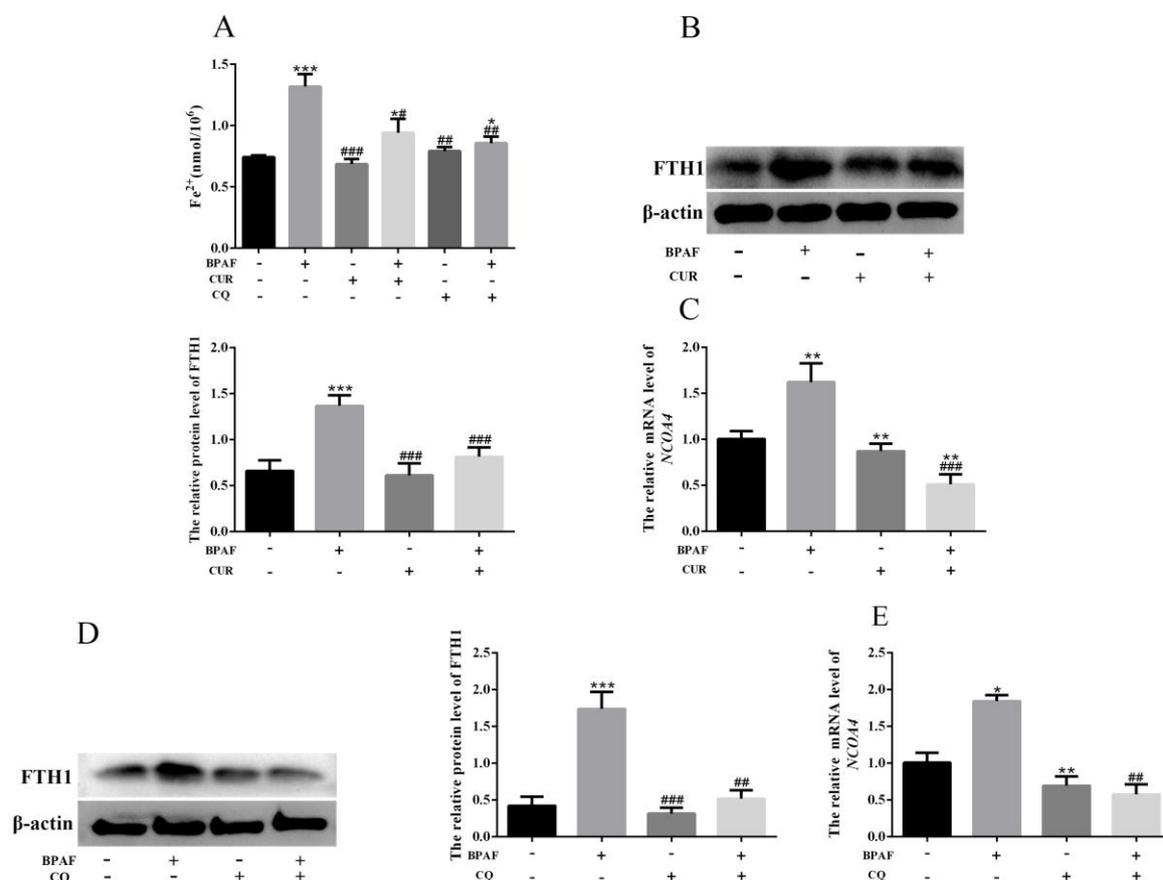
Fig 3-7 Curcumin alleviates endoplasmic reticulum stress induced by BPAF

Note: (A) Western blot analysis of p-PERK, GRP78, CHOP, ATF4, and ATF6 expression levels in EECs following BPAF treatment with or without curcumin. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (compared with control group). # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  (compared with BPAF group).

### 3.2.4 姜黄素通过恢复铁稳态缓解 BPAF 诱导的铁死亡

为了进一步探究姜黄素怎样通过抑制自噬缓解 BPAF 诱导的铁死亡。本研究用姜黄素和 CQ 预处理细胞，并测量 EECs 中的铁含量。结果表明，BPAF 处理显著提高了细胞中的铁含量，而姜黄素和 CQ 处理后铁离子含量明显降低（图 3-8A， $P < 0.05$ ）。细胞中的游离铁含量主要受铁蛋白控制，NCOA4 介导的铁蛋白自噬参与了细胞内游离铁的释放。因此，本研究检测了 NCOA4 和铁蛋白轻链 FTH1 的表达。结果表明，BPAF 显著提高了 NCOA4 mRNA 和 FTH1 的表达，而姜黄素和 CQ 显著逆转了这一趋势（图 3-8B-E， $P < 0.01$ ）。这些结果表明，姜黄素可能通过抑制铁蛋白自噬和维持铁稳态来缓解 BPAF 诱导的铁死亡。铁离子是铁死亡发生的必需因素，为了进一步验证铁离子参与了 BPAF 诱导的 EEC 铁死亡，本实验用铁离子螯合剂

DFOM 预处理 EECs 细胞，结果表明，与 BPAF 组相比，DFOM 处理能够显著提升 EECs 活力（图 3-8F,  $P < 0.05$ ）并降低 MDA 含量（图 3-8G,  $P < 0.01$ ），此外，DFOM 可显著降低 FAcl4、COX2、GPX4 和 FTH1 蛋白表达（图 3-8H,  $P < 0.05$ ）。这些结果表明姜黄素可能通过抑制自噬减少铁离子的释放，从而减轻了 BPAF 诱导的铁死亡。



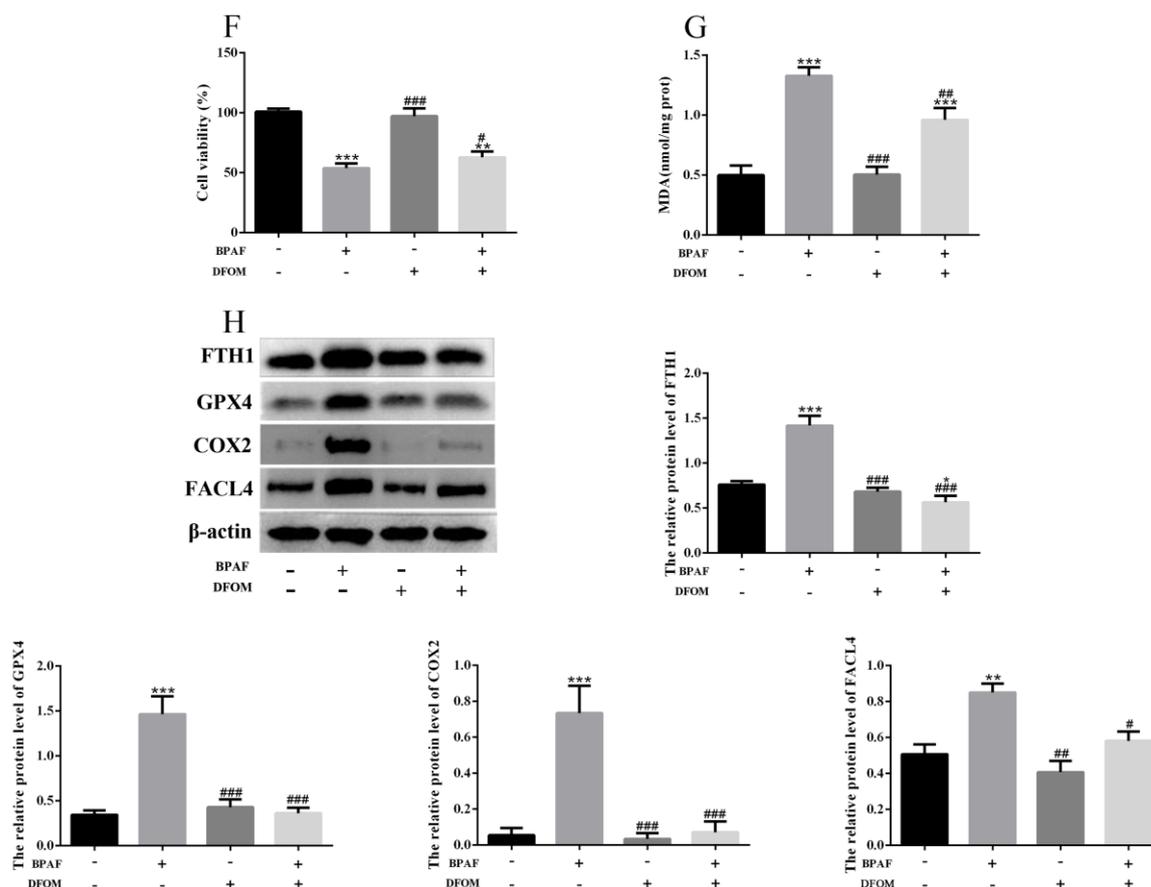


图 3-8 姜黄素通过恢复铁稳态缓解 BPAF 诱导的铁死亡

图注：(A) 姜黄素和 CQ 对 BPAF 处理后铁离子含量的影响。(B-E) 姜黄素和 CQ 对 BPAF 处理后 *NCOA4* mRNA 和 FTH1 蛋白水平的影响。(F) DFOM 对 BPAF 处理后 EECs 细胞活力的影响。(G) DFOM 对 BPAF 处理后 EECs MDA 含量的影响。(H) DFOM 对 BPAF 处理后 FTH1、GPX4、COX2 和 FACL4 蛋白表达的影响。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (与对照组相比); # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  (与 BPAF 组相比)。

Fig. 3-8 Curcumin attenuated BPAF exposure-induced ferroptosis by restoring iron homeostasis

Note: (A) Effects of curcumin and CQ on the BPAF-induced accumulation of cellular iron content. (B-E) FTH1 and *NCOA4* mRNA level in EECs following BPAF treatment with or without Curcumin and CQ. (F) The cell viability in EECs following BPAF treatment with or without DFOM. (G) The MDA content in EECs following BPAF treatment with or without DFOM. (H) Western blot analysis of FTH1, GPX4, COX2 and FACL4 expression levels in EECs following BPAF treatment with or without DFOM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (compared with control group); # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ (compared with BPAF group).

### 3.3 PI3K/AKT/mTOR 通路被激活以对抗 BPAF 诱导的铁死亡

PI3K 通路是一条经典的自噬调控通路，在自噬发生过程中与自噬呈负调控关系。为了评估 PI3K 通路在 BPAF 诱导的铁死亡中的作用，我们对该通路相关蛋白进行了检测，结果发现，BPAF 在 40  $\mu$ M-80  $\mu$ M 时显著提升了 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白表达 ( $P<0.05$ )，而 p-mTOR 在 20  $\mu$ M-80  $\mu$ M 时显著提升 ( $P<0.05$ )。这些结果表明 BPAF 激活了 PI3K/AKT/mTOR 通路 (图 3-9A)，而姜黄素逆转了这一趋势，显著抑制了 p-PI3K、p-AKT 和 p-mTOR 蛋白的表达 (图 3-9B,  $P<0.01$ )。为了进一步探究 PI3K/AKT/mTOR 通路在 BPAF 诱导的铁死亡中的作用，本研究用 PI3K 抑制剂 LY294002 处理细胞，结果表明，与 BPAF 组相比，LY294002 显著抑制 EECs 中的 PI3K、AKT 和 mTOR 磷酸化水平 (图 3-10B,  $P<0.001$ )，然而，LY294002 处理后细胞活力进一步降低 (图 3-10A,  $P<0.001$ )。此外，LY294002 预处理显著增强 LC3II 的积累，降低了 P62 的表达 (图 3-11A,  $P<0.01$ )。为了进一步验证本实验中 PI3K 通路与自噬和铁死亡的关系，接下来用 mTOR 激活剂 MHY1485 处理细胞，它可以通过抑制自噬体和溶酶体的融合对自噬发挥抑制作用。结果表明，MHY1485 处理显著降低了 LC3-II/LC3-I 比值，增强 p62 的表达，表明增强 mTOR 表达可以进一步抑制 BPAF 诱导的自噬发生 (图 3-11B,  $P<0.05$ )。这些结果表明，抑制 PI3K 通路会导致自噬进一步增强，并加剧 BPAF 诱导的细胞受损，而 PI3K 激活可能通过促进 mTOR 表达进而抑制自噬，阻断铁死亡发生。此外，LY294002 处理显著抑制了 BPAF 诱导的铁死亡相关蛋白表达 (图 3-11C,  $P<0.01$ )。综上所述，这些结果表明当 EECs 处于 BPAF 应激环境中时，细胞通过激活 PI3K/Akt/mTOR 通路抑制 BPAF 诱导的自噬以促进细胞修复和存活，这对 BPAF 诱导的细胞损伤起到保护作用。姜黄素可以通过负反馈途径抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路进而降低铁死亡相关蛋白表达，这进一步证明了姜黄素对 BPAF 诱导的 EECs 损伤的挽救作用。

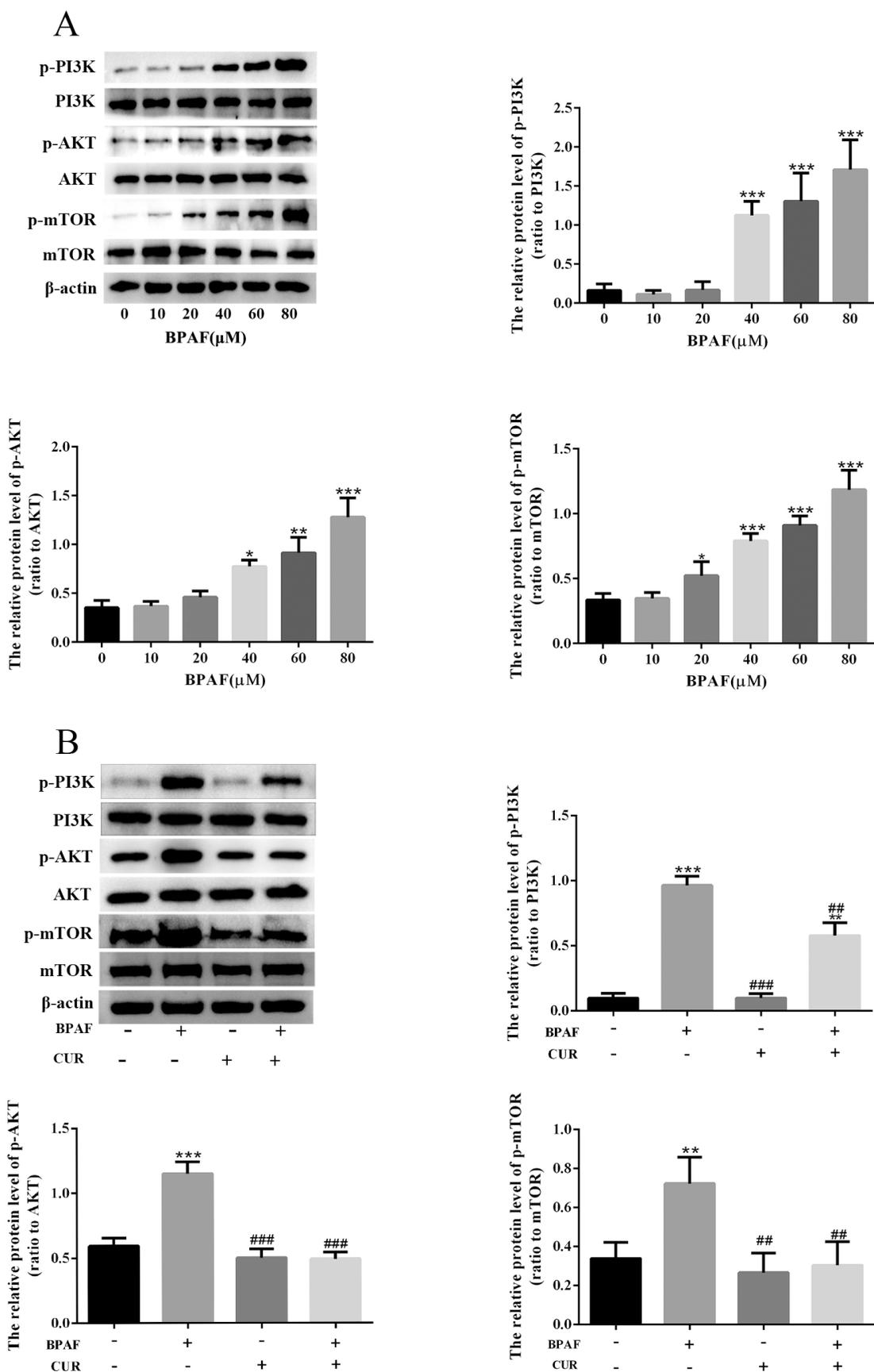


图 3-9 姜黄素抑制 BPAF 诱导的 PI3K/AKT/mTOR 通路激活

图注：（A）BPAF 对 EECs 中 PI3K/AKT/mTOR 通路的影响。（B）姜黄素对 BPAF 处理后 PI3K/AKT/mTOR 通路的影响。 $*P<0.05$ ， $**P<0.01$ ， $***P<0.001$ （与对照组相比）； $##P<0.01$ ， $###P<0.001$ （与 BPAF 组相比）。

