

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.07.019 [http://www.crter.org]

和静, 韦思宇, 刘凤勇, 叶静, 沈炳玲, 姚小梅. 过氧化氢对金属硫蛋白 I/II 敲除小鼠脾细胞的氧化应激[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(7):1243-1250.

## 过氧化氢对金属硫蛋白 I/II 敲除小鼠脾细胞的氧化应激\*\*\*★

和静, 韦思宇, 刘凤勇, 叶静, 沈炳玲, 姚小梅

天津医科大学基础医学院病理生理教研室 天津市 300070

### 文章亮点:

- 1 实验在前期工作中发现, 脑缺血再灌注后外周免疫器官脾脏也出现变化, 实验针对外周免疫器官脾脏的氧化应激及 N-乙酰-L-半胱氨酸对其的抗氧化作用进行研究。
- 2 实验利用金属硫蛋白 I/II 敲除小鼠, 观察在脾脏没有金属硫蛋白 I/II 抗氧化作用条件下, 金属硫蛋白 I/II 敲除小鼠脾细胞对过氧化氢氧化应激损伤的敏感性和 N-乙酰-L-半胱氨酸的抗氧化作用。
- 3 结果证实, 金属硫蛋白 I/II 敲除小鼠脾细胞对过氧化氢处理呈浓度依赖性, 随着过氧化氢浓度的升高, 脾细胞活力逐渐下降。N-乙酰-L-半胱氨酸使乳酸脱氢酶释放和线粒体通透性转换孔的开放减少, 脾细胞活力增强, 可显著减轻过氧化氢诱导的金属硫蛋白 I/II 敲除鼠脾细胞的氧化应激损伤。

### 关键词:

组织构建; 组织构建细胞学实验; 金属硫蛋白; 金属硫蛋白 I/II 基因敲除小鼠; 脾; 凋亡; N-乙酰-L-半胱氨酸; 过氧化氢; 氧化应激; 线粒体通透性转换孔; 脑缺血再灌注; 乳酸脱氢酶; 国家自然科学基金

### 缩略语:

N-乙酰-L-半胱氨酸: N-Acetyl-L-Cysteine, NAC

### 摘要

**背景:** 脑缺血再灌注早期, 由于脾脏中有大量炎症因子浸润引发氧化应激损伤, 导致脑缺血再灌注后脾细胞出现大量凋亡。

**目的:** 观察外源性过氧化氢对金属硫蛋白 I/II 敲除小鼠脾细胞活力的影响及 N-乙酰-L-半胱氨酸对过氧化氢诱导的脾细胞氧化应激损伤的保护作用。

**方法:** 制备金属硫蛋白 I/II 敲除小鼠脾细胞悬液, 分别用不同浓度(0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 mmol/L)过氧化氢处理 2 h 后, MTT 比色法检测细胞活力。根据 MTT 结果选择不同浓度过氧化氢(0.5, 1 mmol/L)诱导脾细胞凋亡, 实验分为 6 组: 对照组、N-乙酰-L-半胱氨酸组、0.5 mmol/L 过氧化氢组、1 mmol/L 过氧化氢组、N-乙酰-L-半胱氨酸+0.5 mmol/L 过氧化氢组、N-乙酰-L-半胱氨酸+1 mmol/L 过氧化氢组, 2 h 后 MTT 比色法检测细胞活力, 酶标仪法检测乳酸脱氢酶活力及紫外分光光度计检测线粒体通透性转换孔的开放情况。

**结果与结论:** 随过氧化氢浓度增加脾细胞活力呈明显下降趋势( $P < 0.01$ ), 且 0.2, 0.5, 1, 2 mmol/L 过氧化氢组脾细胞活力下降幅度最大。与对照组相比, N-乙酰-L-半胱氨酸组脾细胞活力明显提高( $P < 0.01$ ), 且乳酸脱氢酶活力降低( $P < 0.01$ ), 线粒体通透性转换孔开放减少( $P < 0.01$ ); 分别于 0.5, 1 mmol/L 过氧化氢组相比, N-乙酰-L-半胱氨酸+0.5 mmol/L 过氧化氢组、N-乙酰-L-半胱氨酸+1 mmol/L 过氧化氢组脾细胞活力也明显提高( $P < 0.01$ ), 乳酸脱氢酶活力降低( $P < 0.01$ ), 线粒体通透性转换孔开放减少( $P < 0.01$ )。结果表明, 金属硫蛋白 I/II 敲除小鼠随着过氧化氢浓度的升高, 脾细胞活力逐渐下降, 呈浓度依赖性, 尤其对 0.2, 0.5, 1, 2 mmol/L 过氧化氢刺激最为敏感。N-乙酰-L-半胱氨酸使乳酸脱氢酶释放和线粒体通透性转换孔的开放减少, 脾细胞活力增强, 以此减轻过氧化氢诱导的金属硫蛋白 I/II 敲除鼠脾细胞的氧化应激损伤。

和静★, 女, 1987 年生, 山东省泰安市人, 汉族, 天津医科大学基础医学院病理生理教研室在读硕士, 主要从事线粒体和氧化应激相关机制的研究。

hjdlightful@163.com

通讯作者: 姚小梅, 博士, 教授, 研究生导师, 天津医科大学基础医学院病理生理教研室。

jupx@163.com

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2013)07-01243-08

收稿日期: 2012-10-15

修回日期: 2012-11-23

(20120907004/WJ·W)

He Jing★, Studying for master's degree, Department of Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China  
hjdlightful@163.com

Corresponding author: Yao Xiao-mei, Ph.D. in neuroscience, Professor, Master's supervisor, Department of Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China  
jupx@163.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 81273009\*; Tianjin High School Science & Technology Fund Planning Project, No. 20050107\*; Tianjin Science & Technology Council Grant of China, No. 09JCYBJC11700\*

Received: 2012-10-15  
Accepted: 2012-11-23

## Hydrogen peroxide induced oxidative stress in the spleen of metallothionein I/II knockout mice

He Jing, Wei Si-yu, Liu Feng-yong, Ye Jing, Shen Bing-ling, Yao Xiao-mei

Department of Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

### Abstract

**BACKGROUND:** In the early stage of cerebral ischemia-reperfusion, there is a tremendous amount of inflammatory factor expression in the spleen. These inflammatory factor cause oxidative stress damage which leads to cell apoptosis in the spleen after cerebral ischemia-reperfusion.

