· 原 著 ·

PC12细胞低压性缺氧损伤模型的建立

张冬梅¹, 曹琪璐¹, 景临林¹, 赵秀华², 马慧萍¹

1. 中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院药剂科 全军高原医学实验室, 甘肃 兰州 730050

2. 中国人民解放军西部战区疾病预防控制中心传染病防控二科, 四川 成都 610000

[摘要] 目的:构建PC12细胞低压性缺氧细胞模型。方法:将PC12细胞依据缺氧条件随机分为正常对照组、常压缺氧组、低压缺氧组;正常对照组以正常条件培养,常压缺氧组和低压缺氧组分别以常压缺氧和低压缺氧条件培养。通过考察氧气浓度、大气压力和低压缺氧时间,应用CCK-8法测定细胞活性,筛选低压缺氧的条件;显微镜下观察各组细胞形态、结构、数目,微板法检测细胞乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量,流式细胞仪测定细胞凋亡比例和细胞周期。结果:在1%氧浓度和41 kPa低压缺氧环境下培养24h可建立低压性缺氧细胞模型。与正常对照组和常压缺氧组比较,低压缺氧组LDH活性及细胞MDA含量增加、SOD活性下降,细胞凋亡比例上升(均 $P<0.05$),细胞周期阻滞发生在G0/G1期。结论:建立了稳定可靠的低压性缺氧损伤PC12细胞模型,可用于高原低压性缺氧神经损伤的体外实验研究。

[关键词] PC12细胞;低压性缺氧;乳酸脱氢酶;超氧化物歧化酶;丙二醛;细胞凋亡;细胞周期

[中图分类号] R966 **[文献标志码]** A

Establishment of a hypobaric hypoxia-induced cell injury model in PC12 cells

ZHANG Dongmei¹, CAO Qilu¹, JING Linlin¹, ZHAO Xiuhua², MA Huiping¹ (1. Key Laboratory of the Plateau Medicine, the 940th Hospital of Joint Logistics Support Force of Chinese People's Liberation Army, Lanzhou 730050, China; 2. Second Department of Infectious Disease Control and Prevention, Center for Disease Control and Prevention, Western War Zone, Chengdu 610000, China)

Corresponding authors: MA Huiping, E-mail: 1026573411@qq.com, <https://orcid.org/0000-0003-4560-2155>; ZHAO Xiuhua, E-mail: zhaoxiuhua2021xz@163.com, <https://orcid.org/0000-0002-3522-0930>

收稿日期:2021-02-20 接受日期:2021-08-10

基金项目:国家自然科学基金(81571847,81872796);军队后勤科研计划(CWH17J010,CLB18J028)

第一作者:张冬梅,硕士,主管药师,主要从事高原缺氧损伤分子机制研究;E-mail:835935150@qq.com;<https://orcid.org/0000-0002-5708-8387>

通信作者:马慧萍,主任药师,教授,硕士生导师,主要从事高原缺氧损伤机制及新药研发工作;E-mail:1026573411@qq.com;<https://orcid.org/0000-0003-4560-2155>。赵秀华,副主任技师,主要从事高原疾病防控和实验工作;E-mail:zhaoxiuhua2021xz@163.com;<https://orcid.org/0000-0002-3522-0930>

orcid.org/0000-0002-3522-0930

[**Abstract**] **Objective:** To construct a hypobaric hypoxia-induced cell injury model. **Methods:** Rat pheochromocytoma PC12 cells were randomly divided into control group, normobaric hypoxia group and hypobaric hypoxia group. The cells in control group were cultured at normal condition, while cells in other two groups were cultured in normobaric hypoxia and hypobaric hypoxia conditions, respectively. CCK-8 method was used to detect cell viability to determine the optimal modeling conditions like the oxygen concentration, atmospheric pressure and low-pressure hypoxia time. The contents of lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) were detected by microplate method. The apoptosis ratio and cell cycle were analyzed by flow cytometry. **Results:** The hypobaric hypoxia-induced cell injury model can be established by culturing for 24 h at 1% oxygen concentration and 41 kPa atmospheric pressure. Compared with the control group and normobaric hypoxia group, the activity of LDH and the content of MDA in hypobaric hypoxia group were significantly increased, the activity of SOD was decreased, the percentage of apoptosis was increased (all $P<0.05$), and the cell cycle was arrested in G0/G1 phase. **Conclusion:** A stable and reliable cell injury model induced by hypobaric hypoxia has been established with PC12 cells, which provides a suitable cell model for the *in vitro* experimental study on nerve injury induced by hypoxia at high altitude.

