

· 论 著 ·

自噬在葡萄籽原花青素改善氟致 SH-SY5Y 细胞毒性中的作用*

龚泽林, 王本杰, 赵文欣, 杨 露

(石河子大学医学院预防医学系, 新疆 石河子 832002)

[摘要] 目的 探究自噬过程在葡萄籽原花青素提取物(GSPE)缓解氟致人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞毒性中的作用。方法 用氟化钠(60 mg/L)处理 SH-SY5Y 细胞 24 h 构建氟染毒细胞模型, 随机分为对照组、氟化钠组、氟化钠+低剂量 GSPE 组、氟化钠+中剂量 GSPE 组、氟化钠+高剂量 GSPE 组; 采用细胞计数试剂-8 法(CCK-8 法)检测各组细胞活力值变化; 采用 Hoechst33342 染色分析各组细胞凋亡水平变化; 采用免疫荧光方法分析各组细胞 LC3 表达情况; 采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 cleaved-caspase 3, cleaved-PARP、LC3、p62 等蛋白表达情况。随后纳入雷帕霉素重新分组, 检测各组 cleaved-PARP、LC3、p62 等蛋白表达情况, 并采用 Hoechst33342 染色分析各组细胞凋亡水平变化。结果 与对照组比较, 氟化钠组 SH-SY5Y 细胞凋亡水平显著提高($P < 0.05$), 经 GSPE 干预后细胞活力上升且细胞自噬水平上升($P < 0.05$)。与氟化钠组比较, 雷帕霉素干预可以有效抑制细胞凋亡, 且雷帕霉素与原花青素联合后细胞自噬水平进一步提升($P < 0.05$)。结论 GSPE 能够抑制氟化钠诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡, 其作用可能与激活自噬有关。

[关键词] 葡萄籽原花青素; 氟化钠; 人神经母细胞瘤细胞; 自噬

DOI: 10.3969/j.issn.1009-5519.2024.20.004 中图法分类号: R739.9

文章编号: 1009-5519(2024)20-3440-07

文献标识码: A

Role of autophagy in improving fluoride-induced SH-SY5Y cytotoxicity
by grape seed proanthocyanidins*

GONG Zelin, WANG Benjie, ZHAO Wenxin, YANG Lu

(Department of Preventive Medicine, Medical College of Shihezi University,
Shihezi, Xinjiang 832002, China)

[Abstract] **Objective** To explore the role of autophagy in improving fluoride-induced SH-SY5Y cytotoxicity by grape seed proanthocyanidins(GSPE) in human neuroblastoma. **Methods** SH-SY5Y cells were treated with sodium fluoride(60 mg/L) for 24 h to establish a fluoride-infected cell model, and then were randomly divided into the control group, sodium fluoride-infected group, sodium fluoride+low dose GSPE group, sodium fluoride+middle dose GSPE group and sodium fluoride+high dose GSPE group. The cell viability values of each group were detected by CCK-8 assay. Hoechst33342 staining was used to analyze the apoptosis level of each group. Immunofluorescence method was used to analyze the expression of LC3 in each group. The expressions of cleaved-caspase 3, cleaved-PARP, LC3, and p62 were detected by Western blot. Subsequently, Rapamycin was included in the regrouping, and the expressions of cleaved-PARP, LC3, p62 and other proteins in each group were detected, and the changes of apoptosis level in each group were analyzed by Hoechst33342 staining. **Results** Compared with the control group, the apoptosis level of SH-SY5Y cells in the sodium fluoride group was significantly increased($P < 0.05$), while the cell viability and autophagy level of SH-SY5Y cells were increased after GSPE intervention($P < 0.05$). Compared with the sodium fluoride group, Rapamycin intervention could effectively inhibit apoptosis, and the autophagy level was further enhanced in the combination of rapamycin and GSPE together($P < 0.05$). **Conclusion** GSPE can inhibit SH-SY5Y cell apoptosis induced by NaF, and this role may be related to the activation of autophagy.

* 基金项目: 石河子大学自主支持立项项目(ZZZC202015A); 石河子大学高层次人才项目(RCZK201954); 石河子大学创新发展项目(CXFZ20218)。

作者简介: 龚泽林(1998—), 硕士研究生, 主要从事环境毒理学方面的研究。△ 通信作者, E-mail: 522107143@qq.com。

[Key words] Grape seed proanthocyanidins; Sodium fluoride; Human neuroblastoma cells; Autophagy

氟化物广泛地存在于环境介质中,且地域分布具有显著差异^[1]。长期暴露于高氟环境中会增加罹患地方性氟中毒(简称氟中毒)的风险,导致人体各器官功能障碍^[2]。有研究发现,氟可穿过血脑屏障和胎盘屏障,进而在脑组织中蓄积,造成脑组织发育障碍,导致智力水平和学习记忆能力下降^[3-4]。经氟染毒后大鼠后代海马组织中神经元数量减少、形态结构不规则,且记忆水平和空间探索能力均显著降低^[5]。且长期接触氟化物的工人也出现了呕吐、头晕、头痛等不适症状^[6]。综上所述,过量氟化物暴露能够造成神经毒性,而针对氟中毒的有效治疗药物还较为欠缺。

