

生物学活性的结果相吻合。但免疫细胞化学染色的阳性结果也难排除有可能检测的是无活性的变性分子或细胞因子裂解片段。核酸分子原位杂交不仅能检测基因表达还能直接地观察目标分子在组织和细胞内的定位、分布与半定量。本研究采用 Digoxigenin 标记的 EPO 和 GM-CSF 的寡核苷酸探针针对未经诱导和 APS 诱导的 rBMM Φ 进行了核酸分子原位杂交。结果发现, 经过 APS 诱导后, rBMM Φ 中 EPO mRNA 与 GM-CSF mRNA 表达与对照组相比明显提高。这提示 APS 调控造血的可能机制在于增强造血微环境中的巨噬细胞的 GM-CSF 和 EPO 的 mRNA 转录, 这与免疫细胞化学检测的几种造血生长因子的结果是一致的。

BMM Φ 起源于造血干/祖细胞, 又反过来调节造血干/祖细胞的增殖分化, 巨噬细胞能通过细胞间的直接接触等近距离调节方式, 也可通过分泌多种造血调节因子的远程调节方式调节血细胞发生。本研究表明 APS 可能通过直接和/或间接途径刺激 BMM Φ , 促进其合成和分泌 EPO、GM-CSF、IL-3, 进而促进各系造血祖细胞的增殖与分化, 这可能是当归“补血活血”和调节免疫功能的细胞与分子生物学机制之一。

References:

- [1] Wang Y P, Zhu B D. The effect of angelica polysaccharide on proliferation and differentiation of hematopoietic progenitor [J]. *Natl Med J China* (中华医学杂志), 1996, 76(5): 363-366.
- [2] Zheng M, Wang Y P. Study on biological mechanism of angelica polysaccharide regulation on human early multipotential progenitor cell [J]. *Chin J Anat* (解剖学杂志), 2002, 25(2): 105-108.
- [3] Li J, Wang Y P. Methodology of separation, purification, cultivation and identification of rat bone marrow macrophage [J]. *Acta Univ Sci Med Chongqing* (重庆医科大学学报), 2003, 28(3): 304-308.
- [4] Sun W M. *The Methodology of Research Cytokines* (细胞因子研究方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1999.
- [5] Li J Z, Wang H L, Han Z C. *The Hematology Experiment* (血液实验学) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1997.
- [6] Wang Y P, Zhu B D. The effect of angelica polysaccharide on proliferation and differentiation of CFU-CM [J]. *Chin J Anat* (解剖学杂志), 1993, 16(2): 125-129.
- [7] Liu X Z. *The Experimental Manual of Hematopoietic Progenitor Cell Culture* (造血祖细胞培养技术实验手册) [M]. Beijing: Beijing Publishing House, 1993.
- [8] Lamberts R M. Interdigitate coupling of presumptive hematopoietic stem cell to macrophage [J]. *Blood*, 1984, 63(5): 1225-1228.
- [9] Wang Y P, Wang Y, Wang S P, et al. Study on the relationship between macrophage and hematopoiesis regulation [J]. *Chin J Immunol* (中国免疫学杂志), 1997, 13(1): 15-18.
- [10] Guo R Q, Zhu B D. The effect of conditioned culture media of celiac macrophage on hematopoiesis of mouse [J]. *Acta Anat Sin* (解剖学报), 1992, 23(3): 300-305.
- [11] Wang Y, Zhu B D. The experimental research and clinic significance of hematopoietic progenitor cell culture [J]. *Foreign Med Sci-Transfu and Hematol* (国外医学·输血与血液学分册), 1994, 17(2): 89-92.
- [12] Tang P X. Some new ideas about hematopoietic stem/progenitor cells [J]. *J Exp Hematol* (实验血液学杂志), 1996, 4(3): 225-227.
- [13] Gordon M Y. Hematopoietic growth factor and receptor [J]. *Cancer Cell*, 1991, 3(4): 127-132.