[**Key words**] PC12 cells; Hypobaric hypoxia; Lactate dehydrogenase; Superoxide dismutase; Malondialdehyde; Apoptosis; Cell cycle

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2021, 50(5): 614-620.]

[**缩略语**] 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD);丙二醛(malondialdehyde, MDA);细胞计数试剂盒(cell counting kit, CCK);异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC);碘化丙啶(propidium iodide, PI);磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)

机体脑组织对缺氧较为敏感,当海拔上升到一定高度后,首先会出现缺氧性损害。而神经是分化细胞,其结构及功能损伤后不可再生,这也是高原低氧环境致缺氧性脑损害的重要发病机制之一^[1-2]。因此,研究高原环境对神经细胞损伤的影响是预防和治疗高原脑病的关键。目前高原缺氧研究采用的模型主要是通过调控细胞培养环境中氧分压或细胞利用氧的能力而建立细胞缺氧性损伤模型,但这些建模方法不能模拟由于低大气压力导致氧分压降低而造成的高原缺氧。本研究采用降低氧气体积比同时模拟高海拔大气压力的方法建立PC12细胞高原低压缺氧损伤模型,通过筛选氧气浓度、大气压力和低压缺氧时间确定最

佳的造模条件,并通过观察该条件下细胞的形态,测定细胞培养基中LDH、SOD活性及MDA含量,测定细胞周期和细胞凋亡情况,来验证低压缺氧损伤模型,以期高原神经损伤相关疾病的研究建立一种稳定可靠的细胞模型。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂及仪器

PC12细胞购自中国科学院上海细胞库。DMEM高糖培养基、青-链霉素为美国HyClone公司产品;胎牛血清为美国Gibco公司产品;LDH试剂盒(批号20180728)、SOD试剂盒(批号20190412)、MDA试剂盒(批号20180728)均为南京建成生物工

程研究所产品;CCK-8为日本同仁化学研究所产品;FITC-Annexin V/PI细胞凋亡检测试剂盒为美国BD公司产品;细胞周期检测试剂盒为碧云天生物技术有限公司产品。

便携式细胞低氧小室(mic-101)为美国Billups-Rothenberg公司产品;氧浓度测定仪(EST-10-02)为美国Estesros公司产品;压力控制型细胞缺氧培养箱为实验室自制(实用新型专利号CN208995505U);倒置相差显微镜为日本Olympus公司产品;三气培养箱为德国Memmert公司产品;超净工作台(SW-CJ-2FD)为杭州净化工作设备厂产品;Scotsman制冰机(AF 80)、全自动荧光酶标仪(SpectraMax i3)为美国Molecular Devices公司产品;流式细胞仪为美国BD公司产品。

1.2 PC12细胞培养

PC12细胞置于DMEM高糖培养液中,培养液含10%胎牛血清、青霉素100 U/mL、链霉素100 mg/L,于37℃、5%二氧化碳培养箱内培养,培养液每2~3 d更换一次。PC12细胞进入对数生长期后传代,以 1×10^5 /mL密度接种于底面积为10 cm²的塑料培养皿中,24 h后更换培养液,并根据实验要求给予不同的培养条件。

1.3 实验参数筛选

1.3.1 氧气浓度筛选 调整PC12细胞密度至 5×10^4 /mL,按100 μ L/孔平行接种于7块96孔板中,每块96孔板设6个复孔,于5%二氧化碳、37℃的三气培养箱中培养过夜。将7块96孔板随机分为正常对照组以及不同氧气浓度的常压缺氧组,正常对照组在5%二氧化碳、37℃三气培养箱内正常培养;常压缺氧组放至缺氧小室,分别用5%二氧化碳、一定浓度氮气和氧气的混合气体(二氧化碳比例保持在5%,氮气比例随氧气浓度变化而变化,下同)置换其中空气,应用氧浓度测定仪测定氧浓度使之终浓度分别为0%、1%、2%、3%、4%、5%,放入培养箱中培养24 h。应用CCK-8法测定各组细胞活性,选择细胞活性明显降低的氧浓度进行后续实验。

