

DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20161027002

袁圣武, 黄超, 季晓亚, 等. 环境污染物导致氧化应激的关键信号通路及其检测方法[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(1): 25-37

Yuan S W, Huang C, Ji X Y, et al. Main signaling pathways and detection methods of oxidative stress caused by environmental pollutants [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(1): 25-37 (in Chinese)

环境污染物导致氧化应激的关键信号通路及其检测方法

袁圣武¹, 黄超¹, 季晓亚¹, 马梅^{1,2,*}

1. 中国科学院生态环境研究中心中国科学院饮用水科学与技术重点实验室, 北京 100085

2. 中国科学院大学资源与环境学院, 北京 100190

收稿日期: 2016-10-27 录用日期: 2016-10-28

摘要: 环境污染物能够以多种途径进入生物体内, 在体内产生含氧自由基等活性氧物质, 并通过多种信号通路及酶反应引起氧化应激, 造成生物体内的脂质过氧化、蛋白质损伤、DNA 表达改变、酶失活等, 从而引发心血管疾病、风湿类疾病、感染及癌症等的发生。本文对环境污染物致氧化应激产生的原因、涉及的信号通路及酶反应、造成的危害, 以及常见的基于细胞模型的氧化应激检测方法进行了综述, 期望为评价环境污染物和检测氧化损伤提供参考。

关键词: 环境污染物; 氧化应激; 氧化损伤; 信号通路; 监测方法

文章编号: 1673-5897(2017)1-025-13 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Main Signaling Pathways and Detection Methods of Oxidative Stress Caused by Environmental Pollutants

Yuan Shengwu¹, Huang Chao¹, Ji Xiaoya¹, Ma Mei^{1,2,*}

1. State Key Laboratory of Drink Water Science and Technology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

2. College of Resources and Environmental Science, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

Received 27 October 2016 accepted 28 October 2016

Abstract: Environmental pollutants can be uptaken by living organism through different ways, and produce some reactive oxygen species like oxygen free radicals *in vivo*, which arouse oxidative stress by a variety of signaling pathways and enzyme reactions. Some of the reactive oxygen species are associated with human diseases, such as cardiovascular disease, rheumatic diseases, infections and cancer, which may be resulted by lipid peroxidation, protein denaturation, DNA damage, and enzyme inactivation, etc. This article summarized the reasons and harmful effects of oxidative stress caused by environmental pollutants. It reviewed, the involved signaling pathways and enzymatic reactions during oxidative stress, and the currently used cell-model-based approaches for detecting oxidative stress. The purpose of this review article is to provide information for better understanding the oxidative stress associated-mechanisms and further development of detecting methods for oxidative damages.

基金项目: 水体污染控制与治理重大专项课题(2014ZX07206005-002); 国家自然科学基金重点项目(21437006); 中国科学院前沿科学重点研究项目(QYZDY-SSW-DQC004)

作者简介: 袁圣武(1991-), 男, 博士生, 研究方向为水生生态毒理学, E-mail: swyuan_st@rcees.ac.cn;

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: mamei@rcees.ac.cn

Keywords: environmental pollutants; oxidative stress; oxidative damage; signaling pathways; detection methods

环境问题已经成为 21 世纪的社会焦点问题之一。环境污染物是人体健康和生态系统安全的一个重要威胁,而氧化损伤是环境污染物对人类及其他生物体造成伤害的一个具体表现。正常情况下,机体内的氧化系统和抗氧化系统处于平衡状态。但是,当机体或细胞发生病变或受到外源刺激时,机体内的以氧自由基为代表的活性氧物质(reactive oxygen species, ROS)及衍生的含氧自由基的产生与消除失衡,或外源性氧化物质的过量摄入,超出了抗氧化系统的还原能力,导致氧自由基在细胞内过量蓄积,便会引起氧化应激^[1]。总之,氧化损伤是体内的氧化物质与抗氧化系统失衡,产生过量 ROS,引起的分子、细胞和机体的损伤效应^[2]。环境污染物是导致生物体氧化应激的重要原因之一,污染物通过各种途径进入机体内,引起 ROS 含量上升,造成氧化还原电位的变化,对细胞、组织、机体造成伤害。研究者对此开展了大量的研究。近年来,氧化应激对生物体内脂类、蛋白质、DNA 和线粒体的损伤及抗氧化物防御系统的变化均被作为生物标志物,广泛地应用到环境污染物的监测中。为了充分了解氧化应激产生的全过程,人们围绕环境污染物对生物体、分子生物等靶目标进行了广泛的研究,亟待建立一个基于氧化应激的简单、快速、精确的环境污染物监测系统。

1 氧自由基的产生与清除

1.1 氧自由基的产生

在正常的生理条件下,生物体内的氧化活性物质和抗氧化防御体系处于动态平衡状态。但在外源性物质刺激下,机体内会持续产生 ROS,打破这一动态平衡系统。当环境污染物进入机体后,会通过各种信号途径或酶联反应使机体内环境改变,从而产生含氧自由基。生物体内的含氧自由基主要有 ROS 和 RNS(reactive nitric species, RNS)两大类。ROS 包括超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$)、羟自由基($\cdot\text{OH}$)和过氧化氢(H_2O_2)等;RNS 包括一氧化氮($\cdot\text{NO}$)、二氧化氮($\cdot\text{NO}_2$)和过氧化亚硝酸盐($\cdot\text{ONOO}^-$)等。氧自由基和氮自由基在活细胞中持续产生,对维持细胞功能必不可少的。需氧生物细胞的基本代谢就会产生 ROS 和 RNS。含氧自由基能够使具抗氧化能力的维生素(维生素 E 和抗坏血酸盐)、儿茶酚胺和硫醇以及各种具一定惰性的酶(过氧化氢酶和过氧化物

酶)发生氧化^[3-4]。除了正常的生理代谢产生的氧自由基外,生物体内的另外一些内源性自由基,如某些生物体内的黄嘌呤氧化酶、细胞色素 P450 降解酶等氧化酶能够产生 O_2 ,鸟苷酸环化酶、葡萄糖氧化酶等也能产生 H_2O_2 。除了生物体内自身产生的 ROS 之外,大量体外和体内实验的研究均表明,外源性污染物,如重金属镉、铜、汞等^[5-9],除草剂、染料等多环芳烃类化合物^[10-12],多氯联苯类化合物^[9],有机磷和有机氯农药等有毒污染物^[13],均是 ROS 介导的细胞、组织损伤的主要诱导因子,是对生命有机体产生氧化损伤的主要因素。此外,电离辐射也能够氧化 H_2O 产生 $\text{HO}\cdot$ 。人的皮肤收到紫外照射(290~400 nm)也会产生大量的 ROS,最终影响细胞的正常生理功能^[14]。