人参炔醇对大鼠原代培养的神经细胞过氧化氢损伤的影响

王泽剑¹, 陈红专¹, 薛庆生², 陆 阳^{1*}

(1. 上海第二医科大学药物研究所, 上海 200025; 2. 上海第二医科大学瑞金医院 麻醉科, 上海 200025)

摘 要: 目的 探讨人参炔醇对原代神经细胞氧化应激的保护作用。方法 通过 MTT 法、流式细胞术观察人参炔醇对神经细胞氧化应激的影响; 并观察人参炔醇体外对自由基的清除作用及对细胞内超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性与丙二醛(MDA)含量的影响。结果 2~16 $\mu\text{mol/L}$ 人参炔醇对 H_2O_2 损伤神经细胞有一定的保护作用, 可剂量依赖性地促进细胞存活, 8 $\mu\text{mol/L}$ 人参炔醇可显著减少细胞的坏死率及凋亡率 ($P < 0.01$)。30~100 $\mu\text{mol/L}$ 人参炔醇对自由基有一定的清除作用, 2~8 $\mu\text{mol/L}$ 人参炔醇还可显著提高 H_2O_2 损伤细胞内 SOD、GSH-Px 活性并抑制 MDA 的生成 ($P < 0.01$)。结论 人参炔醇具有保护神经细胞对抗氧化应激的活性, 该活性与细胞内 SOD 活性增高有关。

关键词: 人参炔醇; 皮层神经细胞; 过氧化氢; 抗氧化酶

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)01-0072-04

* 收稿日期: 2004-05-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30371731); 上海第二医科大学-上海交通大学联合科研基金资助项目(2003HZJJ002); 上海市教委学科建设专项基金部分资助(JY2001)

作者简介: 王泽剑(1972-), 男, 河南郑州人, 博士, 从事中药药理研究, 现在上海交通大学药学院工作。

* 通讯作者 Tel: (021) 63846590-776466 E-mail: huaxue@shsmu.edu.cn

Effect of panaxynol on rat primary cultured neuron injured by H₂O₂

WANG Ze-jian¹, CHEN Hong-zhuan¹, XUE Qing-sheng², LU Yang¹

(1. Institute of Materia Medica; Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China; 2. Department of Anesthesia, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China)

Abstract: **Objective** To investigate the neuroprotective effect of panaxynol on primary cultured cortical neuron against oxidative stress. **Methods** Viability of panaxynol acted on neuron oxidative stress was monitored by MTT assay and FCM method. Scavenging effects of panaxynol on free radicals were observed *in vitro*. Effects of panaxynol on SOD activity and GSH-Px, and MDA content in primary neuron injured by H₂O₂ were also determined. **Results** Panaxynol (2—16 $\mu\text{mol/L}$) could dose-dependently protect neuron from oxidative stress induced by H₂O₂; 8 $\mu\text{mol/L}$ of panaxynol could decrease necrosis and apoptosis rate of neuron significantly ($P < 0.01$). Panaxynol (30—100 $\mu\text{mol/L}$) could scavenge free radicals. Panaxynol (2—8 $\mu\text{mol/L}$) could significantly improve the activities of SOD and GSH-Px, and inhibit MDA formation ($P < 0.01$) in primary cultured neuron injured by H₂O₂. **Conclusion** The protective effects of panaxynol on neuron against oxidative stress may be related with the increase of SOD activity in cytoplasm.

Key words: panaxynol; cortical neuron; H₂O₂; anti-oxidative enzyme

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是发生于老年及老年前期的神经系统退行性疾病。AD 的发病机制目前尚不十分清楚, 但神经营养因子缺乏和氧化应激可促使 AD 病情恶化已成为共识。由于神经细胞难以再生, 通过神经营养因子和抗氧化应激药物保护存活的神细胞是 AD 治疗的重要手段。神经营养因子 (如神经生长因子, NGF) 相对分子质量较高, 难通过血脑屏障, 因此, 寻找具有上述保护功能的脂溶性小分子是研究的热点。