Fig. 3-9 Curcumin inhibits BPAF-induced activation of PI3K/AKT/mTOR pathway

Note: (A) Effects of BPAF on PI3K/AKT/mTOR pathway in EECs. (B) Western blot analysis of PI3K/AKT/mTOR pathway in EECs following BPAF treatment with or without curcumin.  $*P<0.05$ ， $**P<0.01$ ， $***P<0.001$  (compared with control group);  $##P<0.01$ ， $###P<0.001$  (compared with BPAF group).

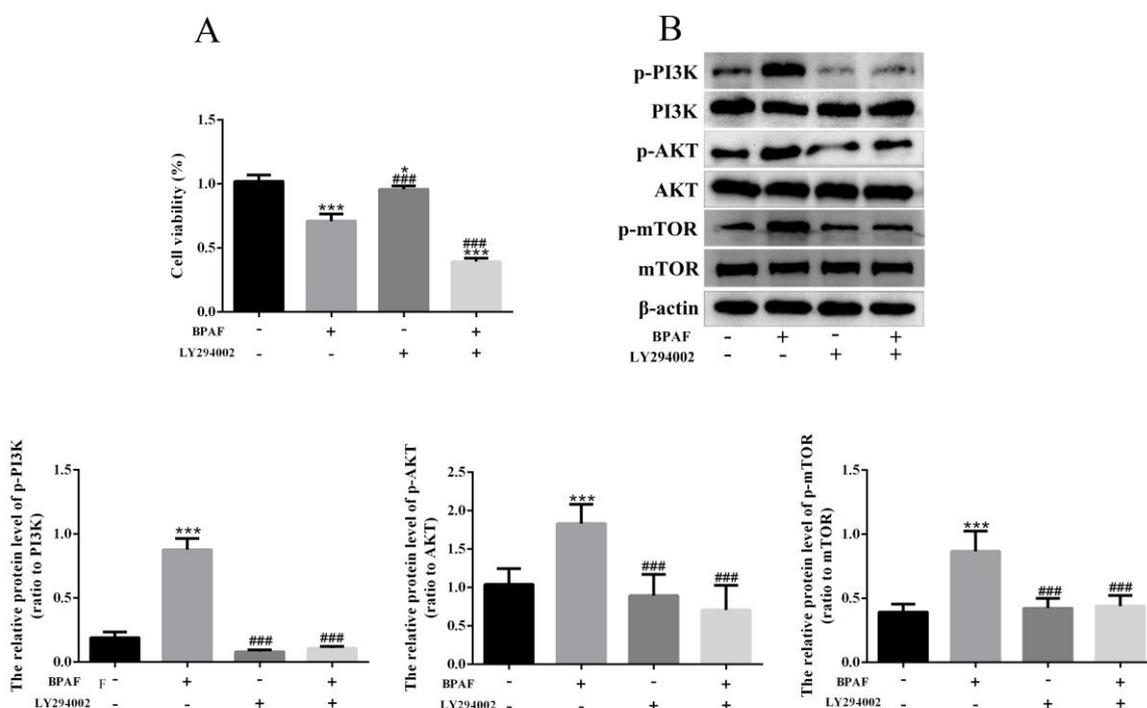


图 3-10 LY294002 通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路加剧 BPAF 诱导的细胞损伤

图注：（A）LY294002 对 BPAF 处理后细胞活力的影响。（B）LY294002 对 BPAF 诱导的 PI3K/AKT/mTOR 通路激活的影响。 $*P<0.05$ ， $***P<0.001$ （与对照组相比）； $###P<0.001$ （与 BPAF 组相比）

Fig.3-10 LY294002 exacerbates BPAF-induced cell injury by inhibiting the PI3K/AKT/mTOR pathway

Note: (A) Effects of LY294002 on the BPAF-induced cell viability. (B) Effects of LY294002 on PI3K/AKT/mTOR pathway activation induced by BPAF.  $*P<0.05$ ， $***P<0.001$  (compared with control group);  $###P<0.001$  (compared with BPAF group).

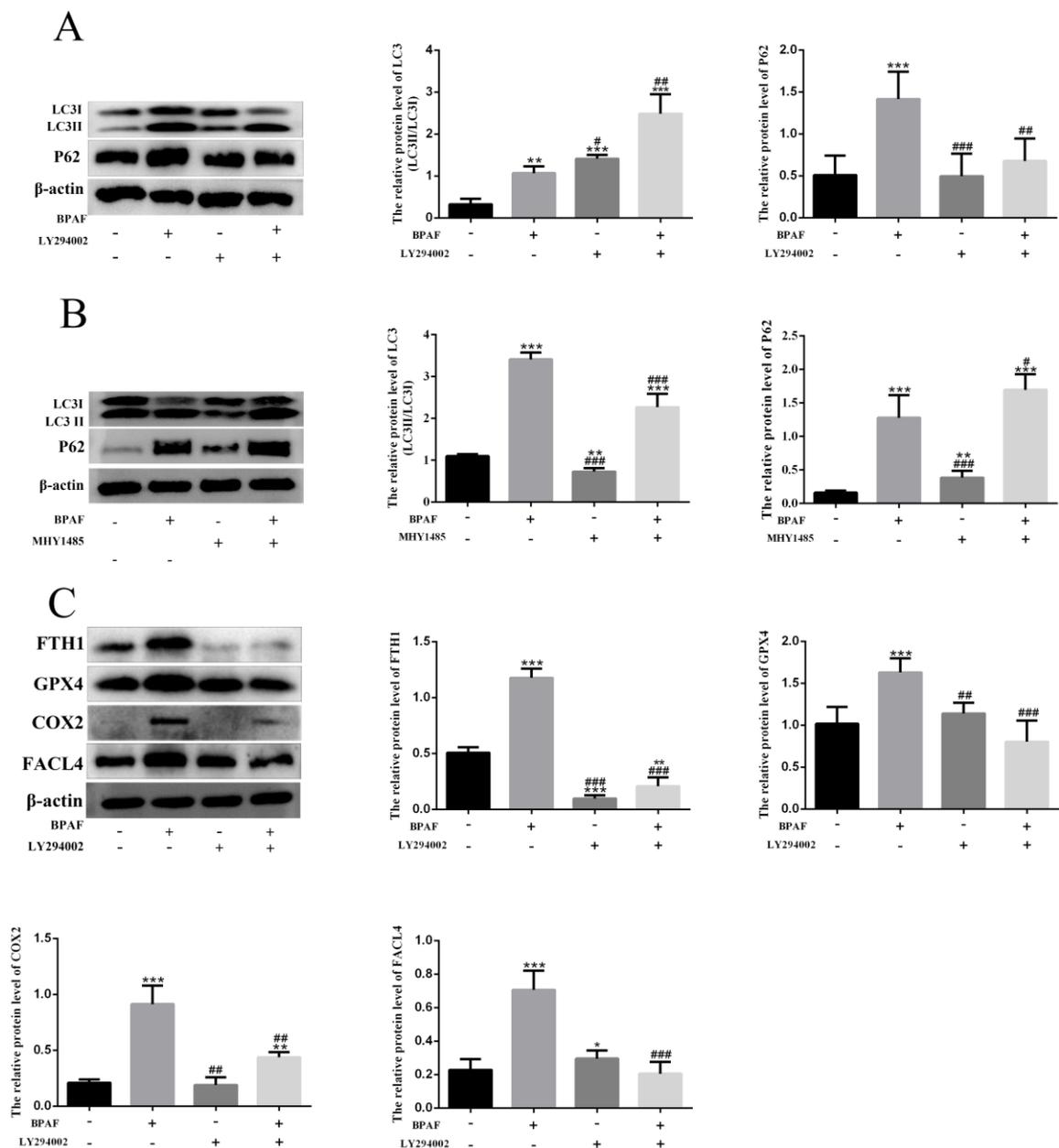


图 3-11 EECs 通过激活 PI3K/AKT/mTOR 通路抑制 BPAF 诱导的自噬和铁死亡

图注：(A) LY294002 处理对 BPAF 诱导的 LC3 和 P62 蛋白表达的影响。(B) MHY1485 处理对 BPAF 诱导的 LC3 和 P62 蛋白表达的影响。(C) LY294002 处理对 BPAF 诱导的 FTH1, GPX4, COX2 和 FACL4 蛋白表达的影响。 $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$  (与对照组相比);  $\#P<0.05$ ,  $\#\#P<0.01$ ,  $\#\#\#P<0.001$  (与 BPAF 组相比)。

Fig.3-11 EECs inhibits BPAF-induced autophagy and ferroptosis by activating the PI3K/AKT/mTOR pathway

Note:(A) Effect of LY294002 treatment on the expression of LC3 and P62 proteins induced by BPAF. (B) Effect of MHY1485 treatment on the expression of LC3 and P62 proteins induced by BPAF.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (compared with control group); # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  (compared with BPAF group).

### 3.4 Nrf2/HO-1 通路被激活以对抗 BPAF 诱导的铁死亡

在第二章结果 3.2.6 中, 研究发现姜黄素预处理可以显著抑制 BPAF 诱导的 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达, 为了探究 Nrf2 通路在 BPAF 诱导的铁死亡中的作用, 本研究用 siNrf2 和 siHO-1 处理细胞。结果表明, 与 BPAF 组相比, siNrf2 处理后细胞活力进一步降低 (图 3-12B,  $P < 0.01$ ), MDA 和 GSH 含量显著升高 (图 3-12 C-D,  $P < 0.01$ ), 但 siNrf2 处理显著抑制了 BPAF 诱导的 LC3、ATG5 和 P62 激活 (图 3-13A,  $P < 0.01$ ) 和铁死亡相关蛋白 HO-1、GPX4、FTH1、COX2 和 FACL4 表达 (图 3-14 A,  $P < 0.01$ )。此外, 用 siRNA 敲低细胞 HO-1 表达后, 细胞活力同样显著降低 (图 3-15A,  $P < 0.05$ ), 但 FACL4 和 COX2 表达显著上升 (图 3-15 B,  $P < 0.05$ ), 而 GPX4 表达进一步降低 (图 3-15B,  $P < 0.001$ )。这些结果表明, 在 BPAF 处理过程中, Nrf2 通过激活 HO-1 起到抵抗铁死亡的作用, 姜黄素通过抑制 Nrf2 降低了自噬和铁死亡相关蛋白表达, 并以负反馈的方式恢复了 BPAF 诱导的 Nrf2 和 HO-1 通路表达。

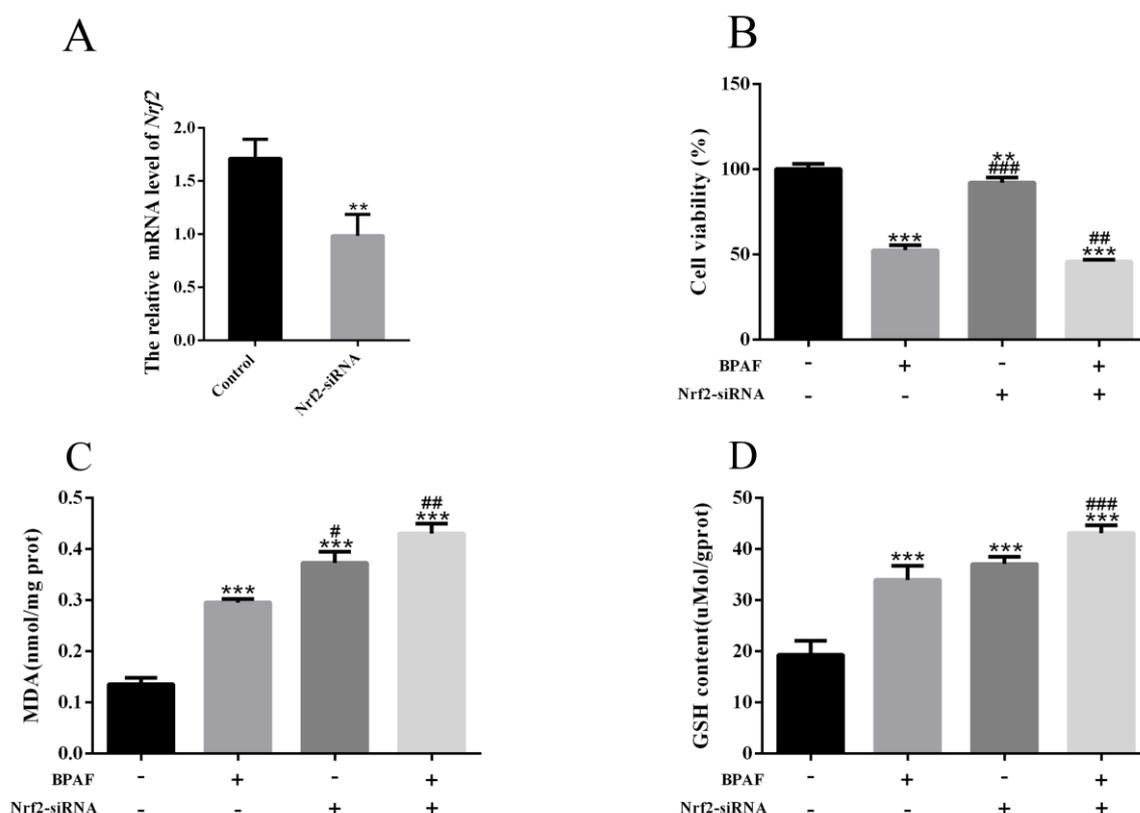


图 3-12 敲低 Nrf2 加剧 BPAF 诱导的细胞损伤

图注：(A) *Nrf2* mRNA 水平。(B) 转染 *Nrf2*-siRNA 对 BPAF 处理后细胞活力的影响 (C-D) 转染 *Nrf2*-siRNA 对 BPAF 处理后 MDA 和 GSH 含量的影响。\* $P < 0.01$ ，\*\*\* $P < 0.001$  (与对照组相比)；# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ，### $P < 0.001$  (与 BPAF 组相比)。

Fig. 3-12 Knocking down *Nrf2* exacerbates BPAF-induced cell injury

Note: (A) The mRNA level of *Nrf2* after transfection with *Nrf2*-siRNA. (B) The effect of transfection with *Nrf2*-siRNA on the BPAF-induced cell viability. (C-D) The effect of transfection with *Nrf2*-siRNA on the MDA and GSH after BPAF treatment. \* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (compared with control group); # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  (compared with BPAF group).

