

β -拉帕醌通过下调过氧化物酶V诱导 SW480结肠癌细胞凋亡

刘悦[#] 焦冰洋[#] 于楠楠 王闯 韩英浩 金成浩 孙虎男*

(黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 大庆 163319)

摘要 过氧化物酶V(peroxiredoxin V, Prx V)是过氧化物酶(peroxiredoxin)家族中的一员,广泛存在于线粒体、溶酶体及细胞质中,具有有效地清除细胞内一氧化氮(nitric oxide, NO)和活性氧(reactive oxygen species, ROS)的功能。该文阐明 β -拉帕醌(β -lapachone)引起SW480结肠癌细胞凋亡过程中Prx V的作用及其机制。该研究利用 β -拉帕醌处理SW480细胞系,通过3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐[3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT]法、荧光显微镜照相、流式细胞术、蛋白质免疫印迹分析等方法检测细胞存活率、细胞内ROS水平、细胞凋亡情况以及凋亡相关蛋白质水平的变化。结果表明, β -拉帕醌通过抑制Prx V水平,致使细胞内ROS水平升高,激活线粒体依赖性凋亡途径,导致SW480结肠癌细胞凋亡。研究结果初步揭示了 β -拉帕醌诱发SW480结肠癌细胞发生凋亡的机制,为结肠癌的治疗提供了新思路。

关键词 过氧化物酶V; 活性氧; 细胞凋亡; β -拉帕醌

β -lapachone Induced the Apoptosis of SW480 Colorectal Cancer Cell through Down-Regulation of the Peroxiredoxin V Expression

Liu Yue[#], Jiao Bingyang[#], Yu Nannan, Wang Chuang, Han Yinghao, Jin Chenghao, Sun Hunan*

(College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 1633419, China)

Abstract Peroxiredoxin V (Prx V) is a thioredoxin peroxidase included in peroxiredoxins family, which is highly expressed in mitochondria, lysosomes and cytosols, and exhibits as scavengers for nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS). This study is aimed to explore the regulatory effect of Prx V on β -lapachone induced apoptosis of SW480 colorectal cell. To examine the SW480 cell viability, cellular ROS levels, apoptosis and the proteins levels, the MTT assay, fluorescence microscopy, flow cytometry and Western blot assay were performed. The results showed that β -lapachone treatments could decrease the Prx V protein level, which in turn increased the cellular ROS levels, then eventually activated the mitochondria signaling, and resulted in inducing the SW480 cell apoptosis. Our findings present a new therapeutic strategy for colorectal cancer.

Keywords peroxiredoxin V (Prx V); reactive oxygen species (ROS); apoptosis; β -lapachone

收稿日期: 2016-07-22 接受日期: 2016-11-14

黑龙江八一农垦大学大学生创新创业训练项目(批准号: XC2015049)和黑龙江省大学生创新创业训练项目(批准号: 201610223035)资助的课题

[#]共同第一作者

*通讯作者。Tel: 18745968262, E-mail: sunmkbb@qq.com

Received: July 22, 2016 Accepted: November 14, 2016

This work was supported by the Training Programs of Innovation and Entrepreneurship for Undergraduates of Heilongjiang Bayi Agricultural University (Grant No. XC2015049) and Training Programs of Innovation and Entrepreneurship for Undergraduates of Heilongjiang Province (Grant No. 201610223035)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-18745968262, E-mail: sunmkbb@qq.com

网络出版时间: 2016-12-19 16:09:40

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20161219.1609.006.html>

结肠癌是一种在全世界都常见的癌症,同时也是致死率很高的癌症。目前为止,结肠癌的治疗大多数采用手术的方法,对于无法手术的则采用化疗和放疗。由于化疗高抗药性的产生、放疗的高副作用、治疗经费高昂等原因,结肠癌的治疗还需探讨新的治疗理念和治疗方法。有大量的研究表明,活性氧(reactive oxygen species, ROS)在多种癌症的研究中都发挥着极为重要的作用,参与细胞增殖相关信号通路的调节,细胞凋亡与衰老等^[1]。细胞内过高的ROS水平会导致氧化应激反应,诱导细胞发生凋亡^[2]。ROS的升高使线粒体膜通透性改变,释放细胞色素c,激活胱天冬酶(caspase)信号通路,促使细胞发生凋亡。因此,利用一些可提高细胞内ROS的药物进行治疗是一个行之有效的癌症治疗方法。目前有研究表明,一些药物能够通过提高细胞内ROS水平达到杀死癌细胞的目的^[3-8]。 β -拉帕醌(β -lapachone)是一种醌类天然提取物,生物学活性较为广泛,不仅能够抑制癌细胞的活性,还可以通过ROS生成途径诱导乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌等多种癌细胞发生凋亡^[9-10]。