1.2 氧自由基的清除

在生物体内,维持氧自由基产生及清除作用间的动态平衡才能维持机体的生理健康。但是在正常代谢过程中仍会有 2%~3% 的自由基未被机体利用或代谢。因此生物体在长期进化过程中形成了抗氧化防御系统,以维持体内氧自由基的动态平衡^[15]。机体有 2 类抗氧化系统:一类是酶抗氧化系统,主要由各种抗氧化酶组成,包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等;另一类是非酶抗氧化系统,是指不直接参与分解代谢 ROS 物质,却能起到维持体内氧化还原平衡作用的蛋白类化合物,主要包括血红蛋白、肌红蛋白等含有 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ 离子的传输蛋白、各种金属硫蛋白及人绒毛膜促性腺激素(HCG)等可以抑制氧化应激过程中细胞凋亡等损伤的功能蛋白^[16]。此外,生物体内还存在多种抗氧化性物质,包括麦角硫因、谷胱甘肽、褪黑素、 α -硫辛酸、类胡萝卜素、维生素 C、维生素 E、微量元素锌、铜、硒(Se)等。在正常情况下,细胞内的氧化还原平衡主要由抗氧化防御系统维持。其中,谷胱甘肽、硫氧还原蛋白、过氧化物氧化还原酶循环起着至关重要的作用^[17-18]。抗氧化系统的失衡导致 ROS、RNS 等含氧自由基的积累,是引起氧化损伤的直接原因。

2 氧化应激的危害

正常条件下,生物体内都存在着一定量的 ROS,作为体内代谢和信号通路的信使,用以激活和调控各种转录因子,诱导体内各种基因的转录及相

关功能蛋白的表达,进而参与细胞的增殖、分化、迁移和维护机体的新陈代谢^[19-20]。当 ROS 浓度升高时,因其含有未成对电子,极不稳定,易与邻近分子反应并诱导产生新的自由基,便会直接或间接对 DNA、蛋白质及细胞膜等脂类物质发生氧化损伤,诱发细胞凋亡、衰老和死亡^[21-24]。大量研究结果表明:过渡金属类污染物、多环芳烃、有机氯和有机磷农药、有机磷酸酯类化合物、多氯联苯等有机物类污染物及其他异型物质都能够对生物体产生氧化压力^[25]。这些环境污染物能够在生物体的各个分子水平上造成的危害,如对膜脂、DNA 和蛋白产生损伤,改变抗氧化酶的活性等,进而造成细胞内蛋白损伤和 DNA 损伤,最终导致细胞的衰老、凋亡或坏死,引起各类疾病的发生^[26-29]。外源性氧化物质不仅能增加机体内的总氧化能力,还可能破坏机体内的抗氧化系统,引起氧化损伤。

研究表明,氧自由基对机体的损伤主要体现在 4 个方面:第一是对脂质的过氧化作用,直接造成细胞的萎缩,导致细胞衰老或死亡;第二是对蛋白质氨基酸的破坏或交联反应产生的损伤;第三是对高糖分子的氧化降解作用;第四是对 DNA、RNA 的交联反应或氧化作用产生的损伤^[30]。

2.1 细胞的衰老和死亡

氧化损伤的直观表现是细胞的衰老和死亡。近年来,有研究证实细胞内高水平的 ROS 的会使细胞变形,酶系统损坏,进而导致细胞衰老和凋亡。持续性的细胞老化和坏死在组织中累积,会造成机体组织坏死、出现黄斑等衰老迹象^[31]。有机磷酸酯类化合物可经呼吸道、消化道等途径被机体吸收和累积,使机体内对氧磷酶活性受到抑制,引起过氧化反应,造成细胞因子分泌增多,引起细胞死亡^[32]。此外,氧化应激还会损害视网膜色素上皮细胞,导致遗传性视网膜疾病的产生^[33]。

2.2 蛋白损伤

各种活性自由基和 ROS 会引起肽键裂解及蛋白的氧化,其结果是导致氨基酸侧链发生氧化修饰,肽键与脂类及糖类的氧化产物发生反应,形成碳酰基衍生物等。实验研究表明 ROS 对蛋白产生氧化损伤后,机体会累积氧化修饰蛋白^[34-35],促进机体衰老或发生疾病^[36-37],导致有机体降解氧化蛋白的能力降低,并影响转录和翻译的精确度^[38]。罕见的 Rett 综合症就与氧化损伤有关,大多数 Rett 综合症是由 X 染色体上的甲基-CpG 结合蛋白 2(methyl-

CpG binding protein 2, MeCP2) 的突变造成,但 MeCP2 突变的机制尚未研究透彻^[39],近年来的研究显示在 Rett 综合症患者的皮肤细胞中发现高浓度的 ROS,以及 NADPH 氧化酶和蛋白激酶活性增强的现象,细胞内抗氧化系统和线粒体的功能出现障碍,证明 Rett 综合症的发病机制可能与氧化损伤有关^[40]。

2.3 线粒体损伤

在环境污染物诱发的细胞氧化损伤过程中,细胞内的线粒体起着至关重要的调节作用。线粒体是细胞的能量工厂,在氧化代谢制造 ATP 过程中会伴随大量 ROS 的产生。在正常生理条件下,线粒体 ROS 的生成速率与线粒体膜电位水平有直接关系^[41]。Suski 等^[42]证实,线粒体膜电动势的降低直接导致 ROS 的产生量增多;此外,线粒体内的抗氧化防御体系能够有效消除过量的 ROS,使自身免受氧化应激的伤害,继续发挥其重要生理功能^[43]。但是,当细胞内 ROS 大量蓄积时,ROS 会氧化渗透性转运通道上的敏感位点,从而导致线粒体发生形态肿胀、膜电位降低等氧化损伤效应,产生严重的细胞毒性^[44]。

2.4 DNA 损伤

DNA 分子具有还原性,较易与金属离子和其他通过膜的渗透物结合并形成羟基^[45]。同时,DNA 分子含有多种碱基和糖苷,容易受到羟基的攻击,当糖苷受到攻击后,会导致嘌呤位点上的碱基易位,脱氧核糖链断裂和半糖氧化^[46]。有研究表明:ROS 与 DNA 分子反应能够产生 100 多种不同的产物^[47]。例如,有机磷酸酯类和叔丁基-氢过氧化物会引起细胞内乳酸脱氢酶(LDH)的泄露,增强脂质过氧化的速率,加速 DNA 的损伤,减少谷胱甘肽(GSH)的含量^[48-49]。重金属汞和铜会导致 DNA 单链断裂,镉则会引起 DNA 损伤^[50]。长期暴露于过量 PM_{2.5} 中,会严重降低人体支气管上皮细胞(16HBE)的细胞活力,导致 ROS 的大量产生和累积,抑制线粒体内相关基因的表达(包括一些融合蛋白 Mfn1、OPA1、SIRT1 和 p53R2 的表达),对线粒体 DNA 造成伤害,破坏细胞的线粒体呼吸链^[51]。

