

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.01.002

三种固定液对两种氧化应激细胞模型 Beclin1 和 LC3 蛋白 免疫荧光染色的影响 *

宗毓麟¹ 于雪¹ 刘畅² 刘锦钢¹ 李昱达¹ 汤阳^{1Δ} 王淑艳¹ 张淑静¹ 刘燕^{1Δ}

(1 北京中医药大学中医学院 北京 102488; 2 北京中医药大学生命科学院 北京 102488)

摘要 目的:比较采用三种不同的固定液对两种氧化应激细胞模型 Beclin1 和 LC3 蛋白免疫荧光染色的影响。**方法:**本研究使用丙酮/甲醇(1:1)固定液、甲醇固定液和 4%多聚甲醛三种固定液分别对氧化应激细胞模型大鼠原代心肌成纤维细胞和 MCF-7 乳腺癌细胞株进行固定,然后再分别进行免疫荧光双染实验,对比三种固定液固定后对自噬关键调控蛋白 Beclin1 和 LC3 染色效果。**结果:**三种固定液对氧化应激细胞模型 Beclin1 和 LC3 蛋白免疫荧光染色结果存在较大差异。丙酮/甲醇(1:1)固定液固定后免疫荧光染色效果最佳,细胞结构清晰可见,两种蛋白定位表达清晰,甲醇固定液次之,4%多聚甲醛固定液效果欠佳。**结论:**在对大鼠原代心肌成纤维细胞和 MCF-7 乳腺癌细胞进行自噬相关蛋白免疫荧光双染色实验中,在使用其它固定液染色效果不佳的情况下,可以选择应用丙酮/甲醇(1:1)固定液固定,再进行免疫荧光染色;根据不同实验需求相应选择更适宜的固定液,以达到最佳的荧光染色结果。

关键词:固定方法;氧化应激;免疫荧光;乳腺癌细胞;心肌成纤维细胞

中图分类号:R-33;Q5-3;Q593 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2023)01-09-05

Effects of Three Kinds of Fixatives on Immunofluorescence Staining of Beclin1 and LC3 Proteins in Two Hypoxic Cell Models*

ZONG Yu-lin¹, YU Xue¹, LIU Chang², LIU Jin-gang¹, LI Yu-da¹, TANG Yang^{1Δ}, WANG Shu-yan¹, ZHANG Shu-jing¹, LIU Yan^{1Δ}

(1 College of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of traditional Chinese Medicine, Beijing, 102488, China;

2 College of Life Sciences, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing, 102488, China)

ABSTRACT Objective: To compare the effects of three different fixation solutions on immunofluorescence staining of Beclin1 and LC3 proteins in two hypoxic cell models. **Methods:** In this study, primary myocardial fibroblasts and MCF-7 breast cancer cell lines of hypoxic cell models were fixed with acetone/methanol (1:1), methanol and 4% paraformaldehyde, respectively, and then double immunofluorescence staining were carried out to compare the staining effects of the three fixatives on the key autophagy regulatory proteins Beclin1 and LC3. **Results:** There were significant differences in the results of immunofluorescence staining of Beclin1 and LC3 proteins in two hypoxic cell models with three kinds of fixed solutions. The best effect of immunofluorescence staining was fixed by acetone/methanol (1:1). The localization and expression of the two proteins could be seen clearly, while methanol, and 4% paraformaldehyde appeared poor effect. **Conclusions:** In the autophagy-associated protein immunofluorescence double staining experiment of cardiac fibroblasts and MCF-7 breast cancer cells, when other fixatives are used and the staining effect is worse, acetone/methanol (1:1) fixation solution is a good choice before immunofluorescence staining. Moreover, choosing a more suitable fixation solution according to different experimental requirements could help to achieve the best fluorescence staining results.

Key words: Fixation; Oxidative stress; Immunofluorescence; Breast cancer cells; Cardiac fibroblasts

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q5-3; Q593 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)01-09-05

前言

免疫组织化学的原理是抗原抗体反应和组织化学呈色反应,在抗体特异性显色后,对其进行定性、定位和半定量测定。免疫荧光染色法是常用的免疫组织化学方法之一,原理是以荧光物质标记抗体而进行抗原定位,具有特异性强、灵敏度高、检

测速度快等优点,因而被广泛应用于病理学等研究中。恰当的组织处理是做好免疫荧光的重要前提^[1],其中,组织的固定是决定染色成功与否的关键所在,选用合适的固定液直接关系到染色的效果。例如,林国豪等^[2]研究发现,6种不同固定液均可使融合了 RFP 和 GFP 基因的鼻咽癌细胞内的荧光蛋白淬灭,且对核蛋白及胞浆蛋白影响不同。氧化应激是指细胞受活性氧化

