

## 抗坏血酸对钴纳米粒子及钴离子致成纤维细胞毒性的保护作用\*

洪鸿翔<sup>1</sup>, 朱海<sup>2</sup>, 刘雅克<sup>2</sup>, 杨晓佑<sup>2</sup>, 吴雪飞<sup>2</sup>, 崔志明<sup>1△</sup>, 刘璠<sup>2</sup>

(1. 江苏省南通市第一人民医院骨科 226001; 2. 南通大学附属医院骨科, 江苏南通 226001)

**[摘要]** **目的** 探讨抗坏血酸(AA)对降低钴(Co)诱导的成纤维细胞毒性作用。**方法** 将实验分为空白对照、Co<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>+AA、钴纳米粒子(CoNPs)、CoNPs+AA、AA 6 个组。AA 提前预处理 1 h。分别用 CCK8 检测 CoNPs、Co<sup>2+</sup> 诱导及 AA 处理后细胞毒性, 采用荧光染色技术检测线粒体中活性氧生成, Western blot 检测相关蛋白表达, 实时定量 PCR 检测相关分子 mRNA 水平。并检测细胞质中细胞色素 C 的水平。**结果** 当使用 CoNPs 和 Co<sup>2+</sup> 处理细胞后, 细胞出现凋亡。CoNPs 可以明显诱导活性氧(ROS)生成; 促凋亡因子(Caspase 3 及 Bax)表达明显升高, 而抗凋亡因子 Bcl-2 表达减少; 细胞色素 C 及细胞凋亡诱导因子(AIF)均表达增加, 并从线粒体进入细胞质中; 使用 AA 预处理后, CoNPs 所引起的这些改变可被减少。**结论** AA 可以通过减少 ROS 的生成与释放降低 CoNPs 导致的细胞毒性, 但不能减弱 Co<sup>2+</sup> 毒性作用。

**[关键词]** 钴; 纳米粒子; 氧化性应激; 细胞凋亡; 抗坏血酸**[中图分类号]** R687.3+2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)05-0607-03**Protective effect of L-ascorbic acid against fibroblast cytotoxicity induced by cobalt nanoparticles and ions\***HONG Hongxiang<sup>1</sup>, ZHU Hai<sup>2</sup>, LIU Yake<sup>2</sup>, YANG Xiaoyou<sup>2</sup>, WU Xuefei<sup>2</sup>, CUI Zhiming<sup>1△</sup>, LIU Fan<sup>2</sup>

(1. Department of Orthopedics, Nantong Municipal First People's Hospital, Nantong, Jiangsu 226001, China;

2. Department of Orthopedics, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the effect of L-ascorbic acid(AA) for reducing the fibroblast cells induced by cobalt(co) cytotoxicity. **Methods** The experiment was divided into the blank control group, Co<sup>2+</sup> group, Co<sup>2+</sup>+AA group, cobalt nanoparticles(CoNPs) group, CoNPs+AA group and AA group. The AA pretreated for 1 h was performed in advance. The CCK8 assay was used to detect the CoNPs and Co<sup>2+</sup> induced and AA-treated cytotoxicity. The fluorescence staining was used to measure the production of ROS in mitochondria. The real-time polymerase chain reaction(PCR) and Western blot were used to measure the expression of related protein and related molecular mRNA respectively. Moreover the cytochrome-C level in cytoplasm was detected. **Results** After treating the cells by CoNPs and Co<sup>2+</sup>, the cells appeared apoptosis. CoNPs could significantly induce ROS generation; the proapoptotic factors(caspases-3, and Bax) were significantly increased, while the anti-apoptotic factor Bcl-2 expression was decreased; cytochrome C and AIF expressions were up-regulated and released from mitochondria into the cytoplasm, after AA pretreatment, these changes caused by CoNPs were decreased. **Conclusion** AA can reduce the CoNPs caused cytotoxicity by reducing ROS generation and release, but can not weaken the Co<sup>2+</sup> toxic effect.