3 氧化应激产生的主要信号通路及酶反应

3.1 主要的信号通路

氧化应激涉及多种信号通路,其中主要的一些信号通路示意图如图 1 所示。

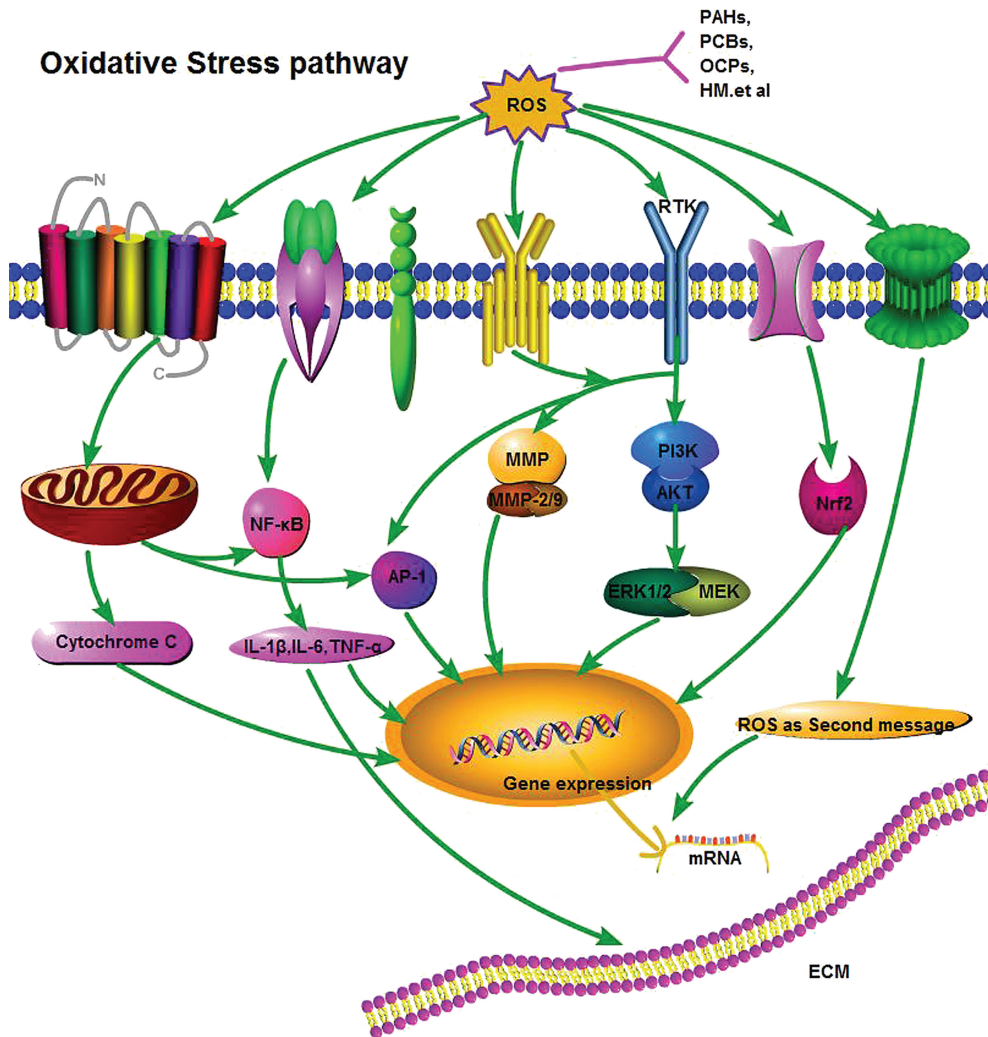


图1 氧化应激的关键信号通路示意图

注:PAHs为多环芳烃,PCBs为多氯联苯,OCPs为有机氯农药,HM为重金属。

Fig. 1 Schematic diagram of the main signal pathway of oxidative stress

Note: PAHs is polycyclic aromatic hydrocarbons; PCBs is polychlorinated biphenyls; OCPs is organochlorine pesticides; HM is heavy metals.

3.1.1 AMPK 通路

氧化应激发生的信号通路中,研究最透彻的信号通路有增殖过程中蛋白激酶(AMPK)/激活蛋白(AP-1)^[52]和基质金属蛋白酶(MMP)激活信号通路^[53]。AMPK在细胞和生物体内发挥着关键作用,维持着细胞内的氧化还原代谢平衡和线粒体的功能。在神经、心脏、骨骼、血管平滑肌、胰腺和肝细胞中氧化应激都会激活AMPK信号系统^[54]。例如, H_2O_2 在诱导胶原蛋白降解过程中,JNK和p38蛋白的表达上升1.2倍和3.8倍,柑橘类果汁混合物诱导ERK1/2蛋白的表达上调,这些蛋白(JNK、p38和ERK1/2)都是细胞内AMPK信号通路中的关键蛋

白,从而介导AMPK信号通路表达的改变。此外, H_2O_2 通过抗氧化系统的监管(regulation)改变MMP信号通路,增加MMP-2和MMP-9的活性,降解胶原蛋白和皮肤上的细胞外基质(ECM)^[31]。

3.1.2 Nrf2 通路

Nrf2是抗氧化系统的一个重要元件,在抵抗ROS过程中扮演着重要的作用,在过量ROS刺激下,通过Nrf2通路诱导下游抗氧化响应元件的表达,进而诱导一系列包括解毒酶基因、谷胱甘肽S-转移酶、NAD(P)H:醌氧化还原酶等基因的表达,从而调节生物体内ROS的含量^[55-56]。在 H_2O_2 的诱导下,Nrf2调节的相关基因FLT1、过氧化物氧化还原

酶 3 和谷氨-半胱氨酸连接酶的表达水平会明显上升^[57]。此外,重金属铜(Cu^{2+})的累积,会造成 pSer40 和 Nrf2 蛋白过度表达,HO-1 基因的持续转录,接着诱导 Nrf2 通路,削弱细胞内抗氧化系统消除 ROS 的能力,造成氧化损伤^[58]。

3.1.3 PI3K/AKT 通路

PI3K/AKT 通路是诱导细胞生长、生存、凋亡等功能的一条重要途径^[59]。在 H_2O_2 诱导下, p-AKT 的表达水平明显下降,而过氧化物氧化还原酶 6 (PRDX6)亦可以通过 PI3K/AKT 通路提高 p-AKT 的表达,保护 ARPE-19 细胞免受 H_2O_2 诱导的氧化应激和凋亡^[33]。有研究亦证实了低聚糖通过诱导细胞凋亡途径 PI3K/AKT 和 MEK/ERK1/2 保护神经免受葡萄糖毒性诱发的氧化损伤^[60]。

3.1.4 NF- κ B 通路

NF- κ B 作为一个转录因子蛋白家族,主要参与与 DNA 结合、二聚体化和核移位,调控早期免疫反应和炎症反应各阶段相关基因的表达。研究表明,肿瘤坏死因子受体相关因子 (TRAF)2 能够经 NF- κ B 途径抑制肿瘤坏死导致的 ROS 积累,以及随后的丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 通路的激活^[61-62]。此外,线粒体中过量的 ROS,除了造成氧化损伤外,还会参与线粒体中氧化还原系统相关的多种转录因子的激活过程,其中包括 NF- κ B 和 AP-1^[63]。转录因子 NF- κ B 的激活,促进 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等的释放,最终导致血管感染,动脉粥样硬化,血管收缩、高血压等症状。有研究证明,阿魏酸预处理大鼠血管平滑肌细胞后,会抑制 NF- κ B 通路的激活,从而使细胞内 NADPH 氧化酶的表达受到抑制,AMPK 通路和 AKT 通路蛋白表达下调,ROS 含量降低^[64]。