1.3.2 大气压力筛选 按照1.3.1节中的方法,将PC12细胞平行接种于7块96孔板中,正常培养12 h后将细胞随机分为正常对照组、常压缺氧组 and 不同压力的低压缺氧组。正常对照组正常培养;常压缺氧组移入缺氧小室,用混合气体置换其中空气使氧气终浓度为1%,将缺氧小室放于三气培养箱

继续培养24 h;低压缺氧组将培养皿置于低压缺氧装置中,用混合气体置换其中空气使氧气终浓度为1%,调整使用不同压力(41、47、54、62、71 kPa),24 h后应用CCK-8法检测各组细胞活性,选择细胞活性明显降低的压力进行后续实验。

1.3.3 低压缺氧时间的筛选 按照1.3.1节中的方法,将PC12细胞分5个时间点平行接种于15块96孔板中(每次接种三块板),正常培养12 h后将每个时间点的细胞均随机分为正常对照组、常压缺氧组和低压缺氧组。正常对照组正常培养;常压缺氧组移入缺氧小室中用混合气体置换其中空气使氧气终浓度为1%;低压缺氧组置于低压缺氧装置中,以1%氧浓度和41 kPa压力培养,分别培养6、12、24、48、72 h后,应用CCK-8法检测细胞活性。

1.4 CCK-8法检测细胞活性

细胞培养后,在96孔板中每孔加入10 μ L CCK-8试剂,摇匀后置于5%二氧化碳、37℃三气培养箱中继续培养1 h,在酶标仪上测定450 nm处的吸光度值并计算细胞活性,细胞活性(%)=(实验组吸光度值-空白吸光度值)/(正常对照组吸光度值-空白吸光度值) $\times 100\%$ 。

1.5 光镜下观察PC12细胞形态

将PC12细胞以 1×10^5 /mL密度接种于60 mm培养皿,培养24 h待细胞完全贴壁后,分为正常对照组、常压缺氧组和低压缺氧组。正常对照组正常培养;常压缺氧组在1%氧浓度下培养;低压缺氧组在1%氧浓度和41 kPa压力下培养。细胞培养24 h后显微镜下拍照,观察低压缺氧对PC12细胞形态的影响。

1.6 微板法测定细胞LDH、SOD活性及MDA含量

调整PC12细胞密度至 5×10^4 /mL,按100 μ L/孔接种于96孔板,于5%二氧化碳、37℃孵箱中培养过夜。按1.5节中的培养方法将96孔板随机分为正常对照组、常压缺氧组和低压缺氧组。细胞培养24 h后,收集细胞上清液于新的96孔板中,根据说明书操作步骤分别测定LDH、SOD的活性及MDA含量。每组设6个复孔,实验重复三次。

1.7 流式细胞术检测细胞凋亡和细胞周期

将对数生长期的PC12细胞以 1×10^5 /mL的密度接种于3块六孔板中,贴壁后按照1.5节中的培养方法随机分为正常对照组、常压缺氧组和低压缺氧组。细胞培养24 h后,弃去培养液,用4℃预

冷的PBS洗两次去掉残余培养基,用不含乙二胺四乙酸的胰蛋白酶消化,室温下 $1500\times g$ 离心10 min,弃去培养基,收集细胞。

检测细胞凋亡:用4℃预冷的1×PBS洗涤细胞两次, $150\times g$ 离心5 min,去上清液,收集细胞;加入1×结合缓冲液300 μL 悬浮细胞,调整细胞浓度为 $1\times 10^6/\text{mL}$;每100 μL 细胞悬液加入5 μL FITC-Annexin V混匀,室温避光孵育15 min;上机检测前5 min加入5 μL PI染液;加入400 μL 1×结合缓冲液轻轻混匀;将细胞转入流式管中,应用流式细胞仪检测。

