

双硫仑-铜离子复合物诱导的神经毒性研究

马文青, 曲颖, 赵忠熙*

(山东大学齐鲁医学院药学院, 济南 250012)

摘要: 双硫仑(disulfiram, DSF)被广泛地用于治疗肿瘤、莱姆病和可卡因成瘾等研究, 而DSF的神经毒性限制了其临床应用, 因此, DSF(特别是DSF-铜离子复合物)的神经毒性及其分子机制的研究具有重要的意义。将不同浓度(100 nmol/L、200 nmol/L和400 nmol/L)的DSF/Cu复合物分别作用于PC12细胞48 h后, 用甲基噻唑基四唑(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)方法检测DSF/Cu复合物对细胞生存增殖的抑制; 流式细胞仪检测PC12细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平; 试剂盒用于检测PC12细胞的丙二醛(malondialdehyde, MDA)、抗氧化因子谷胱甘肽(glutathione, GSH)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)含量; 细胞核内DAPI染色法研究细胞凋亡程度; Western blot法检测不同浓度DSF/Cu复合物处理后PC12细胞中p38蛋白表达水平的差异; 苏木素-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色检测腹腔注射给药的BALB/c-nu雄性裸鼠脑组织病理变性情况。实验结果表明, DSF/Cu复合物剂量依赖性地抑制PC12细胞的增殖, 如200 nmol/L、400 nmol/L DSF/Cu复合物处理后存活率分别是54.6%和42.9%($P<0.001$); DSF/Cu复合物作用24 h后, 与空白对照组(Control)相比, 细胞内ROS和MDA含量显著增加($P<0.001$), GSH含量和SOD活力显著降低($P<0.01$, $P<0.001$); DAPI染色说明DSF/Cu复合物引起细胞明显凋亡; Western blot分析结果表明DSF/Cu复合物显著上调了p38蛋白的表达; HE染色实验说明, DSF/Cu复合物能够引起裸鼠脑组织结构异常, 出现病变。结果表明, DSF/Cu复合物可抑制PC12细胞生长并引发氧化应激, 提示其存在一定的神经毒性, 其机制可能为诱导细胞内ROS堆积而激活下游丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)通路, 引发细胞凋亡。

关键词: 双硫仑联合铜; 神经毒性; PC12细胞; 活性氧; 氧化应激; MAPK

Evaluation of neurotoxicity and molecular mechanism induced by the combination of disulfiram and copper ion

MA Wenqing, QU Ying, ZHAO Zhongxi*

(School of Pharmaceutical Sciences, Cheeloo College of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract: Disulfiram has been widely used in the treatment of tumors, Lyme disease and cocaine addiction. However, the neurotoxicity of DSF limits its clinical application, so it is important to study the neurotoxicity of DSF (especially DSF-copper ion complex) and its molecular mechanism meaning. PC12 cells were cultured to simulate neurons. The DSF/Cu complexes of 100 nmol/L, 200 nmol/L and 400 nmol/L were used to act on PC12 cells, respectively. The MTT method was used to detect the inhibition of the DSF/Cu complex on cell survival. Flow cytometry was used to detect ROS levels in the treated PC12 cells. Commercial kits were used to detect the contents of MDA, antioxidant factor GSH and SOD in PC12 cells. Cell nuclear DAPI staining was

收稿日期: 2021-07-08

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX10005004); 山东重大创新工程项目(2018CXGC1411)

第一作者: E-mail: mwq13853770167@163.com

*通信作者: E-mail: zxzhaosdu.edu.cn

used to study cell apoptosis. The expression of p38 protein in cells was examined by Western Blot. Hematoxylin and eosin staining was used to detect the pathological degeneration of the brain tissue of BALB/c-nu male nude mice administered by intraperitoneal injection. The experimental results show that the DSF/Cu complex inhibited the proliferation of PC12 cells in a dose-dependent manner. For instance, the treatment of cells with 200 nmol/L and 400 nmol/L DSF/Cu complexes for 48 h inhibited the cell viability by 54.6% and 42.9%, respectively ($P<0.001$). After being treated with the DSF/Cu complex for 24 h, the intracellular ROS level and MDA content increased significantly ($P<0.001$), while the GSH content and SOD activity were significantly reduced ($P<0.01$, $P<0.001$) compared with the control group. The results of DAPI staining showed that the DSF/Cu complex caused the significant cell apoptosis. Western Blot results show that the DSF/Cu complex significantly up-regulated the expression of p38 protein. The HE staining experiment showed that the DSF/Cu complex caused abnormal structure changes and appearance of lesions in the brain tissues of the nude mice. In conclusion, the DSF/Cu complex inhibited the growth of PC12 cells and caused oxidative stress, suggesting that it had certain neurotoxicity. The mechanism might be related to the accumulation of intracellular ROS and activation of downstream MAPK pathway, causing cell apoptosis.

