

虾青素对槟榔碱诱导的口腔上皮损伤的保护效应及机制初探

陈琳琳¹, 谢金梅², 张榕芮¹, 石宇晴³, 常秀亭³, 谢曦^{1*}

(1. 海南大学药学院, 热带生物资源教育部重点实验室, 海南海口 570228)

(2. 海南大学食品科学与工程学院, 海南海口 570228) (3. 海南大学生命健康学院, 海南海口 570228)

摘要: 探索虾青素 (AST) 对槟榔碱 (ARC) 诱导的口腔上皮损伤的保护效应及其作用机制。建立 ARC 诱导的大鼠口腔黏膜损伤模型, 观察大鼠口腔黏膜组织病理学形态及人早期生长反应因子 1 (EGR1) 的变化。测定 ARC 诱导的人正常口腔上皮角质 (HOK) 细胞中紧密连接相关蛋白 ZO-1 和 Occludin、线粒体形态、线粒体膜电位 (MMP)、线粒体活性氧 (mtROS) 和 EGR1 的变化。通过分子对接预测 AST 与 EGR1 的结合情况。大鼠口腔黏膜组织病理切片显示, 与模型组相比, AST 干预组中口腔黏膜上皮变薄、钉突变短症状有所改善, 黏膜下相对胶原面积及 Collagen I 面积显著降低 9.84%、23.01%。细胞实验结果显示, AST 改善了 ARC 诱导的 HOK 细胞 ZO-1 和 Occludin 蛋白定位异常、线粒体形态损伤、MMP 下降及 mtROS 生成过多。此外, AST 抑制 ARC 诱导的 EGR1 高表达, 细胞水平上能显著下调 24.53%。分子对接结果显示 AST 与 EGR1 的对接结合能为 -6.869 7 kcal/mol, 存在两个氢键作用。综上所述, AST 可能通过调控 EGR1 和线粒体功能从而改善 ARC 诱导的口腔黏膜损伤, 有望开发成为保护口腔黏膜的功能性食品。

关键词: 虾青素; 槟榔碱; 口腔上皮损伤; 早期生长反应因子 1; 线粒体功能

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.10.0993

Research on the Protective Effect and Mechanism of Astaxanthin on Arecoline Induced Oral Epithelial Injury

CHEN Linlin¹, XIE Jinmei², ZHANG Rongrui¹, SHI Yuqing³, CHANG Xiuting³, XIE Xi^{1*}

(1.School of Pharmaceutical Sciences, Key Laboratory of Tropical Biological Resources and Ministry of Education, Hainan University, Haikou 570228, China)(2.School of Food Science and Engineering, Hainan University, Haikou 570228, China)(3. School of Life and Health Sciences, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: To study the protective effect and mechanism of astaxanthin (AST) on oral epithelial injury, an arecoline (ARC) induced oral mucosal injury rat model was established. The pathological morphology, and the changes in human early growth response factor 1 (EGR1) in rat oral mucosal tissue was observed. The changes in tight junction related proteins ZO-1 and Occludin, mitochondrial morphology, mitochondrial membrane potential (MMP), mitochondrial reactive oxygen species (mtROS), and EGR1 in human oral keratinocyte (HOK) cells induced by ARC, were measured. And the binding of AST and EGR1 was predicted through molecular docking. The results on pathological of oral mucosal tissues showed that compared with the model group, the symptoms of thinning oral mucosal epithelium and short epithelial nail was improved in the AST intervention group. The relative collagen area and Collagen I area under the mucosa were significantly reduced by 9.84% and 23.01%, respectively. In vitro experiments, the results showed that AST improved the abnormal localization of ZO-1 and Occludin proteins in ARC-induced HOK cells; the abnormal mitochondrial morphological, the decreased level of MMP, and the excessive generation of mtROS were also improved. In addition, AST inhibited the expression level of EGR1 in ARC-induced HOK cells, and significantly downregulating 24.53% at the cellular level. The molecular docking results showed that the docking binding energy between AST and EGR1 was -6.869 7 kcal/mol, and had two hydrogen bonding interactions. In summary,

收稿日期: 2024-07-12

基金项目: 海南省自然科学基金项目 (821MS027; 823RC467); 国家自然科学基金项目 (82360731; 81960645); 海南大学全健康协同创新中心 (XTCX2022JKB08)

作者简介: 陈琳琳 (1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 海洋来源药食同源活性物质, E-mail: 2490339859@qq.com

通讯作者: 谢曦 (1986-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 海洋来源药食同源活性物质及纤维化疾病药理研究, E-mail: xiexi@hainanu.edu.cn

AST may improve ARC induced oral mucosal injury by regulating EGR1 and mitochondrial function, and is expected to be developed as a functional food for protecting oral mucosa.

Keywords: astaxanthin; arecoline; oral epithelial injury; human early growth response factor 1; mitochondrial function

虾青素 (Astaxanthin, AST) 是一种在红色素中发现的类胡萝卜素^[1]。它分子结构独特, 每一端都带有一个羟基和酮基的 β -紫罗兰酮环, 这种结构使得 AST 既能提供电子也能吸引自由基^[2,3]。据报道, AST 具有猝灭单线态氧的能力, 拥有比维生素 E 和辅酶 Q₁₀ 更强的抗氧化活性, 对心血管疾病、炎症等许多疾病也具有药理作用^[4,5]。研究发现 AST 还能够有效抑制转化生长因子 TGF- β_1 引起的 I 型胶原蛋白 (Collagen I)、波形蛋白 (Vimentin) 和 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 高表达^[6]。而且, AST 在体内不会成为促氧化剂, 能够有效清除活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 并减少氧化应激^[7]。此外, AST 还可恢复紧密连接相关蛋白 ZO-1 和 Occludin 的表达, 改善小鼠肠道屏障功能^[8]。