**OBJECTIVE:** To investigate the effect of exogenous hydrogen peroxide on spleen cell viability and the effect of N-acetyl-L-cytokine on protection of induced oxidative stress in the spleen of metallothionein- I / II knockout mice.

**METHODS:** Metallothionein- I / II knockout mice spleen cell suspension was prepared and treated with various concentrations of hydrogen peroxide (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 mmol/L) for 2 hours, and the cell viability was detected by MTT colorimetric method. Based on the cells and mitochondria level, hydrogen peroxide induced spleen cells were divided into six group: control group, N-acetyl-L-cytokine group, 0.5 mmol/L hydrogen peroxide group, 1 mmol/L hydrogen peroxide group, N-acetyl-L-cytokine+0.5 mmol/L hydrogen peroxide group, N-acetyl-L-cytokine+1 mmol/L hydrogen peroxide group. Then, the cell viability was detected by MTT colorimetric method, lactate dehydrogenase activity were assayed by microplate reader; mitochondrial permeability transition pore was evaluated by ultraviolet spectrophotometer after 2 hours.

**RESULTS AND CONCLUSION:** With the increase of the concentration of hydrogen peroxide, the spleen cell viability was significantly decreased ( $P < 0.01$ ), and 0.2, 0.5, 1, 2 mmol/L hydrogen peroxide groups had the greatest reduction. Compared with the control group, N-acetyl-L-cytokine could significantly increase spleen cell viability ( $P < 0.01$ ), decrease lactate dehydrogenase activity ( $P < 0.01$ ) and decrease the opening state of mitochondrial permeability transition pore ( $P < 0.01$ ). Compared with 0.5 mmol/L hydrogen peroxide group and 1 mmol/L hydrogen peroxide group, N-acetyl-L-cytokine+0.5 mmol/L hydrogen peroxide group and N-acetyl-L-cytokine+1 mmol/L hydrogen peroxide group could also increase spleen cell viability ( $P < 0.01$ ), decrease lactate dehydrogenase activity ( $P < 0.01$ ) and decrease the opening state of mitochondrial permeability transition pore ( $P < 0.01$ ), respectively. These findings suggest that with the increase of the concentration of hydrogen peroxide, the spleen cell viability is significantly decreased in a dose-dependent manner, especially for 0.2, 0.5, 1, 2 mmol/L hydrogen peroxide; N-acetyl-L-cysteine can relieve the oxidative stress damage induced by hydrogen peroxide in metallothionein- I / II knockout mice spleen cells, through reducing the lactate dehydrogenase release and the opening state of mitochondrial permeability transition pore, and increasing spleen cell viability.

**Key Words:** tissue construction; cytology experiments in tissue construction; metallothionein; metallothionein- I / II knockout mice; spleen; apoptosis; N-acetyl-L-cysteine; hydrogen peroxide; oxidative stress; mitochondrial permeability transition pore; cerebral ischemia/reperfusion; lactate dehydrogenase; the National Natural Science Foundation of China

He J, Wei SY, Liu FY, Ye J, Shen BL, Yao XM. Hydrogen peroxide induced oxidative stress in the spleen of metallothionein I/II knockout mice. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(7): 1243-1250.

## 0 引言

金属硫蛋白是一种具有多种生物学效应的蛋白质, 因能与锌、铜、镉等金属离子结合而得名。其可分为金属硫蛋白 I、金属硫蛋白 II, 金属硫蛋白 III, 金属硫蛋白 IV 亚型, 其中金属硫蛋白 I, 金属硫蛋白 II 在多种组织中均有表达, 金属硫蛋白 III 的表达则局限于神经元及男性生殖器官, 而金属硫蛋白 IV 的表达则在鳞状上皮层<sup>[1]</sup>。目前已有较多研究表明, 金属硫蛋白 I / II 可参与多种疾病的发生、发展及预后如脑血管疾病、心脏病、急性肺损伤等, 其具体机制除金属硫蛋白 I / II 可调节机体内重要金属离子的动态稳定外, 它还可对抗多种炎性递质、清除氧自由基、抗细胞凋亡以及促细胞增殖等作用<sup>[1-2]</sup>。

课题组前期研究发现, 小鼠局灶性脑缺血再灌注 2 h 后, 脑组织和脾脏中血管内皮生长因子、Toll 样受体 4、骨髓分化因子 88 等炎症因子表达水平显著上调, 说明脑缺血再灌注早期脑

组织和脾脏中均发生了强烈的免疫炎症反应<sup>[3-4]</sup>。然而脑缺血再灌注96 h后脾脏出现明显萎缩, 苏木精-伊红染色显示脾白髓区和红髓区组织严重破坏, 可见凋亡细胞且活细胞数目明显减少<sup>[5]</sup>。脑缺血再灌注后早期缺血脑组织发出信号, 诱导外周免疫器官脾脏产生大量的炎症因子, 使免疫细胞迁移入外周血液循环, 产生大量的活性氧, 对脑神经功能的预后及脾脏本身均产生不利影响<sup>[6]</sup>。到脑缺血再灌注晚期大量炎症细胞的浸润使脾细胞发生氧化应激损伤甚至凋亡, 使免疫系统受到严重抑制, 易使脑缺血再灌注后患者出现感染或败血症, 同样严重影响脑缺血再灌注患者的预后。因此, 实验推测减轻脑缺血再灌注早期脾脏介导的免疫炎症反应引起的氧化应激损伤, 保护晚期脾细胞免受损伤和凋亡, 扭转免疫抑制状态, 可能会有助于脑缺血再灌注后的神经功能恢复。