自噬是一种进化上相对保守的细胞内系统,通过将细胞质内多余的组分(包括破碎的细胞器和错误折叠蛋白等)运送至溶酶体中进行降解与回收。当自噬过程受到抑制,细胞内多余有害成分积累,造成细胞死亡^[7]。大多数神经细胞不可再生,无法通过分裂增殖清除胞内错误折叠蛋白和受损细胞器。因此,自噬对胞内有害物质的清除以维持神经细胞正常生理功能至关重要。前期研究发现,氟化物能造成自噬过程障碍,导致大鼠学习记忆能力下降及神经细胞凋亡^[8]。因此,是否能够通过增强自噬过程进而减轻氟中毒症状是本研究的核心问题。

葡萄籽原花青素提取物(GSPE)是具有特殊分子结构的天然生物类黄酮混合物,具有良好的抗氧化、炎症、肿瘤发生的生物学活性^[9]。有研究发现,葡萄籽原花青素在缓解神经毒性中发挥着重要作用^[10],而葡萄籽原花青素能否缓解氟致神经毒性还鲜见报道,且其具体机制尚不完全明确。因此,本研究通过建立氟染毒 SH-SY5Y 细胞模型,探究自噬在葡萄籽原花青素对氟神经毒性保护中的作用。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 超净工作台、CO₂ 培养箱、高速冷冻离心机、Nanodrop、全波长酶标仪(美国赛默飞公司)、电泳仪、电转仪(美国 Bio-Rad 公司)、全自动化学发光成像系统(上海天能公司)、倒置荧光显微镜(日本尼康公司)、台式恒温摇床(无锡玛瑞特公司)、氟化钠(NaF,分析纯,美国 Sigma 公司)、GSPE(纯度 >95%,索莱宝公司,SP8520)、雷帕霉素(RAPA,索莱宝公司,R8140)、cleaved-caspase 3(美国 Cell Signaling Technology 公司)、cleaved-PARP、p62、LC3、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔/鼠(美国 Pro-

teintech 公司)、CCK-8 试剂盒(米鼠生物公司)、电泳电转相关试剂(德国 BioFroxx 公司)、特级胎牛血清(美国 Biological Industries 公司)、胰酶、1%青/链霉素(索莱宝公司)、其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞由石河子大学医学院牛强副教授惠赠。从 -80 °C 冰箱取出 SH-SY5Y 细胞株置于 37 °C 恒温水浴锅轻轻摇晃复苏,培养在含有 1%青/链霉素、10%新鲜胎牛血清的完全培养基中,并置于 37 °C、5% CO₂、95% 相对饱和湿度的细胞培养箱中继续培养,待细胞密度生长至 80%~90% 进行后续实验。

1.2.2 氟染毒模型的建立及确定葡萄籽原花青素最适干预剂量 待细胞生长至适宜密度后,对细胞施加不同剂量 NaF(10、20、40、60、80、100、120 mg/L)处理不同时间(12、24、36、48 h),观察细胞活力变化选择后续实验中氟化钠染毒模型的处理浓度与处理时间。随后建立一系列 GSPE 浓度梯度(2.5、5、10、20、30、40、50、60 mg/L),排除对细胞活力有抑制作用的剂量后,对细胞进行 GSPE 预处理 1 h 后,再加入 60 mg/L NaF 共同孵育 24 h,通过测定细胞活力确定 GSPE 最适干预剂量。

1.2.3 实验分组 设置对照组、NaF 组、低、中、高剂量 GSPE 干预组,加入 NaF 前对细胞进行 GSPE 预处理 1 h,随后共同在培养箱中孵育 24 h。为进一步探究 GSPE 对自噬过程的影响,加入自噬激活剂 RAPA,设置对照组、NaF 组、GSPE 对照组、GSPE 干预组、RAPA 对照组、RAPA 干预组、RAPA+GSPE 干预组,先对细胞进行 1 h RAPA 预处理,再进行 1 h GSPE 预处理,随后加入 NaF 共同孵育 24 h。

1.2.4 细胞活力检测 按照每孔 6 000 个将细胞均匀地接种在 96 孔板中,置于培养箱中 24 h 后按上述操作进行染毒干预操作后。吸出旧培养基,加入 200 μL 磷酸盐缓冲液(PBS)轻轻清洗细胞 2 次,随后每孔加入 100 μL 细胞计数试剂盒-8(CCK-8)工作液(按 CCK-8 原液:DMEM 培养基=1:10 配制),置于 37 °C 培养箱避光孵育 1 h 后,在酶标仪 450 nm 波长下测定吸光度值(A),按照公式:(A_{处理组} - A_{空白组})/(A_{对照组} - A_{空白组}) × 100%,计算细胞活力值。每个处理设置 6 个复孔。