槟榔作为我国四大南药之首, 全身都是宝, 常以食用为主, 是仅次于尼古丁、乙醇和咖啡因的世界第四大嗜好物品^[9]。由于用于咀嚼的槟榔纤维粗糙, 长期嚼食易增加口腔黏膜下纤维化 (Oral Submucosal Fibrosis, OSF)、口腔白斑 (Oral Leukoplakia, OLK) 和口腔扁平苔藓 (Oral Lichen Planus, OLP) 等疾病的发病率^[9,10]。研究表明, 槟榔的多种活性成分和代谢产物都具有细胞毒性和遗传毒性, 甚至有些成分具有致癌性。槟榔的主要生物碱槟榔碱 (Arecoline, ARC) 也被认为是导致 OSF 的主要活性成分。高义军等报导, 30 $\mu\text{g/mL}$ 的 ARC 即可诱导口腔黏膜角质形成细胞发生凋亡^[11]。同时, ARC 还能诱发口腔黏膜上皮细胞 ROS 生成增多, 从而诱导和激活关键的促纤维化因子 TGF- β_1 ^[12]。此外, ARC 还通过损伤上皮屏障进一步侵害黏膜深层细胞, 刺激肌成纤维细胞活化, 促进胶原合成^[12,13]。因此对口腔黏膜上皮的保护至关重要。

早期生长反应因子 1 (Human Early Growth Response Factor 1, EGR1) 是锌指转录因子家族的成员之一, 参与了细胞生长、发育、凋亡和分化过程^[14]。据报道, EGR1 是 TGF- β_1 的下游调节因子, 参与 TGF- β 信号传导过程, 与 TGF- β_1 之间可能存在反馈调节^[15]。体外研究表明, Egr1 可通过靶向 TGF- β_1 启动子增强 TGF- β 信号传导, 从而促进了大鼠肾小球系膜细胞中高糖诱导的增殖和上皮间充质转换^[16]。此外, Hsieh 等^[17]证明了 EGR1 在 OSF 组织中高表达, 低剂量槟榔碱可刺激人颊黏膜成纤维细胞中 EGR1 上调。靶向 MEG3/miR-181a/Egr1 轴也被证明可减轻肌成纤维细胞的活性^[18]。

目前, AST 对嚼食槟榔人群的保护效应未见过多报道。本研究主要通过机械摩擦和 ARC 模拟人嚼食槟榔过程, 建立大鼠口腔黏膜损伤模型, 探索 AST 对大鼠口腔黏膜组织上皮萎缩和胶原沉积的影响; 同时通过 ARC 体外诱导人正常口腔上皮角质 (Human Oral Keratinocyte, HOK) 细胞, 探索 AST 对 HOK 细胞屏障功能、线粒体功能和 EGR1 的影响。为 AST 开发为保护嚼食槟榔人群口腔黏膜的功能性产品提供理论基础和科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与仪器

角质细胞专用培养基, 上海盈湾生物科技有限公司; 线粒体膜电位检测试剂盒 (TMRE)、线粒体超氧化物红色荧光探针, 翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司; ZO-1 和 Occludin 抗体, 武汉三鹰生物技术有限公司; EGR1 抗体, 北京博奥森生物技术有限公司; DAPI 染色剂 (即用型) 和电镜固定液, 武汉赛维尔生物有限公司; 封闭山羊血清, Solarbio 公司; 槟榔碱, 上海源叶生物科技有限公司; 虾青素, 成都普瑞法科技开发有限公司; 舒泰 50, 法国维克。

实验动物为 SPF 级的雄性 SD 大鼠 ($n=21$, 200 ± 10 g, 8 周龄), 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 实验动物质量合格证明号为 110324220101632447。实验过程严格按照中国实验动物使用和管理法规进行操作, 并经海南大学伦理委员会批准 (HNUAUCC-2021-00089)。

HOK 细胞由上海盈湾生物科技有限公司提供。

FV3000, 激光共聚焦显微镜, 日本奥林巴斯; CPY-180, CO₂ 培养箱, 天津市莱玻特瑞仪器设备有限公司; SW-CJ-1D, 超净工作台, 上海沪净医疗器械有限公司; H1750R, 高速台式冷冻离心机, 湖南湘仪实验

室仪器开发有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组与给药

21 只 SPF 级雄性 SD 大鼠购自斯贝福(北京)生物技术有限公司, 体重质量为 200 ± 10 g, 质量合格证号: 110324220101632447。动物每天给予自由进食和饮水, 适应性饲养一周后, 随机分为正常组(Con)、模型组(ARC)、给药组(ARC+AST), 每组 7 只大鼠。模型组中用 6 N 的力使用尼龙刷摩擦大鼠两侧颊黏膜, 随后两侧黏膜分别给予 15 μ L ARC (18 mg/mL) 溶液, 隔天一次。给药组用蒸馏水稀释 AST, 按每天 25 mg/kg 灌胃 AST, 持续灌胃 20 周。

1.2.2 大鼠口腔颊黏膜组织病理检测及免疫组化

禁食不禁水 12 h 后, 用舒泰 50 处死大鼠, 立即取下大鼠口腔两侧颊黏膜组织块并用生理盐水清洗。用滤纸拭干后分别放入含 4% 多聚甲醛的离心管中进行固定。后续实验的组织苏木精-伊红(HE)染色、Masson 染色、天狼星红染色偏振光分析和免疫组化分析交由武汉赛维尔生物科技有限公司完成。