检测细胞周期:收集各组细胞于离心管中, $1500\times g$ 离心5 min,收集细胞,PBS洗两遍,用70%乙醇固定过夜, $1500\times g$ 离心5 min收集细胞,PBS洗两遍,使用100 μL 核糖核酸酶A重悬细胞,置于37℃孵育30 min,加入400 μL PI染液,4℃条件下避光孵育30 min。应用细胞筛过滤细胞后,将细胞转入流式管中,应用流式细胞仪检测。

1.8 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析。正态分布的计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间两两比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 氧气浓度对细胞活性的影响

当氧浓度为0%、1%、2%、3%时,细胞活性较正常对照组均下降(均 $P<0.01$),其中1%氧浓度较2%、3%氧浓度细胞活性下降(均 $P<0.01$),0%氧浓度较1%氧浓度细胞活性下降,而当氧浓度为4%、5%时,细胞活性与正常对照组接近(均 $P>0.05$),见图1。根据实验结果,选择1%氧浓度作为后续缺氧模型的条件。

2.2 大气压力对细胞活性的影响

在1%氧浓度下,当压力为71、62和54 kPa时不足以造成细胞低压性缺氧损伤;而当压力为41、47 kPa时细胞活性较常压缺氧组下降(均 $P<0.05$),其中41 kPa导致细胞活性较71、62和54 kPa均下降(均 $P<0.05$),见图2。根据实验结果,选择41 kPa压力条件进行后续研究。

2.3 低压缺氧时间对细胞活性的影响

常压缺氧组和低压缺氧组在5个时间点的细胞活性均比正常对照组降低(均 $P<0.01$)。培养

与正常对照组比较,** $P<0.01$;与1%氧浓度比较,*** $P<0.01$ 。

图1 不同氧浓度细胞活性比较

Figure 1 Effects of different hypoxia concentrations on the activity of PC12 cells

与常压缺氧组比较,* $P<0.05$;与41 kPa压力比较,## $P<0.01$;与47 kPa压力比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$ 。

图2 1%氧浓度下不同大气压力细胞活性比较

Figure 2 Effects of atmospheric pressure on PC12 cell activity under 1% oxygen concentration

6、12 h,低压缺氧组与常压缺氧组的细胞活性差异无统计学意义(均 $P>0.05$);培养24、48、72 h,低压缺氧组的细胞活性较常压缺氧组下降(均 $P<0.01$),见图3。结果提示,1%氧浓度和41 kPa压力条件下培养24 h即可造成细胞损伤。

2.4 低压缺氧对细胞形态的影响

正常对照组细胞贴壁生长状态良好,边缘清晰可见,多数伸出轴突,细胞呈梭形状态;常压缺氧组细胞形态固缩,伸出轴突的细胞数量减少,多数细胞成圆形,细胞膜较粗糙,细胞贴壁性较差;低压缺氧组细胞肿胀,死细胞增多,细胞生长停滞。见图4。结果提示,低压缺氧环境比单纯低氧环境可以造成更严重的细胞损伤。

2.5 低压缺氧对细胞上清液中LDH活性及细胞中MDA含量和SOD活性的影响

与正常对照组比较,常压缺氧组和低压缺氧

与正常对照组比较, ** $P < 0.01$; 与常压缺氧组比较, ## $P < 0.01$.

图3 低压缺氧条件下不同培养时间点细胞活性比较

Figure 3 Effects of different culture time on PC12 cell activity under hypobaric hypoxia condition

组 LDH 活性均升高(均 $P < 0.05$),且低压缺氧组 LDH 活性较常压缺氧组升高($P < 0.05$)。与正常对照组比较,常压缺氧组和低压缺氧组 SOD 活性降低,MDA 含量增加(均 $P < 0.05$);且与常压缺氧组比较,低压缺氧组 SOD 活性降低,MDA 含量增加(均 $P < 0.05$)。见表1。结果提示,与常压缺氧组比较,低压缺氧组细胞膜损伤程度加重、脂质过氧化反应增加、抗氧化能力降低。

