

羟基红花黄色素A对过氧化氢致L02细胞谷胱甘肽氧化的影响

王晓娜¹, 徐晓敏¹, 邱理红¹, 李 刚², 许 波², 马成俊², 王振华^{1,2,*}

(1.新疆特种植物药资源教育部重点实验室, 石河子大学药学院, 新疆 石河子 832002;

2.烟台大学生命科学学院, 山东 烟台 264005)

摘 要: 研究羟基红花黄色素A(HSYA)对过氧化氢(H₂O₂)所致L02人胎肝细胞内谷胱甘肽氧化的影响。采用5,5'-二硫代双硝基苯甲酸(DTNB)衍生化法, 用高效液相色谱(HPLC)法测定L02细胞内还原型谷胱甘肽(GSH)浓度, 二硫苏糖醇(DTT)还原细胞内氧化型谷胱甘肽(GSSG)后测定细胞内总GSH含量, 以此计算出细胞内GSSG含量。HSYA预处理L02人胎肝细胞24h, 再加入H₂O₂孵育1h后, 利用HPLC测定细胞内GSH和GSSG水平及GSSG/GSH比值的变化。结果表明: GSH在0.1~2mmol/L范围内线性关系良好, 最低定量限为0.1mmol/L, 批内、批间精密密度均小于10%, 样品的回收率均在95%~105%之间。此测定GSH方法准确、精密、重复性好、稳定性高, 可用于细胞中GSH和GSSG的测定。H₂O₂处理后L02细胞内GSSG/GSH比值明显升高, HSYA能够降低L02细胞中GSSG水平, 使GSSG/GSH的比值下降, 表明HSYA能够改善H₂O₂所致L02细胞的氧化胁迫状态, 保护细胞免受氧化损伤。

关键词: 羟基红花黄色素A; 谷胱甘肽; 高效液相色谱; 氧化胁迫

Effect of Hydroxysafflor Yellow A on the Oxidation of Intracellular Glutathione Induced by Hydrogen Peroxide in L02 Cells

WANG Xiao-na¹, XU Xiao-min¹, QIU Li-hong¹, LI Gang², XU Bo², MA Cheng-jun², WANG Zhen-hua^{1,2,*}

(1. Key Laboratory of Xinjiang Endemic Phytomedicine Resources, Ministry of Education, School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832002, China; 2. College of Life Sciences, Yantai University, Yantai 264005, China)

Abstract: The effect of hydroxysafflor A (HSYA) on the oxidation of intracellular reduced glutathione (GSH) induced by hydrogen peroxide (H₂O₂) was investigated in L02 cells. 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) was used as the derivatizing agent and the reduced glutathione was measured by HPLC. The total glutathione was measured by the same method after reduced by dithiothreitol (DTT). Oxidative glutathione can be calculated through reduced glutathione and total glutathione. The L02 cells were pretreated with HSYA for 24 hours, and then exposed to H₂O₂ for 1 hour. The intracellular GSH, GSSG contents and GSSG/GSH were analyzed by HPLC. The results showed that the standard curve was linear over the range of 0.1—2 mmol/L. The minimum quantification limit was 0.1 mmol/L. The precision discrepancy of inter-batch and intra-batch assays were both less than 10%. The recovery rates at low, medium and high spiked concentrations were in the range of 95%—105%. The developed method proved to accurate, quick, precise and suitable for the measurement of glutathione in cells. HSYA can significantly inhibit the increase of GSSG and GSSG/GSH, thus relieving the oxidative stress induced by H₂O₂.

Key words: hydroxysafflor yellow A; glutathione; high performance liquid chromatography; oxidative stress

中图分类号: R962

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)23-0317-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201323064

能量代谢是生命活动的基本过程, 动物体通过摄入食物的氧化生成能量, 以完成各种生理活动。可以说生命活动是一种受控的物质燃烧过程, 而氧化还原状态

是这一过程的关键控制因素。营养物质的氧化代谢主要在线粒体内通过氧化磷酸化过程代谢并转化为能量单位ATP, 此过程中一分子氧获得4个电子被还原为2个水分

收稿日期: 2012-12-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(11175222); 教育部“新世纪优秀人才支持计划”项目(NCET-10-0967);

新疆生产建设兵团医药专项项目(2011BA039); 山东省自然科学基金项目(ZR2009BM027); 烟台市科技发展计划项目(201025)