* 基金项目:国家自然科学基金项目(82004337);中央高校基本科研业务费自主选题(2021-SYJS-002;2019-XJ-SYJJ-010)

作者简介:宗毓麟(1996-),男,硕士研究生,主要研究方向:辨证论治规律研究,E-mail: zongyulin163@163.com

Δ 通讯作者:汤阳(1991-),男,博士,讲师,主要研究方向:从事伤寒论教学及经方的临床与基础研究;

刘燕(1974-),女,硕士,高级实验师,主要研究方向:神经精神疾病病证结合研究,E-mail: liuy806@163.com

(收稿日期:2022-03-25 接受日期:2022-04-20)

物攻击而引起细胞损伤,在临床报道中与多种疾病发病机制密切相关,建立可靠的氧化应激模型,对于揭示氧化应激机制具有重要意义^[9]。本文探究了三种不同固定液对心肌纤维细胞和 MCF-7 乳腺癌细胞株为基础的氧化应激模型 Beclin1(自噬效应蛋白)和 LC3(微管相关蛋白 1A/1B- 轻链 3)免疫荧光染色的影响,以期氧化应激细胞模型 Beclin1 和 LC3 蛋白免疫荧光染色中固定液的选择提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

胎牛血清(翱擎)、胶原酶 II(Gene-bio)、0.25%胰蛋白酶消化液(含 EDTA,翱擎)、DMEM 培养基(Invitrogen)、RPMI1640 培养基(Hyclone)、DMSO(Sigma)、自噬相关蛋白 LC3 抗体(Proteintech, 14600-1-AP) 和 Beclin1 抗体(Proteintech, 66665-1-Ig)、荧光二抗(Proteintech, SA00013-1、SA00013-4),含 DAPI 封片剂(北京索莱宝),甲醇(国药),丙酮(国药),4%多聚甲醛(索莱宝),其他细胞培养相关试剂与耗材均购于北京索莱宝公司;乳腺癌细胞系 MCF-7 购于国家实验细胞资源共享平台(北京总部),乳鼠(SD,北京维通利华实验动物技术有限公司);三气培养箱(Thermo, 160i),Revolve FL 型正倒置一体荧光显微镜(Echo)。

1.2 方 法

1.2.1 心肌纤维细胞的原代培养及氧化应激细胞模型的制备 采用出生 7 天的乳鼠,取出其心脏,放入提前准备好的灭菌处理烧杯中,烧杯中已提前倒入 95%乙醇,将大鼠浸入,几秒钟后用镊子夹出。剪开胸部皮肤,暴露出胸腔,剪取心脏,将心脏放入冰冷的 PBS 中(4℃),剪除心脏周围血管等其它组织,并洗去表面残留的红细胞,将大鼠心脏置于高温高压灭菌后的玻璃皿中,PBS 漂洗三次,置入另一事先准备好的小型培养皿中,将糊状的心肌组织和 3 mL 的 II 型胶原酶(浓度为 1 mg/mL)混悬液吸入 15 mL 的离心管中,放入 37℃震荡 CO₂ 培养箱中消化 5 min,取出后静置于试管架上,待混悬液分层后,用吸管轻轻吸取上清液,勿用力吸取以免吸入沉淀,吸取后置于离心管中。加入 2 mL II 型胶原酶于沉淀中,放入 37℃震荡 CO₂ 培养箱中消化 5 min,静置 2 min,吸取上清液,重复上述步骤共 4 次,直到细胞彻底消化完成。将每次吸入离心管中的上清液离心后接种细胞于 10%的胎牛血清的 DMEM 培养基中,3 h 后弃掉培养基,加入新鲜的培养基,传代培养第 2 代和第 3 代时,将细胞按照 1×10^5 个/mL,接种于 24 孔板中,根据实验室经验,选择过氧化氢的最佳作用浓度为 100 μ mol/L 作用 2 h,诱导心肌成纤维细胞氧化应激细胞模型,进行后续的免疫荧光实验等检测。

1.2.2 MCF-7 乳腺癌细胞株的培养及氧化应激细胞模型的制备 取出 -80℃冰箱中的 MCF-7 细胞株进行复苏,之后使用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,当传代至 2-3 代时,观察到细胞的培养状态良好,将细胞按照 1×10^5 个/mL,接种于 24 孔板中,根据实验室经验,选择过氧化氢的最佳作用浓度为 100 μ mol/L 作用 2 h,诱导乳腺癌细胞株细胞氧化应激细胞模型,即进行免疫荧光实验。