Key Words: disulfiram combined with copper; neurotoxicity; PC12 cells; reactive oxygen species; oxidative stress; MAPK

双硫仑(disulfiram, DSF)是临床上被批准用于酒精药物中毒治疗的戒酒药物之一^[1,2]。近年来研究表明,DSF能够治疗肿瘤、莱姆病和可卡因依赖等疾病^[3,4]。DSF具有抗伯氏疏螺旋体菌、抑制多巴胺- β -羟化酶等作用^[5]。并且,DSF进入细胞后可自发地与铜离子结合形成DSF/Cu复合物^[6-8]。DSF/Cu复合物能够特异性地作用于泛素-蛋白酶体途径,抑制蛋白质降解过程和积累大量残留蛋白,诱导癌细胞凋亡^[9,10]。因此,DSF被认为是一种较为理想的治疗肿瘤、莱姆病和成瘾的有效药物^[11,12]。

然而研究发现,在每日服用250~500 mg DSF的条件下,有一部分患者会出现严重的副作用^[13]。在副作用中,最严重的是各种神经毒性,包括脑病、周围神经病变、脱髓鞘和基底节区白质损伤^[14,15]。值得注意的是,很多文献报道过DSF/Cu复合物的细胞毒性要远远大于单独应用DSF和铜的作用^[16]。但目前对于DSF/Cu复合物是否也有类似的神经毒性作用尚不清楚。

据报道,活性氧(reactive oxygen species, ROS)等氧化自由基积累导致的氧化-还原失衡状态即氧化应激,表现为脂质氧化水平提高,引起过氧化^[17]。与此同时,抗氧化因子谷胱甘肽

(glutathione, GSH)和清除自由基能力相关酶超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性降低^[18,19]。这一系列反应会诱导细胞凋亡^[20,21]。神经元细胞耗氧量高,抗氧化能力弱,氧化应激状态极易对中枢和外周神经系统造成损伤^[22]。因此,检测氧化应激相关指标可能提示药物是否存在神经毒性^[23,24]。PC12大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞是来源于交感神经系统的一种细胞系,在神经生长因子诱导下会停止分裂并长出神经突^[25,26]。PC12细胞具有神经细胞的特性,因此常被作为探索药物神经毒性的体外模型^[27]。N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)是一种巯基氨基酸,具有清除氧化自由基、补充GSH、抑制脂质过氧化、下调氧化应激以及炎症等功能,在神经系统疾病的治疗中显示出积极的疗效。因此,本研究采用抗氧化剂NAC作为对照,通过测定体外氧化应激相关指标和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)信号通路蛋白表达情况,对DSF/Cu复合物诱导神经毒性作用以及可能机制进行初步探讨,并结合动物体内实验来进一步研究DSF/Cu复合物引起神经毒性的作用,对于DSF/Cu复合物的临床研究与应用具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 试剂和材料

DSF购自河北百灵威科技有限公司; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自Sigma公司; NAC、ROS检测试剂盒、4%多聚甲醛固定液均购自上海碧云天生物技术有限公司; PC12大鼠肾上腺嗜铬瘤细胞系购自ATCC公司; RPMI-1640培养基购自Gibco公司; 胎牛血清购自以色列Beit Haemek公司; 甲基噻唑基四唑(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)粉末、RIPA蛋白裂解液、苏木素-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色试剂盒均购自北京索莱宝生物技术有限公司; BCA蛋白检测试剂盒购自大连美仑生物技术有限公司; 细胞内丙二醛(malondialdehyde, MDA)、GSH和SOD测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; 2-羟丙基- β -环糊精购自美国aladdin公司; 本研究所用抗体均购于Cell Signaling Technology公司。

1.2 仪器

CO_2 细胞培养箱购自Thermo Scientific公司; 流式细胞仪购自Becton Coulter Commercial Enterprise公司; 凝胶成像仪Alphamager HP System购自Cell Biosciences。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养及分组

使用含有10%胎牛血清的RPMI-1640培养基培养PC12细胞, 培养箱条件设置为37 °C、5% CO_2 进行孵育, 使用处于对数生长期的细胞用于后续实验。细胞分组: (1)空白对照组(Control), 加入不含任何药物的培养基; (2) DSF/Cu组, 加入浓度摩尔比为1: 1的DSF和 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, DSF/Cu终浓度分别为100 nmol/L、200 nmol/L、400 nmol/L; (3) NAC组, 400 nmol/L NAC。

1.3.2 MTT实验

MTT法检测细胞生存率。首先, 调整PC12细胞浓度以每孔 4×10^3 个细胞接种于96孔板中, 培养12 h后, 按“1.3.1”细胞分组分别加入相应药物100 μL , 所有浓度均设3个复孔, 孵育48 h后向每孔添加20 μL 的MTT溶液(5 mg/mL), 继续培养4 h后弃去所有液体, 向每孔添加DMSO溶液150 μL ,