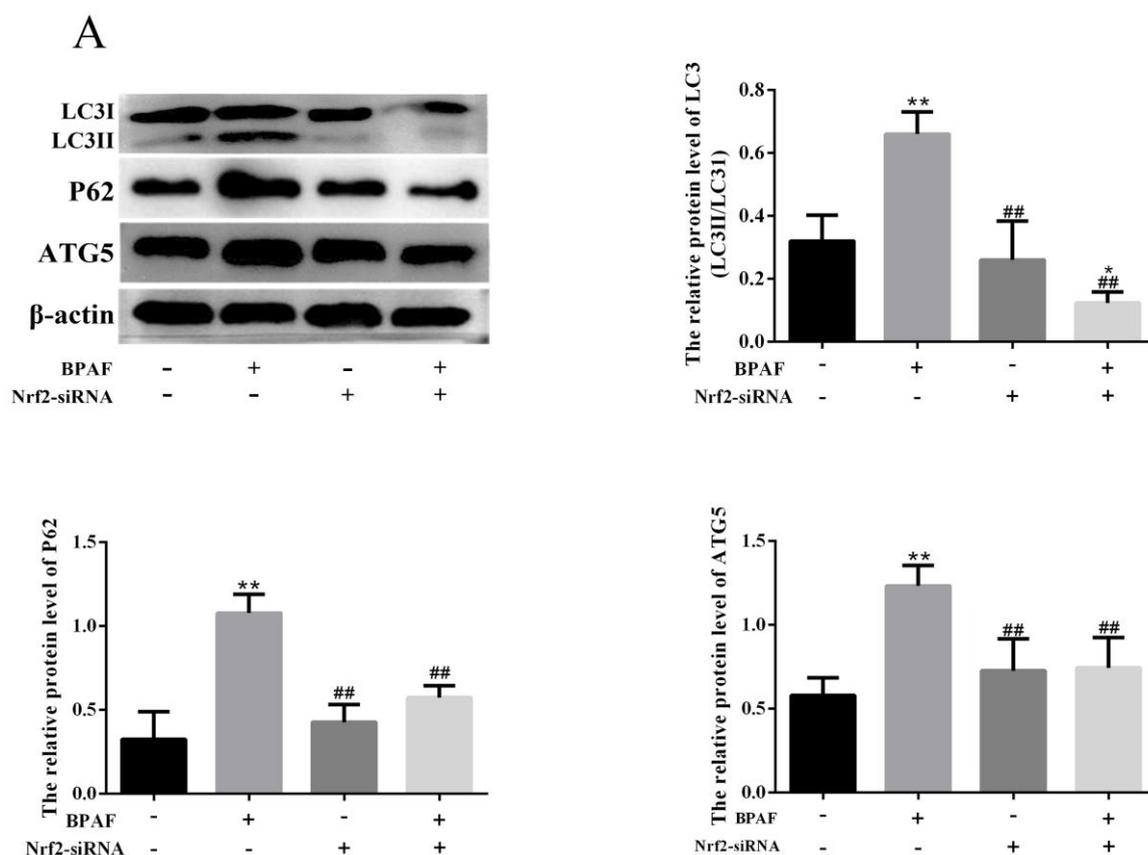


图 3-13 通过敲低 *Nrf2* 表达抑制 BPAF 诱导的自噬激活

图注：(A) 转染 *Nrf2*-siRNA 对 BPAF 处理后 LC3、P62 和 ATG5 蛋白表达的影响。\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$  (与对照组相比)；## $P < 0.01$  (与 BPAF 组相比)。

Fig.3-13 Inhibition of BPAF-induced autophagy activation by knocking down *Nrf2* expression

Note: (A) Effects of *Nrf2*-siRNA transfection on the expression of LC3、P62 and ATG5 after BPAF treatment. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  (compared with control group); ## $P < 0.01$  (compared with BPAF group).

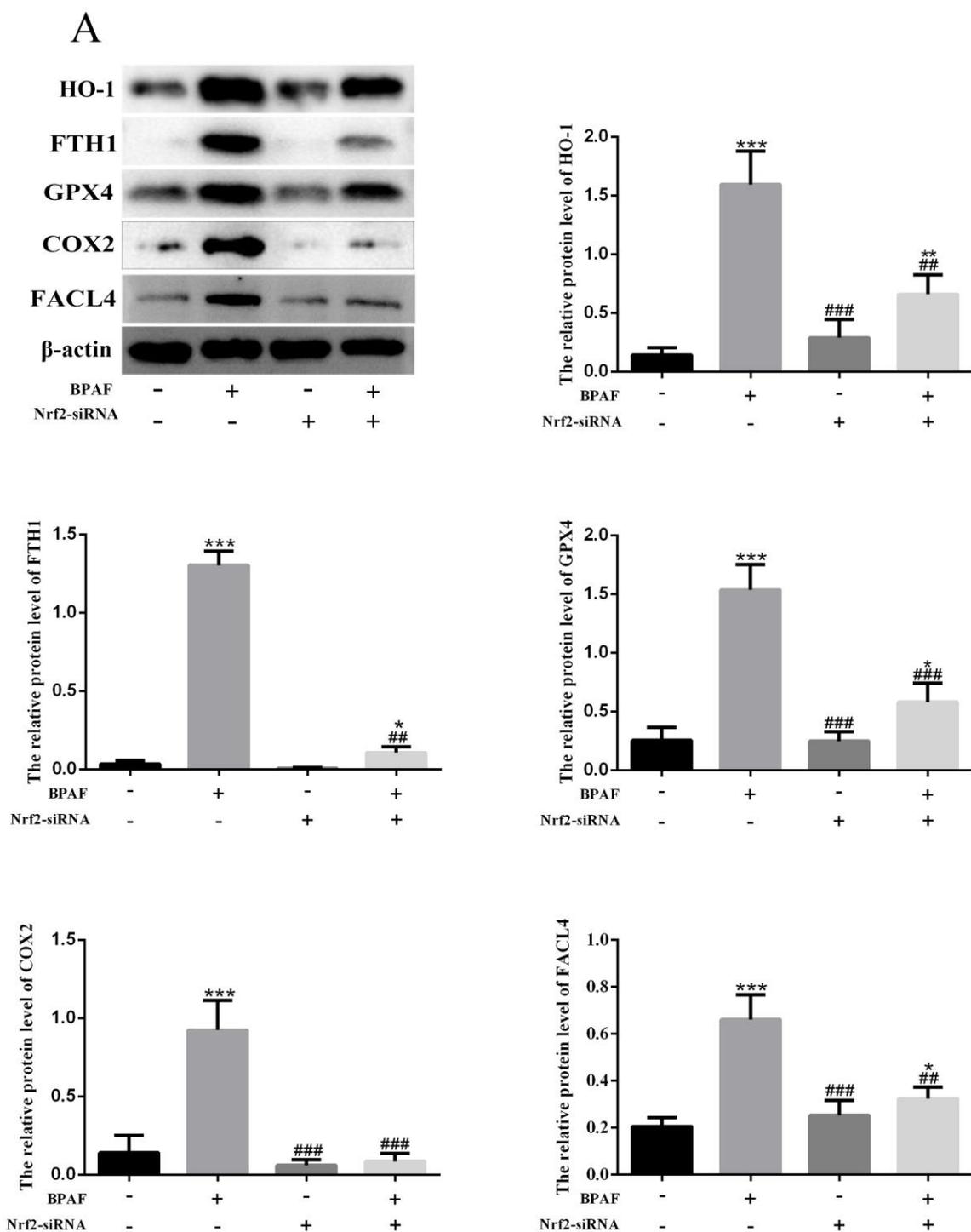


图 3-14 通过敲除 Nrf2 降低 BPAF 诱导的铁死亡相关蛋白表达

图注：(A) 转染 Nrf2-siRNA 对 BPAF 处理后 HO-1、FTH1、GPX4、COX2 和 FACL4 和蛋白表达的影响。 $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$  (与对照组相比);  $###P<0.01$ ,  $####P<0.001$  (与 BPAF 组相比)。

Fig. 3-14 The expression of ferroptosis- related protein induced by BPAF was decreased by knockout

Nrf2

Note:(A) Effects of Nrf2-siRNA transfection on the expression of HO-1, FTH1, GPX4, COX2 and FACL4 and after BPAF treatment. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (compared with control group); ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  (compared with BPAF group).

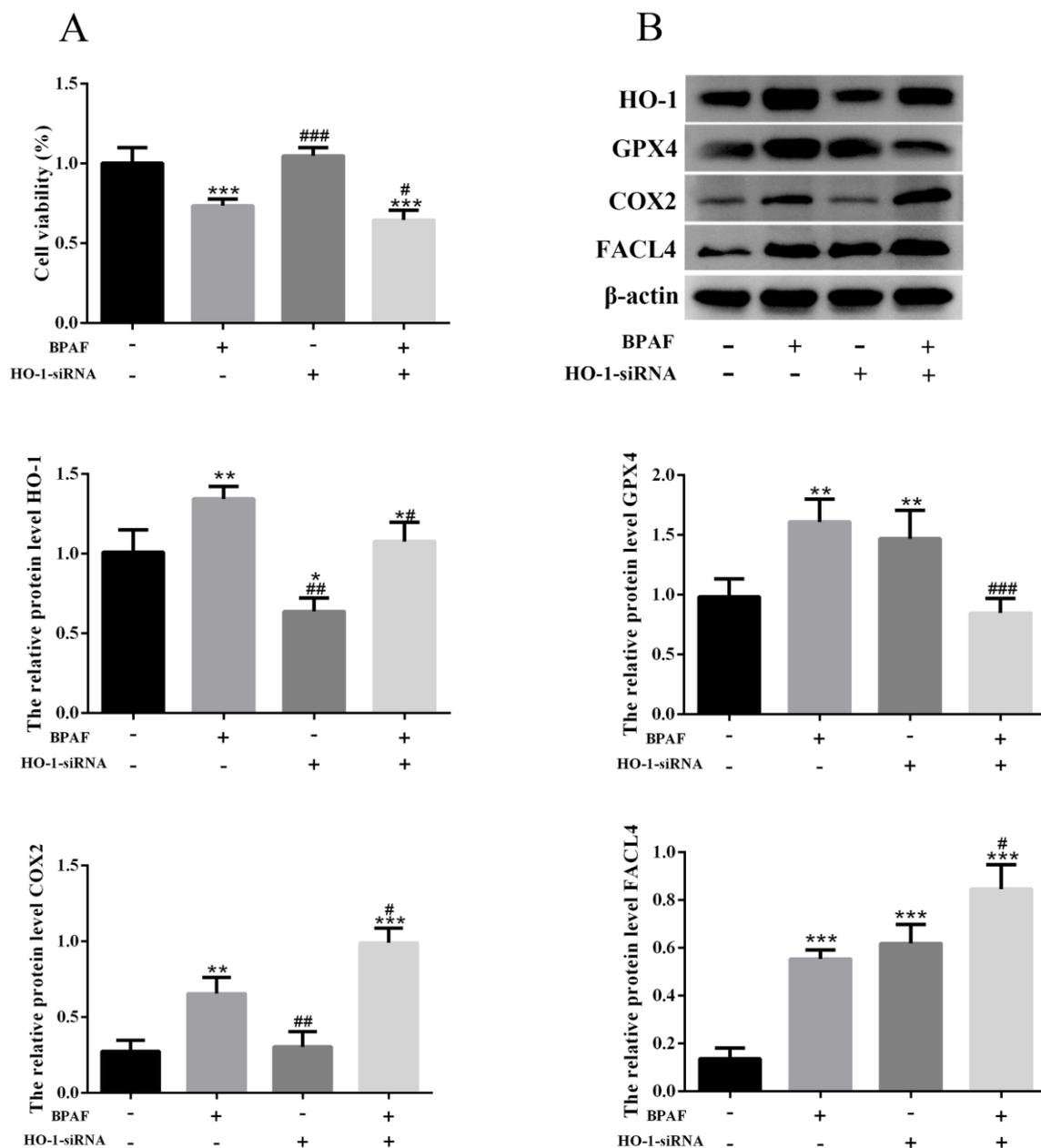


图 3-15 EECs 通过激活 HO-1 表达抵抗 BPAF 诱导的铁死亡

图注：(A) 转染 HO-1-siRNA 对 BPAF 处理后细胞活力的影响。(B) 转染 HO-1-siRNA 对 BPAF 处理后 HO-1、GPX4、COX2、FACL4 和 COX2 蛋白表达的影响。 $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$  (与对照组相比);  $\#P<0.05$ ,  $\#\#P<0.01$ ,  $\#\#\#P<0.001$  (与 BPAF 组相比)。

Fig.3-15 EECs resists BPAF-induced ferroptosis by activating HO-1 expression

Note: (A) The effect of transfection with HO-1-siRNA on the BPAF-induced cell viability. (B) The effect of transfection with HO-1-siRNA on the HO-1, GPX4, COX2 and FACL4 after BPAF treatment.  $*P<0.05$ ,  $**P<0.01$ ,  $***P<0.001$  (compared with control group);  $\#P<0.05$ ,  $\#\#P<0.01$ ,  $\#\#\#P<0.001$  (compared with BPAF group).