过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)可引起氧化应激损伤, 已被广泛用作细胞损伤和凋亡的诱导剂<sup>[7-10]</sup>。N-乙酰-L-半胱氨酸(N-Acetyl-L-Cysteine, NAC)是一种抗氧化剂, 可直接清除自由基, 同时又是抗氧化酶谷胱甘肽的前体物质<sup>[11]</sup>, 对阻止细胞氧化损伤有重要的作用。实验以金属硫蛋白 I/II 敲除鼠脾脏为研究对象, 通过H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤小鼠脾细胞和线粒体模拟脑缺血再灌注后脾脏的氧化应激损伤, 观察在没有金属硫蛋白 I/II 抗氧化保护情况下, 在细胞和线粒体水平上脾脏对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激的敏感性以及NAC对其氧化损伤的拮抗作用, 为保护脑缺血再灌注后脾组织损伤和神经功能预后寻求新的思路。

## 1 材料和方法

**设计:** 细胞学实验。

**时间及地点:** 于2012年2月至2012年8月在天津医科大学基础医学院病理生理学实验室完成。

**材料:**

**实验动物:** 健康7周龄金属硫蛋白 I/II 敲除小鼠, 毛色灰色, 品种编号002211, 品系名称129S7/SvEvBrd-金属硫蛋白1tm1Bri 金属硫蛋白2tm1Bri/J, 购于美国Jackson实验室。SPF级饲养, 维持室内温度(21±2) °C, 相对湿度30%–70%, 光照周期12 h/12 h, 自由饮水进食, 平均日饲料消耗量5 g(8周龄), 平均日饮水消耗量6.0–7.0 mL(8周龄)。饲养到8周龄, 生理状态良好, 体质量达到21–23 g后, 以雌雄2:1配对繁殖, 期间观察阴道栓。妊娠期19–21 d, 平均每窝产仔数为七八只,

出生时体质量1.0–2.0 g, 哺乳期19–21 d。子代断乳后, 与父代分笼饲养, 每次实验随机选取7–8周龄健康小鼠1只用于实验, 共选用20只健康鼠。

小鼠脾细胞培养相关主要试剂及仪器:

Main reagents and instrument for culture of mouse spleen cells:

试剂及仪器	来源
胎牛血清, RPMI-1640 培养基	美国 Thermo scientific 公司
噻唑蓝, D-甘露醇, EGTA	美国 Amresco 公司
N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)	北京 Solarbio 公司
Hepes	Sanland chemical 公司
乳酸脱氢酶测定试剂盒(酶标仪法)	南京建成生物工程研究所
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	北京化工厂
酶标仪	美国 Perkin Elmer 公司
4 °C 高速离心机	美国 Sigma 公司
CO <sub>2</sub> 孵育箱	德国 Binder 公司
无菌超净台	新加坡 ESCO 公司
UV1102 紫外分光光度计	上海天美科学仪器有限公司

**方法:**

**金属硫蛋白 I/II 敲除小鼠脾细胞悬液的制备:** 无菌条件下取成年金属硫蛋白 I/II 敲除小鼠脾脏, 用PBS冲洗2次, 用2 mL注射器抽取PBS, 轻轻加压冲击脾脏, 直到脾脏变白为止。收集脾细胞悬液于离心管中, 1 000 r/min离心10 min, 去上清, 加入10倍体积的Tris-NH<sub>4</sub>Cl 红细胞裂解液(139.6 mmol/L NH<sub>4</sub>Cl, 16.96 mmol/L Tris, pH 7.2), 混匀静止10 min。然后1 000 r/min离心10 min, 细胞沉淀用PBS清洗2次后, 重悬于含体积分数10%胎牛血清的RPMI-1640培养液中<sup>[12]</sup>。

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>损伤金属硫蛋白 I/II 敲除小鼠脾细胞模型的建立:** 用细胞计数板计数, 调整脾细胞悬液浓度为 $5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ , 种于96孔板(100 μL/孔), 同时加入H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(使始终浓度分别为0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 mmol/L), 以正常培养组作为对照组, 每组设7个复孔。细胞于37 °C、体积分数5%CO<sub>2</sub>孵育箱中培养2 h, 每孔加入质量浓度5 g/L的MTT 10 μL, 继续培养4 h, 加三联溶解液(SDS 10 g, 异丁醇5 mL, 10 mol/L HCl 0.1 mL, 双蒸水溶解至100 mL)100 μL/孔, 放入培养箱内继续孵育4–6 h, 镜下观察, 待结晶全部溶解后于酶标仪570 nm处测吸光度值(A)<sup>[7-8, 13]</sup>。实验重复3次。

$$\text{细胞相对存活率(\%)} = \frac{\text{各实验组 A 值} - \text{空白对照组 A 值}}{\text{正常对照组 A 值} - \text{空白对照组 A 值}} \times 100\%$$

NAC对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的金属硫蛋白 I/II 敲除小鼠脾细胞的保护作用检测: 根据MTT结果选择不同浓度H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.5,