1.2.5 Hoechst33342 荧光测定 将细胞均匀地铺在

48 孔板中,置于培养箱生长 24 h 后进行后续实验。按上述染毒干预方式处理后,弃去旧培养液,每孔加入 200 μ L PBS 清洗 2 次,随后在每孔加入 200 μ L Hoechst33342 染料工作液(浓度为 5 μ g/mL)置于培养箱中避光孵育 30 min,弃去染液加入 PBS 在荧光显微镜下选择 DAPI 滤光器(激发波长为 350 nm,发射波长为 460 nm)观察。

1.2.6 LC3 免疫荧光测定 将细胞均匀地铺在 48 孔板中,待细胞生长至形态完整、数量适宜时进行后续实验。按上述染毒干预方式处理后,弃去旧培养液,然后用 PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。4%多聚甲醛固定细胞 30 min 后用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min。0.1% TritonX-100 通透 10 min 后 PBS 清洗 3 次,每次 5 min。用 2%牛血清蛋白室温封闭 1 h 后,加入 LC3(1:250)一抗在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜,PBS 清洗 3 次,每次 5 min。室温避光孵育二抗 2 h,PBS 清洗 3 次,每次 5 min。加入 DAPI 工作液(10 μ g/mL)室温避光孵育 7 min,PBS 清洗 3 次,每次 5 min。使用荧光显微镜对细胞进行观察和拍照。

1.2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 按照上述方法处理各组细胞。使用 RIPA 裂解工作液提取总蛋白,过程中使用冰盒减缓蛋白降解。使用 Nanodrop 仪检测并标准化各组总蛋白浓度。选择 10%~12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳将不同分子量蛋白分离,并转移到聚偏氟乙烯膜(PVDF)上,用 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h。用 Tris-

HCL 缓冲液(TBST)清洗膜 3 次,每次 7 min。随后将 PVDF 膜置于一抗中 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,用 TBST 清洗膜 3 次,每次 7 min。用滤纸去除 PVDF 膜上残留液体后置于二抗中,室温孵育 2 h。将增强型 ECL 化学发光液均匀滴在 PVDF 膜上,每条膜曝光时间最长不超过 60 s,并使用 Image J 软件对条带进行定量分析,每种蛋白条带均重复 3 次实验。

1.3 统计学处理 应用 GraphPad Prism 8.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间总体均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 GSPE 提升了 NaF 染毒 SH-SY5Y 细胞活力 与对照组比较,NaF 以剂量与时间依赖性降低 SH-SY5Y 细胞活力。当处理时间为 24 h,NaF 处理剂量为 60 mg/L 时细胞活力下降至 60%左右,对细胞活力有显著抑制且细胞状态尚可,可进行后续干预实验,见表 1。与对照组比较,GSPE 处理剂量超过 60 mg/L 时,对细胞活力有显著抑制($P < 0.05$)。与 NaF 组[(56.20 \pm 1.02)%]比较,当 GSPE 干预浓度为 10、20 mg/L 时细胞活力分别为(82.19 \pm 5.68)%、(74.86 \pm 2.23)%,对细胞活力有显著提升($P < 0.05$),而当 GSPE 干预浓度为 50 mg/L 时细胞活力为(34.80 \pm 1.21)%,较 NaF 组细胞活力降低($P < 0.05$)。当 GSPE 干预浓度为 10 mg/L 时,对细胞活力提升作用最佳。

表 1 不同浓度、不同时间 NaF 对 SH-SY5Y 细胞活力的影响($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

时间	对照组	10 mg/L	20 mg/L	40 mg/L	60 mg/L	80 mg/L	100 mg/L	120 mg/L
12 h	100.00 \pm 4.94	94.58 \pm 1.21	93.49 \pm 1.09	81.55 \pm 1.19 ^a	70.19 \pm 1.78 ^a	60.64 \pm 0.90 ^a	52.38 \pm 0.46 ^a	41.81 \pm 1.96 ^a
24 h	100.00 \pm 3.28	94.79 \pm 2.05	94.10 \pm 2.33	87.47 \pm 2.36 ^a	63.69 \pm 2.15 ^a	51.30 \pm 0.32 ^a	47.17 \pm 0.80 ^a	38.23 \pm 1.01 ^a
36 h	100.00 \pm 1.21	98.39 \pm 0.92	97.06 \pm 0.41	85.68 \pm 0.56 ^a	53.23 \pm 0.20 ^a	39.32 \pm 0.61 ^a	31.19 \pm 0.16 ^a	25.46 \pm 0.45 ^a
48 h	100.00 \pm 1.52	108.96 \pm 1.24	101.94 \pm 0.55	95.62 \pm 3.32	72.01 \pm 0.77 ^a	62.99 \pm 3.42 ^a	50.54 \pm 0.09 ^a	49.43 \pm 1.20 ^a