2.6 低压缺氧对细胞凋亡及细胞周期的影响

与正常对照组细胞凋亡率(6.40 ± 0.53)%比

A:正常对照组细胞贴壁生长状态良好,边缘清晰可见,多数伸出轴突(蓝色箭头所示),呈梭形状态(红色箭头所示);B:常压缺氧组细胞形态固缩,伸出轴突的细胞数量减少(蓝色箭头所示),多数细胞成圆形(红色箭头所示),细胞膜较粗糙,细胞贴壁性较差;C:低压缺氧组细胞肿胀(绿色箭头所示),死细胞增多(橙色箭头所示),细胞生长停滞。标尺=100 μm 。

图4 各组细胞培养24 h后光镜下形态

Figure 4 Morphology of PC12 cells cultured under different conditions for 24 h

表1 各组乳酸脱氢酶活性、丙二醛含量和超氧化物歧化酶活性比较

Table 1 Lactate dehydrogenase activity, malondialdehyde content and superoxide dismutase activity in each group

组别	n	乳酸脱氢酶(U/mL)	丙二醛(nmol/mg)	超氧化物歧化酶(U/mg)
正常对照组	6	22.55 $\pm$ 2.11	0.0345 $\pm$ 0.0011	0.123 $\pm$ 0.101
常压缺氧组	6	38.15 $\pm$ 1.99*	0.0683 $\pm$ 0.0054*	0.116 $\pm$ 0.083*
低压缺氧组	6	43.15 $\pm$ 3.25**#	0.0789 $\pm$ 0.0019**#	0.112 $\pm$ 0.052**#

与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与常压缺氧组比较, # $P < 0.05$ 。

较,常压缺氧组细胞凋亡率(14.50 ± 0.95)%升高($P < 0.05$);而低压缺氧组细胞凋亡率(18.98 ± 1.12)%较常压缺氧组进一步升高($P < 0.01$),见图5。与正常对照组比较,常压缺氧组S期细胞比例增加,细胞被阻滞在S/G2期;低压缺氧组G1期的细胞比例增加,进入G2/M期的细胞比例减少。见图6。结果提示,细胞在低压缺氧条件下培养24 h后,增殖周期被阻滞在G0/G1期,进入DNA复制期的细胞减少,细胞增殖减慢甚至停滞,细胞凋亡情况也较常压缺氧组更严重。

3 讨论

相对于实验动物而言,细胞在培养过程中具有易获得、研究条件人为可控、研究样本均一、有利于观察单一因素等优势^[3]。原代细胞更接近在体状态,但原代培养成功率低、成本高、操作困难,且在细胞培养过程中容易自然老化从而导致无法持续传代。PC12细胞源于大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤,在形态、生理及生化功能等方面接近于神经细胞,且具有可传代特点,已经成为离体研究神经细胞功能、死亡方式及毒性损害较理想的工具细胞。研究高原低氧致神经细胞损害的机制探索有重要意义。

目前用于研究高原缺氧的细胞模型主要是通过调控细胞培养环境中的氧分压或细胞利用氧的能力而建立细胞缺氧性损伤模型。离体细胞缺氧模型的建立大体上分为物理性缺氧和化学性缺氧两类^[4-9]。化学性缺氧模型是在细胞培养液中加入特定的化学物质,通过损伤细胞利用氧的能力或耗尽培养液中的氧而造成细胞缺氧。常用于建立化学性缺氧模型的化学药物有氰化物、连二亚硫酸钠、氯化钴等。化学性缺氧可能存在对

图 5 流式细胞术检测各组细胞凋亡结果
Figure 5 Results of apoptosis detected by flow cytometry

图 6 各组细胞周期检测结果及比较
Figure 6 Cell cycles of PC12 cells in each group

细胞造成损伤、实验操作不易控制以及与实际环境差异较大等缺点。物理性缺氧模型通常利用混合气体培养法即利用降低培养环境中的氧气比例从而模拟细胞缺氧损伤过程,是目前较为常用的体外缺氧实验模型,通常有液面封闭模型、自制简易密封舱模型及三气培养箱模型,建立的模型比较稳定。但以上细胞建模方法不能模拟由于高原环境低大气压力导致氧分压降低造成的高原缺氧,而压力对细胞的贴壁以及增殖均有一定影响^[10-12],因此混合气体缺氧法和化学缺氧法不能满足高原缺氧的环境特征。目前,国内关于高原缺氧细胞模型的建立尚无统一标准,尽管利用大型低压氧舱通过控制压力和氧浓度模拟高原环境建立了动物高原疾病模型,但在离体细胞领域仍为空白。本研究应用低压缺氧装置对细胞进行低压缺氧处理制备了细胞模型,旨在为低压缺氧致神经损伤疾病的机制研究提供可靠的细胞模型。