1.2.3 细胞培养及处理

HOK 细胞培养于口腔角质细胞专用培养基中 (37°C , 5% CO_2)。根据实验分组为: 正常组(Con)、模型组(ARC)、给药组(ARC+AST), 培养基中加入 ARC 的终浓度为 0.3 mmol/L, 加入 AST 的终浓度为 5 μ mol/L。细胞相应处理 72 h 后即可进行后续实验操作。

1.2.4 细胞免疫荧光

HOK 细胞种于六孔板中, 待细胞达到 50% 时进行相应处理。72 h 后用 4% 多聚甲醛固定细胞, 同时按需求加入 PBS 稀释 0.5% 的 Triton X-100 破膜。用 10% 正常山羊血清封闭细胞后对应的一抗, 于 4°C 静置孵育过夜。次日, 将细胞与荧光标记二抗于室温下孵育 1 h, 使用 DAPI 复染细胞核, PBS 溶液清洗后进行封片, 于激光共聚焦显微镜下观察。

1.2.5 线粒体膜电位检测

HOK 细胞种于玻璃底小皿中, 相应处理 72 h 后, 加入 200 μ L TMRE 染色工作液。在培养箱中 37°C 孵育 60 min 后用 PBS 溶液清洗 3 次, 并用 Hoechst33342 染液复染细胞核 45 min。最后于激光共聚焦显微镜中观察线粒体膜电位变化情况。10 μ mol/L CCCP (Carbonyl Cyanide m-chlorophenyl Hydrazine) 作为诱导线粒体膜电位下降的阳性对照组。

1.2.6 线粒体超氧化物检测

HOK 细胞接种于玻璃底小皿中, 进行相应处理 72 h 后每个小皿中加入 HBSS 缓冲液稀释的 MitoSOX Red Mitochondrial Superoxide Indicator (5 mmol/L) 200 μ L。在 37°C 避光孵育 30 min 后用 PBS 溶液清洗 3 次。使用 Hoechst 33342 染液复染细胞核 45 min, PBS 溶液清洗 4 次。最后于激光共聚焦显微镜中观察并拍照。

1.2.7 细胞透射电镜

HOK 细胞接种于 100 mm 培养皿中, 待细胞汇合至 80% 时进行相应处理。72 h 后将细胞固定于电镜固定液中。5 min 后即可收集细胞, 将收集到的细胞重悬于电镜固定液中, 再次固定 30 min。随后转移至 4°C 进行保存, 后续实验部分委托武汉赛维尔生物科技有限公司完成。

1.2.8 分子对接

从 Uniprot (UniProt) 和 RCSB PDB (RCSB PDB: Homepage) 网站获取 EGR1 (PDB ID: 4x9j) 蛋白的三维晶体结构文件, 并在 Pubchem (PubChem (nih.gov)) 中下载 AST 的三维结构图。应用 Molecular Operating Environment (MOE) 软件进行分子对接, 应用 PyMOL 对分子对接结果进行分析和绘图。

1.4 数据处理

实验数据分析及作图采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件, 数据结果均以均数 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析和 Tukey 法事后多重比较。 $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与讨论

2.1 大鼠口腔黏膜组织形态学变化

郭振兴等^[19]研究,大鼠口腔黏膜下注射 ARC 会促使口腔黏膜上皮萎缩,厚度变薄,上皮钉突扁平且数量减少,同时促使固有层胶原纤维大量堆积,排列紊乱。我们采用机械摩擦和 ARC 刺激大鼠的口腔黏膜也致使大鼠口腔黏膜损伤。从图 1 可看出,与正常组相比,模型组上皮明显变薄,钉突平缓。与模型组相比,AST 干预组大鼠口腔上皮未见过分变薄,且仍维持上皮钉形状。初步判断 AST 可能对大鼠口腔黏膜上皮具有保护作用。

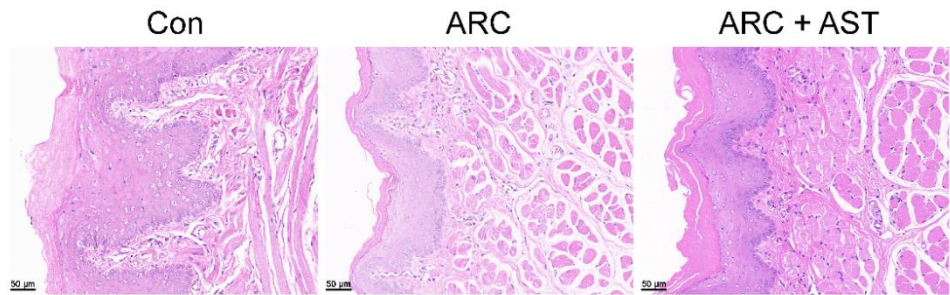


图 1 大鼠口腔黏膜组织形态

Fig.1 The morphology of rat oral mucosal tissues

注：大鼠口腔黏膜组织进行 HE 染色（20×），标尺为 50 μm。

2.2 大鼠口腔黏膜组织胶原纤维变化

ARC 作用于口腔黏膜后可引起胶原代谢紊乱致使胶原蛋白在口腔黏膜中的沉积增加^[20]。Zhao 等^[21]研究表明,AST 能够有效改善 UUO 小鼠胶原蛋白沉积,并降低 Collagen I 蛋白的表达。由图 2a 和 c 可看出,与正常组相比,模型组口腔黏膜组织固有层蓝色胶原明显增多,相对胶原面积显著升高 26.14%,说明胶原代谢紊乱,胶原蛋白在固有层沉积增加,目标模型建立成功。与模型组相比,AST 干预组的相对胶原面积显著降低 9.84%,说明 AST 能够缓解 ARC 诱导的口腔黏膜组织胶原沉积。此外,与正常组相比,模型组中代表 Collagen I 的黄橙色和红橙色纤维面积明显增多 33.43%,说明 Collagen I 在模型组口腔黏膜组织中堆积;而与模型组相比,AST 干预组大鼠 Collagen I 面积显著降低 23.01% (图 2b 和 d)。说明 AST 可通过减少 Collagen I 面积缓解胶原纤维在黏膜下更紧密堆积。