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$ 。

2.2 GSPE 抑制了 NaF 所致 SH-SY5Y 细胞凋亡 Hoechst33342 荧光实验结果显示,与对照组比较,NaF 组细胞蓝色荧光强度明显上升($P < 0.05$),见图 1;而与 NaF 组相比,SH-SY5Y 细胞经 GSPE 预处理后蓝色荧光强度显著下降($P < 0.05$)。Western blot 实验结果显示,与对照组比较,NaF 组 cleaved-PARP、cleaved-caspase 3 表达量增加($P < 0.05$)。见图 1;与 NaF 组比较,GSPE 干预组 cleaved-PARP、cleaved-caspase 3 表达量明显降低($P < 0.05$),且不同浓

度 GSPE 干预后 cleaved-PARP、cleaved-caspase 3 表达量比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1。

2.3 GSPE 增强了 NaF 染毒 SH-SY5Y 细胞自噬过程 LC3 免疫荧光实验结果显示,与对照组相比,NaF 组红色荧光(LC3 荧光点)数量下降;与 NaF 比较,GSPE 干预组红色荧光数量显著增强。Western blot 实验结果同样显示,SH-SY5Y 细胞经 GSPE 预处理后 LC3-II 表达量显著升高($P < 0.05$),p62 表达量明显降低($P < 0.05$)。见图 2。

