

N-乙酰半胱氨酸通过 AMPK/SIRT1 途径抑制缺氧诱导的大鼠脑血管内皮细胞损伤

张 蕴, 韩新生, 张洪阳, 徐建可

(开封市中心医院神经内科, 河南省开封市 475000)

[关键词] N-乙酰半胱氨酸; 脑血管内皮细胞; 氧化应激; 凋亡; AMPK/SIRT1 通路

[摘要] 目的 研究 N-乙酰半胱氨酸(NAC)对缺氧诱导脑血管内皮细胞损伤的调节作用及分子机制。方法 选择 SD 大鼠分离培养脑血管内皮细胞,分为常氧组、缺氧组、0.5 NAC 组(缺氧+0.5 mol/L NAC)、1.0 NAC 组(缺氧+1.0 mol/L NAC)、NAC+8-bAMP 组(缺氧+1.0 mol/L NAC+1.0 mol/L 8-bAMP)。采用 MTS 法检测细胞增殖活力,采用 TUNEL 染色检测凋亡率,采用试剂盒检测氧化应激指标,采用 Western blot 检测凋亡基因、AMPK/SIRT1 通路分子的表达量。结果 缺氧组细胞 OD₄₉₀ 值、T-AOC 含量及 B 淋巴细胞瘤 2(Bcl-2)、p-AMP 活化蛋白激酶(p-AMPK)、去乙酰化酶 Sirtuin1(SIRT1)表达量均明显低于常氧组;缺氧组细胞凋亡率、细胞中活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)、8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)含量及 bcl-2 相关 X 蛋白(bax)、细胞色素 C(Cyt-C)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3(Caspase-3)的表达量均明显高于常氧组。0.5 NAC 组、1.0 NAC 组细胞 OD₄₉₀ 值、T-AOC 量及 Bcl-2、p-AMPK、SIRT1 表达量均明显高于缺氧组;0.5 NAC 组、1.0 NAC 组细胞凋亡率、ROS、MDA、8-OHdG 含量及 Caspase-3、Cyt-C、Bax 的表达量均明显低于缺氧组。NAC+8-bAMP 组细胞 OD₄₉₀ 值、T-AOC 及 Bcl-2、p-AMPK、SIRT1 表达量均明显低于 1.0 NAC 组;NAC+8-bAMP 组凋亡率、ROS、MDA、8-OHdG 含量及 Caspase-3、Cyt-C、Bax 的表达量均明显高于 1.0 NAC 组。结论 NAC 能够通过激活 AMPK/SIRT1 通路来减轻氧化应激及线粒体凋亡介导的脑血管内皮细胞损伤。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

N-acetylcysteine inhibits hypoxia-induced cerebro-vascular endothelial cell injury via AMPK/SIRT1 pathway

ZHANG Yun, HAN Xinsheng, ZHANG Hongyang, XU Jianke

(Department of Neurology, Kaifeng Central Hospital, Kaifeng, Henan 475000, China)

[KEY WORDS] N-acetylcysteine; cerebrovascular endothelial cell; oxidative stress; apoptosis; AMPK/SIRT1 pathway

[ABSTRACT] **Aim** To study the regulatory effect of N-acetylcysteine (NAC) on hypoxia-induced injury of cerebrovascular endothelial cells and its molecular mechanism. **Methods** Healthy male SD rats were selected, cerebrovascular endothelial cells were isolated and cultured. Cells were divided into normal oxygen group, hypoxia group, 0.5 NAC group(hypoxia+0.5 mol/L NAC), 1.0 NAC group(hypoxia+1.0 mol/L NAC), NAC+8-bAMP group((hypoxia+1.0 mol/L NAC+1.0mol/L 8-bAMP). Cell proliferation activity was detected by MTS assay, apoptotic rate was detected by TUNEL assay, oxidative stress index was detected by kit, apoptotic gene and AMPK/SIRT1 pathway molecule expression was detected by western blot. **Results** OD₄₉₀ value, T-AOC and expression of Bcl-2, p-AMPK, SIRT1 in hypoxia group were significantly lower than those in normoxia group, while apoptotic rate, contents of ROS, MDA, 8-OHdG and expression of Caspase-3, Cyt-C, Bax of hypoxia group were significantly higher than those in normoxia group. OD₄₉₀ value, content of T-AOC and expression of Bcl-2, p-AMPK, SIRT1 in 0.5 NAC group, 1.0 NAC group were significantly higher than those in hypoxia group, while apoptotic rate, contents of ROS, MDA, 8-OHdG and expression of Caspase-3,