三七 *Panax notoginseng* F. H. Chen 是传统中药, 具有活血化瘀的作用。笔者在筛选具有“NGF 样作用”小分子化合物的工作中, 开展了对三七脂溶性部位的化学成分和药理研究, 发现人参炔醇是该部位的主要活性成分之一^[1,2]。文献报道人参炔醇具有促进神经细胞轴突生长、改善东莨菪碱所致小鼠记忆缺损的活性^[3]。笔者在研究中发现人参炔醇对皮质、海马脑片氧化应激均具有较强的保护作用, 本实验进一步研究人参炔醇对皮层神经元的氧化应激保护作用, 并讨论其作用机制。

1 材料

1.1 药品: 人参炔醇由本研究所制备^[1], 纯度 $\geq 98\%$, 其乙醇溶液 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用, 用时以 PBS 稀释至所需浓度。

1.2 试剂: 羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES)、噻唑兰 (MTT)、胰蛋白酶、DAB 试剂盒购自上海华美生物制品公司; 黄嘌呤、黄嘌呤氧化酶、脂多糖 (LPS)、细胞色素 C (CYTC)、维生素 E 购自 Sigma 公司; DMEM/F12 培养基、Neurobasal/N₂ 培养基、胎牛血清、马血清购自 Gibco 公司; 丙二醛

(MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 神经元烯醇化酶 (NSE) 单抗购自 Zymed Laboratories INC; 测定凋亡试剂盒 (Annexin/PI) 购自宝赛生物公司; 阿糖胞苷购自上海华联制药公司。

1.3 动物: 清洁级妊娠 16~18 d SD 母鼠, 由上海第二医科大学实验动物中心提供。

1.4 仪器: FACS-420 型流式细胞仪为 Coulter 公司产品; 日本 Olympus IX70 荧光倒置显微镜; 德国 Heraeus 公司 CO₂ 培养箱。

1.5 数据处理: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间用单因素方差分析, 组间用 SNK 检验。

2 方法

2.1 大脑皮层神经细胞培养: 无菌条件取出胎鼠大脑皮质, 剥除脑膜和血管, 剪碎, 0.25% 胰蛋白酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 10 min, 用含血清的 DMEM/F12 终止消化, 制成细胞悬液, 按 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 96 孔板, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后, 更换 Neurobasal/N₂ 培养液, 第 3 天加入阿糖胞苷 (终浓度 5 $\mu\text{mol/L}$) 抑制胶质细胞生长, 培养第 7 天的皮层神经元供实验用。

2.2 大脑皮层神经元鉴定: 取生长有神经元的盖玻片, 4% 多聚甲醛固定, 分别经 NSE 抗体工作液, 生物素化羊抗兔 IgG 的二抗处理, DAB 显色, 复染, 脱水, 透明, 封片, 光镜观察。

2.3 H₂O₂ 损伤与乳酸脱氢酶 (LDH) 活性测定: 对照组神经细胞在原生长环境培养 24 h; 损伤组的神

经细胞在含 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 的培养液中培养 24 h; 用药组的神经细胞分别在含 2、4、8、16 $\mu\text{mol/L}$ 人参炔醇的培养液中培养 0.5 h 后, 按损伤组条件培养 24 h。每孔取 10 μL 上清液, 测定 LDH 活性。剩余液体中加入 10 μL MTT (10 mg/mL), 培养 4 h, 弃上清液, 每孔加 100 μL DMSO, 振荡, 酶标仪测定 570 nm 处的吸光度值 (A_{570})。

2.4 人参炔醇对神经元氧化应激损伤的影响: 对照组、损伤组和用药组按 2.3 项方法处理培养 24 h, 用药组的人参炔醇浓度分别为 2、4、8 $\mu\text{mol/L}$, 流式细胞仪检测。

2.5 人参炔醇对自由基生成的影响^[4]