1.2.3 细胞固定 (1)弃除培养基,用复温的 PBS 轻柔冲洗 3 次。(2)细胞固定:分别用丙酮/甲醇(1:1)固定液、甲醇固定液

和 4%多聚甲醛固定液固定细胞,将细胞完全覆盖为准,常温固定 20 min。除去固定液,PBS 洗 3 次,每次 5 min。(3)透化:将 0.2% Triton X-100 用 PBS 稀释为浓度 0.1%的溶液,覆盖细胞表面室温 10 min,然后 PBS 洗 5 min $\times$ 3 次。(4)封闭:加入 5% BSA-PBS 使样品完全浸没,37℃封闭 60 min,封闭时可置于摇床缓慢摇动效果更佳。封闭之后不用洗涤,但须将多余的封闭液吸去,以避免将一抗稀释。

1.2.4 免疫荧光反应 (1)一抗孵育:用封闭液稀释一抗。如在爬片上滴加适量稀释后的一抗,使样片完全浸没,24 孔板 250 μ L。保湿 4℃过夜。次日吸出多余一抗,用 PBS 洗 3 次,每次 5 min,孵育后的洗涤一定要彻底。荧光双染步骤同单染,只需将抗体按各自稀释比例稀释混合后一起孵育。(2)二抗孵育:除去余液,滴加适量荧光素标记二抗,方法同前,37℃避光孵育 1 h。然后 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。荧光双染二抗配制及孵育方法同一抗。(3)DAPI:用 PBS 将 10 μ g/mL DAPI-PBS 稀释 20 倍即 0.5 μ g/mL DAPI-PBS,滴加覆盖样品,避光孵育 5 min。然后用去离子水清洗 3 次,每次 5 min。(4)封片:上述步骤完成后,吸尽液体,滴加一滴抗荧光衰减封片剂于载玻片上,将细胞爬片正面从一侧缓慢的盖到载玻片另一侧,让细胞接触封片液,尽量避免气泡。共聚焦培养皿则只需滴加封片剂没过细胞即可。封片后避光,锡箔纸包住,进行荧光拍摄。

2 结 果

2.1 心肌纤维细胞培养状态观察

按上述方法进行心肌成纤维细胞原代培养,观察到心肌成纤维细胞生长速度快,生长状态良好,结果见图 1。

2.2 MCF-7 乳腺癌细胞培养状态观察

乳腺癌细胞复苏后传至 2 到 3 代时观察到细胞生长状态良好,结果见图 2。

2.3 心肌成纤维细胞氧化应激模型使用三种固定液后免疫荧光染色结果

使用 3 种固定液固定心肌成纤维细胞后进行免疫荧光染色,镜下观察到采用丙酮/甲醇(1:1)固定液固定的心肌成纤维细胞两种蛋白染色效果最好,能够清晰地观察到两种蛋白定位表达情况;甲醇固定液固定后染色效果优于多聚甲醛固定液。结果见图 3。

2.4 MCF 乳腺癌细胞氧化应激模型使用三种固定液后免疫荧光染色结果

与固定心肌成纤维细胞相同,MCF-7 乳腺癌细胞也采用前述的 3 种不同固定液固定后进行免疫荧光染色,镜下观察到采用丙酮/甲醇(1:1)固定液固定的 MCF-7 乳腺癌细胞两种蛋白染色效果最好,能够清晰地观察到两种蛋白定位表达情况;甲醇固定液固定后染色效果优于多聚甲醛固定液。结果见图 4。

3 讨 论

细胞和组织的固定是细胞生物学研究的免疫荧光和免疫组织化学等生物技术的基本过程。免疫荧光实验结果准确性的关键在于选取合适的固定液进行固定。良好的固定可保持细胞原有形态结构的完整。固定液能阻止溶酶体自溶细胞和组织,使细胞中的蛋白质、脂肪、酶等成分保持原有形态,产生不同折

光率,便于染色和观察。固定液分为醛类、氧化剂类、醇类等,常用的有甲醛、甲醇和乙醇等。其中,醛类固定剂通过交联作用形成抗原遮蔽,会对染色效果产生一定影响,如采用甲醛固定可使抗原发生改变,降低其敏感性。丙酮因其良好的渗透性和脱水性而常用于冷冻切片和细胞涂片固定,且冷丙酮(4℃)可以很好地保存一些较脆弱的抗原。有文献报道,醛类固定剂中,戊二醛可使蛋白质高度交联,在保存超微结构和组织完整性上优于4%多聚甲醛^[1]。4%多聚甲醛可显著影响细胞的整体和局部折

射率,在定量时相成像中具有显著影响^[5]。在确定激素和 HER-2 受体表达状态方面,用福尔马林固定细胞学乳腺癌标本和制备细胞块材料是最好和最可靠的结果^[10]。在单细胞转录研究中,甲醇固定后的细胞和活细胞在 scRNA-seq 数据方面表现基本相似,表明甲醇固定在单细胞转录中表现良好。乙醇固定会导致的 PD-L1 免疫染色减少^[6],引起的 PD-L1 免疫反应性降低对临床实践具有重要意义。