细胞中的过氧化物酶(peroxidoxin, Prx)是一类具有清除细胞内ROS能力的蛋白质,在过氧化解毒反应中起着至关重要的作用^[11-13]。Prx V是Prx家族中的一员,具有清除细胞内ROS和过氧亚硝酸盐的作用^[14-15]。我们前期的研究结果显示,用一氧化氮(nitric oxide, NO)供体硝普化钠(sodium nitroprusside dihydrate, SNP)和脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)处理BV2神经小胶质细胞引起Prx V蛋白质水平上升,与细胞内ROS水平的升高有关^[16],并且还证明了Prx V在NO诱导的小鼠海马神经细胞HT22凋亡过程中也具有保护作用^[19]。另有研究显示,在P53诱导的细胞凋亡中Prx V具有显著的保护作用^[17],且重组Prx V也能够保护由氧化应激引起的细胞凋亡^[18]。但是,Prx V在ROS诱导的结肠癌细胞凋亡过程中的作用机制尚不明确。

因此,本研究利用 β -lapachone处理SW480结肠癌细胞,初步探讨 β -拉帕醌引起SW480细胞凋亡过程中Prx V的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

β -拉帕醌购自Selleck公司; SW480结肠癌细胞来自黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院分子药

理与药效学研究实验室。

1.2 试剂与仪器

DMEM/高糖培养基购自美国Hyclone公司; 胎牛血清购自美国Gibco公司; 抗mouse anti-Bcl2、Bad、caspase-3、Prx V、Prx II、 α -tubulin单克隆抗体购自美国Santa Cruz公司; Annexin-V-FITC和CM-H2DCFDA购自英国Invitrogen公司; ROS清除剂N-乙酰半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine, NAC)购自美国Sigma公司。

6孔细胞培养皿和96孔细胞培养皿购自美国Costar公司; 流式细胞仪(BD, FACS Calibur)、蛋白质免疫印迹系统购自美国Amersham Bioscience公司。

1.3 细胞培养

SW480细胞培养于DMEM培养基中,内含10%的灭活新生胎牛血清(FBS)及100 U/mL青霉素/链霉素(Penicillin/Streptomycin, P/S),置于37 °C、5% CO₂及饱和湿度的培养箱中培养。

1.4 MTT法检测

将SW480细胞接种于96孔细胞培养板,细胞浓度为 1×10^5 /mL,培养22 h后用含1%的灭活新生胎牛血清(FBS)及100 U/mL青霉素/链霉素(Penicillin/Streptomycin, P/S)的培养液进行饥饿处理2 h随后加入 β -拉帕醌处理,分别为对照组(DMSO组)和处理组(0.10、0.25、0.50、1.00、2.50、5.00、10.00 μ mol/L β -拉帕醌组),继续孵育24 h,加入10 μ L MTT溶液孵育4 h,去液体,每孔加入100 μ L DMSO摇匀10 min,检测在570 nm处的吸光度值,筛选合适浓度。每组实验均做3次重复。

1.5 细胞凋亡和ROS的检测

通过流式细胞术分析了SW480细胞凋亡和细胞内ROS水平。

1.5.1 细胞凋亡检测 收集对照组(DMSO组)和处理组(2、4、6 μ mol/L β -拉帕醌组)细胞,重悬于结合缓冲液中,加荧光标记的Annexin-V-FITC(Invitrogen公司)10 μ mol/L,在室温避光条件下孵育10 min。随即用流式细胞仪分析10 000个细胞,统计结果得到细胞凋亡柱形图。另外,在6孔细胞培养板去掉原有液体加入结合缓冲液,加荧光标记的Annexin-V-FITC(Invitrogen公司)10 μ mol/L于37 °C培养箱避光孵育10 min,利用荧光显微镜分别检测白光、红光、绿光以及红光与绿光的叠加条件下的荧光照片。每组实验均做3次重复。

1.5.2 细胞ROS水平检测 除去原有液体,用PBS清洗1遍,加入10 mmol/L的CM-H2DCFDA(Invitrogen公司),在37 °C细胞培养箱中孵化10 min,利用荧光显微镜分别检测白光、绿光条件下的荧光照片。每组实验均做3次重复。

1.5.3 利用ROS清除剂 NAC(5 mmol/L)预处理30 min后,收集对照组(DMSO组)和处理组[5 mmol/L NAC+4 μ mol/L β -拉帕醌(NAC+ β -lapachone组)、4 μ mol/L β -拉帕醌(β -lapachone组)]细胞,分别通过流式细胞术与荧光显微镜检测细胞凋亡与细胞内ROS水平变化。