1 mmol/L) 诱导脾细胞凋亡, 加入 NAC (使其终浓度为 10 mmol/L) 处理, 实验具体分为对照组、NAC 组、0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组、1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组、NAC+0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组、NAC+1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组共 6 组, 每组设 7 个复孔, 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 孵育箱中培养 2 h 后 MTT 检测细胞活力; 按照乳酸脱氢酶测定试剂盒说明书测定每组乳酸脱氢酶的活性。

**线粒体分离提取与线粒体通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 开放情况测定:** 取成年金属硫蛋白 I/II 敲除小鼠脾脏置于冰上, 用预冷的 PBS 冲洗 2 次后, 置于玻璃匀浆器中, 加入 10 倍体积的线粒体提取试剂 (50 mmol/L HEPES, 1 mol/L 甘露醇, 350 mmol/L 蔗糖, 5 mmol/L EGTA, pH 7.5), 冰上匀浆。匀浆液在 4 °C 离心机中, 以 600×g 离心 5 min, 取上清 11 000×g 离心 10 min<sup>[14]</sup>, 所得沉淀用线粒体通透性转换孔测试递质 (230 mmol/L 甘露醇, 70 mmol/L 蔗糖, 3 mmol/L HEPES, pH 7.4) 悬浮 11 000×g 离心 10 min, 沉淀即为提取的线粒体。线粒体用线粒体通透性转换孔测试递质悬浮, 并随机分为对照组、NAC 组、0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组、1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组、NAC+0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组、NAC+1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组共 6 组 ( $n=6$ , NAC 终浓度为 10 mmol/L), 置于 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 孵育箱中培养 2 h。每组用线粒体通透性转换孔测试递质补足到 3 mL 混匀。UV1102 型紫外分光光度计 540 nm 波长处测吸光度值<sup>[15-16]</sup>。

**主要观察指标:** ① MTT 检测脾细胞活力。② 酶标仪检测培养液上清乳酸脱氢酶的活力。③ 线粒体水平上, 紫外分光光度计检测线粒体通透性转换孔开放情况。

**统计学分析:** 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 所有统计分析均使用 SPSS 16.0 统计学软件进行数据分析。组间均数差异的比较采用单因素方差分析法。方差齐时, 多组间数据比较使用 LSD 法; 方差不齐时, 采用 Tamhane's T2 法, 检验水准  $\alpha=0.01$ 。

## 2 结果

**2.1 金属硫蛋白 I/II 敲除鼠脾细胞对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理呈浓度依赖性** 用不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 mmol/L) 处理金属硫蛋白 I/II 敲除鼠脾细胞 2 h 后, MTT 测定结果发现, 与对照组相比, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组使细胞活力显著下降 ( $P < 0.01$ ), 不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组间脾细胞活力差异有显著性意义 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对金属硫蛋白 I/II 敲除小鼠脾细胞活力的影响

Table 1 Effect of different concentrations of hydrogen peroxide on spleen cell relative viability in metallothionein- I / II knockout mice ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

组别	吸光度值	相对细胞活力 (%)
对照组	0.131±0.005	100.00±0.00
过氧化氢 0.1 mmol/L	0.103±0.002	78.46±1.32
过氧化氢 0.2 mmol/L	0.041±0.002	32.68±1.11
过氧化氢 0.5 mmol/L	0.023±0.001	18.38±0.68
过氧化氢 1 mmol/L	0.018±0.001	14.10±0.73
过氧化氢 2 mmol/L	0.016±0.000	12.14±0.62

注: 单因素方差分析结果显示, 不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组间脾细胞活力差异有显著性意义 ( $P < 0.01$ )。证实 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 是浓度依赖性抑制金属硫蛋白 I/II 敲除小鼠的脾细胞活力。

**2.2 NAC 能够改善 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的金属硫蛋白 I/II 敲除鼠脾细胞活力** MTT 检测表明, 与对照组相比, NAC 组能显著提高脾细胞活力 ( $P < 0.01$ ), 与 0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 相比, NAC+0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组能显著改善 0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的脾细胞活力下降 ( $P < 0.01$ ), 与 1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 相比, NAC+1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组能显著改善 1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的脾细胞活力下降 ( $P < 0.01$ ), 但 NAC+0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组和 NAC+1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组与对照组相比, 脾细胞活力仍降低, 见表 2。

表 2 N-乙酰-L-半胱氨酸对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的金属硫蛋白 I/II 敲除小鼠脾细胞活力的影响

Table 2 Effect of N-acetyl-L-cysteine on hydrogen peroxide-induced spleen cell relative viability in metallothionein- I / II knockout mice ( $\bar{x} \pm s, n=7$ )

组别	吸光度值	相对细胞活力 (%)
对照组	0.042±0.006	100.00±0.00
N-乙酰-L-半胱氨酸 10 mmol/L	0.056±0.004	137.43±4.71 <sup>a</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0.5 mmol/L	0.028±0.001	74.10±2.71 <sup>a</sup>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1 mmol/L	0.025±0.002	63.66±2.55 <sup>a</sup>
N-乙酰-L-半胱氨酸+ 0.5 mmol/L H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.035±0.001	77.04±1.50 <sup>ab</sup>
N-乙酰-L-半胱氨酸+ 1 mmol/L H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.034±0.002	76.44±0.19 <sup>ac</sup>

与对照组比, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与 0.5 mmol/L 过氧化氢组比, <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与 1 mmol/L 过氧化氢组比, <sup>c</sup> $P < 0.01$ , 单因素方差分析。

注: N-乙酰-L-半胱氨酸能改善 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的金属硫蛋白 I/II 敲除小鼠脾细胞活力。