作者简介: 王晓娜(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为分子药理学。E-mail: xiaonawang_11@163.com

*通信作者: 王振华(1973—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为自由基生物学与医学。E-mail: zhenhuawang@tom.com

子, 该代谢过程应是绿色安全的^[1]。但生物体内, 氧可被单个电子逐步还原后生成超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(H_2O_2)和羟自由基($\cdot OH$), 均比氧分子具有更强的反应活性, 称为活性氧(reactive oxygen species, ROS)。ROS生成超过机体清除能力时, 导致机体处于氧化胁迫(oxidative stress)状态, 致各类生物分子的氧化损伤。已有充足证据表明氧化胁迫与人类衰老和老年性疾病发生发展相关, 如神经退行性疾病^[2]、心血管疾病^[3]、癌症^[4-5]等相关。谷胱甘肽(glutathione)是生物体由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸合成的含巯基三肽化合物, 广泛存在于动、植物中, 在面包酵母、小麦胚芽和动物肝脏中含量很高, 具有抗氧化和解毒的作用^[6]。动物体内的谷胱甘肽主要由肝细胞分泌, 大部分以还原型谷胱甘肽(GSH)的形式存在, 其可在氧化胁迫等特定条件下被氧化成氧化型谷胱甘肽(GSSG), GSSG/GSH比值是反映氧化还原状态的重要指标。

红花为菊科植物红花(*Carthamus tinctorius* L.)的干燥花, 具有活血散瘀的功效^[7]。红花的化学成分复杂, 现有研究表明红花黄色素是红花的主要有效部位, 目前已作为天然食品色素广泛应用。红花黄色素的主要成分为羟基红花黄色素A^[8], 研究表明, 羟基红花黄色素A具有抗血栓形成^[9]、抑制血管新生^[10]、减轻脑缺血损伤^[11]等作用。已有文献多报道血浆或组织中GSH的含量^[12-14], 对于细胞及GSSG/GSH比值的研究很少。本实验利用高效液相色谱法(HPLC)定量测定人胎肝细胞L02中GSH、GSSG含量及GSSG/GSH比值的变化, 并观察羟基红花黄色素A(HSYA)对氧化损伤的L02细胞中谷胱甘肽水平的影响, 为精确定量检测机体氧化还原状态及红花资源的合理利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

羟基红花黄色素A(纯度 $\geq 95\%$)由实验室自制, 用离子交换树脂, 大孔吸附树脂分离纯化的方法制备^[15]; 人胎肝细胞L02细胞 中国科学院上海生命科学研究院细胞库。

还原型谷胱甘肽标准品(GSH, 纯度 $\geq 99.0\%$)、5,5'-二硫代双硝基苯甲酸(DTNB, 纯度 $\geq 99.0\%$)、二硫苏糖醇(DTT, 纯度 $\geq 99.0\%$) 美国Sigma-Aldrich公司; 甲醇(色谱纯) 天津市科密欧化学试剂有限公司; 优级胎牛血清(FBS) 浙江天杭生物科技有限公司; RPMI 1640培养基 美国Gibco公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

Agilent1100 Series 高效液相色谱系统(配有可变波长紫外检测器和CAG Bootp Server色谱工作站) 美国安捷

伦公司; TGL-16G-A-高速冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂; AL104型分析天平 梅特勒-托利多(上海)仪器有限公司; BCM-1000型生物净化工作台 苏州净化设备有限公司; MCO-15AC型 CO_2 培养箱 三洋电器有限公司; IX71倒置相差显微镜 日本Olympus公司。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件

色谱柱: XB-C₁₈色谱柱(250mm $\times$ 4.6mm, 5 μ m); 保护柱: C₁₈柱(4mm $\times$ 2mm); 流动相: 0.05mol/L pH5.6的醋酸钠缓冲液-甲醇(93:7, V/V); 流速0.8mL/min, 检测波长320nm, 柱温40 $^{\circ}C$; 进样量20 μ L。

1.3.2 细胞分组及给药

将L02细胞按 4×10^5 个/mL的密度接种到含15%胎牛血清FBS的RPMI1640培养液中, 细胞分为正常组, H_2O_2 损伤模型组, HSYA高、中、低剂量处理组, 接种12h后, HSYA处理组各加入终浓度为 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} mol/L的HSYA, 培养24h后, 模型组与HSYA处理组加入100 μ mol/L H_2O_2 , 共孵育1h后, 收集并处理细胞。