[收稿日期] 2019-05-10

[修回日期] 2019-09-26

[基金项目] 河南省科技攻关计划项目(182102310153)

[作者简介] 张蕴,硕士研究生,主治医师,研究方向为神经内科,E-mail 为 zhangyun78999@126.com。通信作者韩新生,博士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向为神经内科脑血管病、肌肉病、神经免疫、癫痫等,E-mail 为 shicheng0549@163.com。

Cyt-C, Bax of 0.5 NAC group, 1.0 NAC group were significantly higher than those in hypoxia group. OD_{490} value, content of T-AOC and expression of Bcl-2, p-AMPK, SIRT1 in NAC+8-bAMP group were significantly lower than those in 1.0 NAC group, while apoptotic rate, contents of ROS, MDA, 8-OHdG and expression of Caspase-3, Cyt-C, Bax of NAC+8-bAMP group were significantly higher than those in 1.0 NAC group. **Conclusion** NAC can alleviate oxidative stress and mitochondrial apoptosis-mediated injury of cerebrovascular endothelial cells by activating AMPK/SIRT1 pathway.

缺血性脑血管疾病是致残率和致死率均较高的疾病,缺血缺氧条件下神经细胞的损伤是造成神经功能损害的直接因素,而缺血缺氧条件下脑血管内皮细胞的损伤会通过促进血管收缩、阻碍新生血管形成及侧枝循环建立来加重神经功能损害^[1-2]。近年来,缺氧诱导的脑血管内皮细胞损伤受到了越来越多的关注,减轻缺氧诱导的脑血管内皮细胞损伤对改善缺血性脑血管疾病的预后具有重要价值。N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)是还原型谷胱甘肽合成的前体,能够增加细胞内还原型谷胱甘肽的合成,进而通过多途径来介导抗氧化、抗凋亡作用。多项体外实验研究表明,NAC能够介导广泛的细胞保护作用,对胶质细胞、肝脏、肾脏、心肌的氧化应激及细胞凋亡均具有显著抑制作用^[3-6]。为了明确NAC对脑血管内皮细胞的保护作用,本实验通过缺氧诱导脑血管内皮细胞发生损伤并具体分析NAC对缺氧诱导脑血管内皮细胞损伤的调节作用及分子机制。

1 材料和方法

1.1 动物和主要材料

健康雄性SD大鼠(体质量200~300 g)购自上海杰思捷实验动物有限公司,许可证号:许可SCXK(沪)2018-0004。

磷酸盐缓冲液、蛋白裂解液、BCA蛋白定量试剂盒、TUNEL试剂盒购自上海碧云天公司,MTS法细胞活力检测试剂盒购自Promega公司,化学法试剂盒、硫代巴比妥酸法试剂盒、酶联免疫吸附法试剂盒、比色法试剂盒均购自南京建成研究所,含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3(cysteine aspartic acid specific protease, Caspase-3)、细胞色素C(cytochrome-C, Cyt-C)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)、B淋巴细胞瘤2(B-cell leukemia/lymphoma 2, Bcl-2)、p-AMP活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)、总AMPK、去乙酰化酶Sirtuin1(SIRT1)的单克隆抗体购自Santa Cruz公司。