**2.3 NAC 能减轻 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的金属硫蛋白 I/II 敲除鼠脾细胞乳酸脱氢酶活性** 乳酸脱氢酶是糖酵解过程中

一种重要的酶, 任何原因引起的细胞损伤均可导致乳酸脱氢酶漏出, 使培养液中乳酸脱氢酶活性增加。

处理2 h后乳酸脱氢酶测定结果显示, 与对照组相比, NAC组乳酸脱氢酶活力显著降低( $P < 0.01$ ), 0.5, 1 mmol/L  $H_2O_2$ 组培养液上清乳酸脱氢酶活力升高( $P < 0.01$ ), 但增加10 mmol/L NAC处理后, 与0.5 mmol/L  $H_2O_2$ 相比, NAC+0.5 mmol/L  $H_2O_2$ 组培养液上清乳酸脱氢酶活力明显降低( $P < 0.01$ ), 与1 mmol/L  $H_2O_2$ 相比, NAC+1 mmol/L  $H_2O_2$ 组培养液上清乳酸脱氢酶活力也明显降低( $P < 0.01$ ), 但是NAC+0.5 mmol/L  $H_2O_2$ 组和NAC+1 mmol/L  $H_2O_2$ 组与对照组相比, 乳酸脱氢酶活力仍升高, 见表3。

表 3 N-乙酰-L-半胱氨酸对  $H_2O_2$  诱导的金属硫蛋白 I/II 敲除小鼠脾细胞乳酸脱氢酶活力的影响

Table 3 Effect of N-acetyl-L-cysteine on lactate dehydrogenase activity in hydrogen peroxide-induced spleen cells in metallothionein- I /II knockout mice ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	乳酸脱氢酶活力( $\mu$ kat/L)
对照组	58.41 $\pm$ 0.69
N-乙酰-L-半胱氨酸 10mmol/L	57.08 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>
过氧化氢 0.5mmol/L	88.02 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>
过氧化氢 1 mmol/L	89.75 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>
N-乙酰-L-半胱氨酸+0.5 mmol/L $H_2O_2$	64.28 $\pm$ 0.61 <sup>ab</sup>
N-乙酰-L-半胱氨酸+1 mmol/L $H_2O_2$	78.95 $\pm$ 0.23 <sup>ac</sup>

与对照组比, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与 0.5 mmol/L 过氧化氢组比, <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与 1 mmol/L 过氧化氢组比, <sup>c</sup> $P < 0.01$ , 单因素方差分析。

注: N-乙酰-L-半胱氨酸能改善  $H_2O_2$  诱导的金属硫蛋白 I/II 敲除小鼠脾细胞乳酸脱氢酶活力。

**2.4 NAC能减轻 $H_2O_2$ 诱导的金属硫蛋白 I/II 敲除鼠脾细胞线粒体通透性转换孔开放和线粒体肿胀** 线粒体通透性转换孔开放可对甘露醇和蔗糖高通透造成线粒体膨胀, 线粒体吸光度值减少。因而, 通过检测线粒体吸光度值的变化可反映线粒体通透性转换孔的开放情况<sup>[15]</sup>。

处理2 h后测定结果显示, 与对照组相比, NAC组线粒体吸光度值升高( $P < 0.01$ ), 0.5、1 mmol/L  $H_2O_2$  组线粒体吸光度值降低( $P < 0.01$ ), 但增加10 mmol/L NAC处理后, 与0.5 mmol/L  $H_2O_2$ 相比, NAC+0.5 mmol/L  $H_2O_2$ 组线粒体吸光度值显著增加( $P < 0.01$ ), 与 1 mmol/L  $H_2O_2$ 相比, NAC+1 mmol/L  $H_2O_2$ 组线粒体吸光度值也显著增加( $P < 0.01$ ), NAC+0.5 mmol/L  $H_2O_2$

组和NAC+1 mmol/L  $H_2O_2$ 组与对照组相比, 线粒体吸光度值也是增高的, 说明NAC能明显改善 $H_2O_2$ (0.5, 1 mmol/L)诱导的线粒体通透性转换孔开放和线粒体肿胀。见表4。

表 4 N-乙酰-L-半胱氨酸对  $H_2O_2$  诱导的脾细胞线粒体通透性转换孔的影响

Table 4 Effect of N-acetyl-L-cysteine on the opening state of mitochondrial permeability transition pore in  $H_2O_2$ -induced spleen cells in metallothionein- I /II knockout mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	线粒体吸光度值
对照组	0.039 $\pm$ 0.001
N-乙酰-L-半胱氨酸 10 mmol/L	0.055 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>
过氧化氢 0.5 mmol/L	0.038 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>
过氧化氢 1 mmol/L	0.035 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>
N-乙酰-L-半胱氨酸+0.5 mmol/L $H_2O_2$	0.048 $\pm$ 0.001 <sup>ab</sup>
N-乙酰-L-半胱氨酸+1 mmol/L $H_2O_2$	0.047 $\pm$ 0.002 <sup>ac</sup>

与对照组比, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与 0.5 mmol/L 过氧化氢组比, <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; 与 1 mmol/L 过氧化氢组比, <sup>c</sup> $P < 0.01$ , 单因素方差分析。

