

钙离子超载在镉致大鼠肝细胞凋亡中的作用

汪纪仓^{1,2}, 孙 娅², 宋瑞龙², 卞建春², 刘宗平^{2*}

(1. 河南科技大学动物科技学院, 洛阳 471003; 2. 扬州大学兽医学院, 扬州 225009)

摘要: 拟探讨 Ca^{2+} 超载在镉诱导大鼠肝细胞凋亡中的作用。采用两步灌注法获得大鼠肝细胞, 经过 24 h 培养, 用醋酸镉、醋酸镉与 Bapta-AM 共同处理肝细胞。用 MTT 法检测细胞存活率, 倒置显微镜和荧光显微镜观察细胞形态和凋亡, 流式细胞仪检测细胞内 Ca^{2+} 浓度、ROS 生成和 $\Delta\Psi_m$ 变化。结果表明, 随着镉剂量的增加和作用时间的延长, 细胞变形, 坏死细胞和凋亡细胞增多, 镉可极显著提高细胞内 Ca^{2+} 浓度和 ROS 生成量 ($P < 0.01$), 极显著降低线粒体膜电位 ($P < 0.01$), Bapta-AM 可显著 ($P < 0.05$) 或极显著 ($P < 0.01$) 降低镉的毒性。研究结果提示 Ca^{2+} 超载在镉致肝细胞凋亡中发挥重要作用。

关键词: 镉; 大鼠; 肝细胞; Ca^{2+} ; 细胞凋亡

中图分类号: S856.9

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)08-1168-07

Cadmium Induced Apoptosis in Rat Hepatocytes by Calcium Overloading

WANG Ji-cang^{1,2}, SUN Ya², SONG Rui-long², BIAN Jian-chun², LIU Zong-ping^{2*}

(1. College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China; 2. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: The aims of this study were to explore the effect of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ on the apoptosis of rat hepatocytes induced by cadmium. Rat hepatocytes were isolated by a two-step perfusion technique. After 24 h planting, hepatocytes were treated with cadmium in the presence or absence of Bapta-AM. Cell viability was evaluated with a colorimetric using MTT level. Cell morphology and apoptosis were photographed under inverted and fluorescence microscope. $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ROS generation and $\Delta\Psi_m$ collapse were evaluated with flow cytometry. The results showed sharp deformation, necrosis and apoptosis in hepatocytes with the dose of Cd increased and time prolonged. Cd induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increased, $\Delta\Psi_m$ collapse and ROS generation ($P < 0.01$). Bapta-AM effectively inhibited Cd-induced cytotoxicity ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). It was showed that cadmium induced apoptosis in rat hepatocytes by calcium overloading.

Key words: cadmium; rat; hepatocytes; Ca^{2+} ; apoptosis

镉是电池、合金等工业上广泛应用的重金属, 并且也是食物中存在的污染物。镉对目标器官有潜在的致癌性^[1], 其致癌效应与其干扰 p53 蛋白表达有关, 国际肿瘤研究机构(IARC)将其列为 I 类致癌物^[2]。 Ca^{2+} 是细胞内重要的信号传导因子, 细胞内

游离钙离子浓度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)的变化在细胞生理过程中具有重要作用, 许多细胞以 Ca^{2+} 作为第二信使传递胞内信息, 诱发一系列的细胞形态、生理和分子生物学事件的发生, 它在细胞增殖、分化、成长和死亡过程中均发挥重要作用, 因此 Ca^{2+} 稳态失调会引起

收稿日期: 2011-01-06

基金项目: 江苏省高校“青蓝工程”中青年学术带头人培养对象资助项目(2006); 江苏省自然科学基金资助项目(BK2008214); 河南科技大学博士科研启动基金资助(09001489)

作者简介: 汪纪仓(1977-), 男, 河南南阳人, 讲师, 博士, 主要从事动物中毒病与营养代谢病研究

* 通讯作者: 刘宗平, E-mail: liuzongping@yzu.edu.cn

细胞凋亡^[3-4]。研究表明镉可引起多种细胞凋亡和死亡,镉的细胞毒理作用与细胞内的 Ca^{2+} 动态平衡有关,镉可以竞争性地减少细胞外的 Ca^{2+} 内流或者通过其它途径增加细胞内 Ca^{2+} 水平,可以通过钙或氧化还原途径改变凋亡等基因的表达,可以干扰钙、锌和铜等必需金属的吸收,尤其是肝细胞的 Ca^{2+} ^[5-6]。