1.6 蛋白质印迹法分析

分别收集处理后的细胞样品,其中, β -拉帕醌(0、2、4 mol/L)处理24 h,4 mol/L β -拉帕醌处理不同时间(0、3、6、9、12 h),用以检测Prx V水平变化的时间浓度依赖性,4 mol/L β -拉帕醌处理不同时间(0、3、6、9、12 h)用以检测凋亡相关蛋白质的变化。加入蛋白质裂液裂解,12 000 r/min,4 °C离心回收上清,即蛋白质。25 μ g细胞总蛋白质提取物进行12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE),蛋白质转移到硝酸纤维素膜(美国Millipore公司),封闭,鼠抗-Bcl2、Bad、caspase-3、Prx V、Prx II、 α -tubulin单克隆抗体4 °C孵育过夜。用TBST[含有15 mmol/L的NaCl(Tris-HCL, TBS)、0.2% Tween-20、10 mmol/L的Tris-HCl]洗涤5次,每次5 min,与HRP标记的鼠二抗(1:5 000)孵育2 h,洗膜、ECL底物孵育、曝光、显影、定影及结果分析。每组实验均做3次重复。

1.7 统计学分析

所有结果以均值 \pm 标准差表示,两组间比较用*t*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。每组实验均至少重复3次。

2 结果

2.1 β -拉帕醌诱导SW480结肠癌细胞凋亡

利用MTT法检测 β -拉帕醌对SW480细胞存活率的影响,发现随着 β -拉帕醌浓度的增加,SW480细胞存活率明显降低(图1A)。为了明确 β -拉帕醌是否引起细胞内ROS水平的上升,我们利用ROS标记试剂CM-H2 DCFDA进行标记,通过荧光显微镜照相

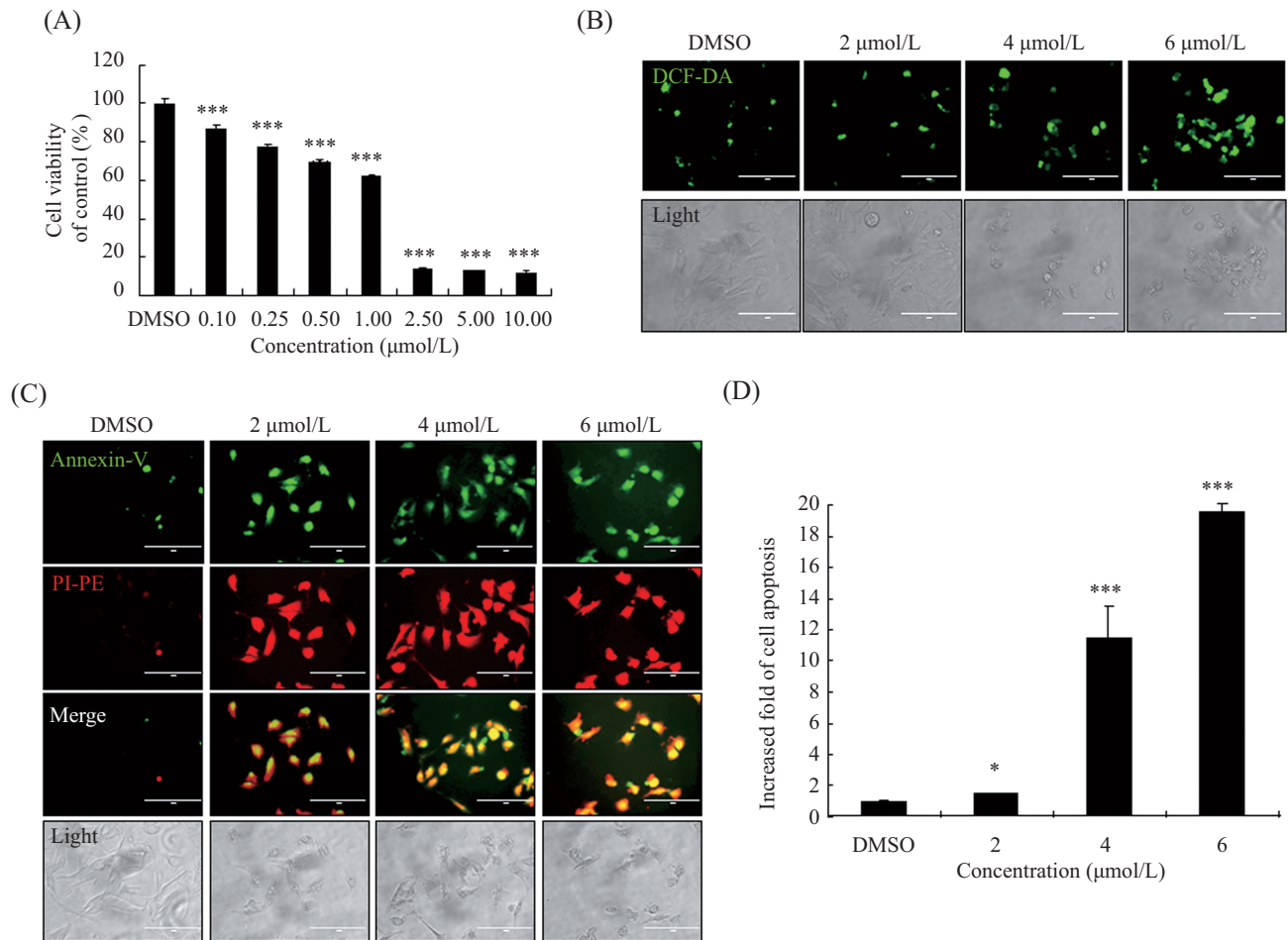
的方法分别检测了 β -拉帕醌(0、2、4、6 mol/L)处理24 h后SW480细胞内ROS水平的变化。结果显示,随着药物浓度的增加,细胞内ROS水平随之升高(图1B)。同时,利用不同浓度(0、2、4、6 mol/L)的 β -拉帕醌处理SW480细胞24 h,用Annexin-V-FITC和PI-PE进行标记,利用荧光显微镜和流式细胞术检测细胞凋亡情况。结果显示,随着 β -拉帕醌浓度的增加,SW480细胞凋亡率也明显的升高(图1C和图1D)。这一结果证明, β -拉帕醌能升高细胞内ROS水平,并诱导SW480细胞发生凋亡。