注: N-乙酰-L-半胱氨酸能减轻  $H_2O_2$  诱导的金属硫蛋白 I/II 敲除小鼠脾细胞线粒体通透性转换孔开放和线粒体肿胀。

### 3 讨论

保护脾细胞免受脑缺血再灌注介导的炎症因子浸润引起的氧化应激损伤和凋亡, 维持机体正常免疫功能, 对脑缺血再灌注预后具有重要意义。脑缺血再灌注数小时内即可激活全身免疫系统, 免疫系统处于激活状态, 脾组织中有大量炎症因子浸润, 这些炎症因子能产生大量的活性氧, 加重脑缺血再灌注患者的损伤<sup>[17]</sup>。有研究表明脑缺血再灌注后外周血中活性氧会显著增加, 并且一些抗氧化酶类如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和非酶类如谷胱甘肽、维生素C等活性出现降低。脾切除能减轻脑缺血再灌注早期全身的炎症反应, 并能增加外周血中抗氧化剂含量, 对损伤脑组织具有一定的保护作用<sup>[18]</sup>。但是脾脏切除后会引发和脑缺血再灌注晚期脾细胞凋亡一样的后果, 使免疫系统处于抑制状态, 增加脑缺血再灌注患者发生感染的机会, 不利于脑缺血再灌注后患者的预后。因此, 脾脏应成为治疗脑缺血再灌注损伤的重要靶点, 脑缺血再灌注早期免疫系统的增强和脑缺血再灌注晚期免疫系统的抑制, 都会对脑缺血再灌注预后产生不利影响。减轻脑缺血再灌注早期因免疫系统增强而引起的氧化应激损伤和保护脑缺血再灌注晚期脾细胞凋亡, 应该成为治疗脑缺血再灌注损伤的关键。

实验在细胞和线粒体水平, 应用过氧化氢作为脾脏氧化应激损伤的诱导剂, 并加入抗氧化剂NAC作干预处理, 为脑缺血再灌注损伤的治疗寻找新的方法。

已有研究表明金属硫蛋白具有强大的抗氧化能力。它们最大的特性就是能与铜、锌、镉等金属离子结合, 维持金属离子稳态, 且能保护机体免受镉、汞等金属离子中毒引起的氧化应激损伤<sup>[1]</sup>。给啮齿动物肝脏注射如四氯化碳、甲萘醌和百枯草等导致自由基形成的化合物后, 金属硫蛋白在基因和蛋白水平表达均有所升高; 许多诱导氧化应激损伤的因素如氯仿、松节油、马来酸二乙酯, 同样可以在体内外诱导金属硫蛋白 I/II 的表达<sup>[2]</sup>。Yu等<sup>[19]</sup>在中枢神经系统研究中发现, 金属硫蛋白 I/II 通过减少或直接清除氧自由基, 稳定线粒体膜电位, 从而保护天门冬氨酸诱导的氧化应激损伤。金属硫蛋白 I/II 除了能拮抗氧自由基引起的氧化应激以外, 还能降低Caspase-3的活力并增加兴奋性神经递质谷氨酸的含量, 从而保护脑组织免受氧化应激损伤<sup>[20]</sup>。实验以金属硫蛋白 I/II 敲除鼠脾脏为研究对象, 观察在没有金属硫蛋白 I/II 抗氧化保护下, 脾细胞对过氧化氢刺激的敏感性及其抗氧化作用。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导金属硫蛋白 I/II 敲除鼠脾细胞损伤呈浓度依赖性。实验发现0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理2 h后, 提示金属硫蛋白 I/II 敲除鼠脾细胞活力随H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度的增加逐渐下降, 且对0.2, 0.5, 1, 2 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激更为敏感。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>可直接氧化细胞膜上的蛋白质及脂质, 极易穿透细胞膜进入细胞内, 并在铁、铜、镉、镍等金属离子存在下生成氧化活性更强的羟自由基[(Fe, Cu, Cd, Ni)<sup>2+</sup>+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fe, Cu, Cd, Ni)<sup>3+</sup>+OH<sup>-</sup>+•OH], 在没有金属硫蛋白 I/II 对金属离子缓冲的情况下, 0.1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>处理脾细胞2 h后, 脾细胞活力即出现了下降, 同样处理2 h后0. mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>则使脾细胞活力出现了明显下降, 0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>则使脾细胞活力出现了显著下降, 1, 2 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>则使脾细胞活力下降更加显著。产生的羟自由基能干扰细胞内正常代谢环境, 活化Caspase-3等促凋亡因子造成线粒体损伤、DNA双链断裂, 细胞最终发生坏死和凋亡<sup>[21-22]</sup>。

选用10 mmol/L NAC干预过氧化氢诱导的金属硫蛋白 I/II 敲除鼠脾细胞和线粒体。NAC作为抗氧化剂, 已被广泛用于拮抗各种氧化应激损伤。有研究表明, 感染寄生虫的人单核细胞给予超氧化物歧化酶抑制剂处

理后, 过量的超氧化物能诱导寄生虫死亡, 当给予10 mmol/L NAC后可翻转这一现象<sup>[23]</sup>。Xie等<sup>[24]</sup>研究发现过氧化氢酶缺失的腺苷酸活化蛋白激酶突变C.线幼虫与腺苷酸活化蛋白激酶突变C.线幼虫相比, 体内过氧化氢含量显著增高, 给予10 mmol/L NAC后能显著降低其体内过量的过氧化氢。NAC也能保护淡水真涡虫镉中毒引起的氧化应激损伤, 并能明显降低其体内聚集的镉, 指出NAC不仅具有强大的抗氧化能力, 也是金属离子的螯合剂<sup>[25]</sup>。这些研究均将NAC应用在寄生虫上, 实验将其应用在了金属硫蛋白 I/II 敲除鼠脾细胞和线粒体上, 观察10 mmol/L NAC能否拮抗过氧化氢引起的氧化应激损伤。

NAC处理H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的金属硫蛋白 I/II 敲除鼠脾细胞, 发现10 mmol/L NAC能有效拮抗H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>引起的金属硫蛋白 I/II 敲除鼠脾细胞氧化应激损伤, 但10 mmol/L NAC并不能完全反转脾细胞的氧化应激损伤。根据MTT结果发现1, 2 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对脾细胞损伤程度差别不大, 故只选用了0.5, 1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>两个浓度观察NAC的抗氧化损伤能力。各组同样处理金属硫蛋白 I/II 敲除鼠脾细胞2 h后MTT检测细胞活力, 与对照组相比, NAC组使细胞活力从100%增加到了137.43%, 分别与0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组、1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组相比, NAC+0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组和NAC+1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组使细胞活力分别由74.10%, 63.66%提高到77.04%, 76.44%, 说明NAC能有效提高过氧化氢诱导的脾细胞活力的下降, 但脾细胞活力还是低于对照组。