低速匀速振摇, 15~20 min后使用酶标仪测定570 nm处各孔的吸光度值。

1.3.3 细胞内ROS含量的测定

ROS含量的测定采用的是化学荧光法。调整PC12细胞浓度为每孔 2×10^4 个, 接种至6孔板中。待细胞贴壁后(约12 h), 按“1.3.1”细胞分组分别加入相应药物2 mL, 继续培养24 h后收集每孔细胞, 离心之后弃去上清液保留细胞沉淀, 向里面加入使用无血清RPMI-1640培养基稀释配制成的浓度为10 $\mu\text{mol/L}$ 的DCFH-DA探针以重悬细胞沉淀, 置于37 °C黑暗环境中孵育30~40 min。孵育完毕, 细胞悬液用无血清培养基洗涤3次, PBS洗涤2次后, 最终用400~500 μL PBS重悬后转移到新流式管中, 使用流式细胞仪进行检测最佳激发波长500 nm, 最佳发射波长525 nm, 以相对荧光强度值显示DCFH-DA染色结果。

1.3.4 BCA法测定蛋白浓度

将BCA试剂盒里的蛋白标准品溶液用PBS溶液进行稀释并得到浓度为0.5 mg/mL的标准品溶液作为母液, 依次取0 μL 、1 μL 、2 μL 、4 μL 、8 μL 、12 μL 、16 μL 、20 μL 的标准品溶液加至96孔板中, 各孔用PBS溶液补足至20 μL 。用PBS适当稀释待测样品后将20 μL 添加至96孔板中。向标准品和样品溶液的每孔加入200 μL 的BCA工作溶液, 并在37 °C放置20 min。测定不同浓度的标准品溶液在562 nm处的吸光度并绘制标准曲线, 以计算待测样品的蛋白质浓度。

1.3.5 细胞内MDA、GSH含量及SOD活性的测定

细胞接种与药物处理步骤同“1.3.3”, 药物作用24 h后, 收集每孔细胞, 1 500 r/min离心5 min, 保留细胞沉淀, 按照相应试剂盒说明书操作。

1.3.6 细胞DAPI染色

调整PC12细胞密度为每孔 1×10^5 个的细胞量接种至12孔板中, 于培养箱中培养12 h后弃去培养基, 按“1.3.1”细胞分组分别加入相应浓度的药物2 mL, 作用24 h后, 弃去所有培养基, 每孔加入-20 °C预冷的1: 1配制的丙酮-甲醇溶液600 μL , 固定细胞15 min。用PBS溶液进行洗涤, 每孔加入500 μL 的DAPI染液, 室温黑暗条件下孵育15 min, 在用PBS洗涤3次后将板置于荧光显微镜下,

观察细胞形态和凋亡情况。

1.3.7 Western blot法检测细胞中相关蛋白的表达

细胞接种与药物处理步骤同“1.3.3”，药物作用24 h后弃掉培养基。向每个孔添加100 μ L裂解液，使之覆盖到细胞上，将细胞收集至预冷的EP管中并冰上裂解30 min。在4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min离心10 min，取上清液为蛋白质样品。取5 μ L蛋白样品用BCA法确定其蛋白浓度，将上样缓冲液加入到其余样品中于95 $^{\circ}$ C变性5 min。以总蛋白为25 μ g上样，进行电泳转膜实验。将PVDF膜置于5%脱脂奶粉中进行封闭，转移于4 $^{\circ}$ C的一抗孵育液中，在摇床上低速摇晃过夜后，于相应的二抗溶液中室温孵育2 h。滴加ECL显色液，并使用Alphamager HP system成像系统进行拍照，使用Image J软件进行半定量分析。

1.3.8 DSF环糊精包合物的制备

将1.5 g 2-羟丙基- β -环糊精粉末溶解于10 mL双蒸水后得到浓度为150 mg/mL的2-羟丙基- β -环糊精的水溶液。将50 mg DSF先溶解于300 μ L乙腈中，将DSF乙腈溶液缓慢滴加至5 mL 2-羟丙基- β -环糊精水溶液中，并在40 $^{\circ}$ C、400 r/min条件下避光搅拌2 h，以获得DSF环糊精包合物。

1.3.9 实验动物及分组

BALB/c-nu雄性裸鼠(SPF级) 10只，6~7周龄，20~22 g，购自北京华阜康实验动物中心，动物证号为SCXK(京) 2020-0004，饲养于温度为25 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C、相对湿度50% $\pm$ 15%。裸鼠随机分两组：模型对照组(Control) 5只，腹腔注射生理盐水体积为100 μ L/20 g；DSF/Cu组5只，早上灌胃给予2 mg/kg的葡萄糖酸铜水溶液，晚上腹腔注射50 mg/kg的DSF环糊精包合物，注射体积为100 μ L/20 g。小鼠每天给药一次，连续给药3周后处死，剥离脑部组织保存于4%的多聚甲醛溶液中以进行后续实验。