本文资料显示,在1%氧浓度、41 kPa的低压缺氧条件下培养24 h即可造成细胞损伤。氧是细胞进行能量代谢的重要原料,缺氧会影响细胞代谢进而导致产生大量的氧自由基,过量氧自由基

会导致氧自由基清除剂SOD活性下降。同时,缺氧过程中细胞会产生大量的活性氧,与细胞膜中的不饱和脂肪酸作用,生成大量脂质过氧化产物MDA,破坏细胞膜的完整性,导致细胞膜通透性增加,细胞中的LDH外漏到培养基中^[13-16]。本文资料显示,低压会加重缺氧对细胞造成的损伤,低压缺氧组上清液中SOD活性与正常对照组和常压缺氧组相比明显降低,说明此时机体大量的氧自由基加重了细胞损伤;同时,低压缺氧组较正常对照组和常压缺氧组LDH活性增强,MDA含量增加,表明低压缺氧进一步造成细胞膜的完整性破坏。细胞凋亡和细胞周期检测结果表明,低压缺氧可以诱导细胞凋亡,细胞周期阻滞在G0/G1期,但具体机制有待进一步研究。

综上所述,PC12细胞在1%氧浓度、41 kPa压力条件下培养24 h可以建立低压性缺氧损伤模型。该模型操作方便、干扰因素较少、可重复性强,为深入研究体外神经细胞高原缺氧损伤提供了便利条件。但高原环境影响因素复杂,除缺氧、低压外,还包括紫外线、昼夜温差和寒冷等因素,在后续研究中将继续深入考察相关因素对细胞损