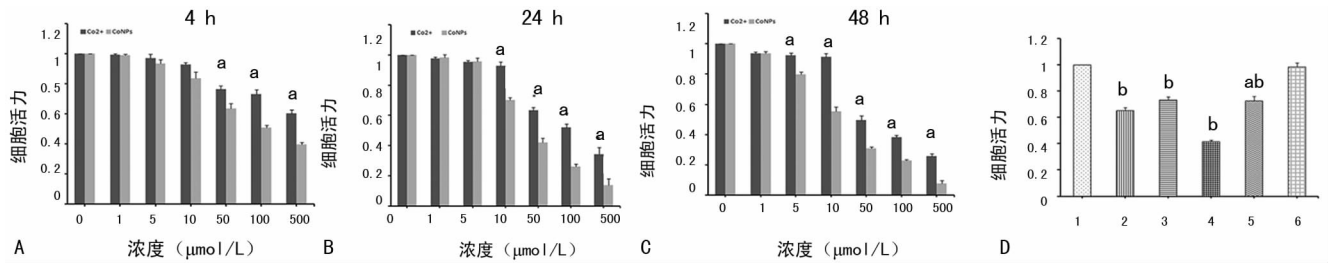
**[Key words]** cobalt; nanoparticles; oxidative stress; apoptosis; ascorbic acid

随着金属对金属(metal-on-metal, MoM)髋关节置换术的普及,其不良反应渐渐引起人们的高度重视,如局部软组织反应及炎性假瘤等<sup>[1]</sup>。由钴铬合金制成的 MoM 髋关节置换植入物在体内会释放大量的金属纳米粒子及金属离子<sup>[2]</sup>。钴纳米粒子(cobalt nanoparticles, CoNPs)是植入物降解产物的重要组成部分<sup>[3]</sup>。因此,钴(CO)可能是导致 MoM 髋关节置换术中不良反应的主要原因。体外实验已经证明,Co<sup>2+</sup> 可以导致氧化损伤、DNA 损伤、炎症反应及有遗传毒性作用<sup>[4]</sup>。有报道称在体外实验中碳化钨-钴(WC-CO)微粒可以诱导细胞凋亡<sup>[5]</sup>。通过测定谷胱甘肽(GSH)水平的变化,可以发现与微粒相比,WC-CoNPs 可以产生更高水平的活性氧(ROS),从而产生更强烈的氧化应激反应。进一步研究表明,在 JB6 细胞上,过氧化氢酶可以消除大量 ROS,抑制 WC-CoNPs 诱导的线粒体膜通透性损伤<sup>[6]</sup>。抗坏血酸(ascorbic acid, AA)是一种常用的抗氧化剂,现已证实增加生理水平的 AA 可以抑制细胞内 ROS 水平<sup>[7]</sup>。本实验旨在探讨 CoNPs 和 Co<sup>2+</sup> 对成纤维细胞的毒性作用机制,并使用 AA 降低 CoNPs 和 Co<sup>2+</sup> 所致的毒性反应。

**1 材料与方法**

**1.1 材料** Balb/3T3 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院。CoNPs,氯化钴(COCl<sup>-2</sup>)和 AA 购于 Sigma 公司。抗体:细胞凋亡诱导因子(AIF),Bcl-2、Bax、Caspase 3、血红素加氧酶 1(HO-1)、β-actin 购于美国 Cell Signaling Technology 公司,兔抗及鼠抗购自 Sigma 公司。Trizol 总 RNA 提取试剂、逆转录试剂盒及 PCR 试剂盒购于 Invitrogen 公司,PCR 引物购自 Sigma 公司,EDTA-Na<sup>2</sup> 购于 Life Sciences 公司,细胞色素 C 试剂盒购自上海研谨生物科技公司,GSH 检测试剂盒来自碧云天,CCK8 试剂盒来自日本同仁化学研究所。

**1.2 方法** 将 Balb/3T3 细胞平均适量接种到 96 孔板中培养,每孔约 100 μL。分别加入 100 μL 含有不同浓度药液的培养基,分别处理 12、24、48 h。加入 CCK8 试剂,酶标仪 450 nm 波长测量。将细胞平均适量接种到 6 孔板中,分为如下 6 个组:对照组、Co<sup>2+</sup> 组、Co<sup>2+</sup>+AA 组、CoNPs 组、CoNPs+AA 组、AA 组。其中,加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的对照组为阳性对照组。首先用 50 μmol/L AA 提前预处理 1 h,然后用 50 μmol/L CoNPs



A、B、C:细胞分别被不同浓度  $\text{Co}^{2+}$  和 CoNPs 处理 4、24、48 h;D:各组细胞活性比较;1:对照组,2: $\text{Co}^{2+}$  组,3: $\text{Co}^{2+}$  + AA 组,4:CoNP 组,5:CoNPs+AA 组,6:AA 组;<sup>a</sup>: $P < 0.05$ ,与 CoNPs 组比较;<sup>b</sup>: $P < 0.05$ ,与对照组比较