1.3.10 HE染色法

将脑部组织脱水后包埋在石蜡中，截面厚度为4 μ m，将石蜡切片脱蜡并水化，并用水洗至透明。在苏木素染液中染色3~5 min，在1%盐酸酒精中分化，再用氨水溶液蓝化，并用水彻底清洗。依次经85%和95%乙醇脱水后，放置于伊红染液中进行染色5 min。依次经70%、80%、95%不同浓度

乙醇进行脱水处理后，放入二甲苯中浸没两次，透化处理，使用中性树脂胶密封装片。将切片放置于光学显微镜下观察病理情况并拍照。

1.3.11 统计学分析

采用GraphPad Prism 5.0软件分析数据，所有结果以均值 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示，采用单因素方差分析(one-way ANOVA)，结合Tukey's Multiple Comparison Test比较各组间差异，以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

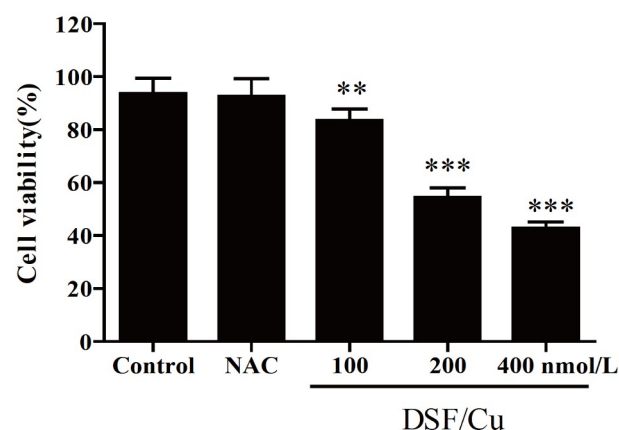
2 结果

2.1 DSF/Cu对PC12细胞生存率的影响

MTT结果表明，与空白对照(Control)相比，给予阳性对照NAC后，细胞生存率仍保持在85%以上，没有统计学差异。但是，不同浓度的DSF/Cu复合物(100 nmol/L、200 nmol/L和400 nmol/L)作用于PC12细胞，均能显著抑制细胞的存活($P < 0.01$ ， $P < 0.001$)，细胞生存率分别降低至83.5% $\pm$ 4.4%、54.6% $\pm$ 3.4%、42.9% $\pm$ 2.3%(图1)，表明随着DSF/Cu复合物浓度的增加，对细胞生存和增殖的抑制作用也显著增加，作用呈浓度依赖性。

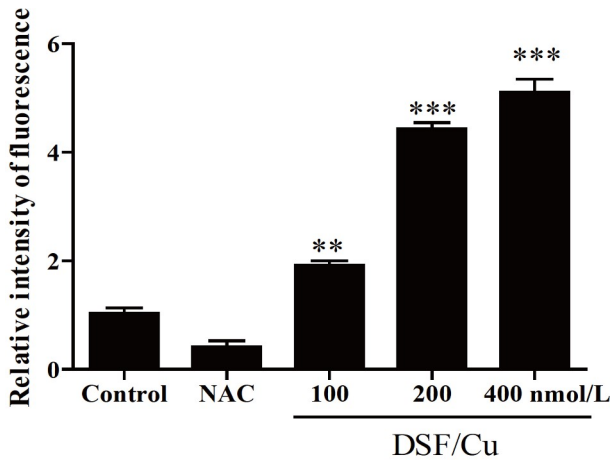
2.2 DSF/Cu对PC12细胞中ROS水平的影响

以空白对照(Control)组荧光强度为1，各处理组相对荧光强度见图2，在加入抗氧化剂NAC处理24 h后，细胞的ROS水平低于空白对照(Control)组，说明NAC会降低ROS含量，具有抗氧化性。PC12细胞经DSF/Cu复合物(200 nmol/L、400 nmol/L)处理24 h后，ROS含量显著上升($P < 0.001$)，且400 nmol/L DSF/Cu处理组升高程度更显著，是空白对



** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组(Control)比较, $n = 3$

图1 MTT法检测DSF/Cu作用下PC12细胞的存活率



** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组(Control)比较, $n=3$

图2 荧光探针检测DSF/Cu作用于PC12细胞ROS的变化

对照组的5倍多。说明DSF/Cu复合物能使PC12细胞内ROS水平升高,且呈浓度依赖性。

2.3 DSF/Cu对细胞内MDA、GSH含量及SOD活性的影响

如图3所示,细胞按分组给药后,NAC组细胞MDA含量低于空白对照(Control)组,而DSF/Cu组细胞MDA含量均高于Control组,其中400 nmol/L DSF/Cu组MDA含量升高至 1.80 ± 0.23 nmol/mg prot,显著高于Control组($P < 0.001$)。PC12细胞给药后,400 nmol/L NAC组GSH含量升高至 22.61 ± 2.91 μ mol/g prot,显著高于Control组($P < 0.01$),而400 nmol/L DSF/Cu组GSH含量降低至 6.88 ± 1.42 μ mol/g prot,显著低于Control组($P < 0.01$)。400 nmol/L NAC处理后,细胞SOD活性升高至 26.40 ± 4.55 U/mg prot,显著高于Control组($P < 0.01$),而DSF/Cu处理后,200 nmol/L和400 nmol/L组细胞SOD活性降低至 13.84 ± 0.82 U/mg