3.1.5 其他信号通路

线粒体内膜上的电子呼吸链是氧化还原反应的主要场所,其中的三羧酸循环是重要的氧化还原通路之一,ROS 的产生和消除在此通路中均有体现。线粒体膜电动势的去极化,细胞色素 C 的释放激发 caspase 蛋白家族活性,激活半胱天冬酶活性。在线粒体释放细胞色素 C 后,氧化损伤会直接刺激 caspase-3-like 的活性,导致 DNA 的破碎和沉淀,诱导细胞凋亡。线粒体中的琥珀酸脱氢酶 (复合物 II) 是产生 ROS 的重要场所,而其电子链上游和下游的复合物能起到负反馈的作用,从而保证整个氧化还原系统的稳定^[65]。

此外,在细胞内凋亡信号通路中,ROS 可以作

为第二信使诱导 DNA 的合成和 mRNA 的表达,引发原癌基因的表达^[66]。

3.2 主要的酶反应

抗氧化防御系统由抗氧化物质、抗氧化酶及非酶抗氧化蛋白等组成,其中抗氧化酶系统是体内抗氧化防御系统的主要方式,机体内抵抗氧化应激主要由抗氧化酶反应完成。抗氧化酶主要包括 SOD、CAT、GSH-Px、谷胱甘肽还原酶 (GR)、谷胱甘肽转硫酶 (GST) 及溶菌酶 (lysozyme) 等。除谷胱甘肽酶系统之外,细胞体内还存在经典的 Fenton 反应酶系统,ROS 在体内的一个主要存在形式是 H_2O_2 ,而 H_2O_2 极易透过细胞膜与细胞内的铁离子 (Fe^{2+}) 通过 Fenton 反应产生活性更高的羟自由基 ($\cdot\text{OH}$), 损害细胞和组织结构^[67]。

抗氧化酶控制着 ROS 含量和抗氧化防御系统的能力,抗氧化酶的作用是抑制活性氧自由基的活性。细胞外低分子量的抗氧化分子 (如抗坏血酸盐、尿酸等) 也能清除一部分自由基和 ROS。有机磷酸酯类化合物能够经机体内的细胞色素 P450 酶代谢系统引起过氧化反应^[33]。此外,很多化学药品如一些神经性药品 (安非他命),在一定浓度下 ($5\ 000\ \text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$) 的就能使双壳类动物 (斑马贻贝) 的呼吸酶系统失衡,使 ROS 过度累积,造成氧化损伤^[68]。

4 基于细胞模型的氧化损伤检测方法

氧化损伤的检测方法包括化学检测法、活体生物模型检测法和离体细胞模型法^[69]。化学检测法是检测机体内含氧自由基的氧化能力。这种方法简单、直接,但不能真实地反映机体内复杂的生理环境和代谢变化,更无法准确地定位氧化和抗氧化反应发生的具体部位 (组织、器官)。活体生物模型检测法应用比较常见,常用水生生物类、小鼠等作为模型生物,来研究环境污染物对生物体的氧化损伤^[25]。但活体生物的实验周期长,成本高,涉及生物体多种代谢途径,难以明确显示环境污染物对分子水平上的氧化应激效应。细胞模型法是以生物体细胞为模型,通过暴露化合物使化合物与细胞内的载体或酶等生物大分子相互作用,环境化合物能够致使细胞发生改变,通过监测细胞生理指标的变化,就能够反映环境污染物对细胞的氧化损伤程度,评价环境污染物的危害程度。细胞模型法在一定程度上能够模拟氧化应激发生的全过程,展示环境污染物导致氧化应激发生的机理,因此越来越多的检测方法也基于细胞模型得以建立。

由于细胞受 ROS 的损伤的机制比较复杂,使得研究者们从不同角度、不同的分子水平上构建适合于研究氧化应激效应的细胞模型,并建立和完善氧化损伤的检测指标与监测手段。自发现“氧化应激是许多环境污染物的致毒机制”以来,人们就开始着手将氧化压力作为生物标记物来探寻氧化损伤机制。起初,环境检测者通过分析生物体细胞内的抗氧化酶活性和抗氧化物质的含量就能够预测有机体的抗氧化状态,并将抗氧化酶(物质)作为判断机体受到氧化应激的生物标志物。但由于机体内抗氧化防御系统的变化情况与化学物质的种类、个体的敏感性、环境污染物等多种因素密切相关,因此需要建立一个完整的检测体系。

4.1 氧化应激研究的细胞模型

细胞模型的建立是氧化应激研究的关键所在。通常根据环境污染物的种类、具体研究的氧化应激通路及酶反应的不同,选择不同的细胞作为模型。模型细胞的选择要以合适的生物体细胞为靶点,以便更准确地反映环境污染物的危害性。细胞的结构、生长周期、生长条件、对化合物的敏感性等均是细胞实验的重要因素。选取的细胞必须具有结构的完整性和对氧化应激反应的敏感性。细胞株的选择还取决于化合物的作用机理及其作用靶位,通常根据化合物的作用部位,选择动、植物相应部位的组织或者胚胎细胞,以更准确地模拟化合物对机体靶位的效应。例如大鼠嗜铬细胞瘤细胞系 PC12 能够生长分化出类似神经元细胞的突触,具有神经元的基本生物学特性,而由含氧自由基引起的中枢神经退行性疾病(如帕金森病、阿尔茨海默病)正好需要 PC12 这类细胞的生物学特性,故在评价潜在的具有神经毒性的环境污染物时,常选用 PC12 来构建细胞氧化损伤模型。临床观察和动物实验中,含氧自由基的大量累积,会造成心肌细胞凋亡^[70-71],因此,在很多污染物毒性试验中,常选用大鼠心肌细胞(H9c2)作为模型细胞株。

4.2 环境污染物的氧化应激作用

外源化合物进入生物体内后,其产生或消除含氧自由基的能力是评价环境污染物致氧化应激能力的重要指标。很多环境污染物对脂类、蛋白质、糖类等具有很强的氧化性,可以通过检测其代谢产物含量的变化及氧化能力评价环境污染物的氧化损伤作用。