## 4. 讨论

作为一种环境污染物, BPAF 已被报道能够引起多种细胞的凋亡和氧化应激, 并通过发挥雌激素活性对人类和动物健康产生危害 (Lei et al 2019), 然而环境污染物通常以多种途径诱导细胞损伤。本研究中用凋亡抑制剂处理细胞后, 虽然提升了细胞活力, 但提升效果有限, 表明可能有其他细胞死亡途径参与了 BPAF 诱导的细胞损伤。先前的研究表明 BPAF 在大鼠睾丸中诱导自噬 (Yu et al 2022b), 而自噬与铁死亡的发生有着密切的联系 (Gao et al 2016), 同样, Nrf2 通路也在铁死亡过程中发挥关键作用 (Anandhan et al 2023)。在本研究中, BPAF 显著激活了 Nrf2 通路。因此, 本研究假设 BPAF 可能诱导了 EECs 中铁死亡的发生。在后续实验中, 本研究证明了铁死亡是 BPAF 诱导 EECs 损伤的一种新的作用机制, 这一细胞死亡机制是通过内质网激活和自噬诱导的, 而姜黄素处理显著逆转了这一过程。这为 BPAF 诱导的子宫疾病风险提供了潜在的作用机制和预防策略。

已有研究表明 BPAF 暴露会增加人类和动物生殖细胞的氧化应激和功能损伤。例如, 产前暴露于 BPAF 的小鼠表现出睾酮生物合成、精子数量和活力下降 (Feng et al 2012) 以及抑制卵母细胞成熟 (Ding et al 2017)。然而, 很少有研究关注 BPAF 与子宫健康之间的关系。子宫是内分泌干扰物的重要靶点之一 (Gore et al 2015a), 内分泌干扰物的存在可能会影响正常的子宫结构和功能, 导致生殖相关疾病 (Jones et al 2018)。先前的研究表明, BPAF 暴露会增加子宫疾病的风险, 但其具体作用机制仍有待探究 (Wu et al 2023)。铁死亡是一种由铁依赖性脂质过氧化调控和驱动的新型细胞死亡方式 (Dixon et al 2012), 铁死亡与多种疾病的发生有关, 如癌症、阿尔兹海默症和神经退行性疾病等 (Yan et al 2021)。以往的研究表明, 铁死亡与脂多糖诱导的子宫内膜炎有关 (Jiang et al 2023), 此外, 一些研究者发现铁死亡也参与了一些其他生殖相关疾病的发生, 如先兆子痫、早产和妊娠丢失等 (Beharier et al 2021)。这些研究表明, 铁死亡与生殖健康密切相关。然而, 铁死亡是否参与 BPAF 引起的细胞损伤尚不清楚。因此, 在本研究中, 我们对 EECs 中铁死亡相关指标进行检测。结果表明, BPAF 暴露显著诱导了铁死亡相关指标的增加, 表明 BPAF 诱导了 EECs 铁死亡, 然而姜黄素可以显著逆转这一趋势, 并通过 Fer-1 抑制剂进一步验证了姜黄素对铁死亡的缓解效果, 这表明姜黄素具有广泛的保护作用, 甚至可能通过抑制铁死亡对其他疾病起到一定的治疗作用, 如姜黄素能够通过抑制铁死亡对肝豆状核变

性起到了治疗作用 (Sun et al 2023)。

铁死亡是一种自噬依赖性的细胞死亡方式，适当的自噬对细胞具有保护作用，但过度的自噬，特别是选择性自噬和溶酶体活性受损可能引起细胞铁死亡的发生 (Zhou et al 2020a)。本研究中，BPAF 诱导了自噬体形成相关蛋白 ATG5、Beclin1 和 LC3 的激活，表明 BPAF 激活了 EECs 细胞自噬。然而，与此矛盾的是 P62 在 BPAF 刺激下也呈现上升趋势。P62 作为一种自噬底物和货物受体，通过与 LC3II 相互作用将泛素化蛋白和受损的细胞器靶向到自噬体中，与溶酶体融合后与其他货物蛋白一起降解 (Geisler et al 2010)，当自噬流被抑制后，P62 会在受损的细胞中积累 (Komatsu and Ichimura 2010)。因此，一般认为 P62 蛋白的表达水平与自噬活性呈负相关关系。为了进一步确定 BPAF 对 EECs 自噬的影响，本研究对促进自噬体和溶酶体相关基因 *VAMP8* 进行了检测，结果表明 BPAF 呈浓度依赖性增加了 *VAMP8* mRNA 表达，这表明 BPAF 促进了自噬体和溶酶体的融合，增强了自噬流，这也为本研究中铁死亡的发生提供了条件。在其他研究中也有类似发现，如在氧化锌纳米颗粒诱导的血管内皮细胞铁死亡中，LC3 和 P62 的表达也呈上升趋势 (Fang et al 2021)。在本研究中姜黄素显著抑制了自噬激活，特别是抑制了 *VAMP8* mRNA 的增加，并利用自噬抑制剂 CQ 和 3-MA 证明了姜黄素通过抑制自噬缓解了铁死亡的发生。3-MA 和 CQ 是实验中常用的两种自噬抑制剂，其中 CQ 通过抑制自噬体和溶酶体的融合，阻断了溶酶体对囊泡内容物的降解从而达到抑制自噬的目的，而 3-MA 则是通过抑制 PI3K 的方式发挥自噬抑制作用。在本研究中，我们发现 CQ 处理细胞可以显著提升细胞活力，而 3-MA 进一步促进了细胞损伤，这可能是因为 3-MA 抑制了 PI3K 通路导致的，这进一步证明了姜黄素可能是通过阻断自噬流的方式发挥保护作用，而自噬流的阻断提升了 P62 表达，在后续的研究中，我们发现 P62 的上升是由于 Nrf2 和 PI3K/AKT/mTOR 通路激活介导的。

PI3K/AKT/mTOR 信号通路在细胞存活、增殖和代谢中发挥重要作用，并通过介导 mTOR 与自噬呈负调控关系 (Butler et al 2017, Ediriweera et al 2019)。先前的研究表明，一些植物提取物，如山柰酚通过激活玉米赤霉烯酮抑制的 PI3K/AKT/Nrf2 通路来减轻细胞损伤，促进了细胞的存活 (Rajendran et al 2020)，花青素通过激活 PI3K/AKT/Nrf2/HO-1 通路降低氧化应激，改善阿尔茨海默病小鼠模型中的神经退化和记忆损伤 (Ali et al 2018)。然而在本研究中得出了相反的结果，BPAF 激活了 PI3K/AKT/mTOR 通路，而姜黄素逆转了这一现象。这可能是由于细胞为了抵御 BPAF

诱导的细胞损伤，以激活 PI3K 通路的方式阻断自噬过程，从而抑制铁死亡，促进细胞存活。而自噬的阻断导致了 P62 表达的上升，这也为自噬过程中 P62 上升这一矛盾结果提供了一定的解释。姜黄素处理后 PI3K/AKT/mTOR 降低则表明姜黄素改善了细胞存活环境，因此以负反馈的方式恢复 PI3K/AKT/mTOR 通路表达。虽然本研究中 PI3K/AKT/mTOR 诱导模式与其他研究并不一致，但同样证明了 PI3K 通路在铁死亡中的保护作用。相似的结果在其他研究中也证明，如西贝母碱通过激活 PI3K/AKT/Nrf2 通路抑制 PM2.5 诱导的铁死亡，并改善肺损伤 (Wang et al 2022b)。在最近一项关于散发性阿尔茨海默病的研究中，发现载脂蛋白 E (Apolipoprotein E, apoE) 可以通过激活 PI3K/AKT 通路抑制铁蛋白自噬，从而抑制铁死亡 (Belaidi et al 2022)。然而，意外的是，抑制 PI3K 通路后，铁死亡相关蛋白 COX2 和 FAACL4 也显著降低，表明姜黄素可能通过抑制 PI3K 通路降低了 COX2 和 FAACL4 表达，这可能是由于二者存在上下游调控关系，其具体机制仍需探究。

Nrf2 除在抗氧化防御中发挥重要作用外，还通过编码铁代谢相关基因如 FTH1、FTL 和 HO-1 等参与铁稳态调控 (Kerins and Ooi 2018b)。大量研究表明环境毒素通过降低 Nrf2 表达，使细胞失去抗氧化能力而引发氧化应激，凋亡和铁死亡，而一些植物提取物通过激活 Nrf2 发挥保护作用，如鸢尾碱通过激活 Nrf2 通路抑制了 PM2.5 诱导的脂质过氧化和铁死亡，并对 PM2.5 导致的肺损伤起到了保护作用 (Dong et al 2023)，益母草碱通过提升 Nrf2 及下游抗氧化蛋白 NQO1 和 HO-1 减缓顺铂诱导的急性肾损伤 (Hu et al 2022)。然而与其他研究不同的是，在本研究中，BPAF 上调了 Nrf2 表达及其下游蛋白 HO-1，而姜黄素逆转了这一现象。在用 siRNA 抑制 Nrf2 后，细胞损伤加剧，表明 Nrf2 通路激活发挥一个保护作用，这与 PI3K/AKT/mTOR 通路在本实验中发挥的作用是一致的。Nrf2 的上升可能是细胞的一种代偿机制，当氧化应激增加时，细胞通过激活 Nrf2，提高抗氧化等下游抗氧化基因的转录效率以达到保护细胞的目的，其中 FTH1 的提高有助于减少细胞内游离铁离子含量，减弱芬顿反应导致的脂质过氧化物的产生，而姜黄素减弱氧化应激产生后，Nrf2 随机恢复到正常状态，其调控的下游基因也随之降低。类似的结果在其他研究也有报道，如益母草碱在抑制顺铂诱导的肾损伤过程中，显著抑制了肾脏铁积累和 FTL 和 FTH-1 水平的升高。P62-Keap1-Nrf2 通路的激活可以抑制肝癌细胞中的铁死亡发生 (Hu et al 2022, Sun et al 2016)。然而，有趣的是，在用 siRNA 降低 Nrf2 表达后，自噬相关蛋白 LC3 和 P62 以及铁死亡蛋白 COX2 和 FAACL4 也随着降低。有研究表明，

Nrf2 的激活可以上调多个自噬相关基因，如 P62、ULK1、ATG5 和 LC3 等，抑制 Nrf2 会导致自噬基因的表达降低，其中，Nrf2 的过度表达会增加 P62 的 mRNA 水平，而 P62 的大量积累会介导 Keap1 失活，进一步激活 Nrf2 通路如此形成正性反馈环路 (Lau et al 2010, Zhang et al 2023)。在本研究中，转染 Nrf2 siRNA 后自噬相关蛋白显著降低，表明姜黄素可能通过抑制 Nrf2 降低了自噬相关蛋白表达，这也进一步解释了本研究中 P62 表达上升的原因。而抑制 Nrf2 表达后，COX2 和 FAACL4 表达的降低，则表明其可能存在其他调控关系，具体机制仍需进一步探究。尽管大部分研究证明了 Nrf2 在抗氧化和铁死亡中的积极作用，然而 Nrf2 的过度表达并不总是有益的，这可能和 HO-1 的过表达有关 (Yuan et al 2008)。HO-1 是血红素降解的限速酶，通过对血红素降解产生游离铁、一氧化碳和胆绿素/胆红素 (Maines 1988)，其中胆绿素通过其代谢物胆红素发挥抗氧化作用 (Kawamura et al 2005)。因此，Nrf2 通路的激活，特别是通过氧化剂增加 HO-1 后，可能会增加铁离子含量，导致铁依赖性氧化性细胞死亡，如 Chang 等 IkBa 抑制剂 (BA Y11-7085) 通过 Nrf2-SLC7A11-HO-1 途径诱导癌细胞铁死亡 (Chang et al 2018a)。Tang 等发现 Nrf2-SLC7A11-HO-1 过度激活 HO-1 导致了人视网膜上皮细胞铁死亡，而敲低 HO-1 提升了抗氧化水平和细胞活力，降低了铁离子含量 (Chang et al 2018a)。而本研究中敲低 HO-1 后，细胞活力进一步降低，COX2 和 FAACL4 表达增强，进一步证明了本研究中 Nrf2 通过激活 HO-1 发挥抵抗铁死亡作用。这也表明在不同实验模型中，HO-1 发挥类似双刃剑的作用，可以提供抗氧化作用或增强铁死亡的敏感性。

近年来，越来越多的研究表明，铁死亡是一种依赖于铁蛋白自噬的细胞死亡形式，在铁死亡过程中，通过激活自噬随后对铁蛋白和自噬货物受体 NCOA4 进行降解，释放储存在铁蛋白中的铁离子，铁离子通过催化芬顿反应，增加脂质过氧化物的产生，敲除 NCOA4 或抑制自噬，可以抑制铁死亡的发生 (Dowdle et al 2014, Mancias et al 2014b)。在其他研究中也证实了这一结论，如敲除自噬相关基因 Atg5 和 Atg7 可以降低小鼠胚胎成纤维细胞 (MEFs) 中的铁含量和脂质过氧化，抑制 erastin 诱导的铁死亡 (Hou et al 2016)。在本研究中，得出了类似的结果。BPAF 上调了 EECs 中的铁离子含量，而用姜黄素和 CQ 处理后，铁离子含量显著降低，表明姜黄素通过抑制自噬降低了 EECs 中的铁离子含量。铁蛋白自噬是一种 NCOA4 介导的铁蛋白降解过程，NCOA4 的过表达加剧了对铁蛋白的降解 (Fang et al 2021)。如 Yin 等发现聚苯乙烯微塑料通过增加 NCOA4，降低 FTH1 的方式诱导了小脑组织中自噬依

赖性的铁死亡 (Yin et al 2022), 而敲除 NCOA4 可以抑制铁蛋白降解和减少铁离子含量 (Fang et al 2021, Kuno et al 2022)。在本研究中 NCOA4 的上升增强了对铁蛋白的降解, 导致了铁死亡, FTH1 受到 Nrf2 调控 (Kerins and Ooi 2018a), FTH1 的上升可能是 Nrf2 通过提升 FTH1 表达增加对铁蛋白的储存, 减少铁离子含量, 抵抗铁死亡对细胞的损伤, 同样, GPX4 也受到 Nrf2 调控, 通过提高 GPX4 的表达有助于抵抗脂质过氧化物的产生。而姜黄素和 CQ 处理后 NCOA4 和 FTH1 显著降低, 表明姜黄素通过抑制铁蛋白自噬抑制了 BPAF 诱导的铁死亡, 且本实验中 DFOM 抑制铁离子后对细胞的保护作用, 进一步验证了这一结论。相似的结果也在其他研究中发现, Wang 等发现 PM2.5 诱导的小鼠肺组织铁死亡中 NCOA4 和 FTH1 表达以及铁离子含量均呈现上升趋势, 而硫化氢通过抑制 FTH1 的降解缓解了铁死亡发生 (Wang et al 2022a)。