2.2 β -拉帕醌诱导SW480结肠癌细胞凋亡过程中对ROS水平的影响

为了确定 β -拉帕醌诱导细胞发生凋亡是否与细胞内ROS水平的升高相关,我们利用ROS清除剂NAC(5 mmol/L)预处理细胞30 min后,收集对照组(DMSO)和处理组(4 μ mol/L β -拉帕醌+5 mmol/L NAC和4 μ mol/L β -拉帕醌)细胞,分别通过流式细胞术与荧光显微镜检测细胞凋亡与细胞内ROS水平的变化。结果显示,加入了NAC之后细胞内ROS水平明显下降(图2A),同时细胞凋亡的比率也明显地受到了抑制(图2B和图2C)。图2C为通过流式细胞术检测Annexin-V-FITC单染的细胞凋亡情况。这一结果证明, β -拉帕醌诱导SW480细胞发生凋亡与细胞内ROS水平上升密切相关。

2.3 β -拉帕醌对凋亡相关蛋白质及Prx V蛋白质水平的影响

Prx V作为Prx家族的一员,在细胞中具有清除ROS的功能。为了检测 β -拉帕醌诱导的SW480细胞凋亡过程中Prx V蛋白质水平变化,用不同浓度的 β -拉帕醌(0、2、4 μ mol/L)处理SW480细胞24 h,检测细胞内Prx V蛋白质水平变化(图3A)。结果显示,随着处理浓度的增加,细胞内Prx V蛋白质水平显著下降。其次,用4 μ mol/L的 β -拉帕醌处理细胞不同时间(0、3、6、9、12 h),发现随着时间的推移,Prx V蛋白质水平显著降低,而同一家族的Prx II并没有发生变化。另外,为了检测 β -拉帕醌诱导SW480细胞凋亡途径,我们检测了 β -拉帕醌(4 μ mol/L)处理SW480细胞不同时间段的凋亡相关蛋白质水平的变化(图3C)。结果表明,抗凋亡蛋白Bcl2水平降低,而促凋亡蛋白Bad水平显著升高,同时前胱冬肽酶-3(pro-caspase-3)水平明显下降。



A: MTT法检测 β -拉帕醌对SW480细胞活力的影响; B: β -拉帕醌对SW480细胞内ROS水平的影响(荧光显微镜照片); C: β -拉帕醌对SW480细胞凋亡的影响, 绿光为Annexin-V-FITC染色, 红光为PI染色, Merge为红光与绿光重叠, Light为白光下的细胞状态, 标尺=100 μm ; D: 通过流式细胞术检测细胞凋亡情况后的半定量分析, 结果以均值 \pm 标准差表示, $n=3$ 。* $P<0.05$, *** $P<0.001$, 与DMSO组比较。

A: effect of β -lapachone on SW480 cell viability by MTT assay; B: effect of β -lapachone on SW480 cellular ROS levels (fluorescence microscope images); C: effect of β -lapachone on SW480 cell apoptosis. Annexin-V-FITC (green), PI-PE (red), Merge (yellow) and light images were measured by fluorescence microscope, scale bars=100 μm ; D: increased fold of cell apoptosis was represented by the mean \pm S.D. ($n=3$). * $P<0.05$, *** $P<0.001$ vs DMSO group.