仪器离心机、细胞培养箱购自Thermo公司,酶

标仪购自Bio-rad公司,荧光显微镜购自Olympus公司,化学显影仪购自上海天能公司。

1.2 细胞培养及分组干预

SD大鼠腹腔注射戊巴比妥麻醉后用75%乙醇浸泡3 min,而后将大鼠放入超净工作台,断头后解剖大脑,在显微镜下分离脑血管后用无菌的磷酸盐缓冲液漂洗3~5遍,而后用眼科剪将血管组织剪碎,转移进入15 mL离心管、加入2 g/L胶原酶1.5 mL,37℃水浴中消化30 min,消化悬液用滤网过滤后在离心机中以3 000 r/min离心10 min,弃去上清液、保留细胞沉淀,加入含有内皮细胞生长添加剂及20% FBS的DMEM重悬,接种在培养瓶内并每48 h更换1次培养基,待密度生长至80%后进行消化传代。

传代后的细胞进行分组干预,包括常氧组、缺氧组、0.5 NAC组、1.0 NAC组和NAC+8-bAMP组。干预方法如下:(1)常氧组:在95%空气、5%二氧化碳的常氧条件下用DMEM培养;(2)缺氧组:在1%氧气、94%氮气、5%二氧化碳的缺氧条件下用DMEM培养;(3)0.5 NAC组:同上缺氧条件下用含有0.5 mol/L NAC的DMEM培养;(4)1.0 NAC组:同上缺氧条件下用含有1.0 mol/L NAC的DMEM培养;(5)NAC+8-bAMP组:同上缺氧条件下用含有1.0 mol/L NAC及1.0 mol/L 8-bAMP的DMEM培养。

1.3 MTS法检测细胞增殖活力

细胞接种在96孔培养板并干预24 h后,按照20 μ L/孔的体积向培养孔内加入细胞活力检测试剂盒中的检测液,而后在培养箱内继续培养4 h;取出培养板并震荡,放入酶标仪检测490 nm波长处的吸光值,记为 OD_{490} 值。

1.4 TUNEL法检测细胞凋亡

细胞接种在24孔培养板并干预24 h后,弃去培养基、保留细胞,用磷酸盐缓冲液漂洗2遍后加固定液,4℃固定过夜;第二天弃去固定液,用磷酸盐缓冲液漂洗2遍后用TUNEL试剂盒进行染色,抗荧光淬灭封片液封片后在显微镜下观察细胞,计算高倍视野下凋亡细胞数占总细胞数的比例,即为凋亡率。

1.5 氧化应激指标的检测

细胞接种在6孔培养板并干预24 h后,弃去培

培养基、保留细胞,用磷酸盐缓冲液漂洗 2 遍后加入蛋白裂解液,用细胞刮刀充分破碎细胞并提取蛋白质后,采用 BCA 蛋白定量试剂盒检测总蛋白含量,采用化学法试剂盒检测活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的含量,采用硫代巴比妥酸法试剂盒检测丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 的含量,采用酶联免疫吸附法试剂盒检测 8-羟基脱氧鸟苷 (8-hydroxydeoxyguanosine, 8-OHdG) 的含量,采用比色法试剂盒检测总抗氧化能力 (T-AOC); 计算每毫克总蛋白中 ROS、MDA、8-OHdG、T-AOC 的含量。

1.6 基因蛋白表达的检测

采用 1.5 相同的方法收集细胞并提取蛋白,高温变性蛋白样本后,取 40 μg 总蛋白加入 SDS-聚丙烯酰胺分离凝胶中,电泳分离不同分子量的蛋白质后进行电转膜,将分离凝胶中的蛋白样本转移至 NC 膜后将 NC 膜放入 5% 脱脂牛奶中封闭 2 h,而后根据抗体说明书中蛋白的分子量对 NC 膜进行裁剪,分别在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 Caspase-3、Cyt-C、Bax、Bcl-2、p-AMPK、SIRT1 的第一抗体过夜。第二天,取出 NC 膜并用 TBST 漂洗 3 遍,而后在室温孵育第二抗体 2 h,再次用 TBST 漂洗 3 遍,最后在化学显影液中曝光得到蛋白条带,根据灰度值计算蛋白表达水平。