研究表明,一些具有氧化还原特性的环境污染物,如过渡金属类、染料、苯醌、二砷啉除草剂和含硝

基的芳香族化合物,是导致生物体产生过量 ROS 的重要因子。这些物质能够催化或者参与生物体内一些氧化还原反应,对生物体造成严重的氧化损伤^[9-12]。但很多环境污染物不能被简单地定义为氧化剂或者还原剂,但可以通过不同的方式产生或者消除 ROS。常见的多环芳烃类污染物、重金属类化合物、消毒副产物类等均能导致生物体内 ROS 含量升高,引起氧化应激^[13, 72]。研究证明,酚类化合物是一类能够清除 ROS 的重要化合物,它们可以显著减缓脂质的过氧化反应,增加 GSH 的含量,降低氧化损伤^[48]。其他物质,如内分泌干扰物类,它们在结构上与天然激素相似,能够模仿或抑制生物体内激素的作用,或者干扰其合成与代谢,能够干扰氧化应激的相关信号通路及酶反应,从而对细胞造成氧化损伤^[73]。有机磷酸酯类化合物能够经细胞色素 P450 系统代谢引起细胞毒性^[49]。GSH、GSH-Px、类谷胱甘肽过氧化氢酶类(含硒、碘等元素)硫氧还原蛋白能够有效地清除活性氧成分,防止 DNA 损伤^[74]。陈立立等^[75]以甲状腺激素(T3)作为暴露化合物,不仅证明了 T3 是胰岛 β 细胞存活和抗凋亡的保护因子,还证实了其可以诱导细胞内抗氧化的相关基因(*PI3K*、*Nrf2*、*NQO*)的表达,提高抗氧化酶的活性,降低 ROS 水平,防御细胞内的氧化损伤,增加细胞的存活率。越来越多证据表明,VA、VC、VE、异黄酮、硫辛酸等被用作抗氧化的物质,在低剂量使用条件下能够表现出抗氧化作用^[76]。研究表明,促红细胞生成素可以抑制 caspase-3 的活性,低剂量(1 国际单位/毫升)的促红细胞生成素可以显著增加细胞对抗 ROS 的能力,减少炎症细胞因子和肿瘤坏死因子- α 的释放,促使氧化损伤的 RPE 细胞恢复形态结构的完整性,阻止氧化剂诱导细胞 DNA 破碎和膜磷脂酰丝氨酸泄露,MDA、脂质过氧化反应的终产物产量下降,细胞内 ROS 水平降低。SOD 与 GSH-Px 水平上升,细胞的总抗氧化能力得以恢复^[77]。一些含硒化合物也被当做含硒酶^[78],用来模拟 GSH-Px 降低过氧化氢的能力,来合成类谷胱甘肽过氧化氢酶的含硒化合物^[79]。miR-99a 是一种非编码的单链小 RNA,参与调节多个信号通路,也是一种抑癌基因^[80],有研究表明,miR-99a 能够增加还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide reduced, NADH)的含量,改善细胞的代谢能力,增强细胞内外 SOD 的表达水平和活性,清除氧自由基^[81]。

4.3 检测方法

氧化应激产生的原因比较复杂,可供检测的能

够反映氧化应激的指标也比较多。氧化应激的监测方法包罗万象,如表 1 所述,检测氧化应激的方法集中在测试实验靶标因自由基引起的氧化损伤及各种氧化压力,除了用于测定因自由基损伤产生的初级和次级产物外,还扩展到细胞水平、蛋白质(酶)水平、转录水平以及基因水平。

4.3.1 酶活性检测

细胞内 SOD、CAT、GSH-Px、GR、GST 等酶的含量和活性是反映氧化损伤最有力的指标,也是检测氧化应激最传统的指标。不论是活体实验还是离体细胞实验,均有利用酶活性检测试剂盒检测提取物中氧化酶/抗氧化酶活性的变化来判断氧化应激是否产生,然后再结合其他环境组学技术进一步检测氧化应激。酶活性检测依然是氧化应激研究最先使用的检测方法,韩飞等^[82]就通过检测 SOD 及 GSH-Px 活性来研究氧化损伤。许多环境污染物暴露细胞后,可以检测到细胞内外 SOD 的活性和含量明显增高,说明这些污染物能够引起细胞内 ROS 水平的增多,造成氧化应激^[81]。

4.3.2 脂质过氧化物检测

脂质过氧化作用的研究比较传统,因自由基引

发组织伤害是研究氧化损伤的一个重要手段。但由于直接分析脂质过氧化作用的产物非常复杂,一般采用测定次级氧化产物(醛类、酮类)含量的方法。应用最多的是用硫代巴比妥酸法测定次级产物丙二醛(MDA)的含量^[83-84],机体内的氧自由基在与抗氧化酶系统反应过程中会与细胞膜不饱和脂肪酸结合发生脂质过氧化反应,产生的脂质过氧化物又会自动生成次级的小分子产物 MDA,在此过程中生成的 MDA 的量与脂质过氧化反应处于一种平衡状态,因而 MDA 通常被作为检测脂质过氧化的合适指标。测定由聚不饱和脂肪酸产生的二烯烃含量^[85]。最新发展起来的有利用色谱分析技术同时监测不同的脂质过氧化作用产物,如利用气相色谱-电子捕捉探测器检测多种不同的降解产物(乙醛、正丁醛、己醛等)^[86]。

4.3.3 蛋白质氧化产物检测

蛋白质(酶)氧化的产物测定方法主要是测定蛋白质的碳酰基衍生物,特别是酪氨酸与苯丙氨酸的氧化产物,酪氨酸会被氧化形成二酪氨酸。有实验证明,二酪氨酸是一种判断氧化应激的很有用的细胞或生物标志物^[87]。很多蛋白质氧化后形成的物质

表 1 常见的氧化应激检测方法

Table 1 The common detection methods of oxidative stress

检测方法 Detection method	原理 Principle	检测指标 Detection index	技术 Assay	特点 Advantage	参考文献 References
酶活性检测 Enzyme activity detection	氧化酶/抗氧化酶系统 Oxidase/Anti-oxidant enzyme system	SOD、CAT、GSH-Px、GR、GST	酶活性试剂盒 Enzyme activity Kit	简单、直观 Simple, intuitive	[89-90]
代谢产物检测 Metabolites detection	脂质、蛋白质等的氧化代谢产物 The oxidation metabolites of lipid, protein, etc	MDA、醛类、酮类等 MDA, aldehyde, ketone, etc	比色法、气相、质谱 Colorimetry, GS, MS	传统、成本小 Traditional, low-cost	[83-84]
蛋白(酶)水平检测 Protein (enzyme) level detection	氧化应激在蛋白水平的损伤、 蛋白酶含量及活性 Oxidative damages in protein level	差异蛋白表达量、 酶活性、酶含量 Protease content, activity, and variation	Western 免疫印记法、 试剂盒 Western blotting, Kit	灵敏度高、 信息量大 High-sensitivity, informative	[37,91-92]
转录水平检测 Transcription level detection	氧化应激的信号通路 Oxidative stress signaling pathways	转录因子、mRNA Transcription factor, mRNA	RT-PCR 法、RNA 测序 RT-PCR, RNA-seq	高通量、灵敏 High-throughput, sensitive	[58,63]
线粒体水平检测 Mitochondrial level detection	线粒体是氧化还原 的主要场所 Mitochondria is the main place of redox reaction	线粒体形态、 线粒体膜电动势 Mitochondria membrane potential, morphology	高内涵、JC-1 试剂盒 High-content screening, JC-1 Kit	新颖、针对性强 Novel, highly-targeted	[42,93]

会被衍生产生 2 种产物： γ -谷氨酰半醛与 2-氨基脂肪半醛，利用高效液相色谱和质谱方法就可以测定这 2 种物质在生物体内的含量^[88]。外源性污染物造成的氧化损伤前后抗氧化酶活性变化是由酶结构(酶结构决定酶活性)和酶含量(机体对抗氧化应激的反馈调节)的变化决定的。因此，只有系统地测定氧化应激过程中酶结构与酶含量的变化才能准确阐明氧化应激过程中抗氧化酶活性变化的机理。氧化损伤涉及多个信号通路，其中信号通路上关键蛋白的表达变化常用作衡量氧化损伤的重要指标，Western 免疫印记法就被用作这些关键蛋白的表达差异分析。

4.3.4 转录水平检测

在转录和基因水平，主要应用各种监测手段检测 ROS 引起的 DNA 损伤，从最基础的分析测试鸟嘌呤核苷·OH 的羟基化作用，以及 DNA 氧化损伤的羟基化产物(胸腺嘧啶乙二醇、胸腺嘧啶脱氧核苷乙二醇)的测定，到分子生物学手段检测特定基因在转录水平含量的变化，以及其表达产物的变化。氧化应激产生涉及多重信号途径的传导，其中引起凋亡途径中的转录因子常被列为必测指标，例如 NF- κ B 和 AP-1 转录因子活性的检测，用 RT-PCR 法扩增特定转录因子，从而在 mRNA 水平上评价氧化损伤。