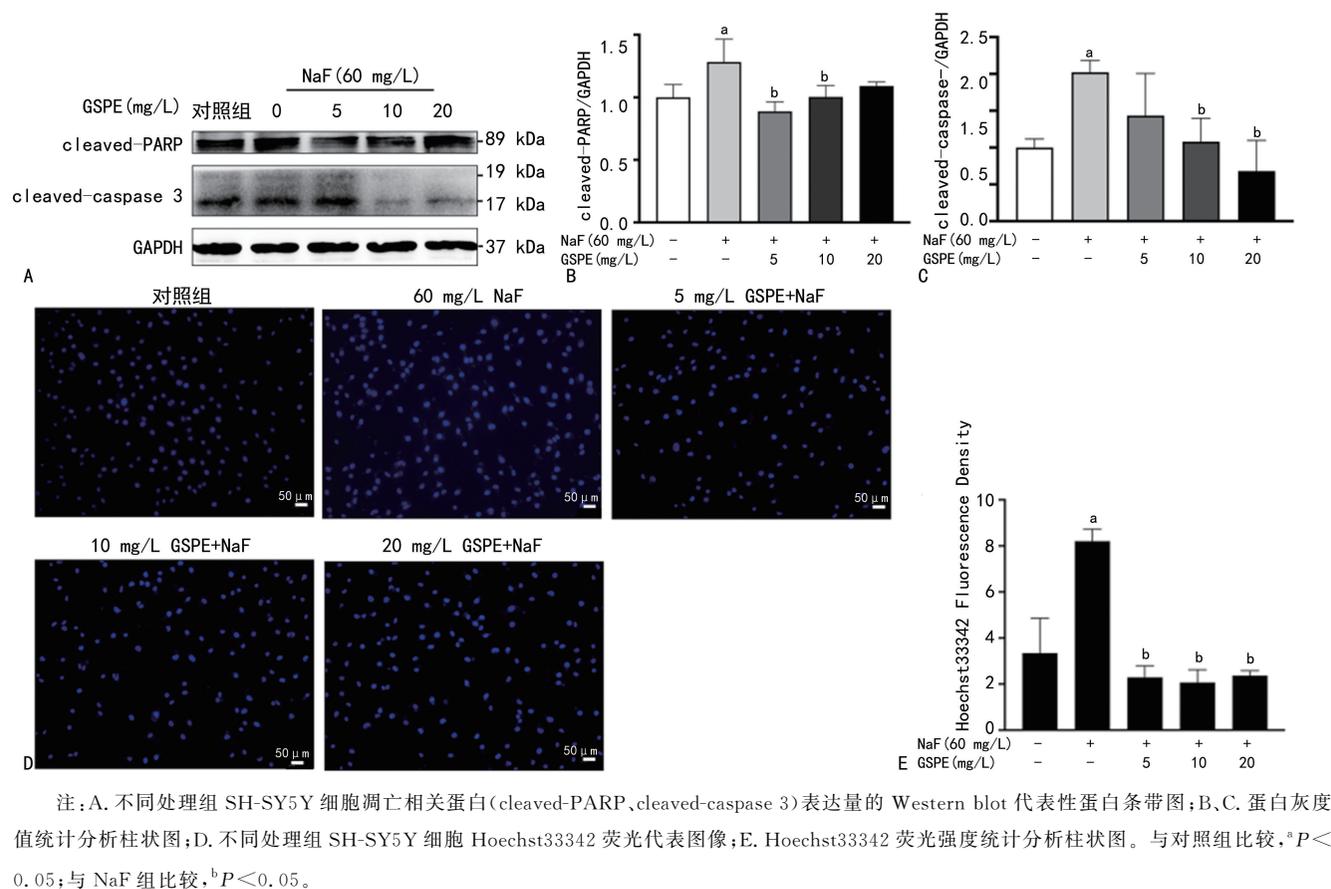


图 1 GSPE 对 NaF 诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响

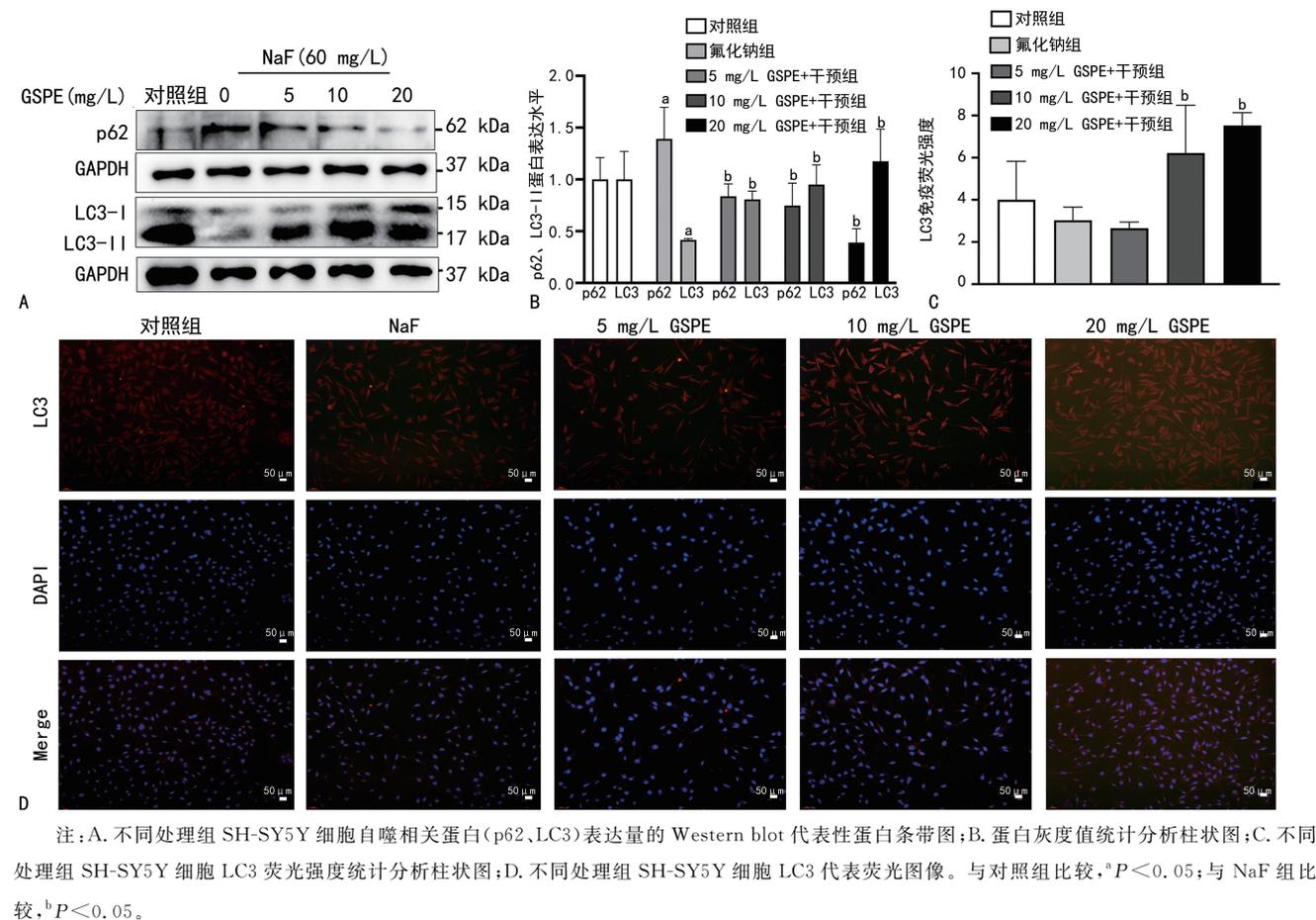
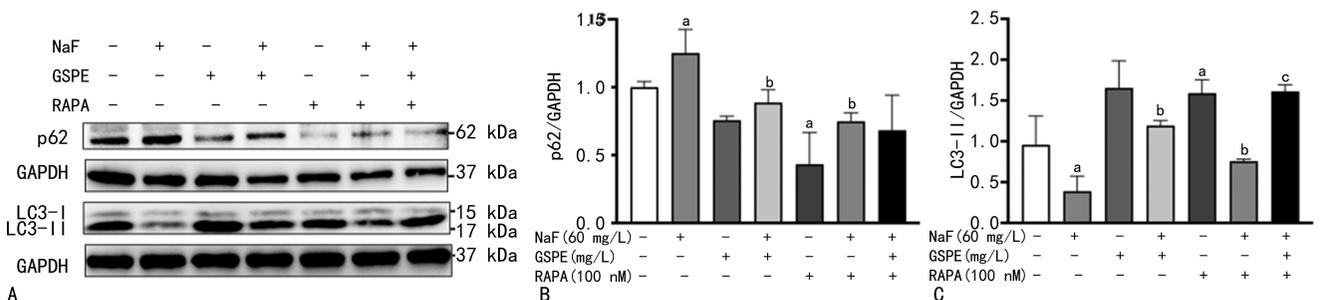