图1 AA对 $\text{Co}^{2+}$ 和CoNPs处理过的Balb/3T3细胞的作用

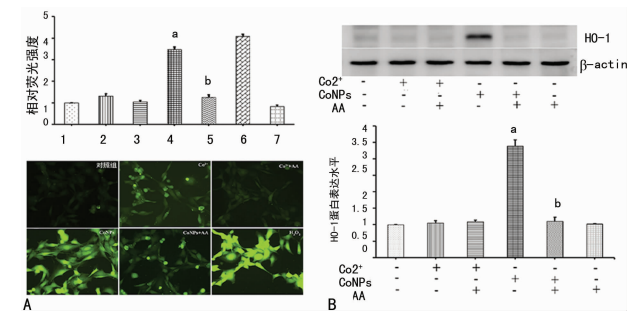
和  $50 \mu\text{mol/L}$   $\text{Co}^{2+}$  分别再处理 24 h。分别用 CCK8 检测 CoNPs、 $\text{Co}^{2+}$  诱导及 AA 处理后的细胞毒性,使用细胞色素 C 试剂盒检测从线粒体释放到细胞质中细胞色素 C 的水平。采用荧光染色技术检测线粒体中 ROS 生成,Western blot 技术检测相关蛋白表达,实时定量 PCR 技术检测 mRNA 水平的变化。所有检测重复 3 次。

**1.3 统计学处理** 实验数据采用 STATA13.0 软件进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA),组间比较采用 SNK 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 AA 对细胞的保护作用** CoNPs 和  $\text{Co}^{2+}$  对细胞的毒性作用随时间延长而增加,随剂量加大而增加,具有时间和剂量依赖性,见图 1A、B、C。CoNPs 诱导的毒性作用明显强于  $\text{Co}^{2+}$ 。CoNPs 和  $\text{Co}^{2+}$  处理 24 h 后,其  $\text{IC}_{50}$  值约为  $50 \mu\text{mol/L}$ 。与 CoNPs 组比较,使用 AA 预处理可以明显提高细胞的存活率,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );而 AA 预处理对  $\text{Co}^{2+}$  处理的细胞存活率无明显影响(图 1D)。

**2.2 AA 对细胞内 ROS 及 HO-1 生成的影响** 结果显示,CoNPs 处理 24 h 可以明显增加 ROS 的表达 ( $P < 0.05$ );而使用 AA 预处理可以明显减少 CoNPs 诱导的 ROS 生成 ( $P < 0.05$ ); $\text{Co}^{2+}$  可以轻微地增加 ROS 的水平,AA 只轻微降低  $\text{Co}^{2+}$  诱导的 ROS 水平(图 2A)。CoNPs 可以明显诱导 HO-1 的表达,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ );使用 AA 预处理,可以明显减少由 CoNPs 诱导的 HO-1 的表达 ( $P < 0.05$ );而  $\text{Co}^{2+}$  对 HO-1 表达无影响,见图 2B。



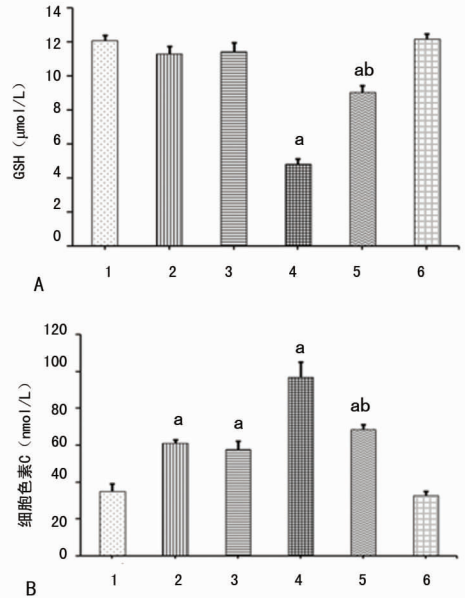
A:AA 对细胞内 ROS 的影响;1:对照组;2: $\text{Co}^{2+}$  组;3: $\text{Co}^{2+}$  + AA 组;4:CoNP 组;5:CoNP+AA 组;6: $\text{H}_2\text{O}_2$  处理阳性对照组;7:AA 组;B:AA 对细胞内 HO-1 的影响,<sup>a</sup>: $P < 0.05$ ,与对照组比较,<sup>b</sup>: $P < 0.05$ ,与 CoNPs 组比较