伤的影响,以便建立更合理的细胞模型。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] ZHANG P, CHEN J S, LI Q Y, et al. Neuroprotectants attenuate hypobaric hypoxia-induced brain injuries in cynomolgus monkeys[J]. **Zool Res**, 2021, 42(1): 3-19.
- [2] SHARMA P, TULSAWANI R. Ganoderma lucidum aqueous extract prevents hypobaric hypoxia induced memory deficit by modulating neurotransmission, neuroplasticity and maintaining redox homeostasis[J]. **Sci Rep**, 2020, 10(1): 8944.
- [3] 陈建, 黄斌, 高钰琪, 等. 预缺氧对PC12细胞缺氧后细胞内游离Ca²⁺的影响[J]. **西北国防医学杂志**, 2008, 29(4): 250-253.
CHEN Jian, HUANG Jian, GAO Yuqi, et al. Effect of hypoxia preconditioning on intracellular Ca²⁺ of PC12 cells[J]. **Medical Journal of National Defending Forces in Northwest China**, 2008, 29(4): 250-253. (in Chinese)
- [4] 闫向丽, 王利胜, 王圣鑫. HT22海马神经元细胞氧糖剥夺再灌注模型的建立[J]. **广州中医药大学学报**, 2020, 37(181): 161-165.
YAN Xiangli, WANG Lisheng, WANG Shengxin. Establishment of HT22 cell oxygen-glucose deprivation reperfusion model[J]. **Journal of Guangdong Pharmaceutical University**, 2020, 37(181): 161-165. (in Chinese)
- [5] 刘菲, 张昊, 刘博, 等. 氯化钴诱导的N2a细胞缺氧损伤模型的机制研究[J]. **广东药科大学学报**, 2020, 36(2): 249-253.
LIU Fei, ZHANG Hao, LIU Bo, et al. Mechanism of cobalt chloride induced hypoxia on N2a cells[J]. **Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine**, 2020, 36(2): 249-253. (in Chinese)
- [6] 李海丽, 卢永昌, 钱帅, 等. 苞叶雪莲粗提物对EA.hy926细胞缺氧损伤的保护作用[J]. **湖北农业科学**, 2016, 55(1): 167-169.
LI Haili, LU Yongchang, QIAN Shuai, et al. *Saussurea obvallata* crude protective effects of hypoxia on EA.hy926 injury[J]. **Hubei Agricultural Sciences**, 2016, 55(1): 167-169. (in Chinese)
- [7] HEIL J, SCHULTZE D, SCHEMMER P, et al. N-acetylcysteine protects hepatocytes from hypoxia-related cell injury[J]. **Clin Exp Hepatol**, 2018, 4(4): 260-266.
- [8] 冯岚, 张二龙, 高钰琪, 等. 7种不同组织来源细胞缺氧损伤效应评价[J]. **第三军医大学学报**, 2019, 41(6): 570-574.
FENG Lan, ZHANG Erlong, GAO Yuqi, et al. Evaluation of hypoxic injuries in 7 cell lines derived from different human tissues[J]. **Journal of Third Military Medical University**, 2019, 41(6): 570-574. (in Chinese)
- [9] 牛其芳, 李德龙, 杨杨, 等. 人血管内皮细胞缺氧复氧损伤细胞模型的建立[J]. **中国口腔颌面外科杂志**, 2019, 17(4): 295-299.
NIU Qifang, LI Delong, YANG Yang, et al. Establishment of human vascular endothelial hypoxia/reoxygenation injury cell model[J]. **China Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, 2019, 17(4): 295-299. (in Chinese)
- [10] 刘阳, 安美文, 芦莹, 等. 压力下角质形成细胞与成纤维细胞共培养对细胞增殖及胶原合成的影响[J]. **医用生物力学**, 2015, 30(2): 148-153.
LIU Yang, AN Meiwen, LU Ying, et al. Effects of keratinocytes/fibroblasts co-culture under pressure on cell proliferation and collagen synthesis[J]. **Journal of Medical Biomechanics**, 2015, 30(2): 148-153. (in Chinese)
- [11] 黄正, 刘益杰, 褚立希, 等. 周期性压力通过凋亡基因调节兔软骨细胞增殖和凋亡的实验研究[J]. **国际骨科学杂志**, 2014, 35(3): 205-208.
HUANG Zheng, LIU Yijie, CHU Lixi, et al. Periodic pressure regulates the proliferation and apoptosis of rabbit chondrocytes genes[J]. **International Journal of Orthopaedics**, 2014, 35(3): 205-208. (in Chinese)
- [12] COBELENS P M, VAN PUTTE B P, KAVELAARS A, et al. Inflammatory consequences of lung ischemia-reperfusion injury and low-pressure ventilation[J]. **J Surg Res**, 2009, 153(2): 295-301.
- [13] TSENG V, NI K, ALLAWZI A, et al. Extracellular superoxide dismutase regulates early vascular hyaluronan remodeling in hypoxic pulmonary hypertension[J]. **Sci Rep**, 2020, 10(1): 280.
- [14] ASANO A, UEDA S, KUJI I, et al. Intracellular hypoxia measured by 18F-fluoromisonidazole positron emission tomography has prognostic impact in patients with estrogen receptor-positive breast cancer[J]. **Breast Cancer Res**, 2018, 20(1): 78.
- [15] SHI Q, YU C, ZHU D, et al. Effects of dietary *Sargassum horneri* on resisting hypoxia stress, which changes blood biochemistry, antioxidant status, and hepatic HSP mRNA expressions of juvenile black sea bream *Acanthopagrus Schlegelii*[J]. **J Appl Phycol**, 2020, 32(5): 3457-3466.
- [16] DEVECI H A, AKYUVA Y, NUR G, et al. Alpha lipoic acid attenuates hypoxia-induced apoptosis, inflammation and mitochondrial oxidative stress via inhibition of TRPA1 channel in human glioblastoma cell line[J]. **Biomed Pharmacother**, 2019, 111: 292-304.

[本文编辑 沈敏余方]