prot、 11.09 ± 1.26 U/mg prot,显著低于Control组($P < 0.01$, $P < 0.001$)。以上结果说明,抗氧化剂NAC能够降低神经细胞的氧化应激水平,而DSF/Cu复合物产生的作用与NAC相反,说明DSF/Cu复合物能明显增加神经细胞内的氧化应激水平而产生神经毒性。

2.4 DSF/Cu诱导PC12细胞凋亡

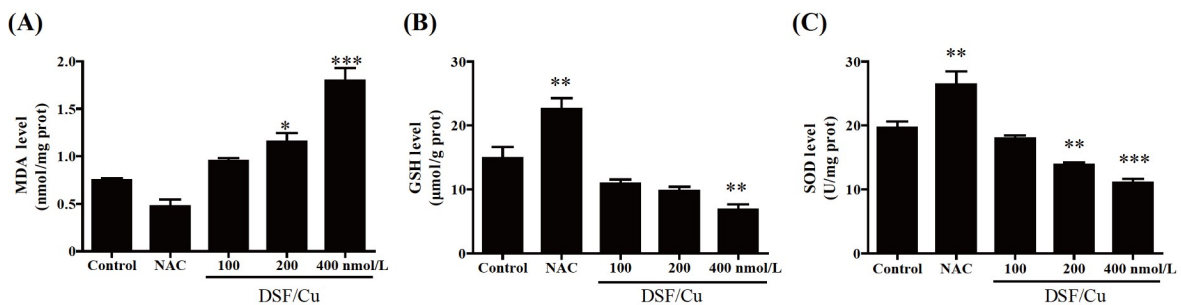
DAPI染色结果显示,Control组细胞核大小均匀、染色质无浓缩;而不同浓度的DSF/Cu复合物处理后,如黄色箭头所示,随着浓度升高,细胞数逐渐减少,出现凋亡小体的数量逐渐增加,胞质浓缩,甚至出现细胞核破碎(图4),说明DSF/Cu复合物可以浓度依赖性诱导PC12细胞凋亡。

2.5 DSF/Cu对PC12细胞中MAPK信号通路的影响

如图5所示,100 nmol/L、200 nmol/L、400 nmol/L的DSF/Cu复合物作用于PC12细胞24 h后,与Control组相比,各个浓度的DSF/Cu复合物能够上调p38蛋白的表达(均有显著性差异, $P < 0.05$),激活p38MAPK通路,且上调程度与给药浓度呈正相关。

2.6 DSF/Cu诱导裸鼠脑部出现病变

对裸鼠连续腹腔注射给药,研究体内的神经毒性。将脑部组织剖出并制备成病理切片,于光学显微镜下观察发现,在Control组中,裸鼠脑组织中的皮层、海马区和丘脑区域神经元数量丰富且结构完整,胞核胞质之间分界清晰,未见明显的变性和坏死。而在DSF/Cu组中,如黑色箭头所示,裸鼠皮层和海马区等区域可见个别的神经元呈现皱缩,染色程度加深,胞体变小,核仁不明