图2 AA对细胞内ROS及HO-1生成的影响

### 2.3 AA 对细胞内 GSH 生成及细胞色素 C 释放的影响

CoNPs 处理可以明显减少 GSH 水平;AA 预处理可以使 CoNPs 组 GSH 降低减弱 ( $P < 0.05$ );而  $\text{Co}^{2+}$  对 GSH 几乎无影响(图 3A)。CoNPs 和  $\text{Co}^{2+}$  都可诱导细胞色素 C 从线粒体释放进入细胞质中 ( $P < 0.05$ );AA 预处理可以抑制 CoNPs 诱

导的细胞色素 C 的释放 ( $P < 0.05$ );而 AA 对  $\text{Co}^{2+}$  无明显作用,见图 3B。



A:AA 对细胞内 GSH 的影响;B:AA 对细胞内细胞色素 C 的影响;1:对照组;2: $\text{Co}^{2+}$  组;3: $\text{Co}^{2+}$  + AA 组;4:CoNPs 组;5:CoNPs+AA 组;6:AA 组;<sup>a</sup>: $P < 0.05$ ,与对照组比较;<sup>b</sup>: $P < 0.05$ ,与 CoNPs 组比较

图3 AA对细胞内GSH生成及细胞色素C释放的影响

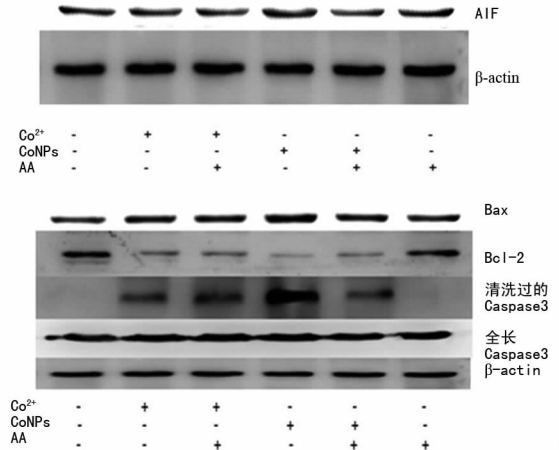


图4 Western blot 检测细胞内 AIF、Bax 等蛋白表达

**2.4 AA 对细胞内 Bax、Bcl-2 及 AIF、Caspases 3 蛋白表达的影响** CoNPs 和  $\text{Co}^{2+}$  可明显抑制抗凋亡因子 Bcl-2 表达,其中 CoNPs 的抑制作用更明显;使用 AA 预处理可抑制 CoNPs 诱

对 Bcl-2 作用,但对  $\text{Co}^{2+}$  的抑制作用无明显影响。CoNPs 和  $\text{Co}^{2+}$  明显诱导促凋亡因子 Bax 表达,且 CoNPs 的诱导作用更明显;使用 AA 预处理后可降低 CoNPs 的诱导作用,但对  $\text{Co}^{2+}$  无明显影响。CoNPs 和  $\text{Co}^{2+}$  可明显激活促凋亡 Caspase 家族表达,使其高表达,CoNPs 的诱导作用更明显;使用 AA 预处理可降低 CoNPs 的诱导作用,但是对  $\text{Co}^{2+}$  的诱导作用无明显影响。CoNPs 可明显诱导 AIF 表达;使用 AA 预处理可以明显减少 AIF 的表达; $\text{Co}^{2+}$  对 AIF 的表达无明显的影响,见图 4。

### 3 讨 论

随着 MoM 关节置换术应用越来越多,由假体释放的金属纳米粒子已成为潜在的健康威胁<sup>[1]</sup>。有报道称 MoM 髋关节假体会导致患者不明原因的疼痛<sup>[6]</sup>,血液中金属离子浓度超标以及早期二次翻修率增高<sup>[9]</sup>。对假体组织检测发现,金属磨损物大多以 CoCr 纳米粒子形式存在,且 Co 可能是不良反应的主要原因<sup>[10]</sup>。