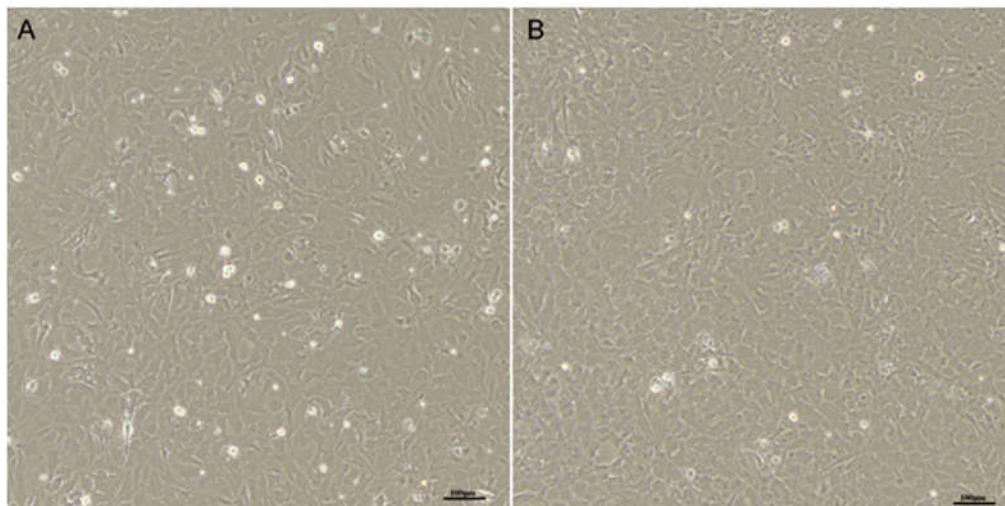


图 1 心肌成纤维细胞培养结果(A:第 3 天;B:传代后 10 × 10)

Fig. 1 Results of cardiac fibroblast culture (A: day 3, B: after passage)

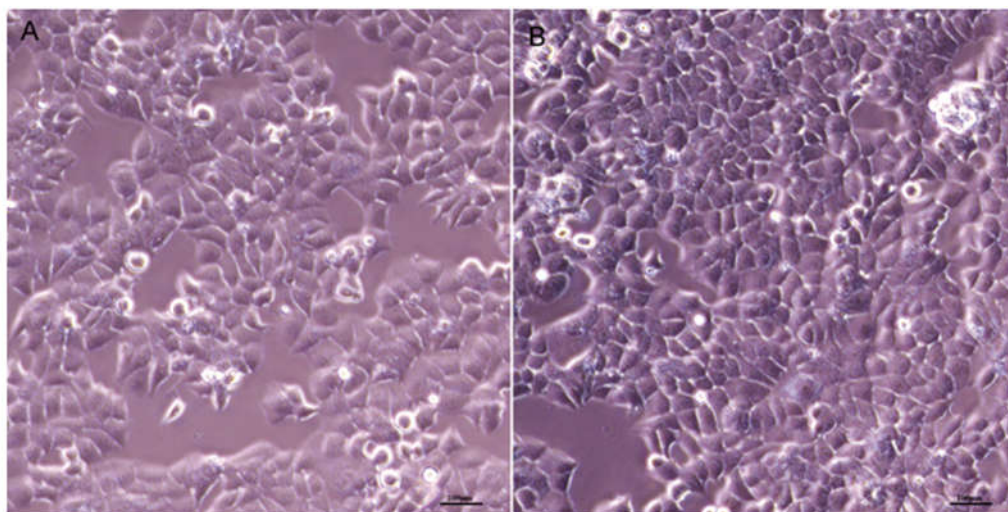


图 2 乳腺癌细胞培养结果(A:第 3 天;B:第 7 天 10 × 10)

Fig. 2 Results of breast cancer cell culture (A: day 3, B: day 7)

细胞固定的意义在于使细胞形态和细胞内分子含量变化最小,同时保持细胞良好的生理状态。在脂质相关疾病的研究中,不当的细胞固定可能会严重影响实验数据。例如,在探讨神经细胞和神经胶质细胞主要细胞室中蛋白质和脂质的 CARS 信号的影响研究中,发现多聚甲醛和乙醇固定剂都会引起蛋白质和脂质信号的变化。乙醇固定会导致神经元细胞核仁蛋白质的 CARS 信号增加约 45%,神经胶质细胞的 CARS 信号减少约 35%。表明多聚甲醛固定是在 CARS 成像前保存神经元和神经胶质细胞的一种较好的方法,不改变细胞内蛋白质和脂肪的