脂质积累和氧化应激会破坏内质网蛋白稳态, 导致内质网应激 (Lebeauin et al 2018), 近年来的研究表明, 在各种因素诱导的铁死亡过程中, 经常伴随着内质网应激的激活 (Tang et al 2021a), 这表明内质网应激的发生与铁死亡密切相关。如 He 等发现内质网应激介导的铁蛋白自噬参与了镉诱导的肝功能紊乱和铁死亡 (He et al 2022)。内质网应激通过 XBP1-Hrd1-Nrf2 通路调节铁死亡, 促进糖尿病患者上皮间质转化 (EMT) 进展 (Liu et al 2023)。此外大量的研究也证明了内质网应激可以通过 IRE1 $\alpha$ 、PERK 和 ATF6 途径以不同方式诱导自噬 (Bernales et al 2006, Hayashi-Nishino et al 2009), 这表明内质网应激可能是通过自噬介导的铁死亡。在本研究中, BPAF 增加了内质网应激相关蛋白表达, 诱导了 EECs 内质网应激, 而姜黄素显著抑制了这一过程, 4-PBA 结果则表明抑制内质网应激后, 自噬相关蛋白也随之降低。类似的发现在其他研究也有报道, Zhao 等发现抑制内质网应激诱导的自噬可以减轻镉诱导的肾小管上皮细胞铁死亡 (Zhao et al 2021)。总之, 这些结果表明姜黄素可能通过抑制内质网介导的自噬减轻 BPAF 诱导的铁死亡。

综上所述, 本研究表明铁死亡参与了 BPAF 诱导的 EECs 细胞损伤, 自噬激活和内质网应激是铁死亡的潜在分子机制。此外, 我们还发现姜黄素通过抑制 BPAF 诱导的自噬和内质网应激可有效抑制铁死亡的发生。这些发现不仅表明铁死亡可能是 BPAF 引起的多种疾病的潜在途径, 而且还表明姜黄素可能是治疗 BPAF 接触相关疾病的潜在治疗策略。

## 5. 小结

本研究以 EECs 体外培养模型，探讨了 BPAF 对 EECs 铁死亡的影响及其触发机制，同时探究了姜黄素对铁死亡的缓解作用和机制。主要结论如下：

(1) BPAF 通过诱导内质网应激通路和自噬相关因子表达，导致 EECs 中内质网应激和自噬激活，从而引发 NCOA4 介导的铁蛋白自噬对铁离子的释放，最终引发 EECs 中铁死亡的发生。

(2) 姜黄素可能通过抑制 BPAF 诱导的内质网应激和自噬，阻断铁蛋白自噬过程中铁离子的释放，对铁死亡过程起到了抑制作用，从而对铁死亡导致的 EECs 损伤起到一定的保护效果。

(3) PI3K/AKT/mTOR 和 Nrf2/HO-1 通路的激活有助于抵抗铁死亡的发生，姜黄素通过其缓解作用，以反馈方式恢复了 PI3K/AKT/mTOR 和 Nrf2/HO-1 通路表达，进而抑制了自噬和铁死亡相关蛋白激活。

## 6. 全文总结

### 6.1 结论

本研究以 EECs 体外培养模型，首先探究了 BPAF 对 EECs 氧化损伤、凋亡和铁死亡等方面的毒性作用，同时为了缓解 BPAF 对 EECs 的毒性影响，选一种植物提取物姜黄素以探究其对 BPAF 诱导的细胞损伤的保护作用。本研究主要获得了以下结论：

- (1) BPAF 可能通过扰乱抗氧化系统和激活 MAPK 通路诱导 EECs 凋亡。
- (2) 姜黄素可能通过恢复抗氧化稳态和抑制 MAPK 通路缓解 BPAF 诱导的 EECs 凋亡。
- (3) BPAF 通过激活内质网应激和自噬诱导了 EECs 铁死亡。
- (4) 姜黄素通过抑制内质网和自噬，阻断铁蛋白自噬，缓解了 BPAF 诱导的铁死亡。
- (5) PI3K/AKT/mTOR 和 Nrf2/HO-1 通路被激活以对抗 BPAF 诱导的细胞损伤。

### 6.2 创新点

(1) 羊的活体毒性研究较难开展，本研究利用 EECs 体外培养模型探究了 BPAF 的细胞毒性，发现了 BPAF 引起 EECs 的细胞凋亡和铁死亡涉及到多种蛋白激酶信号通路紊乱、氧化应激异常、内质网应激和自噬等途径。研究结果为了解 BPAF 等双

酚类化合物对反刍动物子宫内膜功能的毒性影响提供了重要参考。

(2)本研究探讨了姜黄素对 BPAF 诱导 EECs 的细胞毒性的保护功效及其保护途径,为有效降低和缓解 BPAF 接触导致家畜动物繁殖障碍的风险提供了潜在的防治策略和参考价值。

### 6.3 不足之处和下一步计划

(1)本研究仅在细胞水平上对 BPAF 诱导的细胞损伤和姜黄素的缓解作用进行了探究,然而姜黄素是否能在体内发挥保护作用尚不清楚。此外,还需要通过模式动物如小鼠模型进一步验证 BPAF 对子宫功能的毒性影响,包括子宫内膜的分泌功能和子宫内膜容受性等的影响以及姜黄素的保护和缓解功效。

(2)在本实验中,所用 BPAF 浓度相较于实际环境接触浓度有一定差异,因此可参考实际环境中 BPAF 接触浓度,利用模式动物如小鼠模型探究长期低浓度 BPAF 暴露对子宫功能,胚胎附着和胎儿发育的影响。

## 参考文献

1. 代雁凌. 双酚 A 暴露对雄性生殖细胞线粒体和内质网损伤效应及机制的研究: 第三军医大学.
2. 卢芬, 汤倩倩, 娄淑芳, 雷炳莉. 双酚 AF 诱导乳腺癌细胞增殖的分子机制. *中国环境科学*, 2021, 041(012): 5896-5903
3. 王尹强, 高占芳, 徐睿, 蒋香菊. 双酚 A 对小鼠卵巢卵泡 AMH 表达的研究. *黑龙江科学*, 2023, 14(2): 145-147
4. Abdallah S, Jampy A, Moison D, Wieckowski M, Messiaen S, Martini E, Campalans A, Radicella JP, Rouiller-Fabre V, Livera G, Guerquin MJ. Foetal exposure to the bisphenols BADGE and BPAF impairs meiosis through DNA oxidation in mouse ovaries. *Environ Pollut*, 2023a, 317: 120791
5. Abdallah S, Jampy A, Moison D, Wieckowski M, Messiaen S, Martini E, Campalans A, Radicella JP, Rouiller-Fabre V, Livera G, Guerquin MJ. Foetal exposure to the bisphenols BADGE and BPAF impairs meiosis through DNA oxidation in mouse ovaries. *Environmental Pollution*, 2023b, 317:
6. Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol*, 2007, 595: 1-75
7. Akahori Y, Nakai M, Yamasaki K, Takatsuki M, Shimohigashi Y, Ohtaki M. Relationship between the results of in vitro receptor binding assay to human estrogen receptor alpha and in vivo uterotrophic assay: comparative study with 65 selected chemicals. *Toxicol In Vitro*, 2008, 22(1): 225-231
8. Akino N, Wada-Hiraike O, Terao H, Honjoh H, Isono W, Fu HJ, Hirano M, Miyamoto Y, Tanikawa M, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Koga K, Oda K, Kawana K, Fujii T, Osuga Y. Activation of Nrf2 might reduce oxidative stress in human granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2018, 470: 96-104
9. Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, Carabatsos MJ. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*, 2001, 121(5): 647-653
10. Ali H, Dixit S, Ali D, Alqahtani SM, Alkahtani S, Alarifi S. Isolation and evaluation of anticancer efficacy of stigmasterol in a mouse model of DMBA-induced skin carcinoma.

*Drug Design Development and Therapy*, 2015, 9: 2793-2800

11. Ali T, Kim T, Rehman SU, Khan MS, Amin FU, Khan M, Ikram M, Kim MO. Natural Dietary Supplementation of Anthocyanins via PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 Pathways Mitigate Oxidative Stress, Neurodegeneration, and Memory Impairment in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(7): 6076-6093

12. Aljarba NH, Ali H, Alkahtani S. Synergistic Dose Permutation of Isolated Alkaloid and Sterol for Anticancer Effect on Young Swiss Albino Mice. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 4043-4052

13. Amalraj A, Pius A, Gopi S, Gopi S. Biological activities of curcuminoids, other biomolecules from turmeric and their derivatives - A review. *J Tradit Complement Med*, 2017, 7(2): 205-233

14. Anandhan A, Dodson M, Schmidlin CJ, Liu P, Zhang DD. Breakdown of an Ironclad Defense System: The Critical Role of NRF2 in Mediating Ferroptosis. *Cell Chem Biol*, 2020, 27(4): 436-447

15. Anandhan A, Dodson M, Shakya A, Chen J, Liu P, Wei Y, Tan H, Wang Q, Jiang Z, Yang K, Garcia JG, Chambers SK, Chapman E, Ooi A, Yang-Hartwich Y, Stockwell BR, Zhang DD. NRF2 controls iron homeostasis and ferroptosis through HERC2 and VAMP8. *Sci Adv*, 2023, 9(5): eade9585

16. Angeli JPF, Shah R, Pratt DA, Conrad M. Ferroptosis Inhibition: Mechanisms and Opportunities. *Trends Pharmacol Sci*, 2017, 38(5): 489-498

17. Araújo CC, Leon LL. Biological activities of *Curcuma longa* L. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2001, 96(5): 723-728

18. Arredondo M, Núñez MT. Iron and copper metabolism. *Mol Aspects Med*, 2005, 26(4-5): 313-327

19. Baehrecke EH. Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(6): 505-510

20. Baird L, Dinkova-Kostova AT. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch Toxicol*, 2011, 85(4): 241-272

21. Beharier O, Kajiwara K, Sadovsky Y. Ferroptosis, trophoblast lipotoxic damage, and adverse pregnancy outcome. *Placenta*, 2021, 108: 32-38

22. Beharier O, Tyurin VA, Goff JP, Guerrero-Santoro J, Kajiwara K, Chu T, Tyurina YY, St Croix CM, Wallace CT, Parry S, Parks WT, Kagan VE, Sadovsky Y. PLA2G6 guards placental trophoblasts against ferroptotic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(44): 27319-27328
23. Belaidi AA, Masaldan S, Southon A, Kalinowski P, Acevedo K, Appukuttan AT, Portbury S, Lei P, Agarwal P, Leurgans SE, Schneider J, Conrad M, Bush AI, Ayton S. Apolipoprotein E potently inhibits ferroptosis by blocking ferritinophagy. *Mol Psychiatry*, 2022:
24. Bernales S, McDonald KL, Walter P. Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biol*, 2006, 4(12): e423
25. Bersuker K, Hendricks JM, Li Z, Magtanong L, Ford B, Tang PH, Roberts MA, Tong B, Maimone TJ, Zoncu R, Bassik MC, Nomura DK, Dixon SJ, Olzmann JA. The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis. *Nature*, 2019, 575(7784): 688-692
26. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(6): 326-332
27. Boice A, Bouchier-Hayes L. Targeting apoptotic caspases in cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 2020, 1867(6):
28. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1999, 15: 269-290
29. Butler DE, Marlein C, Walker HF, Frame FM, Mann VM, Simms MS, Davies BR, Collins AT, Maitland NJ. Inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway activates autophagy and compensatory Ras/Raf/MEK/ERK signalling in prostate cancer. *Oncotarget*, 2017, 8(34): 56698-56713
30. Cao LY, Ren XM, Li CH, Zhang J, Qin WP, Yang Y, Wan B, Guo LH. Bisphenol AF and Bisphenol B Exert Higher Estrogenic Effects than Bisphenol A via G Protein-Coupled Estrogen Receptor Pathway. *Environ Sci Technol*, 2017, 51(19): 11423-11430
31. Cao SS, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate

- decision and human disease. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 21(3): 396-413
32. Cargnello M, Roux PP. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases (vol 75, pg 50, 2011). *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2012, 76(2): 496-496
33. Carolina Alves R, Perosa Fernandes R, Fonseca-Santos B, Damiani Victorelli F, Chorilli M. A Critical Review of the Properties and Analytical Methods for the Determination of Curcumin in Biological and Pharmaceutical Matrices. *Crit Rev Anal Chem*, 2019, 49(2): 138-149
34. Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *Lancet*, 1993, 341(8855): 1251-1254
35. Česen M, Lambropoulou D, Laimou-Geraniou M, Kosjek T, Blaznik U, Heath D, Heath E. Determination of Bisphenols and Related Compounds in Honey and Their Migration from Selected Food Contact Materials. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(46): 8866-8875
36. Chang HM, Qiao J, Leung PC. Oocyte-somatic cell interactions in the human ovary-novel role of bone morphogenetic proteins and growth differentiation factors. *Hum Reprod Update*, 2016, 23(1): 1-18
37. Chang LC, Chiang SK, Chen SE, Yu YL, Chou RH, Chang WC. Heme oxygenase-1 mediates BAY 11-7085 induced ferroptosis. *Cancer Lett*, 2018a, 416: 124-137
38. Chen D, Kannan K, Tan H, Zheng Z, Feng YL, Wu Y, Widelka M. Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity-A Review. *Environ Sci Technol*, 2016, 50(11): 5438-5453
39. Chen L, Hambright WS, Na R, Ran Q. Ablation of the Ferroptosis Inhibitor Glutathione Peroxidase 4 in Neurons Results in Rapid Motor Neuron Degeneration and Paralysis. *J Biol Chem*, 2015, 290(47): 28097-28106
40. Chen S, Yang S, Wang M, Chen J, Huang S, Wei Z, Cheng Z, Wang H, Long M, Li P. Curcumin inhibits zearalenone-induced apoptosis and oxidative stress in Leydig cells via modulation of the PTEN/Nrf2/Bip signaling pathway. *Food Chem Toxicol*, 2020a, 141: 111385
41. Chen X, Yu C, Kang R, Tang D. Iron Metabolism in Ferroptosis. *Front Cell Dev Biol*, 2020b, 8: 590226

42. Chiurchiù V, Maccarrone M. Chronic inflammatory disorders and their redox control: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(9): 2605-2641
43. Conrad M, Pratt DA. The chemical basis of ferroptosis. *Nat Chem Biol*, 2019, 15(12): 1137-1147
44. Conrad M, Sato H. The oxidative stress-inducible cystine/glutamate antiporter, system x (c) (-) : cystine supplier and beyond. *Amino Acids*, 2012, 42(1): 231-246
45. Daher R, Manceau H, Karim Z. Iron metabolism and the role of the iron-regulating hormone hepcidin in health and disease. *Presse Med*, 2017, 46(12 Pt 2): e272-e278
46. Dai CS, Li B, Zhou Y, Li DW, Zhang S, Li H, Xiao XL, Tang SS. Curcumin attenuates quinocetone induced apoptosis and inflammation via the opposite modulation of Nrf2/HO-1 and NF- $\kappa$ B pathway in human hepatocyte L02 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 2016, 95: 52-63
47. Das M, Djahanbakhch O, Hacıhanefioglu B, Saridogan E, Ikram M, Ghali L, Raveendran M, Storey A. Granulosa cell survival and proliferation are altered in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93(3): 881-887
48. Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology*, 2000, 10(9): 369-377
49. Ding ZM, Jiao XF, Wu D, Zhang JY, Chen F, Wang YS, Huang CJ, Zhang SX, Li X, Huo LJ. Bisphenol AF negatively affects oocyte maturation of mouse in vitro through increasing oxidative stress and DNA damage. *Chem Biol Interact*, 2017, 278: 222-229
50. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, Patel DN, Bauer AJ, Cantley AM, Yang WS, Morrison B, 3rd, Stockwell BR. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072
51. Dixon SJ, Patel DN, Welsch M, Skouta R, Lee ED, Hayano M, Thomas AG, Gleason CE, Tatonetti NP, Slusher BS, Stockwell BR. Pharmacological inhibition of cystine-glutamate exchange induces endoplasmic reticulum stress and ferroptosis. *Elife*, 2014, 3: e02523
52. Dixon SJ, Winter GE, Musavi LS, Lee ED, Snijder B, Rebsamen M, Superti-Furga G, Stockwell BR. Human Haploid Cell Genetics Reveals Roles for Lipid Metabolism Genes