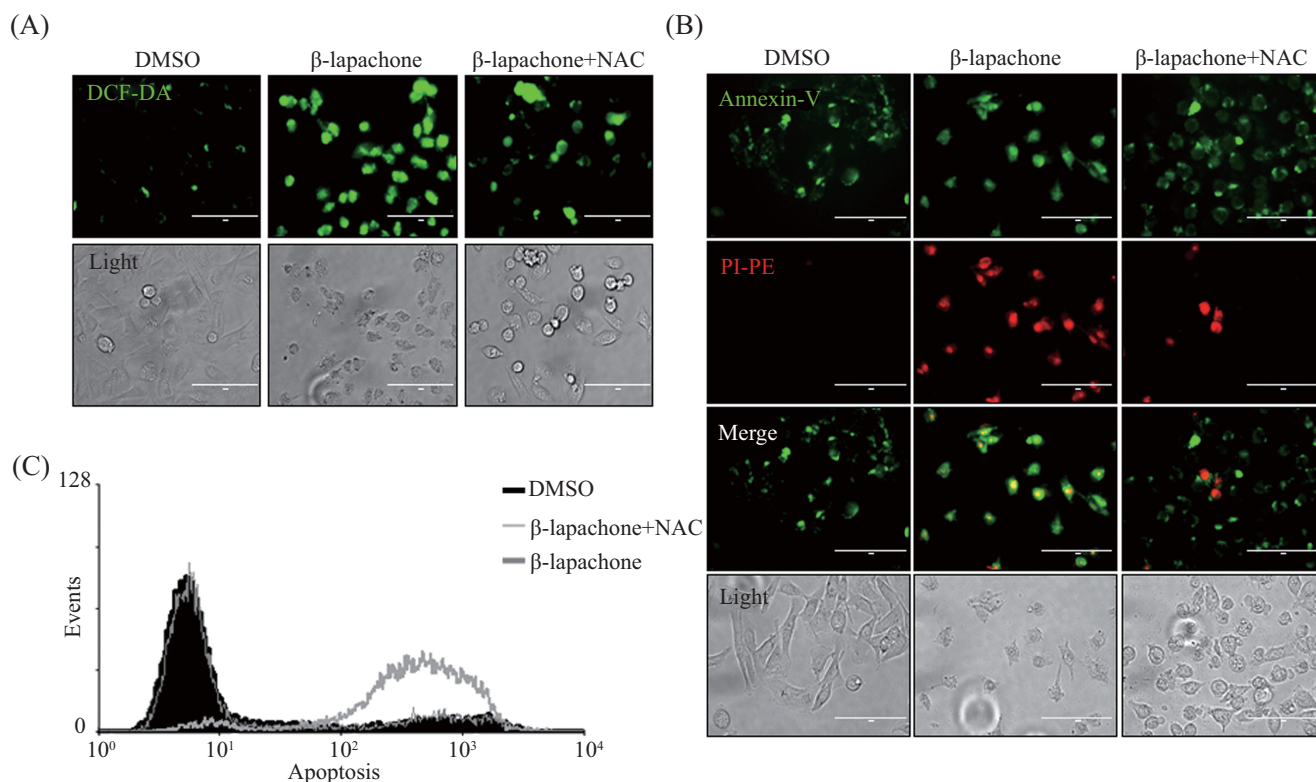
图1 β -拉帕醌诱导SW480细胞凋亡
Fig.1 β -lapachone induced SW480 cells apoptosis

3 讨论

结肠癌具有非常高的致死率, 其放疗的治愈率并不是特别高, 化疗也存在很强的药物依赖性, 并且对人体正常细胞有一定的伤害, 因此, 研究新型的结肠癌治疗药物势在必行。

已知 β -拉帕醌诱导肝癌、前列腺癌细胞的凋亡主要通过阻断细胞周期蛋白或是抑制肿瘤的侵袭能力^[20-21]。本研究发现, β -拉帕醌可以诱导SW480结肠癌细胞发生凋亡, 并且可以有效地提高细胞内ROS水平, 这一结果与其他实验室的研究结果一致, 说明 β -拉帕醌在结肠癌细胞上也有明显地促凋亡效果。众所周知, ROS可以使线粒体膜通透性转

运孔道开放, 细胞色素c的释放等途径, 激活胱冬肽酶-3的活性引起细胞凋亡^[22-25]。此外, 在细胞发生凋亡的时候, Bcl2家族中的促凋亡蛋白成员发生蛋白质的加工修饰, 移位到线粒体的外膜上, 引起细胞色素c、凋亡诱导因子等其他促凋亡因子的释放, 导致细胞凋亡。而抑制Bcl2则起到相反的作用, 可以促进细胞发生凋亡^[26-27]。因此, 当我们用ROS清除剂有效地清除细胞内ROS之后, β -拉帕醌诱导的SW480细胞凋亡受到了明显的抑制, 充分证明 β -拉帕醌诱导的SW480细胞凋亡与细胞内ROS水平具有直接的关联。此外, 在本研究中, 结肠癌细胞SW480在经过 β -拉帕醌处理过后胱冬肽酶-3被活化,