信号强度和分布。而乙醇固定显著改变了细胞核仁中蛋白质的 CARS 信号强度^[7]。然而,多聚甲醛固定会影响 RNA 的提取并抑制 RNA 的扩增。乙二醛可以较好地染色和分选的哺乳动物细胞中提取出 RNA。乙二醛不会将 RNA 与蛋白质交联,也不会形成稳定的 RNA 加合物,从而确保固定后 RNA 的完整性^[8]。

自噬是真核细胞的一种适应性反应,通过溶酶体作用清除生物大分子和受损细胞器,如分解蛋白质和代谢线粒体,并将其降解和循环,从而维持细胞内的动态平衡。自噬受至少 15 个基因表达调控,包含起始、成核、延伸和与溶酶体融合等阶段。

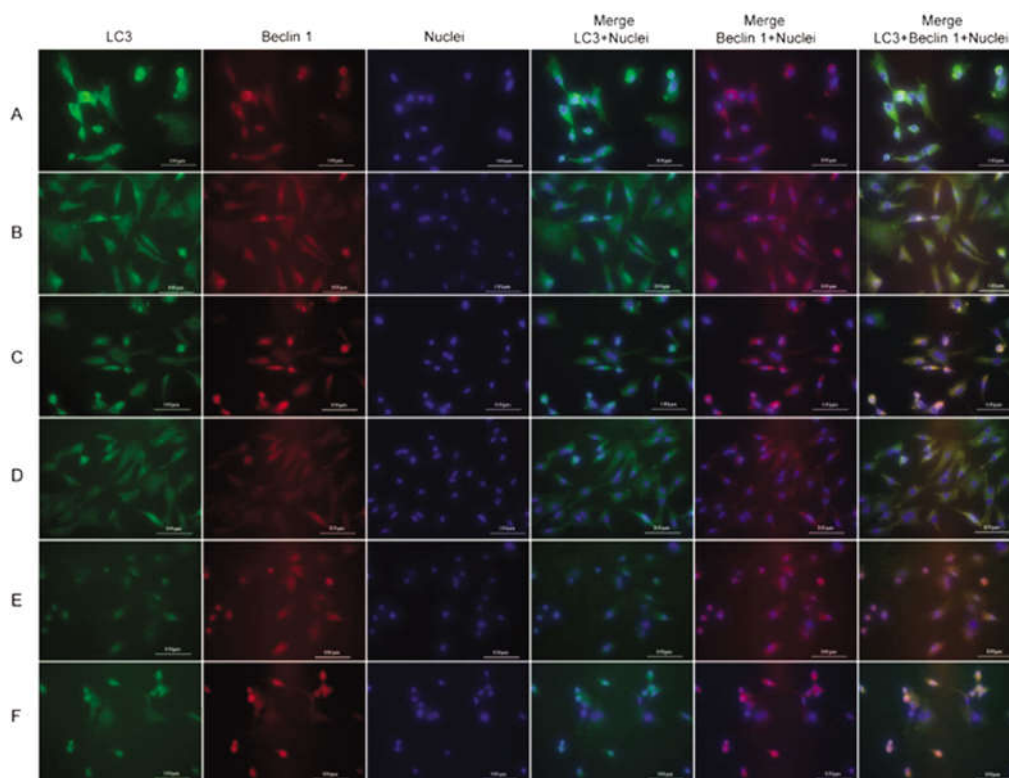


图3 三种固定液对心肌成纤维细胞氧化应激模型 LC3 和 Beclin1 蛋白荧光染色结果(10× 20)(A:丙酮 / 甲醇(1:1)固定液 正常组

B: 丙酮 / 甲醇(1:1)固定液 模型组 C:甲醇固定液 正常组 D:甲醇固定液 模型组 E:多聚甲醛固定液 正常组 F:多聚甲醛固定液 模型组)

Fig. 3 Results of fluorescent staining of LC3 and Beclin1 proteins in oxidative stress model of cardiac fibroblasts with three kinds of fixation solution (10× 20) [A: Acetone/Methanol (1:1) fixed liquid normal group B: Acetone/Methanol (1:1) fixed liquid model group C: Methanol fixed liquid normal group D: Methanol fixed liquid model group E: Paraformaldehyde fixed liquid normal group F: Paraformaldehyde fixed liquid model group]