氧化应激是纳米粒子毒性作用的重要机制之一,且细胞内 ROS 是评价纳米粒子各种毒性作用的常用关键指标<sup>[11]</sup>。GSH 是一种重要的抗氧化剂,在保护细胞对抗凋亡过程中发挥重要作用,GSH 的损耗可以促进细胞内 ROS 堆积及 HO-1 表达,导致细胞凋亡<sup>[12]</sup>。HO-1 水平是衡量氧化应激水平的代表性指标<sup>[13]</sup>。通过荧光染色测量 ROS 发现,CoNPs 使细胞中自由基表达更高,GSH 水平下降,HO-1 表达增加,导致更严重的氧化应激反应。抗氧化剂 AA 是 GSH 的前体,可以抑制 ROS 生成,可部分缓解 CoNPs 诱导的细胞各项指标变化,减少细胞死亡,然而 AA 对  $\text{Co}^{2+}$  引起的细胞指标变化无作用。这表明由 CoNPs 诱导的细胞死亡和 ROS 生成有关,AA 能减少 CoNPs 诱导的死亡可能是通过减少了 ROS 的生成,而  $\text{Co}^{2+}$  无明显诱导 ROS 生成的作用。

有研究测量暴露于  $\text{Co}^{2+}$  细胞胞内 AA 水平,结果显示其水平降低,且在巨噬细胞暴露于 CoNPs 时,在细胞中补充或维持 AA 水平能明显提高细胞活性<sup>[7]</sup>。据报道,当金属离子暴露于人支气管上皮细胞(HAEO)中,额外补充生理水平的 AA (100  $\mu\text{mol/L}$ )可以恢复细胞内 AA 盐水平,转化为类似于初始气管基部内皮细胞,也能在内皮细胞中预防  $\text{Co}^{2+}$  毒性<sup>[14]</sup>。AA 盐可抑制氧化应激相关的 HO-1 生成,同时降低涉及凋亡的 Caspase 家族活性<sup>[15]</sup>。这更进一步表明了 AA 的保护作用与 ROS 生成减少有密切的联系。

已有研究表明 CoNPs 和  $\text{Co}^{2+}$  都可以诱导细胞凋亡<sup>[16]</sup>,但其具体分子机制仍然不是很明确。哺乳动物细胞可以通过两条信号级联反应实现凋亡:内源性途径和外源性途径。Caspase 属于半胱氨酸蛋白酶家族,在细胞凋亡、坏死和炎症中扮演必不可少的角色。本研究中,CoNPs 和  $\text{Co}^{2+}$  都激活了 Caspase 3,并且 CoNPs 的效应高于  $\text{Co}^{2+}$ ,这表明 CoNPs 和  $\text{Co}^{2+}$  诱导的细胞凋亡可能通过外源性信号转导途径。内源性凋亡途径主要通过氧化应激和其他因子损伤线粒体,导致细胞色素 C 和 AIF 从线粒体释放入细胞质激活内源性凋亡途径<sup>[17]</sup>。AIF 直接靶向于 DNA 破碎和染色质凝集,是 Caspase 非依赖性凋亡途径<sup>[18]</sup>,而细胞色素 C 以一种 Caspase 依赖性途径诱导细胞凋亡<sup>[19]</sup>。本研究发现 CoNPs 和  $\text{Co}^{2+}$  都可以诱导细胞色素 C 和 AIF 从线粒体释放入细胞质。结果表明 CoNPs 和  $\text{Co}^{2+}$  激活了细胞内源性凋亡途径。因此,CoNPs 和  $\text{Co}^{2+}$  可以同时激活内源性和外源性凋亡途径。

线粒体介导的内源性凋亡途径受 Bcl-2 家族调控。Bcl-2 家族蛋白通过调控促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白之间的平衡调控细胞生存或死亡<sup>[20]</sup>。在本研究中,CoNPs 和  $\text{Co}^{2+}$  都可以增加