A: NAC预处理细胞30 min后, β -拉帕醌处理24 h, 检测SW480细胞内ROS水平(荧光显微镜照片); B: NAC 预处理细胞30 min后, β -拉帕醌处理24 h, 检测SW480细胞凋亡的情况(荧光显微镜照片), 绿光为Annexin-V-FITC染色, 红光为PI染色, Merge为红光与绿光叠加, Light为白光下的细胞状态; C: NAC预处理细胞30 min后, β -拉帕醌处理24 h, 进行Annexin-V-FITC单染, 检测SW480细胞凋亡情况(流式细胞仪检测), 黑色为对照组, 灰色细线条为 β -拉帕醌与NAC共同处理组, 深灰色粗线条为 β -拉帕醌处理组。标尺=100 μ m。

A: the SW480 cells were pretreated with NAC for 30 min, followed by β -lapachone treatment for 24 h. The cellular ROS levels were measured by fluorescence microscope. B: the SW480 cells were pretreated with NAC for 30 min, followed by β -lapachone treatment for 24 h. The SW480 cell apoptosis was observed with fluorescence microscope images. Annexin-V-FITC (green), PI-PE (red), merge (yellow) and light images. C: the SW480 cells were pretreated with NAC for 30 min, followed by β -lapachone treatment for 24 h. The SW480 cell apoptosis was measured with FACS cytometry. Control (black), β -lapachone (gray thick) and β -lapachone+NAC (gray thin). Scale bars=100 μ m.

图2 β -拉帕醌通过升高ROS水平诱导SW480细胞凋亡

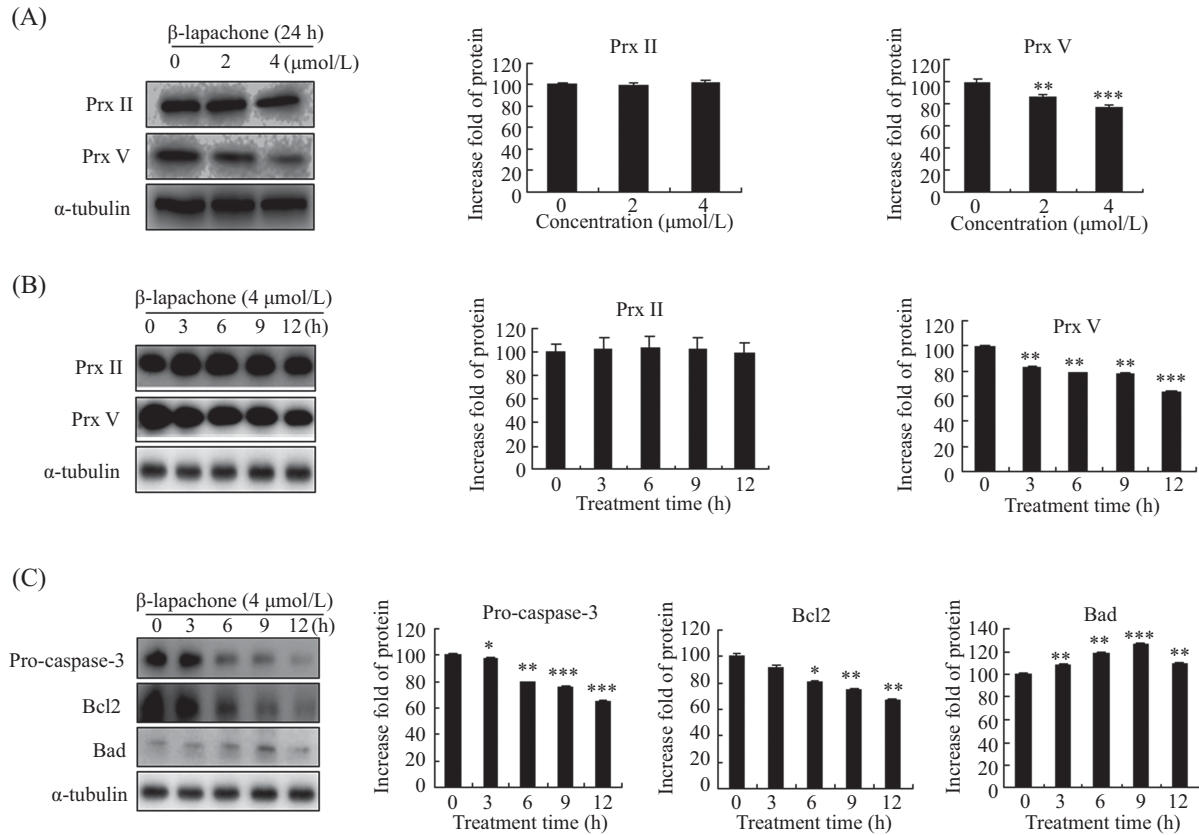
Fig.2 β -lapachone induced SW480 cells apoptosis through ROS accumulate