1.7 统计学方法

采用 SPSS22.0 软件录入数据,计量资料经方差齐性检验、符合方差齐性后以 $\bar{x} \pm s$ 表示、用方差分

析比较组间差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞增殖活力及凋亡率的比较

与常氧组比较,缺氧组 OD₄₉₀ 值明显降低、凋亡率明显增加;与缺氧组比较,0.5 NAC 组、1.0 NAC 组 OD₄₉₀ 值明显增加、凋亡率明显降低;与 1.0 NAC 组比较,NAC+8-bAMP 组 OD₄₉₀ 值明显降低、凋亡率明显增加 ($P < 0.05$, 表 1、图 1)。提示缺氧能够抑制细胞增殖,促进细胞凋亡,NAC 能够在缺氧环境下发挥保护作用,促进细胞增殖,抑制细胞凋亡。

表 1. 各组细胞增殖活力及凋亡率的比较

Table 1. Comparison of cell proliferation activity and apoptosis rate in each group

分组	<i>n</i>	OD ₄₉₀	凋亡率 (%)
常氧组	5	1.02 \pm 0.18	9.19 \pm 1.38
缺氧组	5	0.41 \pm 0.08 ^a	32.31 \pm 6.84 ^a
0.5 NAC 组	5	0.59 \pm 0.07 ^b	20.29 \pm 4.27 ^b
1.0 NAC 组	5	0.89 \pm 0.15 ^b	15.62 \pm 2.42 ^b
NAC+8-bAMP 组	5	0.68 \pm 0.10 ^c	22.31 \pm 4.29 ^c

a 为 $P < 0.05$, 与常氧组比较; b 为 $P < 0.05$, 与缺氧组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 1.0 NAC 组比较。

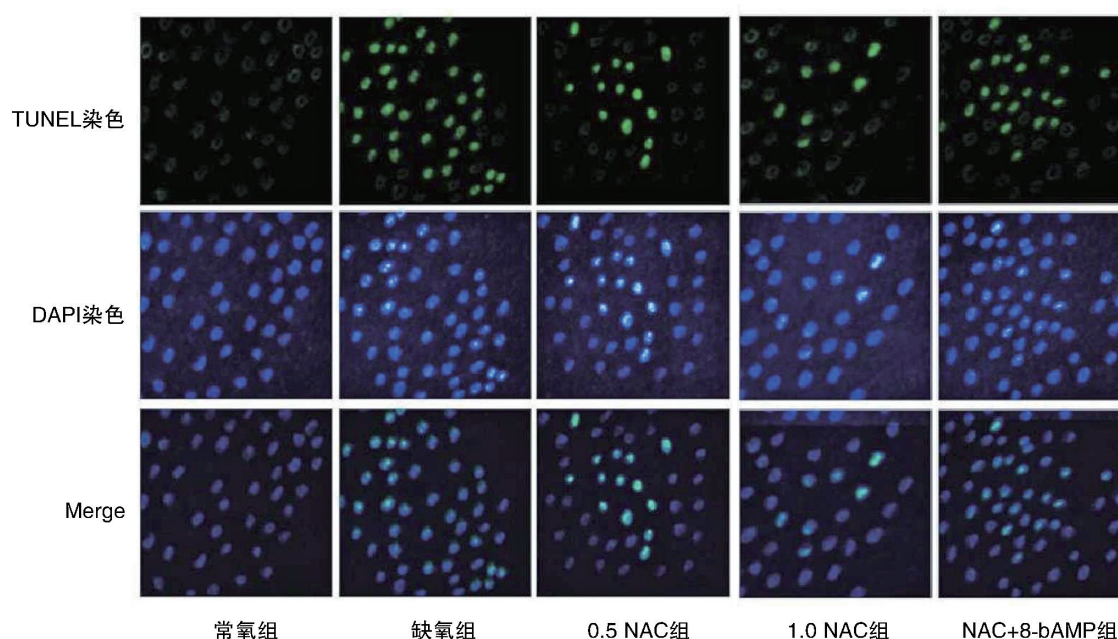


图 1. 各组细胞增殖活力及凋亡率的比较 (TUNEL 染色和 DAPI 染色, 400 \times)