- in Nonapoptotic Cell Death. *Acs Chemical Biology*, 2015, 10(7): 1604-1609
53. Doll S, Freitas FP, Shah R, Aldrovandi M, da Silva MC, Ingold I, Grocin AG, da Silva TNX, Panzilius E, Scheel CH, Mourao A, Buday K, Sato M, Wanninger J, Vignane T, Mohana V, Rehberg M, Flatley A, Schepers A, Kurz A et al. FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor. *Nature*, 2019, 575(7784): 693-698
54. Doll S, Proneth B, Tyurina YY, Panzilius E, Kobayashi S, Ingold I, Irmeler M, Beckers J, Aichler M, Walch A, Prokisch H, Trümbach D, Mao G, Qu F, Bayir H, Füllekrug J, Scheel CH, Wurst W, Schick JA, Kagan VE et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition. *Nat Chem Biol*, 2017, 13(1): 91-98
55. Dong T, Fan X, Zheng N, Yan K, Hou T, Peng L, Ci X. Activation of Nrf2 signalling pathway by tectoridin protects against ferroptosis in particulate matter-induced lung injury. *Br J Pharmacol*, 2023, 180(19): 2532-2549
56. Dowdle WE, Nyfeler B, Nagel J, Elling RA, Liu S, Triantafellow E, Menon S, Wang Z, Honda A, Pardee G, Cantwell J, Luu C, Cornella-Taracido I, Harrington E, Fekkes P, Lei H, Fang Q, Digan ME, Burdick D, Powers AF et al. Selective VPS34 inhibitor blocks autophagy and uncovers a role for NCOA4 in ferritin degradation and iron homeostasis in vivo. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(11): 1069-1079
57. Dubeuf JP, Morand-Fehr P, Rubino R. Situation, changes and future of goat industry around the world. *Small Ruminant Research*, 2004, 51(2): 165-173
58. Edinger AL, Thompson CB. Defective autophagy leads to cancer. *Cancer Cell*, 2003, 4(6): 422-424
59. Ediriweera MK, Tennekoon KH, Samarakoon SR. Role of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in ovarian cancer: Biological and therapeutic significance. *Semin Cancer Biol*, 2019, 59: 147-160
60. Eshraghi M, Adlimoghaddam A, Mahmoodzadeh A, Sharifzad F, Yasavoli-Sharahi H, Lorzadeh S, Albensi BC, Ghavami S. Alzheimer's Disease Pathogenesis: Role of Autophagy and Mitophagy Focusing in Microglia. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(7):
61. Fan HY, Shimada M, Liu Z, Cahill N, Noma N, Wu Y, Gossen J, Richards JS. Selective expression of KrasG12D in granulosa cells of the mouse ovary causes defects in follicle development and ovulation. *Development*, 2008, 135(12): 2127-2137

62. Fang Y, Chen X, Tan Q, Zhou H, Xu J, Gu Q. Inhibiting Ferroptosis through Disrupting the NCOA4-FTH1 Interaction: A New Mechanism of Action. *ACS Cent Sci*, 2021, 7(6): 980-989
63. Feng Y, Yin J, Jiao Z, Shi J, Li M, Shao B. Bisphenol AF may cause testosterone reduction by directly affecting testis function in adult male rats. *Toxicol Lett*, 2012, 211(2): 201-209
64. Fesik SW. Insights into programmed cell death through structural biology. *Cell*, 2000, 103(2): 273-282
65. Friedmann Angeli JP, Schneider M, Proneth B, Tyurina YY, Tyurin VA, Hammond VJ, Herbach N, Aichler M, Walch A, Eggenhofer E, Basavarajappa D, Radmark O, Kobayashi S, Seibt T, Beck H, Neff F, Esposito I, Wanke R, Forster H, Yefremova O et al. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nat Cell Biol*, 2014a, 16(12): 1180-1191
66. Friedmann Angeli JP, Schneider M, Proneth B, Tyurina YY, Tyurin VA, Hammond VJ, Herbach N, Aichler M, Walch A, Eggenhofer E, Basavarajappa D, Rådmark O, Kobayashi S, Seibt T, Beck H, Neff F, Esposito I, Wanke R, Förster H, Yefremova O et al. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nat Cell Biol*, 2014b, 16(12): 1180-1191
67. Fuchs Y, Steller H. Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*, 2011, 147(4): 742-758
68. Fujimoto VY, Kim D, vom Saal FS, Lamb JD, Taylor JA, Bloom MS. Serum unconjugated bisphenol A concentrations in women may adversely influence oocyte quality during in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 2011, 95(5): 1816-1819
69. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, Alnemri ES, Altucci L, Amelio I, Andrews DW, Annicchiarico-Petruzzelli M, Antonov AV, Arama E, Baehrecke EH, Barlev NA, Bazan NG, Bernassola F, Bertrand MJM, Bianchi K, Blagosklonny MV et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*, 2018, 25(3): 486-541
70. Gao MH, Monian P, Pan QH, Zhang W, Xiang J, Jiang XJ. Ferroptosis is an autophagic cell death process. *Cell Research*, 2016, 26(9): 1021-1032

71. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 482(3): 419-425
72. Geisler S, Holmström KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ, Springer W. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nature Cell Biology*, 2010, 12(2): 119-U170
73. Geng SS, Wang SJ, Zhu WW, Xie CF, Li XT, Wu JS, Zhu JY, Jiang Y, Yang X, Li Y, Chen Y, Wang XQ, Meng Y, Zhu MM, Wu R, Huang C, Zhong CY. Curcumin attenuates BPA-induced insulin resistance in HepG2 cells through suppression of JNK/p38 pathways. *Toxicology Letters*, 2017, 272: 75-83
74. Ghosh S, Banerjee S, Sil PC. The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update. *Food Chem Toxicol*, 2015, 83: 111-124
75. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*, 2010, 221(1): 3-12
76. Gore AC, Chappell VA, Fenton SE, Flaws JA, Nadal A, Prins GS, Toppari J, Zoeller RT. EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocr Rev*, 2015a, 36(6): E1-e150
77. Gore AC, Chappell VA, Fenton SE, Flaws JA, Nadal A, Prins GS, Toppari J, Zoeller RT. Executive Summary to EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocr Rev*, 2015b, 36(6): 593-602
78. Gu J, Wang H, Zhou L, Fan D, Shi L, Ji G, Gu A. Oxidative stress in bisphenol AF-induced cardiotoxicity in zebrafish and the protective role of N-acetyl N-cysteine. *Sci Total Environ*, 2020, 731: 139190
79. Guo YJ, Pan WW, Liu SB, Shen ZF, Xu Y, Hu LL. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp Ther Med*, 2020, 19(3): 1997-2007
80. Guvvala PR, Ravindra JP, Selvaraju S. Impact of environmental contaminants on reproductive health of male domestic ruminants: a review. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2020, 27(4): 3819-3836
81. Hansen TE, Johansen T. Following autophagy step by step. *Bmc Biology*, 2011, 9:
82. Harada N, Kanayama M, Maruyama A, Yoshida A, Tazumi K, Hosoya T, Mimura J,

- Toki T, Maher JM, Yamamoto M, Itoh K. Nrf2 regulates ferroportin 1-mediated iron efflux and counteracts lipopolysaccharide-induced ferroportin 1 mRNA suppression in macrophages. *Arch Biochem Biophys*, 2011, 508(1): 101-109
83. Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, Yamamoto A. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(12): 1433-1437
84. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, McMahon M. Cross-talk between transcription factors AhR and Nrf2: lessons for cancer chemoprevention from dioxin. *Toxicol Sci*, 2009, 111(2): 199-201
85. Hayes JD, McMahon M. Molecular basis for the contribution of the antioxidant responsive element to cancer chemoprevention. *Cancer Lett*, 2001, 174(2): 103-113
86. He Y, Yue Y, Zheng X, Zhang K, Chen S, Du Z. Curcumin, inflammation, and chronic diseases: how are they linked? *Molecules*, 2015, 20(5): 9183-9213
87. He Z, Shen P, Feng L, Hao H, He Y, Fan G, Liu Z, Zhu K, Wang Y, Zhang N, Hu X, Fu Y, Wu J. Cadmium induces liver dysfunction and ferroptosis through the endoplasmic stress-ferritinophagy axis. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2022, 245: 114123
88. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(2): 89-102
89. Hewlings SJ, Kalman DS. Curcumin: A Review of Its Effects on Human Health. *Foods*, 2017, 6(10):
90. Hipólito-Reis M, Neto AC, Neves D. Impact of curcumin, quercetin, or resveratrol on the pathophysiology of endometriosis: A systematic review. *Phytother Res*, 2022, 36(6): 2416-2433
91. Hong K, Choi Y. Role of estrogen and RAS signaling in repeated implantation failure. *BMB Rep*, 2018, 51(5): 225-229
92. Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, Guan JL, Oshiro N, Mizushima N. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell*, 2009, 20(7): 1981-1991
93. Hou W, Xie Y, Song X, Sun X, Lotze MT, Zeh HJ, 3rd, Kang R, Tang D. Autophagy

- promotes ferroptosis by degradation of ferritin. *Autophagy*, 2016, 12(8): 1425-1428
94. Høyer-Hansen M, Jäätelä M. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ*, 2007, 14(9): 1576-1582
95. Hu J, Gu W, Ma N, Fan X, Ci X. Leonurine alleviates ferroptosis in cisplatin-induced acute kidney injury by activating the Nrf2 signalling pathway. *Br J Pharmacol*, 2022, 179(15): 3991-4009
96. Huang M, Li X, Jia S, Liu S, Fu L, Jiang X, Yang M. Bisphenol AF induces apoptosis via estrogen receptor beta (ER $\beta$ ) and ROS-ASK1-JNK MAPK pathway in human granulosa cell line KGN. *Environ Pollut*, 2021, 270: 116051
97. Huang M, Liu S, Fu L, Jiang X, Yang M. Bisphenol A and its analogues bisphenol S, bisphenol F and bisphenol AF induce oxidative stress and biomacromolecular damage in human granulosa KGN cells. *Chemosphere*, 2020, 253: 126707
98. Ihde ES, Zamudio S, Loh JM, Zhu Y, Woytanowski J, Rosen L, Liu M, Buckley B. Application of a novel mass spectrometric (MS) method to examine exposure to Bisphenol-A and common substitutes in a maternal fetal cohort. *Hum Ecol Risk Assess*, 2018, 24(2): 331-346
99. Jiang P, Zhao L, Hu R, Zhai Z, Guo J, Zhang K. Nuciferine protects against lipopolysaccharide-induced endometritis via inhibiting ferroptosis and modulating AMPK $\alpha$ /mTOR/HIF-1 $\alpha$  signaling axis. *Int Immunopharmacol*, 2023, 124(Pt B): 110914
100. Jiang X, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021a, 22(4): 266-282
101. Jiang XJ, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2021b, 22(4): 266-282
102. Jiang Y, Ogunade IM, Vyas D, Adesogan AT. Aflatoxin in Dairy Cows: Toxicity, Occurrence in Feedstuffs and Milk and Dietary Mitigation Strategies. *Toxins (Basel)*, 2021c, 13(4):
103. Jiang Z, Wan Y, Li P, Xue Y, Cui W, Chen Q, Chen J, Wang F, Mao D. Effect of Curcumin Supplement in Summer Diet on Blood Metabolites, Antioxidant Status, Immune Response, and Testicular Gene Expression in Hu Sheep. *Animals (Basel)*, 2019, 9(10):

104. Jin H, Xie J, Mao L, Zhao M, Bai X, Wen J, Shen T, Wu P. Bisphenol analogue concentrations in human breast milk and their associations with postnatal infant growth. *Environ Pollut*, 2020, 259: 113779
105. Jin H, Zhu J, Chen Z, Hong Y, Cai Z. Occurrence and Partitioning of Bisphenol Analogues in Adults' Blood from China. *Environ Sci Technol*, 2018, 52(2): 812-820
106. Joe B, Lokesh BR. Role of capsaicin, curcumin and dietary n-3 fatty acids in lowering the generation of reactive oxygen species in rat peritoneal macrophages. *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1224(2): 255-263
107. Jones RL, Lang SA, Kendzierski JA, Greene AD, Burns KA. Use of a Mouse Model of Experimentally Induced Endometriosis to Evaluate and Compare the Effects of Bisphenol A and Bisphenol AF Exposure. *Environ Health Perspect*, 2018, 126(12): 127004
108. Jürgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(9): 4997-5002
109. Kabir MF, Kim H-R, Chae H-J. Endoplasmic reticulum stress and autophagy. *Endoplasmic reticulum*, 2018:
110. Kagan VE, Mao G, Qu F, Angeli JP, Doll S, Croix CS, Dar HH, Liu B, Tyurin VA, Ritov VB, Kapralov AA, Amoscato AA, Jiang J, Anthonymuthu T, Mohammadyani D, Yang Q, Proneth B, Klein-Seetharaman J, Watkins S, Bahar I et al. Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. *Nat Chem Biol*, 2017, 13(1): 81-90
111. Kamal DAM, Salamt N, Yusuf ANM, Kashim M, Mokhtar MH. Potential Health Benefits of Curcumin on Female Reproductive Disorders: A Review. *Nutrients*, 2021, 13(9):
112. Kang R, Tang D. Autophagy and Ferroptosis - What's the Connection? *Curr Pathobiol Rep*, 2017, 5(2): 153-159
113. Kaur J, Debnath J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2015, 16(8): 461-472
114. Kawamura K, Ishikawa K, Wada Y, Kimura S, Matsumoto H, Kohro T, Itabe H, Kodama T, Maruyama Y. Bilirubin from heme oxygenase-1 attenuates vascular