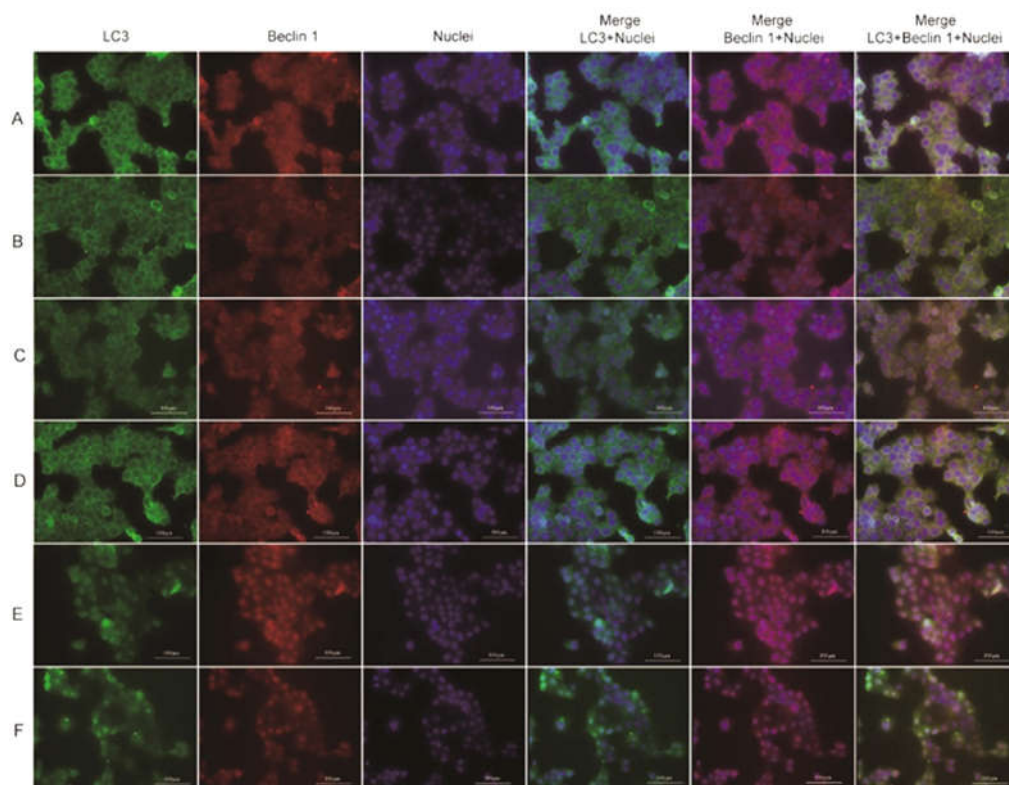


图4 三种固定液对乳腺癌细胞氧化应激模型 LC3 和 Beclin1 蛋白荧光染色结果(10× 20)(A:丙酮 / 甲醇(1:1)固定液 正常组 B: 丙酮 / 甲醇(1:1)固定液 模型组 C:甲醇固定液 正常组 D:甲醇固定液 模型组 E:多聚甲醛固定液 正常组 F:多聚甲醛固定液 模型组)

Fig. 4 Results of fluorescent staining of LC3 and Beclin1 proteins in oxidative stress model of breast cancer cells with three kinds of fixed solution (10× 20) [A: Acetone/Methanol (1:1) fixed liquid normal group B: Acetone/Methanol (1:1) fixed liquid model group C: Methanol fixed liquid normal group D: Methanol fixed liquid model group E: Paraformaldehyde fixed liquid normal group F: Paraformaldehyde fixed liquid Model group]

Beclin-1 和 LC3 是自噬活性的标志,分别在自噬的不同阶段发挥着重要作用。Beclin-1 参与自噬小体的形成,是启动自噬的重要组成部分;LC3 参与自噬较后期的阶段,有 LC3-I 和 LC3-II 两种形式,LC3-I 位于细胞质中,当细胞饥饿、缺氧和缺乏生长因子等因素诱导自噬时,LC3-I 通过与磷脂酰乙醇胺结合进入自噬体膜而转化为 LC3-II。在细胞的增殖、存活、迁移等过程中,Beclin-1 和 LC3 不可或缺。自噬作为正常细胞的肿瘤抑制机制之一,可清除有毒物质、受损细胞器和错误折叠的蛋白质,减少氧化应激反应,保护细胞免受遗传损害。但在肿瘤细胞中,在细胞饥饿、缺氧和其它因素的诱导下,自噬可能维持了肿瘤细胞的生存。Beclin-1 和 LC3 的敲除可抑制自噬,并显著抑制细胞的增殖、克隆形成、迁移/侵袭和诱导细胞凋亡,并抑制多个原癌信号通路。大约 35-50% 的乳腺癌中发现了 Beclin 1 的单等位基因丢失,且 Beclin-1 水平降低与乳腺癌患者的不良预后和总生存期降低有关。高水平的 LC3 蛋白表达也与三阴性乳腺癌(Triple-negative breast cancer, TNBC)的进展和较短的生存期密切相关^[10]。

在缺氧性脑损伤中,有效控制自噬对于开发新的治疗策略具有重要意义。Beclin1 通过调节依赖于 III 类 PI3K 的磷脂酰肌醇 3-磷酸(PI3P)的产生和随后促进自噬小体形成的额外自噬相关(ATG)蛋白的招募来控制自噬过程。增强自噬对缺氧性脑损伤具有保护作用^[11]。在心肌缺血再灌注损伤中,自噬影响了包含细胞炎症等的多种细胞反应,在炎症小体的调节中起着关键作用。Beclin1 过表达可促进自噬信号的释放,减轻微血管损伤,缩小心肌梗塞面积,减轻心脏炎症和细胞死亡进而增加小鼠存活率^[12]。