Figure 1. Comparison of cell proliferation activity and apoptosis rate in each group (TUNEL staining and DAPI staining, 400 \times)

2.2 各组细胞中氧化应激指标的比较

与常氧组比较,缺氧组细胞中 ROS、MDA、8-OHdG 的含量明显增加,T-AOC 的含量明显减少;与缺氧组比较,0.5 NAC 组、1.0 NAC 组细胞中 ROS、MDA、8-OHdG 的含量明显减少,T-AOC 的含

量明显增加;与 1.0 NAC 组比较,NAC+8-bAMP 组细胞中 ROS、MDA、8-OHdG 的含量明显增加,T-AOC 的含量明显减少($P<0.05$,表 2)。提示缺氧能够激活细胞的氧化应激反应,NAC 能够在缺氧环境下发挥保护作用,减轻氧化应激反应。

表 2. 各组细胞中氧化应激指标的比较

Table 2. Comparison of oxidative stress index in each group

分组	<i>n</i>	ROS (kU/gPro)	MDA (mmol/gPro)	8-OHdG (μ g/gPro)	T-AOC (kU/gPro)
常氧组	5	0.72 \pm 0.12	1.88 \pm 0.31	2.33 \pm 0.51	25.12 \pm 4.58
缺氧组	5	2.51 \pm 0.52 ^a	5.41 \pm 0.83 ^a	10.39 \pm 1.84 ^a	10.31 \pm 1.88 ^a
0.5 NAC 组	5	1.94 \pm 0.34 ^b	3.91 \pm 0.72 ^b	7.41 \pm 0.94 ^b	16.51 \pm 2.39 ^b
1.0 NAC 组	5	1.26 \pm 0.21 ^b	2.44 \pm 0.42 ^b	4.52 \pm 0.78 ^b	20.32 \pm 4.86 ^b
NAC+8-bAMP 组	5	2.03 \pm 0.41 ^c	4.18 \pm 0.71 ^c	8.03 \pm 1.26 ^c	13.42 \pm 2.14 ^c

a 为 $P<0.05$,与常氧组比较;b 为 $P<0.05$,与缺氧组比较;c 为 $P<0.05$,与 1.0 NAC 组比较。

2.3 各组细胞中凋亡基因的比较

与常氧组比较,缺氧组细胞中 Caspase-3、Cyt-C、Bax 的表达量明显增加,Bcl-2 的表达量明显减少;与缺氧组比较,0.5 NAC 组、1.0 NAC 组细胞中 Caspase-3、Cyt-C、Bax 的表达量明显减少,Bcl-2 的表达量明显增加;与 1.0 NAC 组比较,NAC+8-bAMP 组细胞中 Caspase-3、Cyt-C、Bax 的表达量明显增加,Bcl-2 的表达量明显减少($P<0.05$,图 2、表 3)。提示缺氧能够增加促凋亡基因表达,抑制抗凋亡基因表达,NAC 能够在缺氧环境下发挥保护作用,减少促凋亡基因表达,增加抗凋亡基因表达。