4.3.5 线粒体膜电动势检测

线粒体损伤也是氧化损伤的一个重要体现，而且线粒体是 ROS 的主要产生部位，大约 4% 的氧气通过线粒体的电子传递链被转换为超氧化物阴离子^[94]。因此，线粒体形态、线粒体膜电动势是检验氧化损伤重要的指标。线粒体膜电动势常用试剂盒 JC-1 进行测试。

氧化损伤的检测方法多种多样，从噻唑蓝(MTT)比色试验测定细胞活力，电子自旋共振法或化学发光法直接检测氧化受损细胞内含氧自由基，硫代巴比妥酸法(TBARS)对脂质过氧化物产物 MDA 的测定^[95]，到彗星试验^[96]检测受氧化损伤的细胞 DNA，RT-PCR 法^[75]检测模型细胞株相关基因及其表达蛋白受氧化损伤前后表达的差异。抗氧化酶类包括 SOD、细胞内锰超氧化物歧化酶(Mn-SOD)，细胞外超氧化物歧化酶(EC-SOD)和总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性、GSH 含量、GSH-Px 和 CAT 活性的检测，二氯荧光素二乙酸酯探针^[97]对细胞内总抗氧化能力水平的测定，细胞形态、数量、凋亡数、

遗传能力以及其他一系列对氧化应激导致细胞凋亡的观察和检测方法等。

5 总结与展望

细胞受 ROS 损伤的机制比较复杂，使得研究者们从不同角度、不同检测层次上构建适合研究氧化应激效应的细胞模型，并建立和完善氧化损伤的检测指标与监测手段，进而客观、可靠、准确地评价环境污染物的毒性作用，为环境污染物的风险评价提供强有力的依据。

现阶段，氧化应激的检测需要应用多种生物标志物共同检测环境污染物对生物体产生的氧化压力，将污染物对生物体的影响与分子水平的损伤有效的结合起来，预测和评价相关污染物对人类和环境产生的影响。未来对于氧化应激的研究，应该根据环境污染物的不同、其触发氧化应激途径的不同、进而导致氧化损伤机制的不同，构建合适的氧化应激损伤细胞模型，建立污染物经不同途径引起氧化损伤的 AOP(Adverse Outcome Pathways)系统网络，将活体生物检测与离体细胞测试结合，并着力解决如何以离体细胞效应反映活体生物效应的问题，从而追本溯源地解释环境污染物的氧化损伤机制，并不断优化检测指标与监测手段。通过离体细胞的损伤效应预测生物体的氧化应激结果，进而客观、可靠、准确地评价各类环境污染物的毒性作用，实现环境污染物致氧化应激过程的监测。

通讯作者简介：马梅(1967-),女,博士,研究员,博士生导师,主要从事水生态毒理学研究。

参考文献(References):

- [1] 杨丽娟, 游育红. 细胞受到氧化应激后损伤的检测方法[J]. 医学综述, 2010, 16(6): 924-927
Yang L J, You Y H. Test method of cell injury induced by oxidative stress [J]. Medical Recapitulate, 2010, 16(6): 924-927 (in Chinese)
- [2] Yoshitaka H, Yoji S, Takuya K, et al. Oxidative stress and central cardiovascular regulation: Pathogenesis of hypertension and therapeutic aspects [J]. Circulation Journal, 2010, 74(5): 827-835
- [3] Thomas A D, John A. Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation [J]. Chemical Research in Toxicology, 1993, 6(1): 2-18
- [4] d'Ischia M, Costantini C, Prota G. Lipofuscin-like pigments by autoxidation of polyunsaturated fatty acids in

- the presence of amine neurotransmitters: The role of malondialdehyde [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1996, 1290(3): 319-326
- [5] Berntssen M H, Aatland A, Handy R D. Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behaviour in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr [J]. *Aquatic Toxicology*, 2003, 65(1): 55-72
- [6] Romeo M, Bennani N, Gnassia-Barelli M, et al. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2000, 48(2): 185-194
- [7] Baker R T M, Martin P, Davies S J. Ingestion of sub-lethal levels of iron sulphate by African catfish affects growth and tissue lipid peroxidation [J]. *Aquatic Toxicology*, 1997, 40(1): 51-61
- [8] Company R, Serafim A, Bebianno M J, et al. Effect of cadmium, copper and mercury on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus* [J]. *Marine Environmental Research*, 2004, 58(2): 377-381
- [9] Thomas P. Effects of Aroclor 1254 and cadmium on reproductive endocrine function and ovarian growth in Atlantic croaker [J]. *Marine Environmental Research*, 1989, 28(1-4): 499-503
- [10] Mitchelmore C L, Birmelin C, Chipman J K, et al. Evidence for cytochrome P-450 catalysis and free radical involvement in the production of DNA strand breaks by benzo [a] pyrene and nitroaromatics in mussel (*Mytilus edulis* L.) digestive gland cells [J]. *Aquatic Toxicology*, 1998, 41(3): 193-212
- [11] Mitchelmore C L, Birmelin C, Livingstone D R, et al. Detection of DNA strand breaks in isolated mussel (*Mytilus edulis* L.) digestive gland cells using the "comet" assay [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1998, 41(1): 51-58
- [12] Mitchelmore C L, Chipman J K, Garcia-Martinez P, et al. Normal status of hepatic 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity, antioxidant enzymes and DNA oxidation in turbot (*Scophthalmus maximus*) and other flatfish species following exposure to nitroaromatic compounds [J]. *Marine Environmental Research*, 1996, 42(1): 329-333
- [13] Kappus H, Sies H. Toxic drug effects associated with oxygen metabolism: Redox cycling and lipid peroxidation [J]. *Experientia*, 1981, 37(12): 1233-1241
- [14] Ross D, Moldeus P. Antioxidant defense systems and oxidative stress [J]. *Membrane Lipid Oxidation*, 1991, 2: 151-170
- [15] Peng X Z, Wang Z D, Yang C, et al. Simultaneous determination of endocrine-disrupting phenols and steroid estrogens in sediment by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1116(1): 51-56
- [16] Kajihara T, Uchino S, Suzuki M, et al. Human chorionic gonadotropin confers resistance to oxidative stress-induced apoptosis in decidualizing human endometrial stromal cells [J]. *Fertility and Sterility*, 2011, 95(4): 1302-1307
- [17] Arnér E S J, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267(20): 6102-6109
- [18] Chae H Z, Kim H J, Kang S W, et al. Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin [J]. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 1999, 45(2-3): 101-112
- [19] Reuter S, Gupta S C, Madan M C, et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2010, 49(11): 1603-1616
- [20] Suzuki Y J, Forman H J, Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1997, 22(1-2): 269-285
- [21] Aruoma O I. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease [J]. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1998, 75(2): 199-212
- [22] Folkes L K, Christlieb M, Madej E, et al. Oxidative metabolism of combretastatin A-1 produces quinone intermediates with the potential to bind to nucleophiles and to enhance oxidative stress via free radicals [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2007, 20(12): 1885-1894
- [23] Valko M, Rhodes C J, Moncol J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2006, 160(1): 1-40
- [24] Upadhyay D, Panduri V, Ghio A, et al. Particulate matter induces alveolar epithelial cell DNA damage and apoptosis: Role of free radicals and the mitochondria [J]. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2003, 29(2): 180-187
- [25] 王丽平, 郑丙辉, 孟伟. 环境污染物对水生生物产生氧化压力的分子生物标志物 [J]. *生态学报*, 2007, 27(1): 380-388
- Wang L P, Zheng B H, Meng W. Molecular biomarkers in aquatic organisms in relation to the oxidative stress imposed by environmental pollutants [J]. *Acta Ecologica*