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与Control比较, $n=3$

图3 DSF/Cu作用下PC12细胞MDA(A)、GSH(B)含量和SOD(C)活性的变化

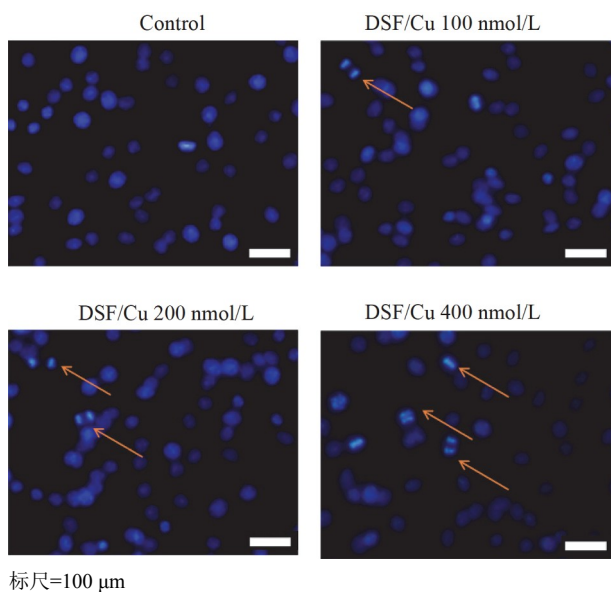
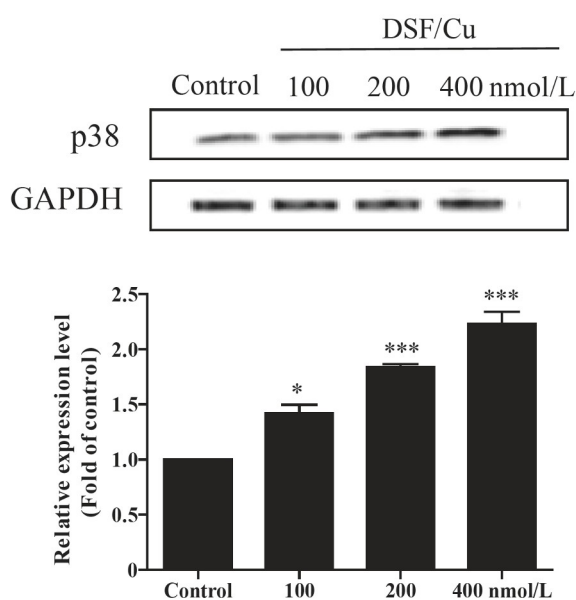


图4 DSF/Cu对PC12细胞凋亡的影响

显，胞核和胞质的分界不清晰(图6)。

3 讨论

DSF是一种临床常用于治疗酒精依赖的药物，能抑制乙醛脱氢酶，阻碍乙醇的正常代谢。近年来，越来越多的证据表明，DSF及其代谢物通过与二价金属铜形成络合物，在肿瘤、莱姆病和可卡因成瘾等疾病的治疗中，表现出优越的治疗效果^[28,29]。众多的临床研究资料显示，DSF具有一定的神经毒性，在长期给药的情况下会引起大鼠脱髓鞘。因此，深入研究DSF/Cu复合物介导的神



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组(Control)比较, $n=3$

图5 DSF/Cu对PC12细胞内p38蛋白表达的影响

经毒性及可能的分子机制，对各类疾病的预防及治疗均具有重要的研究意义和临床价值。

本研究使用具有类神经元特性的PC12细胞，初步探究DSF/Cu复合物对神经细胞的毒性作用。MTT实验结果表明，随着浓度的增加，DSF/Cu复合物对PC12细胞的毒性增强。正常情况下，ROS作为活性因子维持着细胞氧化-还原水平的平衡状态。当某些因素诱导ROS水平升高之后，氧化-还原状态平衡被打破，细胞内DNA、RNA和蛋白质结构被破坏，细胞产生氧化胁迫并凋亡^[30]。本研