Bcl2水平下降, 而Bad水平上升, 说明胱冬肽酶-3、Bcl2经典途径参与到 β -拉帕醌诱导的SW480细胞的凋亡过程。

细胞内ROS的上升显然会导致细胞内抗过氧化物酶的变化。作为抗过氧化物酶, Prx V能够调控细胞内的ROS水平, 参与细胞信号转导和增值、凋亡等过程。本研究结果显示, β -拉帕醌的处理显著地抑制了Prx V蛋白质水平, 而同一家族的Prx II却没有任何变化, 说明 β -拉帕醌有可能通过下调Prx V的表达, 从而引起细胞内ROS水平的上升。但是对于Prx V是不是细胞内唯一对 β -拉帕醌敏感的Prx家族蛋白需要进一步的调查和研究。本实验的结果首次阐述了 β -拉帕醌诱导SW480结肠癌细胞发生凋亡过程中对Prx V蛋白质水平的影响, 为研究ROS诱导

的结肠癌细胞凋亡提供了新的理论依据。虽然, 对 β -拉帕醌致使Prx V蛋白质水平下调的机制以及Prx V对 β -拉帕醌诱导的结肠癌细胞凋亡的调控作用及其机制尚不完整, 但本研究结果提示, β -拉帕醌可下调Prx V, 进而使细胞内ROS水平上升, 在一定程度上揭示了Prx V对ROS诱导结肠癌细胞凋亡的调节作用。

综上所述, β -拉帕醌通过抑制SW480结肠癌细胞中Prx V蛋白质水平, 引起细胞内ROS水平升高, 激活胱冬肽酶-3、Bcl2等经典细胞凋亡途径, 导致SW480细胞发生凋亡, 为结肠癌的临床治疗研究提供了新思路, 尤其是为以提高细胞内ROS水平引起癌细胞凋亡研究提供了新的理论依据, 也为研究新型的结肠癌治疗药物提供基础。



A: 不同浓度的 β -拉帕醌对SW480细胞Prx II、Prx V蛋白质印迹和水平的影响; B: 不同时间段处理 β -拉帕醌对SW480细胞Prx II、Prx V的蛋白印迹和表达的影响; C: β -拉帕醌对SW480细胞凋亡相关蛋白前胱冬肽酶-3、Bcl2、Bad水平的影响及量化分析; * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, 与未处理组(0 $\mu\text{mol/L}$)比较。

A: effect of β -lapachone treatment with different concentration on the protein levels of Prx II and Prx V in SW480 cells; B: effect of β -lapachone on the protein levels of Prx II and Prx V in SW480 cells treated in different time; C: effect of β -lapachone on apoptosis related proteins, pro-caspase-3, Bcl2 and Bad levels in SW480 cells treated in different time; * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 vs 0 $\mu\text{mol/L}$ group.

图3 β -拉帕醌对Bcl2、Bad、胱冬肽酶-3以及Prx V蛋白质水平的影响

Fig.3 Effect of β -lapachone on the protein levels of Bcl2, Bad, pro-caspase-3 and Prx V

参考文献 (References)

- Gamaley IA, Klyubin IV. Roles of reactive oxygen species: Signaling and regulation of cellular functions. *Int Rev Cytol* 1999; 188: 203-55.
- Ozben T. Oxidative stress and apoptosis: Impact on cancer therapy. *J Pharm Sci* 2007; 96(9): 2181-96.
- Qu L, Liu FX, Cao XC, Xiao Q, Yang X, Ren KQ. Activation of the apoptosis signal-regulating kinase 1/c-Jun N-terminal kinase pathway is involved in the casticin-induced apoptosis of colon cancer cells. *Exp Ther Med* 2014; 8(5): 1494-500.
- Chen D, Cao J, Tian L, Liu F, Sheng X. Induction of apoptosis by casticin in cervical cancer cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial signaling pathways. *Oncol Rep* 2011; 26(5): 1287-94.
- Yang J, Yang Y, Tian L, Sheng XF, Liu F, Cao JG. Casticin-induced apoptosis involves death receptor 5 upregulation in hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2011; 17(38): 4298-307.
- Zeng F, Tian L, Liu F, Cao J, Quan M, Sheng X. Induction of apoptosis by casticin in cervical cancer cells: Reactive oxygen species-dependent sustained activation of Jun N-terminal kinase. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2012; 44(5): 442-9.
- Wang X, Hu J, Wang P, Zhang S, Liu Y, Xiong W, *et al.* Analysis of the *in vivo* and *in vitro* effects of photodynamic therapy on breast cancer by using a sensitizer, sinoporphyrin sodium. *Theranostics* 2015; 5(7): 772-86.
- Ong JY, Yong PV, Lim YM, Ho AS. 2-Methoxy-1,4-naphthoquinone (MNQ) induces apoptosis of A549 lung adenocarcinoma cells via oxidation-triggered JNK and p38 MAPK signaling pathways. *Life Sci* 2015; 135: 158-64.
- Wu YT, Lin CY, Tsai MY, Chen YH, Lu YF, Huang CJ, *et al.* β -Lapachone induces heart morphogenetic and functional defects by promoting the death of erythrocytes and the endocardium in zebrafish embryos. *Biomed Sci* 2011; 18: 70.
- He T, Banach-Latapy A, Vernis L, Dardalhon M, Chanet R, Huang ME. Peroxiredoxin 1 knockdown potentiates β -lapachone cytotoxicity through modulation of reactive oxygen species and mitogen-activated protein kinase signals. *Carcinogenesis* 2013; 34(4): 760-9.
- Kinnula VL, Lehtonen S, Sormunen R, Kaarteenaho-Wiik R,