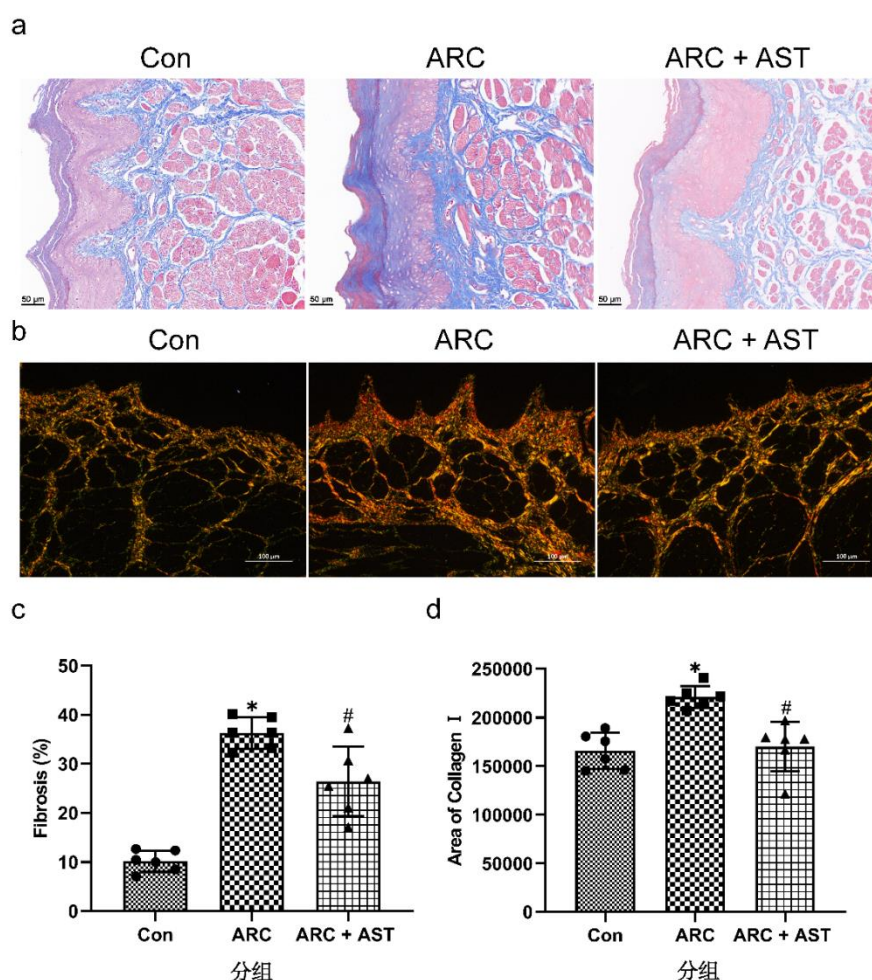


图2 大鼠口腔黏膜组织胶原纤维变化

Fig.2 Changes in collagen fibers in rat oral mucosa tissues

注: 蓝色代表胶原纤维, 黄橙色和红橙色代表 Collagen I。与正常组相比, $*P < 0.05$; 与模型组相比, $\#P < 0.05$ 。a: 口腔黏膜组织进行 Masson 染色 (20 $\times$), 标尺为 50 μm ; b: 大鼠口腔黏膜组织天狼星红染色偏振光分析 (200 $\times$), 标尺为 100 μm ; c: 大鼠口腔黏膜组织 Masson 染色相对胶原面积由 ImageJ 来分析 ($n=6$)。d: 偏振光拍摄中的 Collagen I 分布面积由 Image-Pro Plus 6.0 进行定量分析 ($n=6$)。

2.3 AST 改善 ARC 诱导的 HOK 细胞屏障功能损伤

ZO-1 和 Occludin 蛋白是构成上皮屏障紧密连接结构的重要蛋白, 它们可通过保持上皮细胞彼此紧密连接来确保口腔上皮屏障结构的完整性, 具有调节离子和分子通过细胞旁通道的功能^[22]。Wei 等^[13]研究发现, ARC 可降低 Occludin 蛋白在 HOK 细胞中的表达, 并干扰 ZO-1 和 Occludin 蛋白和在 HOK 细胞中的定位, 从而破坏细胞的紧密连接结构。本研究通过免疫荧光检测 AST 对 ARC 诱导的 HOK 细胞内 ZO-1 和 Occludin 蛋白的影响。如图 3 所示, 与正常组相比, 模型组内可观察到 ZO-1 蛋白不能完全定位在细胞膜上, 部分 ZO-1 蛋白聚集在细胞质中; 而 Occludin 蛋白表达降低, 也未能完全定位于细胞膜。与模型组相比, AST 干预组的细胞中 ZO-1 蛋白在细胞质的聚集明显减少, ZO-1 在细胞膜的蛋白定位增加, 对 ZO-1 蛋白的表达水平没有明显影响, 但增强了 Occludin 蛋白的表达和在细胞膜上的定位。这一结果说明 AST 可通过增强 ZO-1 和 Occludin 蛋白在细胞膜上的定位和提高 Occludin 蛋白的表达来改善 ARC 诱导的 HOK 细胞屏障功能损伤。