促凋亡因子 Bax 生成,减少抗凋亡因子 Bcl-2 生成,但是 CoNPs 的作用强于  $\text{Co}^{2+}$ 。

与  $\text{Co}^{2+}$  相比,CoNPs 导致更大幅度的 GSH 减少、HO-1 增加和 ROS 高表达,而  $\text{Co}^{2+}$  基本未改变这些指标。这表明  $\text{Co}^{2+}$  并未导致高浓度的 ROS 生成。尽管以往研究表明  $\text{Co}^{2+}$  也会产生 ROS,这个矛盾的结论可能是因为  $\text{Co}^{2+}$  浓度不同、时间点不同及 CO 盐的纯度不同而造成<sup>[7]</sup>。在实验中,尽管 AA 可以部分减少 CoNPs 的细胞毒性,但是它不能完全逆转 CoNPs 诱导的细胞凋亡,提示 CoNPs 可能也通过其他非依赖 ROS 的凋亡途径诱导细胞凋亡,这将有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] GILL H S, GRAMMATOPOULOS G, ADSHEAD S A, et al. Molecular and immune toxicity of CoCr nanoparticles in MoM hip arthroplasty[J]. Trends Mol Med, 2012, 18(3):145-155.
- [2] XIA Z D, KWON Y M, MEHMOOD S, et al. Characterization of metal-wear nanoparticles in pseudotumor following metal-on-metal hip resurfacing[J]. Nanomedicine, 2011, 7(6):674-681.
- [3] MILOSEV I, REMSKAR M. In vivo production of nanosized metal wear debris formed by tribochemical reaction as confirmed by high-resolution TEM and XPS analyses[J]. J Biomed Mater Res A, 2009, 91(4):1100-1110.
- [4] MONTEILLER C, TRAN L, MACNEE W, et al. The pro-inflammatory effects of low-toxicity low-solubility particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro; the role of surface area[J]. Occup Environ Med, 2007, 64(9):609-615.
- [5] LOMBAERT N, DE BOECK M, DECORDER I, et al. Evaluation of the apoptogenic potential of hard metal dust (WC-Co), Tungsten carbide and metallic Cobalt[J]. Toxicol Lett, 2004, 154(1/2):23-34.
- [6] ZHAO J, BOWMAN L, MAGAYE R, et al. Apoptosis induced by Tungsten carbide-cobalt nanoparticles in JB6 cells involves ROS Generation through both extrinsic and intrinsic apoptosis pathways[J]. Int J Oncol, 2013, 42(4):1349-1359.
- [7] NYGA A, HART A, TETLEY T D. Importance of the HIF pathway in cobalt nanoparticle-induced cytotoxicity and inflammation in human macrophages[J]. Nanotoxicology, 2015, 9(7):1-13.
- [8] CAMPBELL P, SHIMMIN A, WALTER L, et al. Metal sensitivity as a cause of groin pain in metal-on-metal hip resurfacing[J]. J Arthroplasty, 2008, 23(7):1080-1085.
- [9] HUANG D C, TATMAN P, MEHLE S, et al. Cumulative revision rate is higher in Metal-on-Metal THA than Metal-on-Polyethylene THA; analysis of survival in a community registry[J]. Clin Orthop Relat Res, 2013, 471(6):1920-1925.
- [10] HART A J, QUINN P D, LALI F, et al. Cobalt from metal-on-metal hip replacements May be the clinically relevant active agent responsible for periprosthetic tissue reactions[J]. Acta Biomater, 2012, 8(10):3865-3873.
- [11] NEL A, XIA T, MADLER L, et al. Toxic potential of materials at the nanolevel[J]. Science, 2006, 311(5761):622-627.