图 2 GSPE 促进 SH-SY5Y 细胞自噬过程

注: A. 不同处理组 SH-SY5Y 细胞自噬相关蛋白(p62、LC3)表达量的 Western blot 代表性蛋白条带图; B. 蛋白灰度值统计分析柱状图; C. 不同处理组 SH-SY5Y 细胞 LC3 荧光强度统计分析柱状图; D. 不同处理组 SH-SY5Y 细胞 LC3 代表荧光图像。与对照组比较, $^a P < 0.05$; 与 NaF 组比较, $^b P < 0.05$ 。

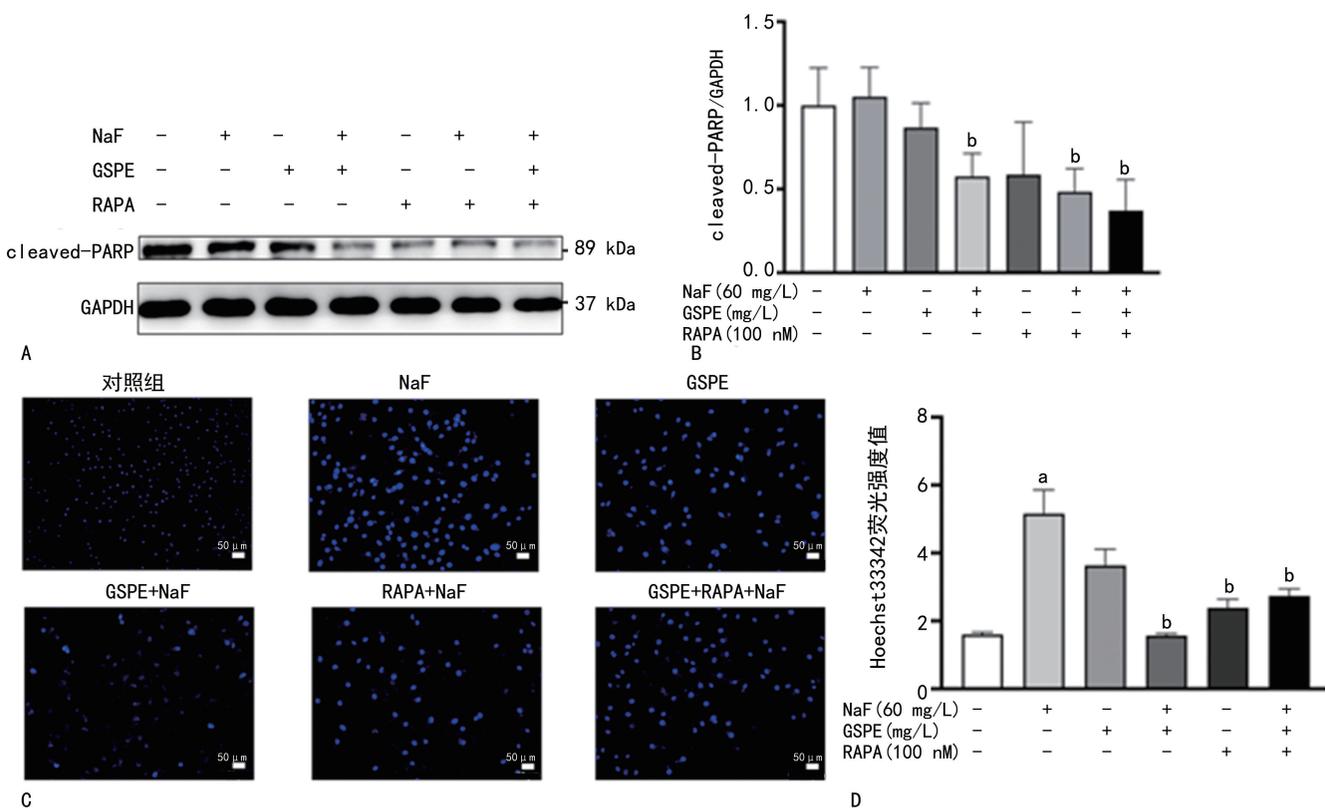
2.4 自噬激活剂 RAPA 对 GSPE 缓解 NaF 致 SH-SY5Y 细胞毒性的影响 根据课题组前期研究结果,本实验 RAPA 干预浓度为 100 nM。与对照组比较, RAPA 对照组 LC3-II 蛋白表达上升 ($P < 0.05$); 与 NaF 组比较, RAPA 干预组 LC3-II 蛋白表达量明显升高 ($P < 0.05$) (图 3), 而 cleaved-PARP 表达量显著

下降 ($P < 0.05$) (图 4)。而与 RAPA 干预组比较, RAPA 联合 GSPE 后 LC3-II 表达量进一步上升 ($P < 0.05$) (图 3)。Hoechst33342 荧光结果显示, 与 NaF 组比较, GSPE 与 RAPA 联合处理后细胞受损程度显著降低 (图 4)。