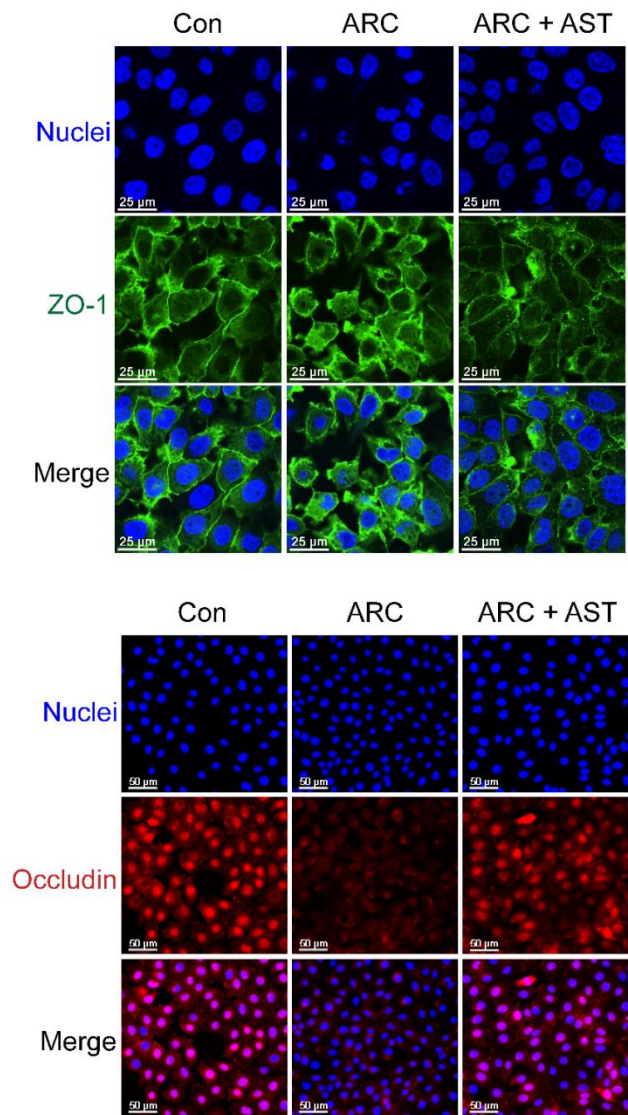


图3 AST可改善ARC诱导的HOK细胞屏障功能损伤

Fig.3 AST can improve barrier dysfunction in HOK cells induced by ARC (25 μm, 50 μm)

注：蓝色：DAPI，绿色：ZO-1，红色：Occludin。

2.4 AST改善ARC诱导的HOK细胞线粒体功能损伤

ROS在多种口腔黏膜疾病发病机制中都起着重要作用^[23]。细胞内主要由线粒体产生ROS，从而激活特定通路促进疾病的发生^[12]。AST作为一种天然的强抗氧化剂，可轻易透过细胞膜定位于线粒体。研究表明，AST能够减少氧化应激来维持线粒体完整性，防止线粒体膜电位丧失，并增加线粒体的耗氧量从而抑制线粒体功能障碍。Sun等同样报道了AST能够抑制Sol8成肌细胞线粒体活性氧（mtROS）的产生^[24]。本研究中，在ARC的刺激下，模型组HOK细胞线粒体超微结构出现空泡化，线粒体嵴数量减少，膜电位（MMP）明显下降，mtROS生成增多；相比于模型组，AST干预组能够有效保护线粒体结构正常，维持MMP，清除过多的mtROS（图4）。这提示AST能够改善ARC诱导的ROS生成增多，保护HOK细胞免受氧化损伤。

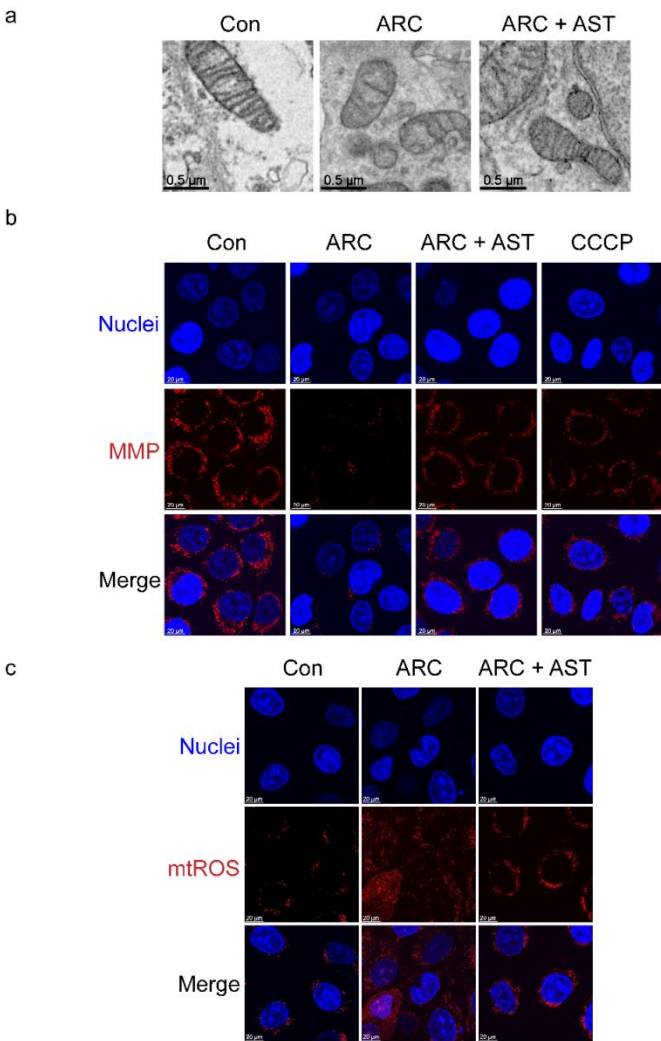


图 4 AST 可缓解 ARC 诱导的 HOK 细胞线粒体形态和功能损伤

Fig.4 AST can alleviate ARC induced mitochondrial morphological abnormalities and functional damage in HOK cells