2.5.1 羟自由基生成: 取 1% H_2O_2 、500 $\mu\text{mol/L}$ FeSO_4 和 500 $\mu\text{mol/L}$ CYTC 磷酸二氢钾缓冲液 ($\text{pH}7.4$, 0.15 mmol/L) 各 1 mL, 分别与 40、120、400 $\mu\text{mol/L}$ 人参炔醇磷酸二氢钾缓冲液 1 mL 混匀, 25 $^\circ\text{C}$ 培养 1.5 h, 测定 532 nm 处吸光度值 (A_{532})。维生素 E (终浓度 100 $\mu\text{mol/L}$) 为阳性对照。

2.5.2 超氧阴离子的生成及测定: 取含黄嘌呤 (100 $\mu\text{mol/L}$)、NBT (600 $\mu\text{mol/L}$) 和浓度分别为 0、20、60、200 $\mu\text{mol/L}$ 人参炔醇磷酸缓冲液 ($\text{pH}7.4$) 2 mL, 37 $^\circ\text{C}$ 预热 5 min, 加黄嘌呤氧化酶 (0.1 IU) 触发反应, 加磷酸缓冲液至 4 mL, 在 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 30 min, 冰浴终止反应, 测定 560 nm 处吸光度值 (A_{560})。另设维生素 E (100 $\mu\text{mol/L}$) 阳性对照组。

2.6 人参炔醇对皮层神经元内抗氧化酶活性的影响: 对照组、损伤组和用药组按 2.3 项方法培养 24 h, PBS 冲洗, 加 1 mL PBS, 匀浆, 取 10 μL 用于蛋白含量测定。样品中 MDA、SOD、GSH-Px 活性测定按试剂盒说明操作。

3 结果

3.1 皮层神经元免疫细胞化学染色: 台盼蓝拒染法观察测定细胞存活率 > 95%, 大多数神经细胞在接种培养 7 d 左右生长成熟, 胞体增大, 光晕明显, 突起增多、边缘清晰, 形成明显的神经网络。免疫细胞化学染色证实培养的细胞即为神经细胞。

3.2 H_2O_2 损伤培养对皮层神经细胞活性影响及人参炔醇的作用: 皮层神经元在含 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 的培养基中孵育 24 h, 与对照组相比其存活神经元数目显著减少, 表现为 A_{570} 显著下降, LDH 释放量增加, 人参炔醇可剂量依赖性地抑制 H_2O_2 的作用 ($P < 0.05$ 、0.01), 结果见表 1。

3.3 H_2O_2 对皮层神经细胞凋亡和坏死的影响及人参炔醇的作用: 流式细胞术分析结果显示, 皮层神经

元与 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 共同孵育 24 h 后大量死亡, 神经元的坏死率明显高于凋亡率。人参炔醇可剂量依赖性地抑制 H_2O_2 导致的神经细胞坏死, 8 $\mu\text{mol/L}$ 人参炔醇还可降低细胞的凋亡率, 提高细胞的存活率, 结果见表 2。

表 1 人参炔醇对原代培养的神经细胞 H_2O_2 损伤的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Effect of panaxynol on primary cultured neuron injured by H_2O_2 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	A_{570}	LDH/($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)
对照	—	0.69 $\pm$ 0.16* *	203.7 $\pm$ 237* *
H_2O_2	—	0.37 $\pm$ 0.07	744.8 $\pm$ 694
人参炔醇	2	0.41 $\pm$ 0.04	704.7 $\pm$ 595
	4	0.42 $\pm$ 0.09*	575.8 $\pm$ 867*
	8	0.59 $\pm$ 0.14* *	527.9 $\pm$ 602* *
	16	0.57 $\pm$ 0.09* *	505.6 $\pm$ 872* *
维生素 E	10	0.54 $\pm$ 0.09* *	527.1 $\pm$ 657* *