注: A. 不同处理组 SH-SY5Y 细胞自噬相关蛋白(p62、LC3)表达量的 Western blot 代表性蛋白条带图; B、C. 蛋白灰度值统计分析柱状图; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 NaF 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 RAPA 干预组(RAPA+NaF 组)比较, ^c $P < 0.05$ 。

图 3 自噬激活剂 RAPA 对 SH-SY5Y 细胞自噬的影响



注: A. 不同处理组 SH-SY5Y 细胞 cleaved-PARP 蛋白表达量的 Western blot 代表性蛋白条带图; B. 蛋白灰度值统计分析柱状图; C. 不同处理组 SH-SY5Y 细胞 Hoechst33342 荧光代表图像; D. Hoechst33342 荧光强度统计分析柱状图。与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 NaF 组比较, ^b $P < 0.05$ 。

图 4 自噬激活剂 RAPA 对 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响

3 讨论

地氟病是一种以氟斑牙、氟骨病等骨相损伤及机体其他器官功能损害等非骨相损伤为主要特征的地方性疾病, 具有显著的地域差异性。我国存在多个地

氟病区, 主要分布在西南、西北各省份, 氟中毒类型以煤烟型和饮水型为主。据统计, 目前我国氟中毒村落数量超过 70 000 余个, 约 7 000 万人受到氟中毒的影响^[11]。地方性氟中毒病情程度易受到自然环境氟

含量和暴露时间的影响,为了更好地在体外模拟地氟病暴露情况,本研究参考相关文献设置系列剂量梯度与时间梯度,根据 LD₅₀ 原则筛选最适氟染毒条件为 60 mg/L NaF 染毒 24 h。人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 具备神经细胞普遍特性,常被用于构建神经相关疾病的体外细胞模型,如阿尔茨海默症等^[12]。本研究结果显示,SH-SY5Y 细胞经 60 mg/L NaF 处理后凋亡率上升,且细胞活力显著下降,说明高剂量 NaF 可造成神经细胞毒性。

天然产物在预防和恢复环境毒物引起的疾病方面受到广泛关注。葡萄籽里富含多种花青素,纯度可达 99%,原花青素是一种具有特殊分子结构的天然生物类黄酮混合物,具有降低炎症和氧化活性的作用^[13]。最新研究发现,一种在原花青素降解过程中产生的糖醇具有良好的神经保护作用,并且原花青素对帕金森病情有明显改善作用^[14]。caspase 3 已被确定是调控凋亡的关键介质,与细胞色素 C 通过调节凋亡蛋白酶激活因子促进凋亡小体形成并启动凋亡程序,DNA 修复酶 PARP 能特异性识别 DNA 片段并启动修复程序,经 caspase 切割修饰后发挥生物学效应^[15]。有研究发现,经高浓度 NaF 处理后 SH-SY5Y 细胞 PARP 及 cleaved-caspase 3 表达量显著升高^[16]。本研究发现,与 NaF 组比较,经葡萄籽原花青素预处理后 SH-SY5Y 细胞活力升高,cleaved-caspase 3、cleaved-PARP 表达量显著降低,表明 GSPE 对氟致细胞毒性具有良好的改善作用。

细胞凋亡过程内部往往伴随着自噬失调,当细胞内部有害物质过度积累,自噬过程启动并将其包裹形成自噬小体运送至溶酶体代谢,自噬过程受阻时有害物质无法降解便会启动凋亡程序,细胞最终死亡。LC3 是反映自噬金指标分子,自噬过程启动后 LC3 由 LC3-I 活化为 LC3-II,后者是形成自噬体膜结构的重要部分。p62 偶联于 LC3,作为一种调节因子参与自噬体形成,在自噬中后期降解,自噬体与溶酶体通过膜融合形成自噬溶酶体,自噬体内物质最终被水解酶降解^[17]。本研究发现,NaF 处理后 SH-SY5Y 细胞 p62 表达量显著升高,提示自噬过程受到抑制导致 p62 降解受阻,并且 LC3-II 蛋白表达显著降低,说明经氟处理后细胞自噬过程受到抑制,最终造成细胞凋亡。而经 GSPE 预处理后,细胞自噬水平显著上升而凋亡水平下降,提示 GSPE 可能通过促进细胞自噬拮抗氟致神经毒性。为进一步明确原花青素对自噬的调节作用,本研究纳入了自噬激活剂 RAPA 进行对

照。有研究表明,RAPA 在缓解神经毒性方面具有显著疗效。本实验中,细胞经 RAPA 干预后自噬水平明显上升,而凋亡水平得到显著降低,将 RAPA 与 GSPE 进行联合干预,LC3 蛋白表达量较单独 RAPA 干预组进一步增多,而 PARP 蛋白表达较单独 RAPA 干预组相比显著降低,提示 GSPE 与 RAPA 具有协同效应,表明激活自噬是 GSPE 缓解氟致 SH-SY5Y 细胞毒性的重要机制。类似研究发现,GSPE 通过增强自噬改善了糖氧剥夺造成的 HT22 细胞毒性作用^[18],原花青素还可以通过调节自噬上游 PI3K/Akt 通路改善疾病症状^[19]。