1.3.3 细胞处理

将细胞消化后悬浮于100 μ L PBS中, 加入40 μ L 0.3mmol/L的EDTA和100 μ L 2%的TrironX-100, 涡旋混合1min, 使其裂解。裂解液分两份, 一份以Lowry法测定细胞蛋白含量^[16], 另一份加入100 μ L 0.15g/mL的三氯乙酸酸化沉淀蛋白, 9700r/min离心10min, 收集上清液。

1.3.4 谷胱甘肽的测定

1.3.4.1 还原型谷胱甘肽(GSH)含量的测定

取130 μ L上清液, 加入0.5mL 500 μ mol/L, pH8.9的Tris-HCl溶液, 混合均匀, 加入20 μ L纯水, 再加入350 μ L 10mmol/L的DTNB溶液, 振荡混匀, 室温反应5min, 再加入100 μ L 7.0mol/L的 H_3PO_4 溶液重新酸化。9700r/min离心10min, 上清液过0.45 μ m的微孔滤膜后, 进行液相分析。

1.3.4.2 总谷胱甘肽(tGSH)含量的测定

取130 μ L上清液, 加入0.5mL 500 μ mol/L的Tris-HCl溶液(pH8.9), 混匀, 加入20 μ L 10mmol/L的DTT, 室温反应5min, 向体系中加入350 μ L 10mmol/L的DTNB溶液, 作用5min, 再加入100 μ L 7.0mol/L的 H_3PO_4 溶液重新酸化。9700r/min离心10min, 上清液过0.45 μ m的微孔滤膜后, 进行液相分析。

氧化型谷胱甘肽(GSSG)的含量按照以下公式计算:

$$GSSG \text{ 含量} = (tGSH \text{ 含量} - GSH \text{ 含量}) / 2$$

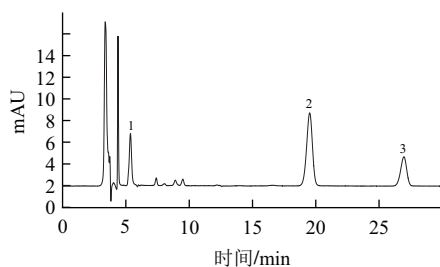
1.3.5 数据处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用SPSS 17.0软件处理数据, 各组数据间的比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 HPLC方法测定的特异性

DTNB是定量巯基化合物常用的衍生剂,其与GSH反应生成衍生物GSH-TNB及阴离子TNB。GSH-TNB的量可以直接反映出GSH的量。本实验条件下TNB、GSH-TNB、DTNB的保留时间分别为5、19、27min左右,GSH-TNB保留时间固定,峰形良好,无杂质峰干扰测定,见图1。



1.TNB; 2.GSH-TNB; 3.DTNB。

图1 L02细胞中谷胱甘肽高效液相色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of glutathione in L02 cells

2.2 线性关系

取L02细胞悬浮于100μL PBS中,取80μL于1.5mL离心管中,加入20μL GSH标准曲线工作液或加入20μL PBS(作为空白对照),按“细胞处理”项处理细胞,测定GSH浓度。以GSH峰面积对进样浓度绘制标准曲线,得线性回归方程为 $y=376.25x-1.2523$ ($R^2=0.9990$)。在0.1~2mmol/L范围内线性良好,最低定量限为0.1mmol/L。

2.3 精密度

按“线性关系”项下操作,得到含GSH标准品分别为0.1、0.5、1.0mmol/L的低、中、高3个浓度的细胞样品,每个样品测定5次,共测定3d,并与标准曲线同时进行,由标准曲线计算各样品的浓度,计算其相对标准偏差。经统计分析得到的日内、日间精密度RSD值均小于10%,说明本方法精密度良好,结果见表1。

表1 含GSH标准品的细胞样品的精密度测定结果

组别	日内误差(n=5)		日间误差(n=3)	
	测定值/(mmol/L)	RSD/%	测定值/(mmol/L)	RSD/%
低浓度组	0.247±0.011	4.36	0.244±0.016	6.63
中浓度组	0.646±0.010	1.54	0.645±0.022	3.42
高浓度组	1.139±0.035	3.07	1.141±0.032	2.84