活性氧化物(ROS)包括超氧阴离子、活性氧、过氧化氢等物质,在细胞的增殖、迁移和分化中起重要作用^[13]。外源 ROS 可引起细胞内外的氧化应激^[14]。过氧化氢是 ROS 之一,可以导致蛋白质、脂质和 DNA 氧化损伤,常用于细胞氧化应激模型的制备^[15]。氧化应激由促氧化剂和抗氧化剂之间的失衡造成^[16]。ROS 产生且超过内在抗氧化剂,平衡被打破,活细胞不断受到 ROS 的氧化攻击,导致细胞氧化损伤。氧化应激、炎症和功能损害三位一体,导致衰老、致癌和代谢综合征等,并在许多疾病和临床症状的发病机制中已有报道^[17]。研究表明,线粒体也参与了氧化应激,且其功能障碍与 ROS 的产生有关。如 T-2 毒素诱导的氧化应激可导致线粒体断裂,通过降低视神经萎缩蛋白 1(OPA1)和丝裂原蛋白 1 和 2(Mfn1 和 Mfn2)的 mRNA 水平破坏线粒体融合的动态平衡^[18]。

综上所述,本文主要阐述了三种固定液对两种氧化应激细胞模型 Beclin1 和 LC3 蛋白免疫荧光染色的影响。以大鼠原代心肌成纤维细胞和 MCF-7 乳腺癌细胞为例,进行自噬相关蛋白免疫荧光双染色实验时,使用其它固定液染色效果不佳的情况下,可以选择应用丙酮/甲醇(1:1)固定液固定,再进行免疫荧光染色。同时要注意避免固定时间过长,固定或透化过久也是导致伪影的因素。固定后如果不立即进行抗体染色,可将 PBS 留在孔中,需确保盖玻片不会变干,在 4℃ 下保存密封的孔板。注意操作全程不要干片,干片容易造成后续高背景染色。

免疫荧光过程中,有很多洗涤步骤,在洗涤过程中要注意动作轻柔,固定后的细胞比较脆弱,如果太过大力,很容易把细胞吹洗掉。重视细胞免疫荧光实验的上述细节,合理选用丙酮/甲醇(1:1)固定液,可以增强染色效果,获得满意的实验结果。

参考文献(References)

- [1] 马恒辉,周晓军.提高免疫组化染色质量的相关处理和操作[J].临床与实验病理学杂志, 2011, 27(07): 760-762
- [2] 林国豪,蒋旭,孙丽纳,等.不同固定液对体外细胞系荧光蛋白淬灭及对胞内蛋白荧光染色的影响[J].现代生物医学进展, 2019, 19(11): 2072-2075, 2050
- [3] 韩飞,周孟良.过氧化氢诱导 HepG2 细胞产生氧化应激细胞模型的建立[J].食品科学, 2011, 32(05): 55-57
- [4] Friederike P, Amin S, Akik N. The impact of fixation on the detection of oligodendrocyte precursor cell morphology and vascular associations[J]. Cells, 2021, 10(6): 1302
- [5] Maria B, Kai E, Steffi K, et al. Refractive index changes of cells and cellular compartments upon paraformaldehyde fixation acquired by tomographic phase microscopy [J]. Cytometry A, 2021, 99 (4): 388-398
- [6] Wang XL, Yu L, Wu A R. Correction to: The effect of methanol fixation on single-cell RNA sequencing data [J]. BMC Genomics, 2021, 22(1): 554
- [7] Levchenko SM, Xiao P, Liu L, et al. The impact of cell fixation on coherent anti-stokes Raman scattering signal intensity in neuronal and glial cell lines[J]. Journal of Biophotonics, 2019, 12(1): e201800203
- [8] Prasanna C, Jonathan H. Glyoxal fixation facilitates transcriptome analysis after antigen staining and cell sorting by flow cytometry[J]. PLoS One, 2021, 16(1): e0240769
- [9] Sara M, Olena D, Jaya S, et al. Estrogen, progesterone, and HER-2 receptor immunostaining in cytology: the effect of varied fixation on human breast cancer cells[J]. Diagn Cytopathol, 2013, 41(10): 864-870
- [10] Hamurcu Z, Deliba N, GeEne S, et al. Targeting LC3 and Beclin-1 autophagy genes suppresses proliferation, survival, migration and invasion by inhibition of Cyclin-D1 and uPAR/Integrin β 1/ Src signaling in triple negative breast cancer cells [J]. J CANCER RES CLIN, 2018, 144(3): 415-430
- [11] Lu N, Li XX, Tan RL, et al. HIF-1 α /Beclin1-mediated autophagy is involved in neuroprotection induced by hypoxic preconditioning[J]. J Mol Neurosci, 2018, 66(2): 238-250
- [12] Sun WJ, Lu HQ, Dong SJ, et al. Beclin1 controls caspase-4 inflammasome activation and pyroptosis in mouse myocardial reperfusion-induced microvascular injury[J]. Cell Commun Signal, 2021, 9(1): 107
- [13] Jay P. Hydrogen peroxide and disease: towards a unified system of pathogenesis and therapeutics[J]. Mol Med, 2020, 26(1): 41
- [14] Pan Y, Cheng J, Sun D. Metabolomic analyses on microbial primary and secondary oxidative stress responses [J]. COMPR REV FOOD SCI F, 2021, 20(6): 5675-5697
- [15] Hu X, Liang YY, Zhao B, et al. Oxyresveratrol protects human lens epithelial cells against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptosis by activation of Akt/HO-1 pathway[J]. J Pharmacol Sci, 2019, 139(3): 166-173