注：a：通过透射电镜观察 HOK 细胞内线粒体的超微结构，标尺为 0.5 μm；b：通过 TMRE 试剂盒检测线粒体膜电位，标尺为 20 μm；c：通过 MitoSOX Red Mitochondrial Superoxide 探针标记 mtROS，标尺为 20 μm。

2.5 AST 可抑制 ARC 诱导的 HOK 细胞 EGR1 高表达

TGF-β 是一类具有多种生物学功能的细胞因子，在 OSF 和 OLP 的发展中都起着重要的作用^[25,26]。特别是 TGF-β₁，对胶原蛋白生成和减少基质降解中发挥重要作用。EGR1 是 TGF-β₁ 诱导的靶蛋白之一，Hsieh 等^[27]的研究中，EGR1 在 OSF 组织中高表达，ARC 诱导的 mtROS 可通过激活潜伏的 TGF-β₁ 促进 EGR1 合成，使其参与 TGF-β 信号传导。除此之外，也有研究发现 EGR1 与 ROS 的生成有着密切联系，通过抑制 EGR1 可减少 mtROS 生成过多，改善线粒体功能损伤^[28-30]。本研究通过免疫组化检测了大鼠口腔黏膜组织中 EGR1 蛋白的表达水平，发现相比于正常组，模型组中 EGR1 蛋白表达水平增加，而 AST 干预组中 EGR1 蛋白的表达则下调（图 5a）。为了进一步确定 AST 对 EGR1 蛋白的影响，本研究又通过体外细胞实验用 ARC 诱导 HOK 细胞，使细胞内 EGR1 蛋白表达水平增加。免疫荧光结果显示，相比于正常组，EGR1 蛋白平均荧光强度在模型组中显著增加 44.22%；而给予 AST 后，EGR1 蛋白平均荧光强度则比模型组的下降了 24.53%（图 5b）。这一结果提示 AST 可抑制 ARC 诱导的 HOK 细胞内 EGR1 表达增加。此外，我们还探索了 EGR1 是否有可能成为 AST 的作用靶点。通过分子对接，我们发现 AST 与 EGR1 的对接结合能为 -6.8697 kcal/mol，存在两个氢键作用，说明两者之间可能存在潜在的相互结合作用（图 6）。

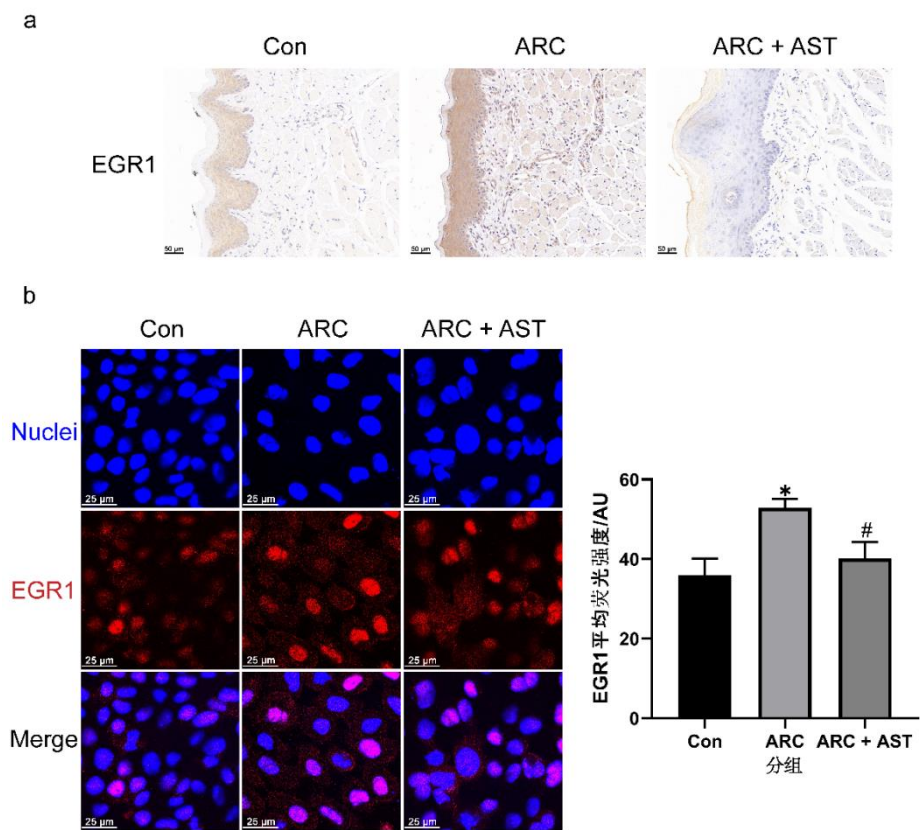
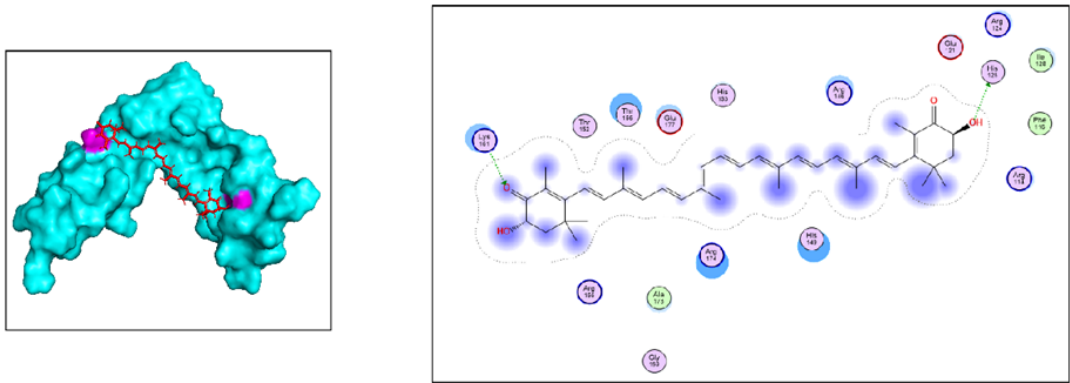