- s disease-like tauopathy in female rats[J]. *Biol Chem*, 2004, 279(21):22684-22692.
- [5] SCHRAEN-MASCHKE S, SERGEANT N, DHAENENS C, et al. Tau as a biomarker of neurodegenerative diseases[J]. *Bio Med*, 2008, 2(4):363-384.
- [6] 孙永明, 郑祖根, 沈忆新. 经颅外制作犬后脑缺血模型[J]. *中华实验外科学杂志*, 1998, 15(6):565.
- [7] HIDEAKI W, HIDEKAZU T, AKIGUCHI I, et al. Axonal damage and demyelination in the white matter after chronic cerebral hypoperfusion in the rat[J]. *Brain Res*, 2002, 924(1):63-70.
- [8] TOMIMOTO H, IHARA M, WAKITA H, et al. Chronic cerebral hypoperfusion induces white matter lesions and loss of oligodendroglia with DNA fragmentation in the rat[J]. *Acta Neuropathol*, 2003, 106(6):527-534.
- [9] GABRIELLA M, CHRISTIAN Z, MUSCAT R, et al. Oligodendrocyte pathophysiology and treatment strategies in cerebral ischemia[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2014, 20(7):603-612.
- [10] TAKAHASHI K, HASEGAWA S, MAEBA S, et al. Serum tau protein level serves as a predictive factor for neurological prognosis in neonatal asphyxia[J]. *Brain Dev*, 2014, 36(8):670-675.
- [11] RANDALL J, MÖRTBERG E, PROVUNCER G, et al. Tau proteins in serum predict neurological outcome after hypoxic brain injury from cardiac arrest: Results of a pilot study[J]. *Resuscitation*, 2013, 84(3):351-356.
- [12] TATEBAYASHI Y, HAQUE N, TUNG Y C, et al. Role of tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3beta in the regulation of organelle transport[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt9):1653-1663.
- [13] IRVING E A, YATSUSHIRO K, MCCULLOCH J, et al. Rapid alteration of tau in oligodendrocytes after focal ischemic injury in the rat: involvement of free radicals[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1997, 17(6):612-622.
- [14] DAWSON M R, POLITO A, LEVINE J, et al. NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2003, 24(2):476-488.
- [15] AGUIRRE A, GALLO V. Postnatal neurogenesis and gliogenesis in the olfactory bulb from NG2-expressing progenitors of the subventricular zone[J]. *J Neurosci*, 2004, 24(46):10530-10541.
- [16] VERONIKA S, BAUER N G, LISA S, et al. Downregulation of the microtubule associated protein Tau impairs process outgrowth and myelin basic protein mRNA transport in oligodendrocytes[J]. *Glia*, 2015, 63(9):1621-1635.
- [17] KURSULA P. Structural properties of proteins specific to the myelin sheath[J]. *Amino Acids*, 2008, 34(2):175-185.
- [18] JESERICH G, KLEMPAHN K, PFEIFFER M, et al. Features and functions of oligodendrocytes and myelin proteins of lower vertebrate species[J]. *J Mol Neurosci*, 2008, 35(1):117-26.
- [19] SEIBERLICH V, BAUER N G, SCHWARZ L, et al. Downregulation of the microtubule associated protein Tau impairs process outgrowth and myelin basic protein mRNA transport in oligodendrocytes[J]. *Glia*, 2015, 3(9):1621-1635.

(收稿日期:2017-06-22 修回日期:2017-09-26)

(上接第 609 页)

- [12] PAOLICCHI A, DOMINICI S, PIERI L, et al. Glutathione catabolism as a signaling mechanism[J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, 64(5/6):1027-1035.
- [13] KIM H P, WANG X, CHEN Z H, et al. Autophagic proteins regulate cigarette smoke-induced apoptosis: protective role of heme oxygenase-1[J]. *Autophagy*, 2008, 4(7):887-895.
- [14] QIAO H, LI L Y, QU Z C, et al. Cobalt-induced oxidant stress in cultured endothelial cells: prevention by ascorbate in relation to HIF-1alpha[J]. *Biofactors*, 2009, 35(3):306-313.
- [15] WAGNER A E, BOESCH-SAADATMANDI C, BRECKWOLDT D, et al. Ascorbic acid partly antagonizes resveratrol mediated heme oxygenase-1 but not paraoxonase-1 induction in cultured hepatocytes - role of the redox-regulated transcription factor Nrf2[J]. *BMC Complement Altern Med* 2011(11):1-10.
- [16] BATTAGLIA V, COMPAGNONE A, BANDINO A A, et al. Cobalt induces oxidative stress in isolated liver mitochondria responsible for permeability transition and intrinsic apoptosis in hepatocyte primary cultures[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41(3):586-594.
- [17] CAROPPI P, SINIBALDI F, FIORUCCI L, et al. Apoptosis and human diseases: mitochondrion damage and lethal role of released cytochrome C as proapoptotic protein[J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16(31):4058-4065.
- [18] LANDSHAMER S, HOEHN M, BARTH N, et al. Bid-induced release of AIF from mitochondria causes immediate neuronal cell death[J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(10):1553-1563.
- [19] GARLAND J M, RUDIN C. Cytochrome c induces caspase-dependent apoptosis in intact hematopoietic cells and overrides apoptosis suppression mediated by bcl-2, growth factor signaling, MAP-kinase-kinase, and malignant change[J]. *Blood*, 1998, 92(4):1235-1246.
- [20] YANG W, SHI L, CHEN L, et al. Protective effects of perindopril on D-galactose and Aluminum trichloride induced neurotoxicity via the apoptosis of mitochondria-mediated intrinsic pathway in the hippocampus of mice[J]. *Brain Res Bull*, 2014, 109(1):46-53.

(收稿日期:2017-06-24 修回日期:2017-09-02)