- endothelial activation and dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(1): 155-160
115. Kerins MJ, Ooi A. The Roles of NRF2 in Modulating Cellular Iron Homeostasis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2018a, 29(17): 1756-1773
116. Kesavardhana S, Malireddi RKS, Kanneganti TD. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Pyroptosis. *Annu Rev Immunol*, 2020, 38: 567-595
117. Keshavarzi B, Seradj A, Akbari Z, Moore F, Shahraki AR, Pourjafar M. Chronic arsenic toxicity in sheep of Kurdistan province, western Iran. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2015, 69(1): 44-53
118. Kim PK, Hailey DW, Mullen RT, Lippincott-Schwartz J. Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins and peroxisomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(52): 20567-20574
119. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, Adachi H, Adams CM, Adams PD, Adeli K, Adhietty PJ, Adler SG, Agam G, Agarwal R, Aghi MK, Agnello M, Agostinis P, Aguilar PV, Aguirre-Ghiso J, Airoidi EM et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*, 2016, 12(1): 1-222
120. Klionsky DJ, Schulman BA. Dynamic regulation of macroautophagy by distinctive ubiquitin-like proteins. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2014, 21(4): 336-345
121. Komatsu M, Ichimura Y. Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy. *FEBS Lett*, 2010, 584(7): 1374-1378
122. Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J, Ezaki J, Murata S, Hamazaki J, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Yanagawa T, Uwayama J, Warabi E, Yoshida H, Ishii T, Kobayashi A et al. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*, 2007, 131(6): 1149-1163
123. Konno R, Yamakawa H, Utsunomiya H, Ito K, Sato S, Yajima A. Expression of survivin and Bcl-2 in the normal human endometrium. *Mol Hum Reprod*, 2000, 6(6): 529-534
124. Koppula P, Zhuang L, Gan B. Cytochrome P450 reductase (POR) as a ferroptosis

fuel. *Protein Cell*, 2021, 12(9): 675-679

125. Kraft VAN, Bezjian CT, Pfeiffer S, Ringelstetter L, Müller C, Zandkarimi F, Merl-Pham J, Bao XW, Anastasov N, Kössl J, Brandner S, Daniels JD, Schmitt-Kopplin P, Hauck SM, Stockwell BR, Hadian K, Schick JA. GTP Cyclohydrolase 1/Tetrahydrobiopterin Counteract Ferroptosis through Lipid Remodeling. *Acs Central Science*, 2020b, 6(1): 41-53

126. Kuma A, Komatsu M, Mizushima N. Autophagy-monitoring and autophagy-deficient mice. *Autophagy*, 2017, 13(10): 1619-1628

127. Kuno S, Fujita H, Tanaka YK, Ogra Y, Iwai K. Iron-induced NCOA4 condensation regulates ferritin fate and iron homeostasis. *EMBO Rep*, 2022, 23(5): e54278

128. LaFleur AD, Schug KA. A review of separation methods for the determination of estrogens and plastics-derived estrogen mimics from aqueous systems. *Analytica Chimica Acta*, 2011, 696(1-2): 6-26

129. Lau A, Wang XJ, Zhao F, Villeneuve NF, Wu TD, Jiang T, Sun Z, White E, Zhang DD. A Noncanonical Mechanism of Nrf2 Activation by Autophagy Deficiency: Direct Interaction between Keap1 and p62. *Molecular and Cellular Biology*, 2010, 30(13): 3275-3285

130. Lebeaupin C, Vallee D, Hazari Y, Hetz C, Chevet E, Bailly-Maitre B. Endoplasmic reticulum stress signalling and the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*, 2018, 69(4): 927-947

131. LeBlanc SJ. Interactions of metabolism, inflammation, and reproductive tract health in the postpartum period in dairy cattle. *Reprod Domest Anim*, 2012, 47 Suppl 5: 18-30

132. Lee D, Bae J, Kim YK, Gil M, Lee JY, Park CS, Lee KJ. Inhibitory effects of berberine on lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase and the high-mobility group box 1 release in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 431(3): 506-511

133. Lee Y, Chou TF, Pittman SK, Keith AL, Razani B, Weihl CC. Keap1/Cullin3 Modulates p62/SQSTM1 Activity via UBA Domain Ubiquitination. *Cell Rep*, 2017, 20(8): 1994, 19: 188-202

134. Lei B, Sun S, Zhang X, Feng C, Xu J, Wen Y, Huang Y, Wu M, Yu Y. Bisphenol AF

- exerts estrogenic activity in MCF-7 cells through activation of Erk and PI3K/Akt signals via GPER signaling pathway. *Chemosphere*, 2019, 220: 362-370
135. Lei B, Xu L, Tang Q, Sun S, Yu M, Huang Y. Molecular mechanism study of BPAF-induced proliferation of ER $\alpha$ -negative SKBR-3 human breast cancer cells in vitro/in vivo. *Sci Total Environ*, 2021, 775: 145814
136. Li DK, Zhou Z, Miao M, He Y, Wang J, Ferber J, Herrinton LJ, Gao E, Yuan W. Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality. *Fertil Steril*, 2011, 95(2): 625-630.e621-624
137. Li J, Lu K, Sun F, Tan S, Zhang X, Sheng W, Hao W, Liu M, Lv W, Han W. Panaxydol attenuates ferroptosis against LPS-induced acute lung injury in mice by Keap1-Nrf2/HO-1 pathway. *J Transl Med*, 2021a, 19(1): 96
138. Li R, Fang H, Shen J, Jin Y, Zhao Y, Wang R, Fu Y, Tian Y, Yu H, Zhang J. Curcumin Alleviates LPS-Induced Oxidative Stress, Inflammation and Apoptosis in Bovine Mammary Epithelial Cells via the NFE2L2 Signaling Pathway. *Toxins (Basel)*, 2021b, 13(3):
139. Li S, Zheng L, Zhang J, Liu X, Wu Z. Inhibition of ferroptosis by up-regulating Nrf2 delayed the progression of diabetic nephropathy. *Free Radic Biol Med*, 2021c, 162: 435-449
140. Li X, Chen Y, Mao Y, Dai P, Sun X, Zhang X, Cheng H, Wang Y, Banda I, Wu G, Ma J, Huang S, Forouzanfar T. Curcumin Protects Osteoblasts From Oxidative Stress-Induced Dysfunction via GSK3 $\beta$ -Nrf2 Signaling Pathway. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020a, 8: 625
141. Li X, He S, Ma B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Mol Cancer*, 2020b, 19(1): 12
142. Li Y, Burns KA, Arao Y, Luh CJ, Korach KS. Differential estrogenic actions of endocrine-disrupting chemicals bisphenol A, bisphenol AF, and zearalenone through estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  in vitro. *Environ Health Perspect*, 2012, 120(7): 1029-1035
143. Li Y, Zeng X, Lu D, Yin M, Shan M, Gao Y. Erastin induces ferroptosis via ferroportin-mediated iron accumulation in endometriosis. *Hum Reprod*, 2021d, 36(4): 951-964

144. Liao C, Liu F, Alomirah H, Loi VD, Mohd MA, Moon HB, Nakata H, Kannan K. Bisphenol S in urine from the United States and seven Asian countries: occurrence and human exposures. *Environ Sci Technol*, 2012, 46(12): 6860-6866
145. Liu B, Yu H, Baiyun R, Lu J, Li S, Bing Q, Zhang X, Zhang Z. Protective effects of dietary luteolin against mercuric chloride-induced lung injury in mice: Involvement of AKT/Nrf2 and NF- $\kappa$ B pathways. *Food Chem Toxicol*, 2018, 113: 296-302
146. Liu J, Wen S, Lin Y, Yang X, Liu Z, Quan S, Song Y. Advanced oxidation protein products change biological behaviors of rat endometrial epithelial cells by activating ERK/P38 signaling pathways. *Biol Open*, 2020, 9(5):
147. Liu J, Zhang L, Lu G, Jiang R, Yan Z, Li Y. Occurrence, toxicity and ecological risk of Bisphenol A analogues in aquatic environment - A review. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 208: 111481
148. Liu MQ, Chen Z, Chen LX. Endoplasmic reticulum stress: a novel mechanism and therapeutic target for cardiovascular diseases. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37(4): 425-443
149. Liu Z, Nan P, Gong Y, Tian L, Zheng Y, Wu Z. Endoplasmic reticulum stress-triggered ferroptosis via the XBP1-Hrd1-Nrf2 pathway induces EMT progression in diabetic nephropathy. *Biomed Pharmacother*, 2023, 164: 114897
150. Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, Jozkowicz A, Dulak J. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(17): 3221-3247
151. Lopresti AL, Maes M, Maker GL, Hood SD, Drummond PD. Curcumin for the treatment of major depression: a randomised, double-blind, placebo controlled study. *J Affect Disord*, 2014, 167: 368-375
152. Louandre C, Ezzoukhry Z, Godin C, Barbare JC, Mazière JC, Chauffert B, Galmiche A. Iron-dependent cell death of hepatocellular carcinoma cells exposed to sorafenib. *Int J Cancer*, 2013, 133(7): 1732-1742
153. Lymberopoulos AG, Kotsaki-Kovatsi VP, Taylor A, Papaioannou N, Brikas P. Effects of cadmium chloride administration on the macroscopic and microscopic characteristics of ejaculates from Chios ram-lambs. *Theriogenology*, 2000, 54(7): 1145-1157
154. Ma Y, Hendershot LM. ER chaperone functions during normal and stress conditions.

*J Chem Neuroanat*, 2004, 28(1-2): 51-65

155. Machtinger R, Orvieto R. Bisphenol A, oocyte maturation, implantation, and IVF outcome: review of animal and human data. *Reprod Biomed Online*, 2014, 29(4): 404-410

156. Maines MD. Heme Oxygenase - Function, Multiplicity, Regulatory Mechanisms, and Clinical-Applications. *Faseb Journal*, 1988, 2(10): 2557-2568

157. Maity S, Tomar MS, Wasnik K, Patra S, Das Modak M, Gupta PS, Pareek D, Singh M, Paik P. Seed Derived Carbon Nanocapsules: Cell Imaging, Depolarization of Mitochondrial Membrane Potential, and Dose-Dependent Control Death of Breast Cancer. *Acs Biomaterials Science & Engineering*, 2022, 8(8): 3608-3622

158. Mancias JD, Wang XX, Gygi SP, Harper JW, Kimmelman AC. Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy. *Nature*, 2014b, 509(7498): 105-109

159. Mao C, Liu XG, Zhang YL, Lei G, Yan YL, Lee HM, Koppula P, Wu SQ, Zhuang L, Fang BL, Poyurovsky MV, Olszewski K, Gan BY. DHODH-mediated ferroptosis defence is a targetable vulnerability in cancer (vol 593, pg 586, 2021). *Nature*, 2021, 596(7873): E13-E13

160. Maruyama K, Nakamura M, Tomoshige S, Sugita K, Makishima M, Hashimoto Y, Ishikawa M. Structure-activity relationships of bisphenol A analogs at estrogen receptors (ERs): discovery of an ER $\alpha$ -selective antagonist. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23(14): 4031-4036

161. Mathur PP, D'Cruz SC. The effect of environmental contaminants on testicular function. *Asian J Androl*, 2011, 13(4): 585-591

162. Matsuda F, Inoue N, Manabe N, Ohkura S. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *J Reprod Dev*, 2012, 58(1): 44-50

163. Merksamer PI, Papa FR. The UPR and cell fate at a glance. *J Cell Sci*, 2010, 123(Pt 7): 1003-1006

164. Mesnage R, Phedonos A, Arno M, Balu S, Corton JC, Antoniou MN. Editor's Highlight: Transcriptome Profiling Reveals Bisphenol A Alternatives Activate Estrogen Receptor Alpha in Human Breast Cancer Cells. *Toxicol Sci*, 2017, 158(2): 431-443

165. Mishima E, Conrad M. Nutritional and Metabolic Control of Ferroptosis. *Annu Rev Nutr*, 2022, 42: 275-309
166. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev*, 2007, 21(22): 2861-2873
167. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, 2011, 147(4): 728-741
168. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 2008, 451(7182): 1069-1075
169. Mondal P, Shaw P, Bandyopadhyay A, Bhowmik AD, Chakraborty A, Sudarshan M, Chattopadhyay A. Mixture effect of arsenic and fluoride at environmentally relevant concentrations in zebrafish T liver: Expression pattern of Nrf2 and related xenobiotic metabolizing enzymes. *Aquatic Toxicology*, 2019, 213:
170. Mu X, Huang Y, Li X, Lei Y, Teng M, Li X, Wang C, Li Y. Developmental Effects and Estrogenicity of Bisphenol A Alternatives in a Zebrafish Embryo Model. *Environ Sci Technol*, 2018, 52(5): 3222-3231
171. Musachio EAS, Janner DE, Meichtry LB, Fernandes EJ, Gomes NS, Romio LC, Guerra GP, Prigol M. Bisphenol F and Bisphenol S exposure during development reduce neuronal ganglia integrity and change behavioral profile of melanogaster larvae. *Behavioural Brain Research*, 2024, 459:
172. Netea-Maier RT, Plantinga TS, van de Veerdonk FL, Smit JW, Netea MG. Modulation of inflammation by autophagy: Consequences for human disease. *Autophagy*, 2016, 12(2): 245-260
173. Nezic L, Skrbic R, Amidzic L, Gajanin R, Milovanovic Z, Nepovimova E, Kuca K, Jacevic V. Protective Effects of Simvastatin on Endotoxin-Induced Acute Kidney Injury through Activation of Tubular Epithelial Cells' Survival and Hindering Cytochrome C-Mediated Apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(19):
174. Ng Shu Wing , Norwitz SG, Norwitz ER. The Impact of Iron Overload and Ferroptosis on Reproductive Disorders in Humans: Implications for Preeclampsia. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(13):
175. Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling

Pathway and Its Activation by Oxidative Stress. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(20): 13291-13295

176. Niu Y, Wang B, Zhao Y, Zhang J, Shao B. Highly Sensitive and High-Throughput Method for the Analysis of Bisphenol Analogues and Their Halogenated Derivatives in Breast Milk. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(48): 10452-10463

177. Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. *Braz J Biol*, 2021, 81(4): 1133-1143

178. Oikawa D, Kimata Y, Kohno K, Iwawaki T. Activation of mammalian IRE1alpha upon ER stress depends on dissociation of BiP rather than on direct interaction with unfolded proteins. *Exp Cell Res*, 2009, 315(15): 2496-2504

179. Okazaki H, Hirao-Suzuki M, Takeda S, Takemoto Y, Mizunoe R, Haraguchi K, Watanabe K, Takiguchi M, Aramaki H. Bisphenol AF as an activator of human estrogen receptor  $\beta 1$  (ER $\beta 1$ ) in breast cancer cell lines. *J Toxicol Sci*, 2018, 43(5): 321-327

180. Orogo AM, Gustafsson AB. Therapeutic targeting of autophagy: potential and concerns in treating cardiovascular disease. *Circ Res*, 2015, 116(3): 489-503

181. Osburn WO, Wakabayashi N, Misra V, Nilles T, Biswal S, Trush MA, Kensler TW. Nrf2 regulates an adaptive response protecting against oxidative damage following diquat-mediated formation of superoxide anion. *Arch Biochem Biophys*, 2006, 454(1): 7-15

182. Oskam IC, Lyche JL, Krogenaes A, Thomassen R, Skaare JU, Wiger R, Dahl E, Sweeney T, Stien A, Ropstad E. Effects of long-term maternal exposure to low doses of PCB126 and PCB153 on the reproductive system and related hormones of young male goats. *Reproduction*, 2005, 130(5): 731-742

183. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 2007, 12(5): 913-922

184. Pelusi C, Ikeda Y, Zubair M, Parker KL. Impaired follicle development and infertility in female mice lacking steroidogenic factor 1 in ovarian granulosa cells. *Biol Reprod*, 2008, 79(6): 1074-1083