图 5 AST 可抑制 ARC 诱导的 HOK 细胞 EGR1 蛋白高表达

Fig.5 AST can inhibit the expression of EGR1 in HOK cells

注：蓝色：DAPI；红色：EGR1。与正常组相比，* $P < 0.05$ ；与模型组相比，# $P < 0.05$ 。a：通过免疫组化检测口腔黏膜组织中 EGR1 蛋白的阳性表达水平，标尺为 50 μm。b：通过 IF 检测 HOK 细胞中 EGR1 蛋白的表达，并由 ImageJ 定量分析 ($n = 6$)，标尺为 25 μm。



有良好的保护咀嚼槟榔人群的口腔健康, 可进一步开发成具有口腔保护功能的功能性食品。

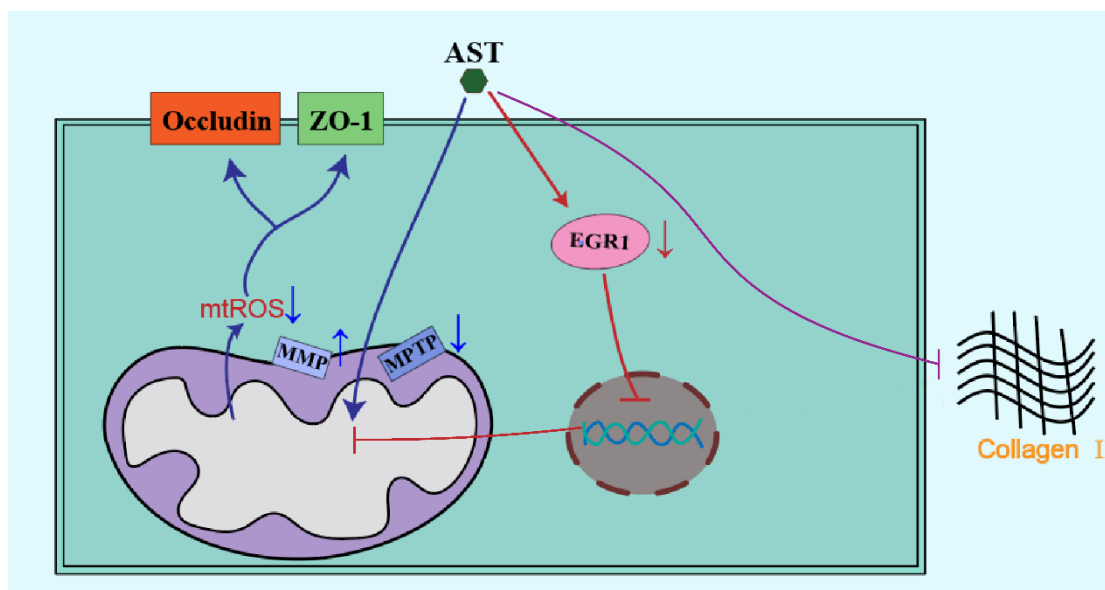


图 7 AST 改善 ARC 诱导的 HOK 细胞上皮屏障和线粒体功能损伤

Fig.7 AST improves ARC induced epithelial barrier and mitochondrial dysfunction in HOKs