乳酸脱氢酶的释放是细胞损伤的重要标志, 任何原因引起的细胞损伤均会导致乳酸脱氢酶的释放。通过酶标仪法测定培养液上清乳酸脱氢酶的活性, 进一步验证NAC能否有效拮抗H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>对细胞的损伤, 发现与对照组相比, NAC组使乳酸脱氢酶活力从下降了2.28%, 分别与0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组、1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组相比, NAC+0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和NAC+1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组使培养液上清中乳酸脱氢酶活力分别下降26.97%和12.04%, 但乳酸脱氢酶的活力还是高于对照组。这些结果均揭示在没有金属硫蛋白 I/II 抗氧化作用下, NAC能减轻金属硫蛋白 I/II 敲除鼠脾细胞氧化应激损伤但不能有效反转这一损伤。

实验结果发现, 10 mmol/L NAC能减少H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的脾细胞细胞线粒体通透性转换孔的开放和线粒体肿胀,

但10 mmol/L NAC也不能完全反转脾线粒体的氧化应激损伤。实验从线粒体水平,测定脾细胞线粒体通透性转换孔开放和线粒体肿胀,来衡量过氧化氢和NAC对线粒体氧化应激的影响。

在前期研究中发现H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>可引起强烈的氧化应激反应,线粒体是氧化应激的主要场所,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>可直接攻击线粒体膜脂质,引发脂质过氧化反应,破坏线粒体膜完整性及通透性,使线粒体跨膜电位发生改变<sup>[26-27]</sup>。线粒体跨膜电位的改变是细胞凋亡的早期标志,线粒体通透性转换孔是位于线粒体内外膜间的非选择性电压道,对于维持线粒体跨膜电位具有重要作用。用不同浓度H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.5, 1 mmol/L)处理金属硫蛋白 I/II 敲除小鼠脾细胞线粒体2 h后发现,与对照组相比,NAC组使线粒体吸光度增加了41.03%,分别与0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组、1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组相比,NAC+0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和NAC+1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>组可使线粒体吸光度分别增加26.32%和34.29%,说明NAC可减轻过氧化氢诱导的线粒体通透性转换孔的开放。

生理情况下,线粒体通透性转换孔一般处于关闭状态。钙超载、氧化应激等损伤可使线粒体通透性转换孔出现不可逆开放,水和溶质的进入使线粒体基质肿胀,线粒体去极化,并导致线粒体外膜破裂,内膜蛋白包括乳酸脱氢酶、细胞色素C、Caspase在内的各种活性蛋白进入到细胞质中,最终DNA断裂导致细胞坏死和凋亡<sup>[28]</sup>。最近有研究发现心肌缺血再灌注损伤及神经退行性疾病如阿尔兹海默病、多样硬化引起的氧化应激损伤都与线粒体通透性转换孔的开放有关,线粒体通透性转换孔已经成为治疗心脑血管病的研究热点<sup>[29-30]</sup>。

实验通过外源性过氧化氢诱导金属硫蛋白 I/II 小鼠脾细胞损伤,模拟脑缺血再灌注后脾脏细胞的氧化应激损伤和凋亡,为治疗脑缺血再灌注损伤寻求新的思路。发现在没有金属硫蛋白 I/II 抗氧化保护下,金属硫蛋白 I/II 小鼠脾细胞活力随H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>浓度的增加逐渐下降,且脾细胞对0.2, 0.5, 1, 2 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激最为敏感,并将抗氧化剂NAC作为治疗剂,发现在细胞和线粒体水平,10 mmol/L NAC能改善氧化应激损伤引起的脾细胞活力下降、乳酸脱氢酶释放和线粒体通透性转换孔开放。

**基金资助:** 国家自然科学基金(81273009), 天津市高等

学校科技发展基金项目(20050107), 天津市应用基础及前沿技术研究计划(09JCYBJC11700)。

**致谢:** 感谢天津医科大学实验动物科学部对实验动物的饲养; 感谢天津医科大学基础医学院病理生理教研室各位老师、同学在实验过程中的帮助。

**作者贡献:** 第一作者进行实验实施,数据分析,成文; 其他作者提供技术支持; 通讯作者实验设计和指导。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理批准:** 实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》<sup>[31]</sup>。