镉可引起大鼠肝细胞凋亡且呈剂量依赖关系^[7]。 Ca^{2+} 稳态失调是细胞凋亡过程中普遍存在的生化事件^[8-14],镉引起多种细胞凋亡^[4,9-10]与其 Ca^{2+} 稳态失调密切相关。但镉引起大鼠肝细胞凋亡是否与钙稳态相关未见报道。本研究以大鼠肝细胞为研究对象,细胞用镉和钙离子抑制剂 Bapta-AM 处理,通过测定肝细胞形态和凋亡、细胞存活率、 $[\text{Ca}^{2+}]$,以及活性氧(ROS)和线粒体膜电位($\Delta\Psi\text{m}$)的变化。探讨钙稳态在镉诱导肝细胞凋亡中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD 大鼠,180~220 g,雄性,清洁级,扬州大学医学院实验动物中心提供。

1.2 主要试剂和仪器

Leibovitz-15(L-15)培养基(Invitrogen),2',7'-二氯二氧荧光素二乙酸酯(DCFH₂-DA,2',7'-Dichlorofluorescein diacetate)、罗丹明 123(Rhodamine 123,R123)、钙离子探针 Fluo-4-AM(Invitron 公司)、钙离子抑制剂 Bapta-AM(瑞士 Alexis)、醋酸镉、胰岛素、地塞米松、青霉素、链霉素(美国 Sigma-Aldrich),Trypsin、MTT、牛血清白蛋白(BSA)(Amresco),胎牛血清(FBS)(杭州四季青),其他试剂均为国产分析纯。

FACSAria 型流式细胞仪(美国 Becton-Dickinson),80i 型荧光显微镜(日本 Nikon),Sunrise-basic 型酶标仪(澳大利亚 Tecan)等。

1.3 大鼠肝细胞的分离与培养

大鼠肝细胞的分离参照裔传卉等^[15]的两步灌注法。收集肝细胞于含 10% 胎牛血清、0.8 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰岛素、0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 地塞米松、100 $\text{kIU} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素和 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素的 L-15 培养基中,台盼蓝排斥法检测细胞存活率并作细胞计数。细胞活力大于 90% 者用于后续试验。调整细胞密度接种于铺鼠尾胶原的培养板中,于 37 °C、5% CO_2 环境中培

养。接种后 4 h 换液去除未贴壁及死细胞,继续培养 20 h 进行试验。

1.4 细胞处理

将培养 24 h 的单层肝细胞,单独添加醋酸镉,或在添加醋酸镉的同时加入 Bapta-AM,并设空白对照组,置于 37 °C、5% CO_2 环境中继续培养,在一定时间检测相关指标。

1.5 醋酸镉、醋酸镉和 Bapta-AM 对细胞形态、细胞凋亡、细胞内 Ca^{2+} 含量、ROS、 $\Delta\Psi\text{m}$ 变化的影响

2.5、5.0、10.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的醋酸镉作用于肝细胞不同时间,作用结束后,用倒置显微镜观察细胞形态;用 Hoechst33258 染色法并用荧光显微镜观察细胞凋亡^[9];用 Fluo-4-AM 标记细胞,检测细胞内 Ca^{2+} 的含量^[9];用 DCFH₂-DA 和 R123 分别标记细胞^[16],检测细胞内 ROS 水平和 $\Delta\Psi\text{m}$ 的变化。同时用醋酸镉和 Bapta-AM 处理细胞,检测上述指标变化。

1.6 统计分析

所测数据以平均数±标准差表示,采用 *t*-检验进行差异显著性分析。

2 结果

2.1 镉和 Bapta-AM 对细胞存活率的影响

镉和/或 Bapta-AM 共同作用细胞 24 h 时,Bapta-AM 对细胞存活率没有影响,Bapta-AM 能够显著提高镉处理组细胞的存活率($P < 0.05$)(表 1)。

表 1 Bapta-AM 对镉致细胞存活率的影响(24 h, $n=8$)

Table 1 Effects of Bapta-AM on Cd-induced cell viability in hepatocytes (24 hour's treatment)

细胞处理 Treatment	细胞存活率 Cell survival rate
Control	100.00±7.83
5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Bapta-AM	102.89±12.10
10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd	52.20±3.88**
Cd+Bapta-AM	59.71±7.09#