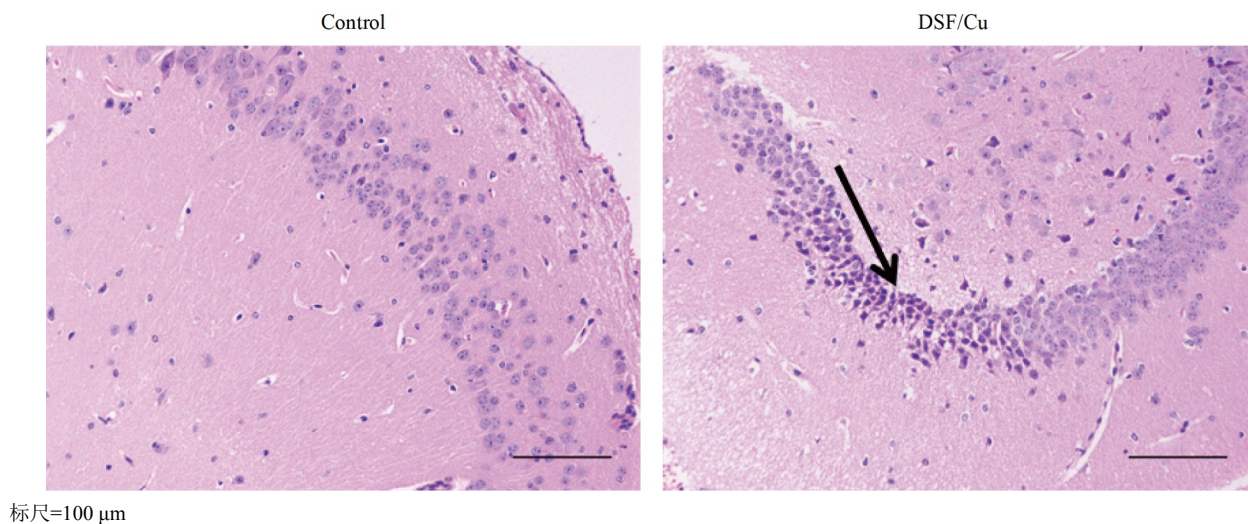


图6 DSF/Cu对裸鼠脑部的组织病理学检查

究以抗氧化剂NAC作为对照, 探究DSF/Cu复合物对氧化还原指标水平的影响。结果发现, NAC的抗氧化作用使PC12细胞内ROS和脂质过氧化产物MDA水平降低, 细胞内GSH和SOD水平增加, 意味着细胞清除活性氧及超氧阴离子等超氧化物的能力增强。与NAC造成的影响相反, 在DSF/Cu复合物作用下, 细胞ROS和MDA水平明显提高, 抗氧化因子GSH和SOD水平降低, 综合以上结果表明, DSF/Cu复合物可能通过提高ROS水平, 产生氧化应激。进一步通过DAPI染色研究DSF/Cu复合物对细胞凋亡的影响, 观察发现, DSF/Cu复合物处理后, 细胞染色质浓缩聚集, 出现凋亡小体并呈现凋亡相关特征, 提示DSF/Cu复合物具有一定的神经毒性。MAPK是一类与细胞凋亡密切相关的酶家族, 其中p38作为MAPK通路上的一个因子, 参与调节细胞增殖、分化和凋亡过程。研究显示, p38可被ROS活化^[31,32]。本研究结果显示, 200 nmol/L、400 nmol/L DSF/Cu复合物可明显活化p38 MAPK通路, 且活化程度随DSF/Cu复合物的给药浓度升高而升高, 表明DSF/Cu复合物可浓度依赖性地激活PC12细胞中的ROS/p38 MAPK通路, 使神经细胞产生氧化应激的表现, 进而引发凋亡。且动物实验结果也证明, DSF环糊精包合物联合铜给药后, 裸鼠脑组织出现病变, 一定程度上证明了DSF与铜联用会引起神经毒性的相关表现。

综上所述, DSF/Cu复合物具有一定神经毒性, 抑制PC12细胞增殖和促进凋亡, 引起一系列氧化应激指标的改变, 其机制可能与诱发氧化应激损伤以及激活ROS下游通路MAPK有关。该项目的研究结果为后期进一步深入探讨改善DSF/Cu复合物神经毒性作用方面的研究奠定了一定基础。

参考文献

- [1] Swetha KL, Sharma S, Chowdhury R, et al. Disulfiram potentiates docetaxel cytotoxicity in breast cancer cells through enhanced ROS and autophagy. *Pharmacol Rep*, 2020, 72(6): 1749-1765
- [2] Choi SA, Choi JW, Wang KC, et al. Disulfiram modulates stemness and metabolism of brain tumor initiating cells in atypical teratoid/rhabdoid tumors. *Neuro Oncology*, 2015, 17(6): 810-821
- [3] Kampangkaew JP, Spellacy CJ, Nielsen EM, et al. Pharmacogenetic role of dopamine transporter (SLC6A3) variation on response to disulfiram treatment for cocaine addiction. *Am J Addict*, 2019, 28(4): 311-317
- [4] Trautmann A, Gascan H, Ghoszi R. Potential patient-reported toxicities with disulfiram treatment in late disseminated lyme disease. *Front Med*, 2020, 7: 133
- [5] Lee YE, Choi SA, Kwack PA, et al. Repositioning disulfiram as a radiosensitizer against atypical teratoid/rhabdoid tumor. *Neuro Oncology*, 2017, 19(8): 1079-1087
- [6] Yang Y, Li M, Sun X, et al. The selective cytotoxicity of DSF-Cu attributes to the biomechanical properties and cytoskeleton rearrangements in the normal and cancerous nasopharyngeal epithelial cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 2017, 84: 96-108
- [7] Khairnar SI, Mahajan UB, Patil KR, et al. Disulfiram and its copper chelate attenuate cisplatin-induced acute nephrotoxicity in rats via reduction of oxidative stress and inflammation. *Biol Trace Elem Res*, 2020, 193(1): 174-184
- [8] Johansson B. A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of disulfiram and its metabolites. *Acta Psychiatr Scand*, 1992, 86(S369): 15-26
- [9] Viola-Rhenals M, Patel KR, Jaimes-Santamaria L, et al. Recent advances in antabuse (disulfiram): the importance of its metal-binding ability to its anticancer activity. *Curr Med Chem*, 2018, 25(4): 506-524
- [10] Liu P, Brown S, Goktug T, et al. Cytotoxic effect of disulfiram/copper on human glioblastoma cell lines and ALDH-positive cancer-stem-like cells. *Br J Cancer*, 2012, 107(9): 1488-1497
- [11] Lun X, Wells JC, Grinshtein N, et al. Disulfiram when combined with copper enhances the therapeutic effects of temozolomide for the treatment of glioblastoma. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(15): 3860-3875
- [12] Qu Y, Sun X, Ma L, et al. Therapeutic effect of disulfiram inclusion complex embedded in hydroxypropyl- β -cyclodextrin on intracranial glioma-bearing male rats via intranasal route. *Eur J Pharmaceutical Sci*, 2021, 156: 105590
- [13] Viquez OM, Lai B, Ahn JH, et al. N,N-diethyldithiocarbamate promotes oxidative stress prior to myelin structural changes and increases myelin copper content. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, 239(1): 71-79
- [14] Tran AT, Rison RA, Beydoun SR. Disulfiram neuropathy: two case reports. *J Med Case Rep*, 2016, 10(1): 72
- [15] Santos T, Martins Campos A, Morais H. Sensory-motor axonal polyneuropathy involving cranial nerves: an uncommon manifestation of disulfiram toxicity. *Clin Neurol Neurosurg*, 2017, 152: 12-15