- Sinca, 2007, 27(1): 380-388 (in Chinese)
- [26] Kandarakis E D, Bourguignon J P, Giudice L C, et al. Endocrine disrupting chemicals: An endocrine society scientific statement [J]. *Endocrine Reviews*, 2009, 30(4): 293-342
- [27] Sies H. Biochemistry of oxidative stress [J]. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1986, 25 (12): 1058-1071
- [28] Schieber M, Chandel N S. ROS function in redox signaling and oxidative stress [J]. *Current Biology*, 2014, 24 (10): R453-R462
- [29] Cairns R A, Harris I S, Mak T W. Regulation of cancer cell metabolism [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2011, 11(2): 85-95
- [30] 许民辉, 姜德福. 自由基与脑水肿[J]. *中国急救医学*, 1988, 8(6): 36-39
- [31] Kim D B, Shin G H, Kim J M, et al. Antioxidant and anti-ageing activities of citrus-based juice mixture [J]. *Food Chemistry*, 2016, 194: 920-927
- [32] 李鹏, 尹雅玲, 张玉林, 等. 有机磷酸酯类化合物对机体的影响[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(31): 13492-19493, 13501
- Li P, Yin Y L, Zhang Y L, et al. Effects of organophosphate compounds on the organism [J]. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 2008, 36(31): 13492-19493, 13501 (in Chinese)
- [33] Zha X, Wu G, Zhao X, et al. PRDX6 protects ARPE-19 cells from oxidative damage via PI3K/AKT signaling [J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2015, 36(6): 2217-2228
- [34] Shanlin F U, Stocker R, Davies M J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation [J]. *Biochemical Journal*, 1997, 324(1): 1-18
- [35] Berlett B S, Stadtman E R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(33): 20313-20316
- [36] Goto S, Nakamura A. Age-associated, oxidatively modified proteins: A critical evaluation [J]. *Age*, 1997, 20(2): 81-89
- [37] Davies M J, Fu S, Wang H, et al. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, 27(11): 1151-1163
- [38] Dukan S, Farewell A, Ballesteros M, et al. Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97(11): 5746-5749
- [39] Guy J, Cheval H, Selfridge J, et al. The role of MeCP2 in the brain [J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2011, 27(1): 631-652
- [40] Cervellati C, Sticozzi C, Romani A, et al. Impaired enzymatic defensive activity, mitochondrial dysfunction and proteasome activation are involved in RTT cell oxidative damage [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2015, 1852(10): 2066-2074
- [41] Chan D C. Mitochondria: Dynamic organelles in disease, aging, and development [J]. *Cell*, 2006, 125 (7): 1241-1252
- [42] Suski J M, Lebiezinska M, Bonora M, et al. Relation between mitochondrial membrane potential and ROS formation [J]. *Mitochondrial Bioenergetics: Methods and Protocols*, 2012, 810: 183-205
- [43] Scherz-Shouval R, Elazar Z. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy [J]. *Trends in Cell Biology*, 2007, 17(9): 422-427
- [44] Foster K A, Galeffi F, Gerich F J, et al. Optical and pharmacological tools to investigate the role of mitochondria during oxidative stress and neurodegeneration [J]. *Progress in Neurobiology*, 2006, 79(3): 136-171
- [45] Halliwell B, Aruoma O I. DNA damage by oxygen-derived species its mechanism and measurement in mammalian systems [J]. *FEBS Letters*, 1991, 281(1-2): 9-19
- [46] Breen A P, Murphy J A. Reactions of oxyl radicals with DNA [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1995, 18 (6): 1033-1077
- [47] Dizdaroglu M. Chemistry of free radical damage to DNA and nucleoproteins [M]// US EPA. DNA and Free Radicals. 1993: 19-39
- [48] Lima C F, Fernandes F, Pereira-Wilson C. Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: Relevance of glutathione levels [J]. *Life Science*, 2006, 79(21): 2056-2068
- [49] An J, Hu J W, Shang Y, et al. The cytotoxicity of organophosphate flame retardants on HepG2, A549 and Caco-2 cells [J]. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 2016, 51(11): 1-9
- [50] Bolognesi C, Landini E, Roggeri P, et al. Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: Experimental studies [J]. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 1999, 33(4): 287-292
- [51] Jin X, Su R, Li R, et al. Amelioration of particulate matter-induced oxidative damage by vitamin C and quercetin

- in human bronchial epithelial cells [J]. *Chemosphere*, 2015, 144: 459-466
- [52] Puglia C, Offerta A, Saija A, et al. Protective effect of red orange extract supplementation against UV-induced skin damages: Photoaging and solar lentigines[J]. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2014, 13(2): 151-157
- [53] Rittié L, Fisher G J. UV-light-induced signal cascades and skin aging [J]. *Ageing Research Reviews*, 2002, 1(4): 705-720
- [54] Zou M H, Kirkpatrick S S, Davis B J, et al. Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin *in vivo*: Role of mitochondrial reactive nitrogen species [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(42): 43940-43951
- [55] Itoh K, Chiba T, Takahashi S, et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 236(2): 313-322
- [56] Ishii T, Itoh K, Takahashi S, et al. Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(21): 16023-16029
- [57] Dickinson D A, Levonen A I F-M D R, Moellering Dr F-A E K, et al. Human glutamate cysteine ligase gene regulation through the electrophile response element [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2004, 37(8): 1152-1159
- [58] Huang H C, Hong L, Chang P, et al. Chitoooligosaccharides attenuate Cu²⁺-induced cellular oxidative damage and cell apoptosis involving Nrf2 activation [J]. *Neurotox Research*, 2015, 27(4): 411-420
- [59] Krasilnikov M A. Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: The role in control of cell growth, survival, and malignant transformation [J]. *Biochemistry*, 2000, 3: 10-12
- [60] Xu Y Y, Zhang I, Yu S, et al. The protective effects of chitoooligosaccharides against glucose deprivation-induced cell apoptosis in cultured cortical neurons through activation of PI3K/Akt and MEK/ERK1/2 pathways [J]. *Brain Research*, 2011, 1375(23): 49-58
- [61] Sakon S, Xue X, Takekawa M, et al. NF-κB inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death [J]. *The EMBO Journal*, 2003, 22(15): 3898-3909
- [62] Ghosh S, Baltimore D. Activation *in vitro* of NF-κB by phosphorylation of its inhibitor IκB [J]. *Nature*, 1990, 344(12): 678 - 682
- [63] Assar M E, Fau-Rodriguez-Manas L A J, Rodriguez-Manas L. Oxidative stress and vascular inflammation in aging [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2013, 65: 380-401
- [64] Cao Y J, Zhang Y M, Qi J P, et al. Ferulic acid inhibits H₂O₂-induced oxidative stress and inflammation in rat vascular smooth muscle cells via inhibition of the NADPH oxidase and NF-κB pathway [J]. *International Immunopharmacol*, 2015, 28(2): 1018-1025
- [65] Siebels I, Drose S. Q-site inhibitor induced ROS production of mitochondrial complex II is attenuated by TCA cycle dicarboxylates [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2013, 1827(10): 1156-1164
- [66] Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: A review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling [J]. *Circulation Research*, 2000, 87(3): 179-183
- [67] Liu H T, He J L, Li W M, et al. Chitosan oligosaccharides protect human umbilical vein endothelial cells from hydrogen peroxide-induced apoptosis [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2010, 80(4): 1062-1071
- [68] Parolini M, Magni S, Castiglioni S, et al. Amphetamine exposure imbalanced antioxidant activity in the bivalve *Dreissena polymorpha* causing oxidative and genetic damage [J]. *Chemosphere*, 2015, 144: 207-213
- [69] 刘微微, 任红, 曹学丽. 天然产物抗氧化活性体外评价方法研究进展 [J]. *食品科学*, 2010, 31(17): 415-419
- Liu W W, Ren H, Cao X L. Progress in evaluation techniques for antioxidant activity of natural products *in vitro* [J]. *Food Science*, 2010, 31(17): 415-419 (in Chinese)
- [70] Bliss C I. The toxicity of poisons applied jointly [J]. *Annals of Applied Biology*, 1939, 26(3): 585-615
- [71] Lounsbury K M, Hu Q H, Ziegelstein R C. Calcium signaling and oxidant stress in the vasculature [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000, 28(9): 1362-1369
- [72] Regoli F, Winston G W, Gorbi S, et al. Integrating enzymatic responses to organic chemical exposure with total oxyradical absorbing capacity and DNA damage in the European eel *Anguilla anguilla* [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2003, 22(9): 2120-2129
- [73] Sonnenschein C, Soto A M. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists [J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1998, 65(1): 143-150
- [74] Bhowmick D, Srivastava S, D' Silva P, et al. Highly effi-