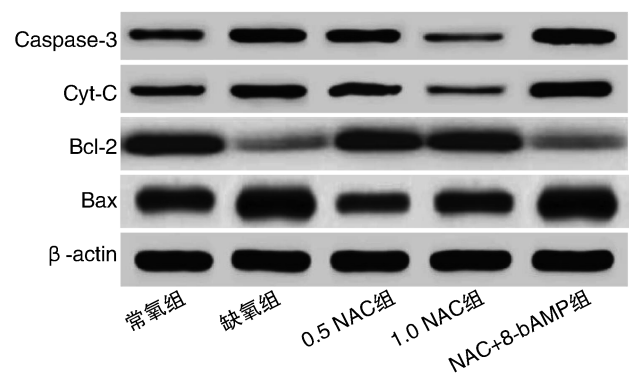


图 2. 各组细胞中凋亡基因的比较

Figure 2. Comparison of apoptotic genes in different groups of cells

表 3. 各组细胞中凋亡基因表达的比较

Table 3. Comparison of apoptosis genes expression in cells among 5 groups

分组	<i>n</i>	Caspase-3	Cyt-C	Bcl-2	Bax
常氧组	5	1.00 \pm 0.19	1.00 \pm 0.12	1.00 \pm 0.16	1.00 \pm 0.20
缺氧组	5	2.23 \pm 0.34 ^a	1.87 \pm 0.25 ^a	0.29 \pm 0.06 ^a	2.15 \pm 0.36 ^a
0.5 NAC 组	5	1.91 \pm 0.26 ^b	1.71 \pm 0.22 ^b	1.01 \pm 0.19 ^b	1.03 \pm 0.18 ^b
1.0 NAC 组	5	0.89 \pm 0.15 ^b	0.81 \pm 0.14 ^b	1.12 \pm 0.18 ^b	0.93 \pm 0.14 ^b
NAC+8-bAMP 组	5	2.18 \pm 0.34 ^c	2.03 \pm 0.34 ^c	0.54 \pm 0.09 ^c	1.91 \pm 0.32 ^c

a 为 $P<0.05$,与常氧组比较;b 为 $P<0.05$,与缺氧组比较;c 为 $P<0.05$,与 1.0 NAC 组比较。

2.4 各组细胞中 p-AMPK、SIRT1 的比较

与常氧组比较,缺氧组细胞中 AMPK、SIRT1 的表达量明显减少;与缺氧组比较,0.5 NAC 组、1.0 NAC 组细胞中 AMPK、SIRT1 的表达量明显增加;与 1.0 NAC 组比较,NAC+8-bAMP 组细胞中 AMPK、SIRT1 的表达量明显减少($P<0.05$,图 3、表 4)。提

示缺氧能够抑制 AMPK/SIRT1 通路,NAC 能够在缺氧环境下发挥保护作用,激活 AMPK/SIRT1 通路。

3 讨论

脑血管内皮细胞损伤是缺血性脑血管疾病发

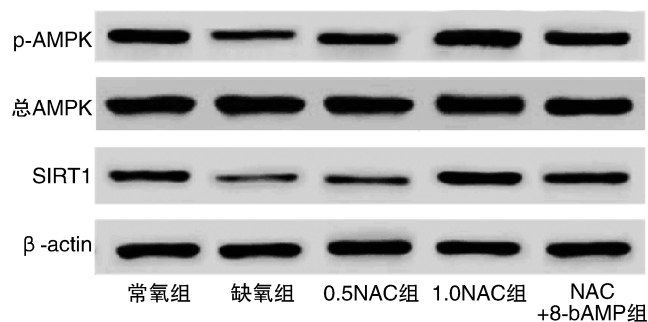


图 3. 各组细胞中 AMPK、SIRT1 的比较

Figure 3. Comparison of AMPK and SIRT1 in each group

表 4. 各组细胞中 AMPK、SIRT1 表达的比较

Table 4. Comparison of AMPK and SIRT1 expression in each group

分组	n	p-AMPK	SIRT1
常氧组	5	1.00±0.17	1.00±0.20
缺氧组	5	0.38±0.08 ^a	0.43±0.07 ^a
0.5 NAC 组	5	0.79±0.12 ^b	0.59±0.08 ^b
1.0 NAC 组	5	1.21±0.19 ^b	1.31±0.19 ^b
NAC+8-bAMP 组	5	0.89±0.12 ^c	0.90±0.14 ^c