- [16] Li Y, Fu SY, Wang LH, et al. Copper improves the anti-angiogenic activity of disulfiram through the EGFR/Src/VEGF pathway in gliomas. *Cancer Lett*, 2015, 369(1): 86-96
- [17] Taskiran AS, Ergul M. The modulator action of thiamine against pentylenetetrazole-induced seizures, apoptosis, nitric oxide, and oxidative stress in rats and SH-SY5Y neuronal cell line. *Chem Biol Interact*, 2021, 340: 109447
- [18] Thakre A, Jadhav V, Kazi R, et al. Oxidative stress induced by piperine leads to apoptosis in *Candida albicans*. *Med Mycol*, 2021, 59(4): 366-378
- [19] Xia H, Liang Y, Chen K, et al. Reduction-sensitive polymeric micelles as amplifying oxidative stress vehicles for enhanced antitumor therapy. *Colloids Surfs B Biointerfaces*, 2021, 203: 111733
- [20] Li Z, Liu Q, Liu C, et al. Evaluation of PFOS-mediated neurotoxicity in rat primary neurons and astrocytes cultured separately or in co-culture. *Toxicol In Vitro*, 2017, 38: 77-90
- [21] Al-Fahdawi MQ, Al-Doghachi FAJ, Abdullah QK, et al. Oxidative stress cytotoxicity induced by platinum-doped magnesia nanoparticles in cancer cells. *Biomed Pharmacother*, 2021, 138: 111483
- [22] Pellacani C, Eleftheriou G. Neurotoxicity of antineoplastic drugs: Mechanisms, susceptibility, and neuroprotective strategies. *Adv Med Sci*, 2020, 65(2): 265-285
- [23] Arafa MH, Atteia HH. Protective role of epigallocatechin gallate in a rat model of cisplatin-induced cerebral inflammation and oxidative damage: impact of modulating NF- κ B and Nrf2. *Neurotox Res*, 2020, 37(2): 380-396
- [24] Binnetoglu D, Hacimuftuoglu A, Aricioglu F. Neuroprotective effects of agmatine in antineoplastic drugs induced neurotoxicity: *in vitro* study. *Life Sci*, 2019, 221: 311-318
- [25] He X, Guo X, Ma Z, et al. Grape seed proanthocyanidins protect PC12 cells from hydrogen peroxide-induced damage via the PI3K/AKT signaling pathway. *Neurosci Lett*, 2021, 750: 135793
- [26] Li X, Qin X, Tian J, et al. Liquiritin protects PC12 cells from corticosterone-induced neurotoxicity via regulation of metabolic disorders, attenuation ERK1/2-NF- κ B pathway, activation Nrf2-Keap1 pathway, and inhibition mitochondrial apoptosis pathway. *Food Chem Toxicol*, 2020, 146: 111801
- [27] Qiao S, Yang D, Li X, et al. Silencing PAQR3 protects against oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced neuronal apoptosis via activation of PI3K/AKT signaling in PC12 cells. *Life Sci*, 2021, 265: 118806
- [28] Hu H, Cui L, Lu J, et al. Intestinal microbiota regulates anti-tumor effect of disulfiram combined with Cu²⁺ in a mice model. *Cancer Med*, 2020, 9(18): 6791-6801
- [29] Gil F, de Andrade AG, Castaldelli-Maia JM. Discussing prevalence, impacts, and treatment of substance use disorders in athletes. *Int Rev Psychiatry*, 2016, 28(6): 572-578
- [30] Forouzanfar F, Asadpour E, Hosseinzadeh H, et al. Safranal protects against ischemia-induced PC12 cell injury through inhibiting oxidative stress and apoptosis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2021, 394(4): 707-716
- [31] Xu F, Zhang X, Wang J, et al. Spinosin protects N2a cells from H₂O₂-induced neurotoxicity through inactivation of p38MAPK. *J Pharmacy Pharmacol*, 2020, 72(11): 1607-1614
- [32] Wang YM, Gao FJ, Lin SQ, et al. Activation of p38MAPK in spinal microglia contributes to autologous nucleus pulposus-induced mechanical hyperalgesia in a modified rat model of lumbar disk herniation. *Brain Res*, 2020, 1742: 146881