- Kang SW, Rhee SG, *et al.* Overexpression of peroxiredoxins I, II, III, V, and VI in malignant mesothelioma. *J Pathol* 2002; 196(3): 316-23.
- 12 Boveris A, Cadenas E. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1977; 180(2): 248-57.
- 13 Kang SW, Rhee SG, Chang TS, Jeong W, Choi MH. 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: Therapeutic implications. *Trends Mol Med* 2005; 11(12): 571-8.
- 14 Rhee SG, Chae HZ, Kim K. Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* 2005; 38(12): 1543-52.
- 15 Hofmann B, Hecht HJ, Flohe L. Peroxiredoxins. *Biol Chem* 2002; 383(3/4): 347-64.
- 16 Sun HN, Kim SU, Huang SM, Kim JM, Park YH, Kim SH, *et al.* Microglial peroxiredoxin V acts as an inducible anti-inflammatory antioxidant through cooperation with redox signaling cascades. *J Neurochem* 2010; 114(1): 39-50.
- 17 Zhou Y, Kok KH, Chun AC, Wong CM, Wu HW, Lin MC, *et al.* Mouse peroxiredoxin V is a thioredoxin peroxidase that inhibits p53-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 268(3): 921-7.
- 18 Plaisant F, Clippe A, Vander Stricht D, Knoops B, Gressens P. Recombinant peroxiredoxin 5 protects against excitotoxic brain lesions in newborn mice. *Free Radic Biol Med* 2003; 34(7): 862-72.
- 19 冯丽, 金永哲, 刘磊, 韩冰, 吕春阳, 崔玉东, 等. Peroxiredoxin V保护HT22小鼠海马神经细胞抵抗NO诱导的细胞凋亡. *中国细胞生物学学报*(Feng Li, Jin Yongzhe, Liu Lei, Han Bing, Lü Chunyang, Cui Yudong, *et al.* Peroxiredoxin V protects the HT22 cells against NO mediated apoptosis. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2015; 37(1): 53-58.
- 20 Kim SO, Kwon JI, Jeong YK, Kim GY, Kim ND, Choi YH. Induction of Egr-1 is associated with anti-metastatic and anti-invasive ability of β -lapachone in human hepatocarcinoma cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71(9): 2169-76.
- 21 Lien YC, Kung HN, Lu KS, Jeng CJ, Chau YP. Involvement of endoplasmic reticulum stress and activation of MAP kinases in β -lapachone-induced human prostate cancer cell apoptosis. *Histol Histopathol* 2008; 23(11): 1299-308.
- 22 Sekhon B, Sekhon C, Khan M, Patel SJ, Singh I, Singh AK. N-Acetyl cysteine protects against injury in a rat model of focal cerebral ischemia. *Brain Res* 2003; 971(1): 1-8.
- 23 Patten DA, Germain M, Kelly MA, Slack RS. Reactive oxygen species: Stuck in the middle of neurodegeneration. *J Alzheimers Dis* 2010; 20 Suppl 2: S357-67.
- 24 刘卉, 刘延香. 细胞凋亡与活性氧. *现代肿瘤学*(Liu Hui, Liu Yanxiang. Cell apoptosis and reactive oxygen speices. *Modern Oncology*) 2008; 16(10): 1830-2.
- 25 赵云罡, 徐建兴. 线粒体、活性氧和细胞凋亡. *生物化学与生物物理进展*(Zhao Yungang, Xu Jianxing. Mitochondria, ROS and cell apoptosis. *Prog Biochem Biophys*) 2001; 28(2): 168-71.
- 26 Koubi D, Jiang H, Zhang L, Tang W, Kuo J, Rodriguez AI, *et al.* Role of Bcl-2 family of proteins in mediating apoptotic death of PC12 cells exposed to oxygen and glucose deprivation. *Neurochem Int* 2005; 46(1): 73-81.
- 27 翟中和, 王喜忠, 丁明孝. *细胞生物学*(第四版). 北京: 高等教育出版社(Zhai zhonghe, Wang xizhong, Ding mingxiao. *Cell Biology*. Beijing: Higher Education Press) 2011, 341-52.