- cient glutathione peroxidase and peroxiredoxin mimetics protect mammalian cells against oxidative damage[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2015, 54(29): 8449-8453
- [75] 陈立立, 唐雪, 徐圆媛, 等. 甲状腺素对 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用[J]. *食品与生物技术学报*, 2014, 33(9): 935-940
Chen L L, Tang X, Xu Y Y, et al. Protective effect of thyroid hormone on oxidative damage in HepG2 cell [J]. *Journal of Science and Biotechnology*, 2014, 33(9): 935-940 (in Chinese)
- [76] 陈伟, 林映才, 马现永. 一些抗氧化剂的抗/促氧化作用及其机制[J]. *动物营养学报*, 2012, 24(4): 595-605
Chen W, Lin Y C, Ma X Y. The mechanisms and effects of some antioxidants [J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2012, 24(4): 595-605 (in Chinese)
- [77] Wang Z Y, Shen L J, Tu L, et al. Erythropoietin protects retinal pigment epithelial cells from oxidative damage[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2009, 46(8): 1032-1041
- [78] Muges G, Singh H B. Synthetic organoselenium compounds as antioxidants: Glutathione peroxidase activity [J]. *Chemical Society Reviews*, 2000, 29(5): 347-357
- [79] Bhabak K P, Muges G. Functional mimics of glutathione peroxidase: Bioinspired synthetic antioxidants [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2010, 43(11): 1408-1419
- [80] Lerman G, Avivi C F-M C, Mardoukh C F - B A, et al. miRNA expression in psoriatic skin: Reciprocal regulation of HSA-miR-99a and IGF-1R [J]. *PloS One*, 2011, 6(6): e20916
- [81] 陶真, 王荣亮, 赵海萍. miRNA-99a 对过氧化氢诱导 neuro-2a 细胞氧化损伤的影响[J]. *首都医科大学学报*, 2014, 35(3): 304-309
Tao Z, Wang R L, Zhao H P. Effects of microRNA-99a on Neuro-2a cells against oxidative injury induced by hydrogen peroxide [J]. *Journal of Capital Medical University*, 2014, 35(3): 304-309 (in Chinese)
- [82] 韩飞, 周孟良. 过氧化氢诱导 HepG2 细胞产生氧化应激细胞模型的建立[J]. *食品科学*, 2011, 32(5): 55-57
Han F, Zhou M L. An experimental HepG2 cell model of hydrogen peroxide induced DNA oxidative injury [J]. *Food Science*, 2011, 32(5): 55-57 (in Chinese)
- [83] Draper H H, Squires E J, Mahmoodi H, et al. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1993, 15(4): 353-363
- [84] Janero D R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 1990, 9(6): 515-540
- [85] Gutteridge J M. Aspects to consider when detecting and measuring lipid peroxidation [J]. *Free Radical Research Communications*, 1986, 1(3): 173-184
- [86] De Zwart L, Venhorst J, Groot M, et al. Simultaneous determination of eight lipid peroxidation degradation products in urine of rats treated with carbon tetrachloride using gas chromatography with electron-capture detection [J]. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1997, 694(2): 277-287
- [87] Véronique W S, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia [J]. *Kidney International*, 1996, 49(5): 1304-1313
- [88] Daneshvar B, Frandsen H, Autrupand H, et al. γ -Glutamyl semialdehyde and 2-amino-adipic semialdehyde: Biomarkers of oxidative damage to proteins [J]. *Biomarkers*, 1997, 2(2): 117-123
- [89] Zini A, Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: Levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa [J]. *International Journal of Andrology*, 1993, 16(3): 183-188
- [90] Tanaka H, Okada T, Konishi H, et al. The effect of reactive oxygen species on the biosynthesis of collagen and glycosaminoglycans in cultured human dermal fibroblasts [J]. *Archives of Dermatological Research*, 1993, 285(6): 352-355
- [91] Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species [J]. *International Microbiology*, 2010, 3(1): 3-8
- [92] Cabiscol E, Piulats E, Echave P, et al. Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(35): 27393-27398
- [93] Sun W H, Liu F, Chen Y, et al. Hydrogen sulfide decreases the levels of ROS by inhibiting mitochondrial complex IV and increasing SOD activities in cardiomyocytes under ischemia/reperfusion[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 421(2): 164-169
- [94] Wallace D C. Mitochondrial genetics: A paradigm for aging and degenerative diseases? [J]. *Science*, 1992, 256(5057): 628-632

- [95] 李建武, 吴中立. 硫代巴比妥酸荧光法测定血清及组织脂质过氧化物[J]. 第二军医大学学报, 1987, 8(5): 371-373
- [96] 崔琳, 高维奇. 单细胞凝胶电泳在检测晶状体上皮细胞 DNA 氧化损伤中的应用[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2007, 11(1): 187-189
Cui L, Gao W Q. Application of single cell gel electrophoresis in the detection of DNA oxidative damage in lens epithelial cells [J]. Journal of Harbin Medical University, 2007, 11(1): 187-189 (in Chinese)
- [97] Rastogi R P, Singh S P, Häder D P, et al. Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidant-sensing probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937 [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010, 397(3): 603-607 ◆