a 为 $P<0.05$, 与常氧组比较; b 为 $P<0.05$, 与缺氧组比较; c 为 $P<0.05$, 与 1.0 NAC 组比较。

生发展过程中的重要病理环节,缺血缺氧引起的脑血管内皮细胞损伤能够造成血管过度收缩、阻碍缺血病灶周围侧枝循环建立,进而加重缺血缺氧所导致的神经损害。本实验分离培养了 SD 大鼠的脑血管内皮细胞,在缺氧条件下培养并观察到细胞的增殖活力下降、凋亡率增加,表明缺氧能够引起脑血管内皮细胞损伤、表现为增殖抑制及凋亡加剧。NAC 是含有巯基的还原化合物,作为前体参与还原型谷胱甘肽的生物合成并起到抗氧化、抗凋亡作用。该药物已经被证实多种心脑血管疾病中起到保护作用^[7-8],为了明确 NAC 对缺血性脑血管疾病发生发展过程中脑血管内皮损伤的保护作用,本实验将 NAC 用于缺氧环境下脑血管内皮细胞的干预,在 NAC 干预后,不同剂量 NAC+缺氧组细胞的增殖活力高于缺氧组、凋亡率低于缺氧组,表明 NAC 能够减轻缺氧诱导的脑血管内皮细胞损伤、表现为促进增殖及抑制凋亡。

氧化应激及线粒体途径凋亡是细胞在缺血缺氧病理条件下发生损伤的重要病理环节^[9-11]。在氧化应激过程中,具有强氧化性的 ROS 大量产生,攻击细胞内的脂质及核酸,导致细胞损伤的同时一方面引起氧化产物 MDA 及 8-OHdG 的生成、另一方面

引起抗氧化物的消耗及 T-AOC 的下降^[12]。在线粒体途径凋亡过程中,线粒体内的 Cyt-C 释放进入胞质并启动 Caspase-3 的活化及细胞凋亡;Bax 和 Bcl-2 是调节线粒体膜对 Cyt-C 通透性的分子,前者增加 Cyt-C 释放并促进线粒体途径凋亡、后者抑制 Cyt-C 释放并阻碍线粒体途径凋亡^[13-14]。在本实验中,缺氧组细胞内 ROS、MDA、8-OHdG 的含量及 Caspase-3、Cyt-C、Bax 的表达明显增多,而 T-AOC 的含量及 Bcl-2 的表达明显减少,表明缺氧能够促进脑血管内皮细胞的氧化应激及凋亡。在 NAC 干预后,不同剂量 NAC+缺氧组细胞内 ROS、MDA、8-OHdG 的含量及 Caspase-3、Cyt-C、Bax 的表达明显低于缺氧组,而 T-AOC 的含量及 Bcl-2 的表达明显高于缺氧组,表明 NAC 对缺氧诱导的脑血管内皮细胞氧化应激及凋亡均具有显著的抑制作用,通过抑制氧化应激及凋亡能够起到细胞保护作用。

在明确 NAC 能够减轻缺氧诱导的脑血管内皮细胞损伤及氧化应激、凋亡后,本实验进一步对可能的分子机制进行了探究。AMPK/SIRT1 是细胞内感受能量代谢的通路,心肌组织、脑组织、肾脏组织在经历缺血缺氧后的 AMPK 表达明显增多^[15-17]。本实验对脑血管内皮细胞中 AMPK/SIRT1 通路的分析显示,缺氧组细胞中 p-AMPK、SIRT1 的表达明显减少,而在 NAC 干预后不同剂量 NAC+缺氧组细胞中 p-AMPK、SIRT1 的表达明显高于缺氧组,表明缺氧能够使脑血管内皮细胞中 AMPK/SIRT1 通路受到抑制、而 NAC 干预能够激活 AMPK/SIRT1 通路,进而推测激活 AMPK/SIRT1 通路参与了 NAC 所发挥的脑血管内皮细胞保护作用。为了验证这一推测,本实验在 NAC 干预的同时联合使用了 AMPK 的抑制剂 8-bAMP,在加用 8-bAMP 后,NAC 减轻细胞损伤、抑制细胞凋亡及氧化应激的作用均发生了逆转,由此说明 NAC 通过 AMPK/SIRT1 通路发挥对脑血管内皮细胞的保护作用。

综上所述,NAC 能够减轻缺氧诱导的脑血管内皮细胞损伤并抑制缺氧过程中的氧化应激及凋亡,激活 AMPK/SIRT1 通路是 NAC 发挥上述保护作用的分子机制。

[参考文献]