- Nutritional Status and Postpartum Depression Symptoms [J]. *Nutrients*, 2019, 11(6): 1204
- [18] Dennis CL, Grigoriadis S, Zupancic J, et al. Telephone-based nurse-delivered interpersonal psychotherapy for postpartum depression: nationwide randomised controlled trial[J]. *Br J Psychiatry*, 2020, 216(4): 189-196
- [19] Carter T, Bastounis A, Guo B, et al. The effectiveness of exercise-based interventions for preventing or treating postpartum depression: a systematic review and meta-analysis [J]. *Arch Womens Ment Health*, 2019, 22(1): 37-53
- [20] Sangsawang B, Wacharasin C, Sangsawang N. Interventions for the prevention of postpartum depression in adolescent mothers: a systematic review[J]. *Arch Womens Ment Health*, 2019, 22(2): 215-228
- [21] Özkan SA, Küçükkeleş DS, Korkmaz B, et al. The effectiveness of an exercise intervention in reducing the severity of postpartum depression: A randomized controlled trial [J]. *Perspect Psychiatr Care*, 2020, 56(4): 844-850
- [22] 李腾, 周小兰, 褚静, 等. 鼠李糖乳杆菌对产后抑郁小鼠行为和运动能力的影响[J]. *蚌埠医学院学报*. 2021, 46(3): 295-299
- [23] Johnson S, Adam S, McIntosh M. The Lived Experience of Postpartum Depression: A Review of the Literature [J]. *Issues Ment Health Nurs*, 2020, 41(7): 584-591
- [24] Atuhaire C, Brennaman L, Cumber SN, et al. The magnitude of postpartum depression among mothers in Africa: a literature review [J]. *Pan Afr Med J*, 2020, 37: 89
- [25] Kołomańska-Bogucka D, Mazur-Biały AI. Physical Activity and the Occurrence of Postnatal Depression-A Systematic Review[J]. *Medicina*, 2019, 55(9): 560
- [26] Shovers SM, Bachman SS, Popek L, et al. Maternal postpartum depression: risk factors, impacts, and interventions for the NICU and beyond[J]. *Curr Opin Pediatr*, 2021, 33(3): 331-341
- [27] 韩远山, 黄会珍, 孟盼, 等. 逍遥抗癌解郁方对乳腺癌并发抑郁小鼠海马 NMDAR 相关蛋白表达的影响[J]. *中国新药杂志*, 2019, 28(5): 628-635
- [28] Compans B, Camus C, Kallergi E, et al. NMDAR-dependent long-term depression is associated with increased short term plasticity through autophagy mediated loss of PSD-95 [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2849
- [29] Adell A. Brain NMDA Receptors in Schizophrenia and Depression [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(6): 947
- [30] Pochwat B, Nowak G, Szewczyk B. An update on NMDA antagonists in depression[J]. *Expert Rev Neurother*, 2019, 19(11): 1055-1067

(上接第 13 页)

- [16] Chiaradia E, Tancini B, Emiliani C, et al. Extracellular vesicles under oxidative stress conditions: biological properties and physiological Roles[J]. *Cells*, 2021, 10(7): 1763
- [17] Karol T, Katarzyna K, Jerzy S. Biomarkers and mechanisms of oxidative stress-last 20 years of research with an emphasis on kidney damage and renal transplantation[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15): 8010
- [18] You L, Zhao Y, Kuca K, et al. Hypoxia, oxidative stress, and immune evasion: a trinity of the trichothecenes T-2 toxin and deoxynivalenol (DON)[J]. *ARCH TOXICOL*, 2021, 95(6): 1899-1915