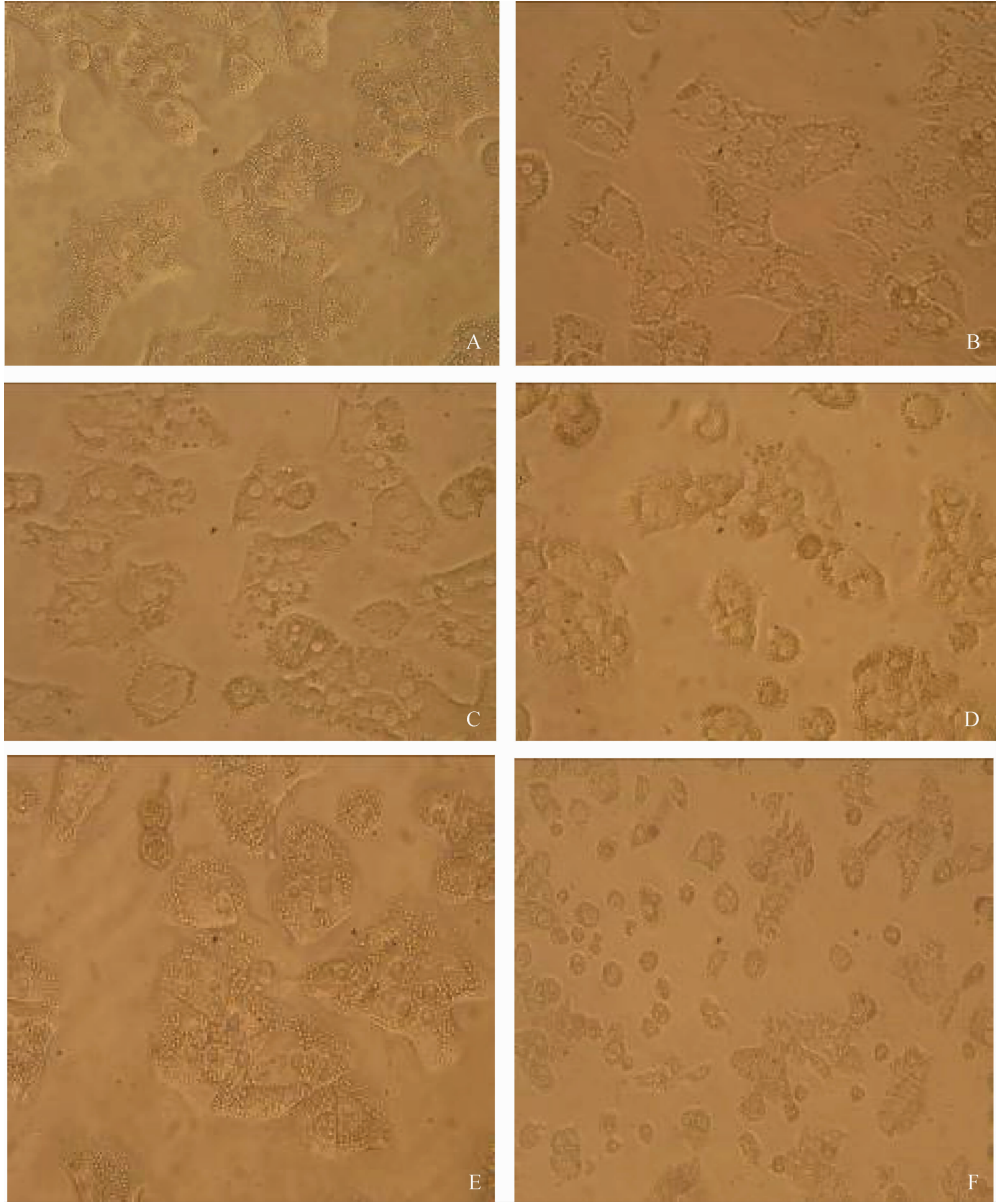
与对照组比较, ** . $P < 0.01$; 与染镉组比较, # . $P < 0.05$
** . $P < 0.01$ vs. untreated control, # . $P < 0.05$ vs. Cd treated hepatocytes

2.2 镉和 Bapta-AM 对细胞形态的影响

如图 1 所示,镉和 Bapta-AM 共同作用于肝细胞 24 h,随着镉剂量的增大,肝细胞急剧变形,表现

为细胞皱缩、收缩变圆和与邻近细胞分离,细胞间隙增大,坏死细胞增多,10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd 剂量组更显著,胞核破碎消失。Bapta-AM 对细胞形态无影响,

但可使染镉组细胞形态趋于完整、变形细胞和死亡细胞减少,许多胞核清晰可见,但细胞形态不能恢复到对照组水平。



0~10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 镉和 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Bapta-AM 共同作用肝细胞 24 h。A. 对照组;B. 2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd;C. 5.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd;D. 10.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd;E. 5.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Bapta-AM;F. 10.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd+5.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Bapta-AM
Hepatocytes treated with 0-10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd for 24 h. A. Control; B. 2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd; C. 5.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd; D. 10.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd; E. 5.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Bapta-AM; F. 10.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd+5.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Bapta-AM

图 1 镉和 Bapta-AM 对肝细胞形态的影响(200 \times)