2.4 加样回收率

将细胞沉淀悬浮于4mL PBS中,分别取200、300、400、500、500(作为本底)、600、700、800μL于1.5mL EP管中,离心,将其重新悬浮于100μL PBS中,取80μL于1.5mL离心管中,加入20μL 1mmol/L的GSH标准液,本

底中加入20μL PBS,按“细胞处理”项处理细胞,测定还原型谷胱甘肽GSH的量,再代入公式:加样回收率/%= $\frac{\text{测定量}-\text{本底量}}{\text{加入量}} \times 100$,计算加样回收率,回收率均在95%~105%范围内,表明此方法准确可靠,结果见表2。

表2 加样回收率实验结果

Table 2 Recovery rates of the developed method

实测值/(mmol/L)	本底量/(mmol/L)	回收率/%
0.302	0.109	96.4
0.356	0.163	96.7
0.427	0.218	104.6
0.477	0.272	102.5
0.528	0.326	101.3
0.587	0.381	102.8
0.642	0.435	103.9

2.5 稳定性

2.5.1 新配储备液的稳定性

将新配制的储备液在-20℃冻存,分别在30、60、90d取出,用PBS稀释成浓度分别为0.2、0.5、1.0mmol/L的测定液,每个浓度平行配制3份进行测定,表3结果显示储备液稀释的3个浓度的相对标准偏差分别为5.79%、3.41%和5.20%,均小于10%,说明GSH在3个月内稳定。

表3 储备液的稳定性实验结果($\bar{x} \pm s$, n=3)

Table 3 Stability of stock solutions ($\bar{x} \pm s$, n=3)

时间/d	低浓度组	中浓度组	高浓度组
0	0.200±0.012	0.500±0.019	1.000±0.024
30	0.192±0.005	0.493±0.032	0.972±0.047
60	0.187±0.008	0.487±0.021	0.949±0.034
90	0.174±0.007	0.462±0.028	0.884±0.053

2.5.2 衍生化后GSH的稳定性

衍生化后的GSH的稳定性从3个水平进行测定即L02细胞及含0.2、0.5mmol/L GSH标准品的L02细胞样品。样品贮存于-20℃冷冻,分别在0、0.5、1、2、5 d测定GSH含量,表4结果表明3个水平GSH的相对标准偏差分别为7.48%、6.59%、4.86%,均小于10%。

表4 衍生化后细胞样品的稳定性实验结果

Table 4 Stability of the developed method for cell samples after derivatization

时间/d	不含GSH	含0.2mmol/L GSH	含0.5mmol/L GSH
0	0.275	0.482	0.769
0.5	0.271	0.476	0.763
1	0.258	0.448	0.745
2	0.244	0.426	0.716
5	0.229	0.415	0.683

2.6 HSYA对氧化损伤的L02细胞内谷胱甘肽的影响

由表5可知,与正常组相比,模型组的GSSG含量上升($P<0.01$),GSSG/GSH比值明显升高($P<0.01$)。HSYA中、高剂量组与模型组相比,GSSG的含量明显下降,GSSG/GSH比值显著降低。

表5 HSYA对H₂O₂损伤后L02细胞中谷胱甘肽的影响($\bar{x} \pm s$, $n=4$)
Table 5 Effect of HSYA on glutathione in L02 cells with oxidative damage induced by H₂O₂ ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别	GSSG含量/($\mu\text{mol}/(\text{mg pro})$)	GSH含量/($\mu\text{mol}/(\text{mg pro})$)	GSSG/GSH
正常组	0.097±0.006**	2.751±0.085	0.035±0.003**
模型组	0.562±0.107 ^{△△}	2.137±0.23	0.263±0.043 ^{△△}
HSYA低剂量组	0.484±0.142	2.276±0.283	0.213±0.048
HSYA中剂量组	0.263±0.115*	2.529±0.264	0.104±0.021*
HSYA高剂量组	0.088±0.019**	2.778±0.247	0.032±0.009**

注: Δ . 与正常组比较, 有显著性差异 ($P < 0.05$); $\Delta\Delta$. 与正常组比较, 有极显著性差异 ($P < 0.01$); *. 与模型组比较, 有显著性差异 ($P < 0.05$); **. 与模型组比较, 有极显著性差异 ($P < 0.01$).