**作者声明:** 文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

#### 4 参考文献

- [1] Thirumorthy N, Shyam SA, Manisenthil Kumar KT, et al. A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology. *World J Surg Oncol*. 2011;9:54.
- [2] Inoue k, Takano H, Shimada A, et al. Metallothionein as an anti-inflammatory mediator. *Mediators of Inflammation*. 2009; 2009:101659.
- [3] Yao X, Miao W, Li M, et al. Protective effect of albumin on VEGF and brain edema in acute isehemia in rats. *Neurosci Lett*. 2010;472(3):179-183.
- [4] Wang M, Wang YM, Li HD, et al. *Zhonghua Laonian Xinxuexueguanbing Zazhi*. 2011;13(2):164-167. 王敏,王永明,李海东,等.白蛋白治疗对小鼠脑缺血早期脑组织Toll样受体4和骨髓分化因子88 mRNA表达的影响[J].中华老年心脑血管病杂志,2011,13(2):164-167.
- [5] Offner H, Vandenbark AA, Hurn PD. Effect of experimental stroke on peripheral immunity: CNS ischemia induces profound immunosuppression. *Neuroscience*. 2009;158(3): 1098-1111.
- [6] Kim CH, Vaziri ND, Rodriguez-Iturbe B. Integrin expression and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in circulating and splenic leukocytes of obese rats. *Obesity (Silver Spring)*. 2007; 15(9):2209-2216.
- [7] Liu B, Jian Z, Li Q, et al. Baicalein protects Human melanocytes from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis via inhibiting mitochondria-dependent caspase activation and the p38 MAPK pathway. *Free Radic Biol Med*. 2012;53(2):183-193.
- [8] Li XB, Zhang HC, Guo ZK. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2012;16(1):22-26. 刘新宾,张红超,郭子宽.骨髓间充质干细胞条件培养液对H2O2损伤大鼠心肌细胞的保护[J].中国组织工程研究,2012,16(1): 22-26.
- [9] Gu DS, Li W, Gu WW. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2011;15(44):8281-8284. 顾东曙,刘闻,顾为望.静脉输注过氧化氢溶液上调小鼠脾脏和外周血CD4<sup>+</sup>Foxo3<sup>+</sup>调节性T细胞[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(44):8281-8284.

- [10] Yang P, Peairs JJ, Tano R, et al. Oxidant-mediated Akt activation in human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(10):4598-606.
- [11] Yoshino F, Yoshida A, Okada E, et al. Dental resin curing blue light induced oxidative stress with reactive oxygen. *J Photochem Photobiol B*. 2012;114:73-78.
- [12] Nakamura R, Lnoue K, Fujitani Y, et al. In vitro study of the effect of nanoparticle-rich diesel exhaust particles on IL-18 production in splenocytes. *J Toxicol Sci*. 2011;36(6):823-827.
- [13] Wu Y, Wang D, Wang X, et al. Caspase 3 is activated through caspase 8 instead of caspase 9 during H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in HeLa cells. *Cell Physiol Biochem*. 2011;27(5):539-546.
- [14] Ru Y, Yin L, Sun H, et al. A micropreparation of mitochondria from cells using magnetic beads with immunoaffinity. *Anal Biochem*. 2012;421(1):219-226.
- [15] Wang DM, Dong J, Qi ZT, et al. Xian Tiyu Xueyuan Xuebao. 2011;28(4):471-475.  
王冬梅,董军,漆正堂,等. 对骨骼肌线粒体通透性转换孔及细胞凋亡的影响[J]. 西安体育学院学报, 2011, 28(4):471-475.
- [16] Petronilli V, Penzo D, Scorrano L, et al. The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome c and cell death. *J Biol Chem*. 2001;267(15):12030-12034.
- [17] Ajmo CT Jr, Vernon DO, Collier L, et al. The spleen contributes to stroke-induced neurodegeneration. *J Neurosci Res*. 2008;86(10):2227-2234.
- [18] Izci Y. Splenectomy may be a prophylactic treatment for cerebral ischemia? *Med Hypotheses*. 2010;75(4):347-349.
- [19] Yu X, Guo J, Fang H, et al. Basal metallothionein- I /II protects against NMDA-mediated oxidative injury in cortical neuron/astrocyte cultures. *Toxicology*. 2011;282(1-2):16-22.
- [20] Ghanizadeh A. Gold implants and increased expression of metallothionein- I /II as a novel hypothesized therapeutic approach for autism. *Toxicology*. 2011; 283(1):63-64.
- [21] Hamdi Y, Kaddour H, Vaudry D, et al. The octadecaneuropeptide ODN protects astrocytes against hydrogen peroxide-induced apoptosis via a PKA/MAPK-dependent mechanism. *PLoS One*. 2012;7(8):e42498.
- [22] Baumeister P, Huebner T, Reiter M, et al. Reduction of oxidative DNA fragmentation by ascorbic acid, zinc and N-acetylcysteine in nasal mucosa tissue cultures. *Anticancer Res*. 2009;29(11):4571-4574.
- [23] Khouri R, Novais F, Santana G, et al. DETC induces Leishmania parasite killing in human in vitro and murine in vivo models: a promising therapeutic alternative in Leishmaniasis. *PLoS One*. 2010;5(12):e14394.
- [24] Xie M, Roy R. Increased levels of hydrogen peroxide induce a HIF-1-dependent modification of lipid metabolism in AMPK compromised *C. elegans* Dauer Larvae. *Cell Metab*. 2012; 16(3):322-335.
- [25] Wu JP, Chen HC, Li MH. Bioaccumulation and toxicodynamics of cadmium of freshwater planarian and the protective effect of N-Acetylcysteine. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2012;63(2):220-229.
- [26] Yao X, Li M, He J, et al. Effect of early acute high concentrations of iodide exposure on mitochondrial superoxide production in FRTL cells. *Free Radic Biol Med*. 2012; 52(8):1343-1352.
- [27] Li M, Li LY, Chen ZP, et al. Tianjin Yiyao. 2010;38(3): 212-215.  
李敏,李兰英,陈组培,等. 过氧化氢对FRTL细胞线粒体膜电位和超氧化物生成的影响[J]. 天津医药, 2010, 38(3):212-215.
- [28] Kinnally KW, Peixoto PM, Ryu SY, et al. Is mPTP the gate keeper for necrosis, apoptosis, or both? *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(4):616-622.
- [29] Drahota Z, Milerova M, Endlicher R, et al. Developmental changes of the sensitivity of cardiac and liver mitochondrial permeability transition pore to calcium load and oxidative stress. *Physiol Res*. 2012;61(Suppl 1):S165-172.
- [30] Loor G, Kondapalli J, Lwase H, et al. Mitochondrial oxidant stress triggers cell death in simulated ischemia-reperfusion. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(7):1382-1394.
- [31] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.