参考文献

- [1] KOHANDEL Z, FARKHONDEH T, ASCHNER M, et al. Nrf2 a molecular therapeutic target for Astaxanthin [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2021, 137: 111374.
- [2] AMBATI R R, PHANG S M, RAVI S, et al. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications-a review [J]. Marine Drugs, 2014, 12(1):128-152.
- [3] 侯晓宁,张育昆,陈祉晴,等.虾青素对 D-半乳糖致衰老大鼠肾脏和心脏组织氧化损伤的修复作用[J].现代食品科技,2022,38(12): 146-153.
- [4] FANG N, WANG C, LIU X, et al. De novo synthesis of Astaxanthin: from organisms to genes [J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 92: 162-171.
- [5] 崔静,李涛,丁巍,等.胁迫条件下褪黑素诱导雨生红球藻虾青素合成[J].食品与生物技术学报,2020,39(6):15-21.
- [6] CHEN H, WANG J, LI R, et al. Astaxanthin attenuates pulmonary fibrosis through lncITPF and mitochondria-mediated signal pathways [J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2020, 24(17): 10245-10250.
- [7] MAEZAWA T, TANAKA M, KANAZASHI M, et al. Astaxanthin supplementation attenuates immobilization-induced skeletal muscle fibrosis via suppression of oxidative stress [J]. The Journal of Physiological Sciences, 2017, 67(5): 603-611.
- [8] ZHANG X, ZHAO X, HUA Z, et al. ROS-triggered self-disintegrating and pH-responsive Astaxanthin nanoparticles for regulating the intestinal barrier and colitis [J]. Biomaterials, 2023, 292: 121937.
- [9] 陈君,马子龙,覃伟权,等.世界槟榔产业发展概况[J].中国热带农业,2009,6:32-34.
- [10] 杜永秀,孙东业,翦新春,等.咀嚼槟榔种类与口腔黏膜疾病的流行病学调查分析[J].华西口腔医学杂志,2016,34(4):391-394.
- [11] 高义军,凌天牖,尹晓敏,等.槟榔碱诱导口腔角质形成细胞凋亡研究[J].口腔医学研究,2007,23(6):624-627.
- [12] SHARMA M, SARODE S C, SARODE G, et al. Areca nut-induced oral fibrosis – reassessing the biology of Oral Submucous Fibrosis [J]. Journal of Oral Biosciences, 2024, 66(2): 320-328.
- [13] WEI Q, CHEN L, LUO W, et al. PDE12 disrupts mitochondrial oxidative phosphorylation and mediates mitochondrial dysfunction to induce oral mucosal epithelial barrier damage in Oral Submucous Fibrosis [J]. European Journal of Pharmacology, 2024, 967: 176353.
- [14] BAI Q, YAN H, SHENG Y, et al. Long-term acetaminophen treatment induced liver fibrosis in mice and the involvement of Egr-1 [J]. Toxicology, 2017, 382: 47-58.

- [15] MAGEE N, ZHANG Y. Role of early growth response 1 in liver metabolism and liver cancer [J]. Hepatoma Research, 2017, 3: 268-277.
- [16] WANG D, GUAN M P, ZHENG Z J, et al. Transcription factor Egr1 is involved in high glucose-induced proliferation and fibrosis in rat glomerular mesangial cells [J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2015, 36(6): 2093-2107.
- [17] HSIEH Y P, CHEN H M, CHANG J Z, et al. Arecoline stimulated early growth response-1 production in human buccal fibroblasts: suppression by epigallocatechin-3-gallate [J]. Head & Neck, 2015, 37(4): 493-497.
- [18] FANG C Y, CHEN S H, HUANG C C, et al. Fucoidan-mediated inhibition of fibrotic properties in Oral Submucous Fibrosis via the MEG3/miR-181a/Egr1 Axis [J]. Pharmaceuticals (Basel) 2022, 15(7): 833.
- [19] 郭振兴,王悦,许昊清,等.槟榔碱黏膜下注射法构建 SD 大鼠口腔黏膜下纤维化模型[J].口腔生物医学,2024,15(1):21-37.
- [20] RAY J G, RANGANATHAN K, CHATTOPADHYAY A. Malignant transformation of Oral Submucous Fibrosis: overview of histopathological aspects [J]. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology, 2016, 122(2): 200-209.
- [21] ZHAO J, MENG M, ZHANG J, et al. Astaxanthin ameliorates renal interstitial fibrosis and peritubular capillary rarefaction in unilateral ureteral obstruction [J]. Molecular Medicine Reports, 2019, 19(4): 3168-3178.
- [22] BEN LAGHA A, PELLERIN G, VAILLANCOURT K, et al. Effects of a tart cherry (*Prunus cerasus* L.) phenolic extract on Porphyromonas gingivalis and its ability to impair the oral epithelial barrier [J]. PLoS One, 2021, 16(1): e0246194.
- [23] SARDARO N, DELLA VELLA F, INCALZA M A, et al. Oxidative stress and oral mucosal diseases: an overview [J]. In Vivo, 2019, 33(2): 289-296.
- [24] SUN L, MIYAJI N, YANG M, et al. Astaxanthin prevents atrophy in slow muscle fibers by inhibiting mitochondrial reactive oxygen species via a mitochondria-mediated apoptosis pathway [J]. Nutrients, 2021, 13(2): 379.
- [25] 谭劲,吴丹,陈明,等.丹玄口康对 ANE 诱导大鼠口腔粘膜下纤维化 TGF- β_1 表达的影响[J].临床医学工程,2015,2(22):2.
- [26] 张志瑞,陈莉娅,祁红延,等.口腔扁平苔藓中 TGF- β_1 、Smad 4 和 Cyclin D1 的表达研究[J].牙体牙髓牙周病学杂志,2010,11:4.
- [27] HSIEH Y P, WU K J, CHEN H M, et al. Arecoline activates latent transforming growth factor β_1 via mitochondrial reactive oxygen species in buccal fibroblasts: suppression by epigallocatechin-3-gallate [J]. Journal of the Formosan Medical Association, 2018, 117(6): 527-534.
- [28] SUGINOBE H, ISHIDA H, ISHII Y, et al. Isogenic pairs of induced-pluripotent stem-derived endothelial cells identify DYRK1A/PPARG/EGR1 pathway is responsible for Down syndrome-associated pulmonary hypertension [J]. Human Molecular Genetics, 2024, 33(1): 78-90.
- [29] TOMAR D, ELROD J W. Metabolite regulation of the mitochondrial calcium uniporter channel [J]. Cell Calcium, 2020, 92: 102288.
- [30] WANG M, WANG G, PANG X, et al. MOTS-c repairs myocardial damage by inhibiting the Ccn1/ERK1/2/Egr1 pathway in diabetic rats [J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 1060684.