3 结论

DTNB是定量巯基化合物常用的衍生剂, 其与GSH反应生成衍生物GSH-TNB及阴离子TNB。TNB在412nm波长处有强吸收, 因此之前通过分光光度法测定TNB, 间接反映GSH的含量, 但经常被在测定波长下有吸收的其他物质干扰, 而不能准确测定^[17-18]。近几年高效液相色谱因其良好的专属性、灵敏度而用于GSH的测定, 并因其具有良好的分离功能, 能够把衍生物GSH-TNB与阴离子TNB分开, 通过测定GSH-TNB直接确定GSH的量。GSSG的测定利用还原剂DTT将GSSG还原成GSH, 测定总的GSH, 再减去还原前测定的GSH量, 即为GSSG的量。

高效液相色谱系统中, 生物样品中蛋白质的去除至关重要, 样品中残留的蛋白会对色谱柱造成损伤^[19]。TCA能够除去样品中的蛋白得到澄清的上清, 达到液相分析的标准。影响GSH测定的一个重要的因素就是GSH的氧化, GSH氧化形成GSSG, 而使样品中测得的GSH量比实际值偏低。酸化样品能够阻止GSH中的巯基离子化形成更容易被氧化的巯基阴离子, 从而减少GSH的氧化。另外, 在肝细胞中含有一些降解GSH的酶, 例如 γ -谷氨酰转肽酶, GSH是其催化反应的底物, 它参与GSH降解的第一步^[20-21]。因此, 酸化样品及冰浴操作可以降低 γ -谷氨酰转肽酶的活性, 减少GSH的降解。

对生物样品进行酸化是非常必要的, 但DTT的还原力受pH值的影响, 只有pH值大于7时, $-SH$ 失去质子形成 $-S^-$ 才具有反应活性。另外衍生化试剂DTNB在中性条件下的反应性和稳定性比酸性条件下好。因处理样品时对样品进行了酸化, 所以在还原或衍生化之前加入Tris-HCl缓冲液, 使体系达到反应的最佳pH值。

H₂O₂造成细胞氧化损伤是经典的氧化损伤模型, H₂O₂不仅能直接氧化细胞膜上的脂质及蛋白, 而且能自由穿过细胞膜进入胞质, 在细胞凋亡、机体的各种疾病及衰老过程中发挥重要的作用。GSH是细胞内重要的抗氧化剂, 它是谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的底物, 该酶消耗GSH把H₂O₂还原成水, 降低H₂O₂对生物体的氧化损伤, 在这个过程中GSH氧化成GSSG, 从而使胞内的GSSG/GSH比例改变。H₂O₂造模的损伤程度与其浓度、作用时间、细胞类型及密度有关^[22-24]。本实验选用 4×10^5 个/mL密度的L02细胞, 用100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的H₂O₂作用1h时, 可显著提高GSSG

的水平, 使GSSG/GSH的比值升高。氧化损伤前预先加入HSYA能够显著改善L02细胞内谷胱甘肽的水平, 降低胞内GSSG/GSH比值, 减少氧化损伤, 保护细胞。

本方法准确, 精密, 线性关系良好, 稳定性高, 可用于细胞中GSH的测定。并且此方法能够检测出正常及处于氧化胁迫条件下L02细胞中GSSG/GSH比值的变化, 可作为检验氧化模型建立是否成功的方法之一, 为体外抗氧化剂的筛选和研究提供参考。

参考文献:

- [1] LANE N. The costs of breathing[J]. Science, 2011, 334: 184-185.
- [2] MOREIRA P I, SIEDLAK S L, ALIEV G, et al. Oxidative stress mechanisms and potential therapeutics in Alzheimer's disease[J]. J Neural Transm, 2004, 112(7): 921-932.
- [3] MILLS B J, WEISS M M, LANG C A, et al. Blood glutathione and cysteine changes in cardiovascular disease[J]. J Lab Clin Med, 2000, 135(5): 396-401.
- [4] LYNNEN A H, ALADEMIR A Z, OBEK C, et al. The effect of prostate cancer and antiandrogenic therapy on lipid peroxidation and antioxidant systems[J]. Int Urol Nephrol, 2004, 36(1): 57-62.
- [5] YE H C C, HOU M F, TSAI S M, et al. Superoxide anion radical lipid peroxides and antioxidant status in the blood of patients with breast cancer[J]. Clin Chim Acta, 2005, 361(1/2): 104-111.
- [6] 蔡俊. 谷胱甘肽的研究进展[J]. 粮食与饲料工业, 2000(10): 41-42.
- [7] 国家药典委员会. 中国人民共和国药典: 一部[S]. 2010版. 北京: 化学工业出版社, 2010: 141.
- [8] 于美玲, 邓传良, 高武军, 等. 红花研究进展综述[J]. 生物学教学, 2009, 34(11): 3-4.
- [9] 夏玉叶, 闵阳, 盛雨辰. 羟基红花黄色素A对大鼠血栓形成和血小板聚集功能的影响[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(11): 1400-1401.
- [10] 张前, 牛欣, 闫妍, 等. 羟基红花黄色素A对体外培养人脐静脉内皮细胞增殖的抑制作用[J]. 中国医药学报, 2004, 19(6): 379-381.
- [11] 朱海波, 王振华, 田京伟, 等. 羟基红花黄色素A对实验性脑缺血的保护作用[J]. 药学报, 2005, 40(12): 1144-1146.
- [12] 张全英, 华雯妍, 施爱明, 等. 液相色谱-串联质谱法测定人血浆和全血中内源性还原型谷胱甘肽浓度[J]. 中国新药与临床杂志, 2010, 29(8): 620-624.
- [13] BOULIGAND J, DEROUSSEMENT A, PACI A, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay of reduced and oxidized glutathione and main precursors in mice liver[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2006, 832(1): 67-74.
- [14] 颜鸣, 史国兵, 隋因, 等. 高效液相色谱法测定人血浆中还原型谷胱甘肽浓度[J]. 解放军药学报, 2008, 24(3): 251-253.
- [15] 姜新刚, 赵韶华, 贾继明. 一种从红花中提取精制羟基红花黄色素A的方法: 中国, 201110060955.2[P]. 2012-09-19.
- [16] MAQUSSON O T, TOYAMA H, SAEKI M, et al. The structure of a biosynthetic intermediate of pyrroloquinoline quinone (PQQ) and elucidation of the final step of PQQ biosynthesis[J]. J Am Chem Soc, 2004, 126(17): 5342-5343.
- [17] 范崇东, 王淼, 卫功元, 等. 谷胱甘肽测定方法研究进展[J]. 生物技术, 2004, 4(1): 68-70.
- [18] CHEN W, ZHAO Y, SEEFELDT T, et al. Determination of thiols and disulfides via HPLC quantification of 5-thio-2-nitrobenzoic acid[J]. J Pharm Biomed Anal, 2008, 48(5): 1375-1380.
- [19] GARCIA S C, SCHOTT K, CHARAO M, et al. Quantification of reduced glutathione by HPLC-UV in erythrocytes of hemodialysis patients[J]. Biomed Chromatogr, 2008, 22(5): 460-468.
- [20] ROBERTS J C, FRANCETIC D J. The importance of sample preparation and storage in glutathione analysis[J]. Anal Biochem, 1993, 211(2): 183-187.
- [21] RUEDIG C, DRINGEN R. TNF alpha increase activity of gamma-glutamyl transpeptidase in cultured rat astroglial cells[J]. J Neurosci Res, 2004, 75(4): 536-543.
- [22] DRINGEN R, KUSSMAUL L, GUTTERER M J, et al. The glutathione system of peroxide detoxification is less efficient in neurons than in astroglial cells[J]. J Neurochem, 1999, 72(6): 2523-2530.
- [23] de WIT R, MAKKINIE M, BOONSTRA J, et al. Hydrogen peroxide reversibly inhibits epidermal growth factor (EGF) receptor internalization and coincident ubiquitination of the EGF receptor and Eps15[J]. FASEB J, 2001, 15(2): 306-308.
- [24] RAHMAN I, GILMOUR P S, JIMENEZ L A, et al. Oxidative stress and TNF-alpha induce histone acetylation and NF-kappaB/AP-1 activation in alveolar epithelial cells: potential mechanism in gene transcription in lung inflammation[J]. Mol Cell Biochem, 2002, 234-235(1/2): 239-248.