与 H_2O_2 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs H_2O_2 group

表 2 人参炔醇对 H_2O_2 损伤的原代培养的神经细胞凋亡和坏死的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 2 Effect of panaxynol on apoptosis and necrosis of primary cultured neuron injured by H_2O_2 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	坏死率/%	凋亡率/%
对照	—	2.5 $\pm$ 1.2* *	3.2 $\pm$ 1.0* *
H_2O_2	—	37.5 $\pm$ 3.4	15.9 $\pm$ 2.4
人参炔醇	2	21.6 $\pm$ 4.8*	16.6 $\pm$ 1.6
	4	13.8 $\pm$ 5.8* *	11.5 $\pm$ 2.0*
	8	10.2 $\pm$ 6.9* *	9.6 $\pm$ 1.5* *
维生素 E	10	11.5 $\pm$ 2.4* *	10.1 $\pm$ 2.5* *

与 H_2O_2 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs H_2O_2 group

3.4 人参炔醇对自由基生成的影响: 通过 Fenton 系统及黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶氧自由基生成系统产生羟自由基及超氧阴离子是常用的筛选氧自由基捕获剂的离体实验模型。结果显示: 10 $\mu\text{mol/L}$ 人参炔醇对羟自由基及氧自由基生成无明显影响, 30、100 $\mu\text{mol/L}$ 人参炔醇对羟自由基及氧自由基均有一定的捕获作用, 相同剂量的人参炔醇对羟自由基的捕获作用强于对超氧阴离子的捕获作用, 结果见表 3。表明人参炔醇直接捕获自由基作用所需的浓度 (> 30 $\mu\text{mol/L}$) 远大于其保护细胞所需的浓度 (2~8 $\mu\text{mol/L}$)。

3.5 人参炔醇对皮层神经细胞抗氧化酶活性的影响: 结果显示, 皮层神经元与 100 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 孵育 24 h, 细胞内 SOD、GSH-Px 活性显著下降, 2~8 $\mu\text{mol/L}$ 人参炔醇可剂量依赖性地增加 H_2O_2 损伤细

胞的 SOD、GSH-Px 活性,并抑制其 MDA 的生成,结果见表 4。

表 3 人参炔醇清除羟自由基及超氧阴离子的作用 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 3 Scavenging effects of panaxynol on hydroxyl radicals and superoxidative anion ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组 别	剂 量 $/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	羟自由基		超氧阴离子	
		A_{532}	抑制率/%	A_{560}	抑制率/%
对照	—	0.630 ± 0.048	—	0.817 ± 0.016	—
人参炔醇	10	0.627 ± 0.003	0.47	0.804 ± 0.015	1.6
	30	$0.517\pm0.008^*$	17.9	$0.753\pm0.021^*$	7.8
	100	$0.038\pm0.006^{**}$	93.9	$0.692\pm0.026^{**}$	15.3
维生素 E	100	$0.032\pm0.005^{**}$	94.9	$0.610\pm0.010^{**}$	25.3

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group

表 4 人参炔醇对 H₂O₂ 损伤的原代培养的神经细胞 SOD 和 GSH-Px 活性及 MDA 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 4 Effect of panaxynol on SOD, GSH-Px activities, and MDA level in primary cultured neuron injured by H₂O₂ ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组 别	剂 量 $/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	SOD $/(\text{U}\cdot\text{mg}^{-1})$	GSH-Px $/(\text{U}\cdot\text{mg}^{-1})$	MDA $/(\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1})$
		$/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	$/(\text{U}\cdot\text{mg}^{-1})$	$/(\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1})$
对照	—	$92.0\pm6.8^{**}$	$44.6\pm7.2^{**}$	$0.1\pm0.0^{**}$
H ₂ O ₂	100	74.3 ± 6.4	16.5 ± 4.6	7.2 ± 1.1
人参炔醇	2	81.5 ± 4.2	16.6 ± 4.8	6.0 ± 1.9
	4	$109.0\pm6.2^{**}$	$25.4\pm5.2^*$	$4.5\pm0.2^*$
	8	$121.3\pm8.8^{**}$	$29.1\pm5.0^{**}$	$2.2\pm0.2^{**}$
维生素 E	10	$95.0\pm8.2^{**}$	$26.2\pm8.1^*$	$2.1\pm0.0^{**}$