综上所述,GSPE 能够促进 SH-SY5Y 细胞自噬过程,进而缓解 NaF 所致毒性,发挥神经细胞保护作用,对防治氟中毒具有一定启示作用,也为后续开发葡萄籽原花青素药用价值提供参考。

参考文献

- [1] SOLANKI Y S, AGARWAL M, GUPTA A B, et al. Fluoride occurrences, health problems, detection, and remediation methods for drinking water: a comprehensive review [J]. *Sci Total Environ*, 2022, 807 (Pt 1): 150601.
- [2] LI Y W, LIU Y W, YI J N, et al. The potential risks of chronic fluoride exposure on nephrotoxic via altering glucolipid metabolism and activating autophagy and apoptosis in ducks [J]. *Toxicology*, 2021, 461: 152906.
- [3] MCPHERSON C A, ZHANG G Z, GILLIAM R, et al. An evaluation of neurotoxicity following fluoride exposure from gestational through adult ages in long-evans hooded rats [J]. *Neurotox Res*, 2018, 34 (4): 781-798.
- [4] FARMUS L, TILL C, GREEN R, et al. Critical windows of fluoride neurotoxicity in Canadian children [J]. *Envir Res*, 2021, 200: 111315.
- [5] CANTORAL A, TÉLLEZ-ROJO M M, MALIN A J, et al. Dietary fluoride intake during pregnancy and neurodevelopment in toddlers: a prospective study in the progress cohort [J]. *Neurotoxicology*, 2021, 87: 86-93.
- [6] MIRANDA G H N, ALVARENGA M O P, FERREIRA M K M, et al. A systematic review and meta-analysis of the association between

- fluoride exposure and neurological disorders [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):22659.
- [7] LIU S Z, YAO S J, YANG H, et al. Autophagy: regulator of cell death[J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(10):648.
- [8] ZHOU G Y, TANG S, YANG L, et al. Effects of long-term fluoride exposure on cognitive ability and the underlying mechanisms: role of autophagy and its association with apoptosis [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 378: 114608.
- [9] RODRÍGUEZ-PÉREZ C, GARCÍA-VILLANOVA B, GUERRA-HERNÁNDEZ E, et al. Grape seeds proanthocyanidins: an overview of in vivo bioactivity in animal models [J]. *Nutrients*, 2019, 11(10):2435.
- [10] ABDOU H M, ABD ELKADER H T A E, EL-GENDY A H, et al. Neurotoxicity and neuroinflammatory effects of bisphenol A in male rats: the neuroprotective role of grape seed proanthocyanidins[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2022, 29(6):9257-9268.
- [11] 范淑玲. “十三五”期间我国地方性氟中毒防制现状[J]. *环境与职业医学*, 2020, 37(12):1219-1223.
- [12] YANG T X, ZHU Y F, WANG C C, et al. EPA-enriched plasmalogen attenuates the cytotoxic effects of LPS-stimulated microglia on the SH-SY5Y neuronal cell line[J]. *Brain Res Bull*, 2022, 186:143-152.
- [13] ZHANG H H, LANG W Y, LIU X, et al. Procyanidin a1 alleviates DSS-induced ulcerative colitis via regulating AMPK/mTOR/p70S6k-mediated autophagy [J]. *J Physiol Biochem*, 2022, 78(1):213-227.
- [14] PASINETTI G M, KSIEZAK-REDING H, SAN-TAMARIA I, et al. Development of a grape seed polyphenolic extract with anti-oligomeric activity as a novel treatment in progressive supranuclear palsy and other tauopathies[J]. *J Neurochem*, 2010, 114(6):1557-1568.
- [15] MA X X, HAO J N, WU J R, et al. Prussian blue nanozyme as a pyroptosis inhibitor alleviates neurodegeneration[J]. *Adv Mater*, 2022, 34(15):e2106723.
- [16] 李新颖, 于星辰, 张舜, 等. 氟中毒对神经细胞线粒体功能及凋亡的影响[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2021, 50(5):555-560.
- [17] LIM J, KIM H W, YOUNG M B H, et al. Binding preference of p62 towards LC3-II during dopaminergic neurotoxin-induced impairment of autophagic flux[J]. *Autophagy*, 2011, 7(1):51-60.
- [18] 涂幸, 罗利, 刘艺琳, 等. 葡萄籽原花青素提取物对 HT22 细胞糖氧剥夺损伤的保护作用[J]. *神经解剖学杂志*, 2020, 36(1):57-64.
- [19] 张毅, 马丹丹, 龚齐, 等. 莲房原花青素调控 RAC1/PI3K/Akt 信号途径抑制结肠癌的增殖, 迁移与侵袭[J]. *医学研究生报*, 2021, 34(6):580-585.

(收稿日期:2024-02-27 修回日期:2024-06-19)