- [1] Koge J, Kato S, Hashimoto T, et al. Vessel wall injury after stent retriever thrombectomy for internal carotid artery occlusion with duplicated middle cerebral artery[J]. World Neurosurg, 2019, 123: 54-58.
- [2] Kawano T, Miyashita K, Takeuchi M, et al. Blood biomar-

- kers associated with neurological deterioration in patients with acute penetrating artery territory infarction: a multicenter prospective observational study [J]. *Int J Stroke*, 2018, 13(2): 207-216.
- [3] Shieh P, Jan CR, Liang WZ. The protective effects of the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) against oxidative stress-associated apoptosis evoked by the organophosphorus insecticide malathion in normal human astrocytes [J]. *Toxicology*, 2019, 1(417): 1-14.
- [4] Onk D, Özçelik F, Onk OA, et al. Assessment of renal and hepatic tissue-protective effects of N-acetylcysteine via ammonia metabolism: a prospective randomized study [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 15(24): 1540-1546.
- [5] Cai Z, Shi T, Zhuang R, et al. Protective effect of N-acetylcysteine activated carbon release microcapsule on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(2): 1809-1818.
- [6] 陈立杰, 杨雪华, 王成雅, 等. N-乙酰半胱氨酸对高糖合并缺血缺氧小胶质细胞中 Toll 样受体 4 通路的作用研究 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2018, 20(9): 981-985.
- [7] Uemura T, Watanabe K, Ko K, et al. Protective effects of brain infarction by N-acetylcysteine derivatives [J]. *Stroke*, 2018, 49(7): 1727-1733.
- [8] Dłudla PV, Dias SC, Obonye N, et al. A systematic review on the protective effect of N-acetyl cysteine against diabetes-associated cardiovascular complications [J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2018, 18(4): 283-298.
- [9] Mentek M, Morand J, Baldazza M, et al. Chronic intermittent hypoxia alters rat ophthalmic artery reactivity through oxidative stress, endothelin and endothelium-derived hyperpolarizing pathways [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59(12): 5256-5265.
- [10] Avezov K, Aizenbud D, Lavie L. Intermittent hypoxia induced formation of "endothelial cell-colony forming units (EC-CFUs)" is affected by ROS and oxidative stress [J]. *Front Neurol*, 2018, 14(9): 447.
- [11] Ma X, Wang J, Li J, et al. Loading miR-210 in endothelial progenitor cells derived exosomes boosts their beneficial effects on hypoxia/reoxygenation-injured human endothelial cells via protecting mitochondrial function [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(2): 664-675.
- [12] Sada K, Nishikawa T, Kukidome D, et al. Hyperglycemia induces cellular hypoxia through production of mitochondrial ROS followed by suppression of aquaporin-1 [J]. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0158619.
- [13] Cao Y, Jiang Z, Zeng Z, et al. Bcl-2 silencing attenuates hypoxia-induced apoptosis resistance in pulmonary microvascular endothelial cells [J]. *Apoptosis*, 2016, 21(1): 69-84.
- [14] Fadda LM, Attia HA, Al-Rasheed NM, et al. Roles of some antioxidants in modulation of cardiac myopathy induced by sodium nitrite via down-regulation of mRNA expression of NF- κ B, Bax, and flt-1 and suppressing DNA damage [J]. *Saudi Pharm J*, 2018, 26(2): 217-223.
- [15] Kosuru R, Cai Y, Kandula V, et al. AMPK contributes to cardioprotective effects of pterostilbene against myocardial ischemia-reperfusion injury in diabetic rats by suppressing cardiac oxidative stress and apoptosis [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(4): 1381-1397.
- [16] Wen ZW, Liang DS, Cai XH, et al. The role of AMPK/mTOR signal pathway in brain injury following chronic intermittent hypoxia in growing rats [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(4): 1071-1077.
- [17] Li H, Satriano J, Thomas JL, et al. Interactions between HIF-1 α and AMPK in the regulation of cellular hypoxia adaptation in chronic kidney disease [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2015, 309(5): F414-428.
- (此文编辑 朱雯霞)