与 H₂O₂ 组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs H₂O₂ group

4 讨论

氧化应激是指细胞受到氧自由基损伤所致的细胞毒作用。当细胞内自由基含量超过细胞自身的清除能力时,可产生破坏脂质和细胞膜的作用,并导致蛋白、核酸损坏等氧自由基毒性作用^[5]。H₂O₂ 主要通过 Haber-Weiss 或 Fentons 反应生成的·OH 对细胞造成损伤,10~100 μmol/L H₂O₂ 可使神经细胞 SOD 活性降低、MDA 升高及细胞存活率下降,并呈一定的剂量效应关系^[6]。利用 H₂O₂ 建立原代培养的神经细胞损伤模型可用于筛选神经细胞保护药物。

MTT 测定法不仅可以测定细胞的增殖情况,且可以在无细胞增殖情况下测定细胞活力的变化。本实验采用 MTT 法观察到 2~8 μmol/L 人参炔醇处理的皮层细胞具有剂量依赖性的抗 H₂O₂ 致损

伤作用,人参炔醇还能够显著减轻细胞因氧化应激造成的 LDH 外泄及细胞线粒体功能损伤。

药物对氧化应激的保护作用通常主要通过直接捕获氧自由基来减轻细胞损伤,或者通过提高应激情况下细胞内抗氧化酶的活性,对抗氧自由基损伤。10 μmol/L 以下人参炔醇对氧自由基并无显著捕获作用,人参炔醇上调细胞内抗氧化酶(主要为 SOD)的活性可能是其抗氧化应激的机制之一。

氧化应激与细胞的凋亡或坏死密切相关^[7]。本实验用流式细胞仪定量分析被标记的细胞,发现 2 μmol/L 人参炔醇可减少由 H₂O₂ 引起的神经细胞损伤的细胞坏死率,而细胞凋亡率无显著改变,8 μmol/L 人参炔醇可显著降低坏死率和凋亡率。文献报道适度升高细胞内环磷酸腺苷(cAMP)可促进损伤的分化细胞由坏死转向凋亡,使坏死率显著下降^[8]。本研究提示,人参炔醇降低 H₂O₂ 损伤细胞的坏死率,可能与细胞内 cAMP 升高有关^[2]。

References:

[1] Lin Q, Zhao X, Liu P, *et al.* Studies on the lipophilic constituents of *Panax notoginseng* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(6): 490-492.

[2] Wang Z J, Lu Y, Chen H Z. The influence of panaxynol on different injury model of rat brain slice [J]. *Acta Univ Med Second Shanghai* (上海第二医科大学学报), 2003, 23(6): 485-488.

[3] Yamazaki M, Hirakura K, Miyaichi Y, *et al.* Effect of polyacetylenes on the neurite outgrowth of neuronal culture cells and scopolamine induced memory impairment in mice [J]. *Biol Pharm Bull*, 2001, 24(12): 1434-1436.

[4] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase improved assays and an assay applicable to acrylamide gels [J]. *Anal Biochem*, 1971, 44: 276-281.

[5] Butler A R, Flitnery F, Williams D L H. NO, nitrosonium ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 1995, 16: 18-22.

[6] Kong X F, Chen W R, Ni B, *et al.* The protective effects of selenium on oxidative damages of differentiation neuron exposed to H₂O₂ [J]. *J Health Toxicol* (卫生毒理学杂志), 2000, 14(2): 91-94.

[7] Ankarcrona M, Dypbukt J M, Bonfoco E, *et al.* Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function [J]. *Neuron*, 1995, 15: 961-973.

[8] Studzinski D M, Benjamins J A. Cyclic AMP differentiation of the oligodendroglial cell line N20.1 switches staurosporine-induced cell death from necrosis to apoptosis [J]. *J Neurosci Res*, 2001, 66(4): 691-697.