185. Pivari F, Mingione A, Brasacchio C, Soldati L. Curcumin and Type 2 Diabetes Mellitus: Prevention and Treatment. *Nutrients*, 2019, 11(8):

186. Poppenga RH. Current environmental threats to animal health and productivity. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2000, 16(3): 545-558, viii
187. Powers JM, Buchanan GR, Adix L, Zhang S, Gao A, McCavit TL. Effect of Low-Dose Ferrous Sulfate vs Iron Polysaccharide Complex on Hemoglobin Concentration in Young Children With Nutritional Iron-Deficiency Anemia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 2017, 317(22): 2297-2304
188. Priyadarsini KI, Maity DK, Naik GH, Kumar MS, Unnikrishnan MK, Satav JG, Mohan H. Role of phenolic O-H and methylene hydrogen on the free radical reactions and antioxidant activity of curcumin. *Free Radic Biol Med*, 2003, 35(5): 475-484
189. Qi L, Jiang J, Zhang J, Zhang L, Wang T. Curcumin Protects Human Trophoblast HTR8/SVneo Cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative Stress by Activating Nrf2 Signaling Pathway. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9(2):
190. Rajendran P, Ammar RB, Al-Saeedi FJ, Mohamed ME, ElNaggar MA, Al-Ramadan SY, Bekhet GM, Soliman AM. Kaempferol Inhibits Zearalenone-Induced Oxidative Stress and Apoptosis via the PI3K/Akt-Mediated Nrf2 Signaling Pathway: In Vitro and In Vivo Studies. *Int J Mol Sci*, 2020, 22(1):
191. Rashid HO, Yadav RK, Kim HR, Chae HJ. ER stress: Autophagy induction, inhibition and selection. *Autophagy*, 2015, 11(11): 1956-1977
192. Reale E, Vernez D, Hopf NB. Skin Absorption of Bisphenol A and Its Alternatives in Thermal Paper. *Ann Work Expo Health*, 2021, 65(2): 206-218
193. Reddy RK, Mao C, Baumeister P, Austin RC, Kaufman RJ, Lee AS. Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *J Biol Chem*, 2003, 278(23): 20915-20924
194. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(7): 519-529
195. Rossé T, Olivier R, Monney L, Rager M, Conus S, Fellay I, Jansen B, Borner C. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature*, 1998, 391(6666): 496-499
196. Rudel RA, Fenton SE, Ackerman JM, Euling SY, Makris SL. Environmental

- exposures and mammary gland development: state of the science, public health implications, and research recommendations. *Environ Health Perspect*, 2011, 119(8): 1053-1061
197. Salman A, Caamaño JN, Fernández-Alegre E, Hidalgo CO, Nadri T, Tamargo C, Fueyo C, Fernández Á, Merino MJ, Martínez-Pastor F. Supplementation of the BIOXcell extender with the antioxidants crocin, curcumin and GSH for freezing bull semen. *Res Vet Sci*, 2021, 136: 444-452
198. Sandur SK, Ichikawa H, Pandey MK, Kunnumakkara AB, Sung B, Sethi G, Aggarwal BB. Role of pro-oxidants and antioxidants in the anti-inflammatory and apoptotic effects of curcumin (diferuloylmethane). *Free Radic Biol Med*, 2007a, 43(4): 568-580
199. Sandur SK, Pandey MK, Sung B, Ahn KS, Murakami A, Sethi G, Limtrakul P, Badmaev V, Aggarwal BB. Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-proliferative responses through a ROS-independent mechanism. *Carcinogenesis*, 2007b, 28(8): 1765-1773
200. Sangkhae V, Fisher AL, Ganz T, Nemeth E. Iron Homeostasis During Pregnancy: Maternal, Placental, and Fetal Regulatory Mechanisms. *Annu Rev Nutr*, 2023, 43: 279-300
201. Seiler A, Schneider M, Förster H, Roth S, Wirth EK, Culmsee C, Plesnila N, Kremmer E, Rådmark O, Wurst W, Bornkamm GW, Schweizer U, Conrad M. Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. *Cell Metab*, 2008, 8(3): 237-248
202. Shah R, Shchepinov MS, Pratt DA. Resolving the Role of Lipoxygenases in the Initiation and Execution of Ferroptosis. *ACS Cent Sci*, 2018, 4(3): 387-396
203. Shahcheraghi SH, Salemi F, Peirovi N, Ayatollahi J, Alam W, Khan H, Saso L. Nrf2 Regulation by Curcumin: Molecular Aspects for Therapeutic Prospects. *Molecules*, 2021, 27(1):
204. Shaw P, Chattopadhyay A. Nrf2-ARE signaling in cellular protection: Mechanism of action and the regulatory mechanisms. *J Cell Physiol*, 2020, 235(4): 3119-3130

205. Silva AM, Correia S, Casalta-Lopes JE, Mamede AC, Cavaco JE, Botelho MF, Socorro S, Maia CJ. The protective effect of regucalcin against radiation-induced damage in testicular cells. *Life Sci*, 2016, 164: 31-41
206. Sone M, Oyama K, Mohri Y, Hayashi R, Clevers H, Nishimori K. LGR4 expressed in uterine epithelium is necessary for uterine gland development and contributes to decidualization in mice. *Faseb Journal*, 2013, 27(12): 4917-4928
207. Song JH, Lee HJ, Kang KS. Procyanidin C1 Activates the Nrf2/HO-1 Signaling Pathway to Prevent Glutamate-Induced Apoptotic HT22 Cell Death. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(1):
208. Song S, Ruan T, Wang T, Liu R, Jiang G. Distribution and preliminary exposure assessment of bisphenol AF (BPAF) in various environmental matrices around a manufacturing plant in China. *Environ Sci Technol*, 2012, 46(24): 13136-13143
209. Sun X, Ou Z, Chen R, Niu X, Chen D, Kang R, Tang D. Activation of the p62-Keap1-NRF2 pathway protects against ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology*, 2016, 63(1): 173-184
210. Sun X, Zhang X, Yan H, Wu H, Cao S, Zhao W, Dong T, Zhou A. Protective effect of curcumin on hepatocellular degeneration through copper excretion and inhibition of ferroptosis. *Phytomedicine*, 2023, 113: 154539
211. Tang DL, Chen X, Kang R, Kroemer G. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications. *Cell Research*, 2021b, 31(2): 107-125
212. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008, 9(3): 231-241
213. Tian F, Li Q, Shi L, Li J, Shi M, Zhu Y, Li H, Ge RS. In utero bisphenol AF exposure causes fetal Leydig cell dysfunction and induces multinucleated gonocytes by generating oxidative stress and reducing the SIRT1/PGC1 $\alpha$  signals. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2022, 447: 116069
214. Tomeh MA, Hadianamrei R, Zhao XB. A Review of Curcumin and Its Derivatives as Anticancer Agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(5):
215. Tucker DK, Hayes Bouknight S, Brar SS, Kissling GE, Fenton SE. Evaluation of Prenatal Exposure to Bisphenol Analogues on Development and Long-Term Health of the

- Mammary Gland in Female Mice. *Environ Health Perspect*, 2018, 126(8): 087003
216. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Current Neuropharmacology*, 2009, 7(1): 65-74
217. Vahdati Hassani F, Mehri S, Abnous K, Birner-Gruenberger R, Hosseinzadeh H. Protective effect of crocin on BPA-induced liver toxicity in rats through inhibition of oxidative stress and downregulation of MAPK and MAPKAP signaling pathway and miRNA-122 expression. *Food Chem Toxicol*, 2017, 107(Pt A): 395-405
218. Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol*, 2007, 24(2): 139-177
219. Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 2011, 334(6059): 1081-1086
220. Wang H, Liu D, Zheng B, Yang Y, Qiao Y, Li S, Pan S, Liu Y, Feng Q, Liu Z. Emerging Role of Ferroptosis in Diabetic Kidney Disease: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(9): 2678-2694
221. Wang Y, Liao S, Pan Z, Jiang S, Fan J, Yu S, Xue L, Yang J, Ma S, Liu T, Zhang J, Chen Y. Hydrogen sulfide alleviates particulate matter-induced emphysema and airway inflammation by suppressing ferroptosis. *Free Radic Biol Med*, 2022a, 186: 1-16
222. Wang Y, Shen Z, Zhao S, Huang D, Wang X, Wu Y, Pei C, Shi S, Jia N, He Y, Wang Z. Sipeimine ameliorates PM2.5-induced lung injury by inhibiting ferroptosis via the PI3K/Akt/Nrf2 pathway: A network pharmacology approach. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2022b, 239: 113615
223. Waring RH, Harris RM, Mitchell SC. Plastic contamination of the food chain: A threat to human health? *Maturitas*, 2018, 115: 64-68
224. Wei S, Qiu T, Yao X, Wang N, Jiang L, Jia X, Tao Y, Wang Z, Pei P, Zhang J, Zhu Y, Yang G, Liu X, Liu S, Sun X. Arsenic induces pancreatic dysfunction and ferroptosis via mitochondrial ROS-autophagy-lysosomal pathway. *J Hazard Mater*, 2020, 384: 121390
225. Wu D, Huang CJ, Jiao XF, Ding ZM, Zhang SX, Miao YL, Huo LJ. Bisphenol AF compromises blood-testis barrier integrity and sperm quality in mice. *Chemosphere*, 2019, 237: 124410

226. Wu J, Li Q, Wang X, Yu S, Li L, Wu X, Chen Y, Zhao J, Zhao Y. Neuroprotection by curcumin in ischemic brain injury involves the Akt/Nrf2 pathway. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59843
227. Wu SF, Yu WL, Jiang XX, Huang RM, Zhang XY, Lan J, Zhong GL, Wan F, Tang ZX, Hu LM. Protective effects of curcumin on ATO-induced nephrotoxicity in ducks in relation to suppressed autophagy, apoptosis and dyslipidemia by regulating oxidative stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 219:
228. Wu X, Yang X, Tian Y, Xu P, Yue H, Sang N. Bisphenol B and bisphenol AF exposure enhances uterine diseases risks in mouse. *Environ Int*, 2023, 173: 107858
229. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 2006, 124(3): 471-484
230. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(10): 1102-1109
231. Xing WW, Zou MJ, Liu S, Xu T, Gao J, Wang JX, Xu DG. Hepatoprotective effects of IL-22 on fulminant hepatic failure induced by d-galactosamine and lipopolysaccharide in mice. *Cytokine*, 2011, 56(2): 174-179
232. Xiong S, Mu T, Wang G, Jiang X. Mitochondria-mediated apoptosis in mammals. *Protein Cell*, 2014, 5(10): 737-749
233. Xue S, Liu L, Dong M, Xue W, Zhou S, Li X, Guo S, Yan W. Prenatal exposure to bisphenol AF induced male offspring reproductive dysfunction by triggering testicular innate and adaptive immune responses. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2023, 259: 115030
234. Yan HF, Zou T, Tuo QZ, Xu S, Li H, Belaidi AA, Lei P. Ferroptosis: mechanisms and links with diseases. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 49
235. Yan Z, Dai Y, Fu H, Zheng Y, Bao D, Yin Y, Chen Q, Nie X, Hao Q, Hou D, Cui Y. Curcumin exerts a protective effect against premature ovarian failure in mice. *J Mol Endocrinol*, 2018, 60(3): 261-271
236. Yang WS, Kim KJ, Gaschler MM, Patel M, Shchepinov MS, Stockwell BR. Peroxidation of polyunsaturated fatty acids by lipoxygenases drives ferroptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(34): E4966-4975
237. Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, Shimada K, Skouta R, Viswanathan VS,

- Cheah JH, Clemons PA, Shamji AF, Clish CB, Brown LM, Girotti AW, Cornish VW, Schreiber SL, Stockwell BR. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*, 2014a, 156(1-2): 317-331
238. Yang WS, Stockwell BR. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(3): 165-176
239. Yang Y, Guan J, Yin J, Shao B, Li H. Urinary levels of bisphenol analogues in residents living near a manufacturing plant in south China. *Chemosphere*, 2014b, 112: 481-486
240. Ye L, Su ZJ, Ge RS. Inhibitors of testosterone biosynthetic and metabolic activation enzymes. *Molecules*, 2011, 16(12): 9983-10001
241. Yin K, Wang D, Zhao H, Wang Y, Zhang Y, Liu Y, Li B, Xing M. Polystyrene microplastics up-regulates liver glutamine and glutamate synthesis and promotes autophagy-dependent ferroptosis and apoptosis in the cerebellum through the liver-brain axis. *Environ Pollut*, 2022, 307: 119449
242. Yu Y, Xin X, Ma F, Li X, Wang Y, Zhu Q, Chen H, Li H, Ge RS. Bisphenol AF blocks Leydig cell regeneration from stem cells in male rats. *Environment Pollution*, 2022a, 298: 118825
243. Yu YG, Xin X, Ma FF, Li XH, Wang YY, Zhu QQ, Chen HQ, Li HT, Ge RS. Bisphenol AF blocks Leydig cell regeneration from stem cells in male rats. *Environmental Pollution*, 2022b, 298:
244. Yuan Y, Guo JZ, Zhou QX. The homeostasis of iron and suppression of HO-1 involved in the protective effects of nimodipine on neurodegeneration induced by aluminum overloading in mice. *Eur J Pharmacol*, 2008, 586(1-3): 100-105
245. Yue H, Yang X, Wu X, Tian Y, Xu P, Sang N. Identification of risk for ovarian disease enhanced by BPB or BPAF exposure. *Environ Pollut*, 2023, 319: 120980
246. Zhang HFM, Ye X, Su Y, Yuan J, Liu Z, Stein DA, Yang DC. Cocksackievirus B3 Infection Activates the Unfolded Protein Response and Induces Apoptosis through Downregulation of p58 and Activation of CHOP and SREBP1. *Journal of Virology*, 2010, 84(17): 8446-8459
247. Zhang WW, Geng X, Dong Q, Li XH, Ye P, Lin MY, Xu B, Jiang H. Crosstalk

between autophagy and the Keap1-Nrf2-ARE pathway regulates realgar-induced neurotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology*, 2023, 301:

248. Zhao C, Yu D, He Z, Bao L, Feng L, Chen L, Liu Z, Hu X, Zhang N, Wang T, Fu Y. Endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy activation is involved in cadmium-induced ferroptosis of renal tubular epithelial cells. *Free Radic Biol Med*, 2021, 175: 236-248

249. Zhou BR, Liu J, Kang R, Klionsky DJ, Kroemer G, Tang DL. Ferroptosis is a type of autophagy-dependent cell death. *Seminars in Cancer Biology*, 2020a, 66: 89-100

250. Zhou N, Liu Y, Cao S, Guo R, Ma Y, Chen J. Biodegradation of bisphenol compounds in the surface water of Taihu Lake and the effect of humic acids. *Sci Total Environ*, 2020b, 723: 138164

251. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (Ros) and Ros-Induced Ros Release. *Physiological Reviews*, 2014, 94(3): 909-950