Fig. 1 Effect of Bapta-AM on Cd-induced morphological characteristics in hepatocytes (200 \times)

2.3 镉和 Bapta-AM 对细胞凋亡的影响

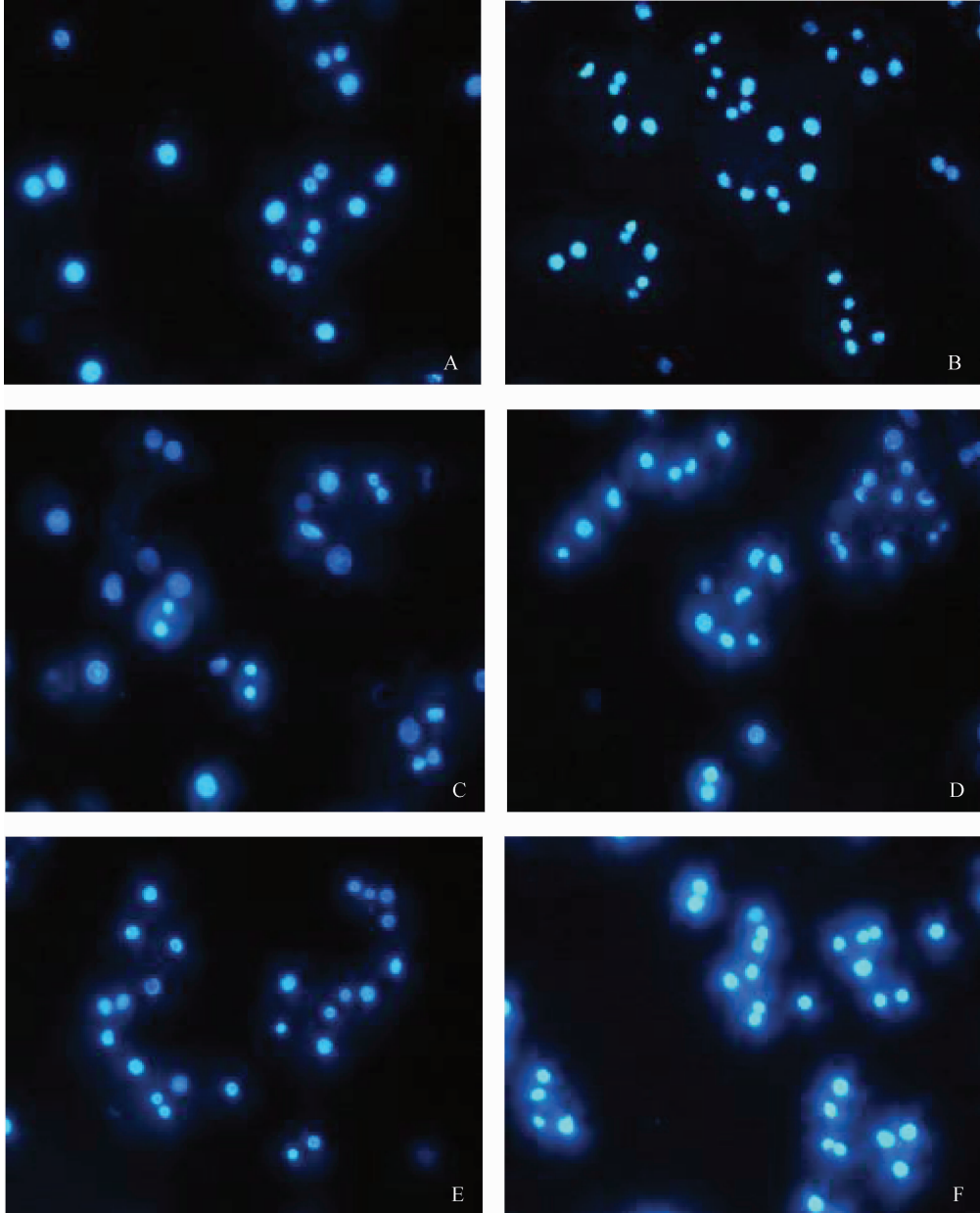
由图 2 可见,镉和/或 Bapta-AM 共同作用肝细胞 24 h,对照组细胞核呈圆形或卵圆形,染色质均匀分布;染毒组出现染色质浓缩,细胞核缩小,

有的呈新月形,出现凋亡小体,甚至出现核碎裂,且随着剂量的增大,凋亡细胞明显增多。Bapta-AM 不引起细胞凋亡,并可使染镉组凋亡细胞显著减少。

2.4 镉和 Bapta-AM 对 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响

如表 2 所示,镉作用肝细胞 1.5 h 时,各剂量组 $[Ca^{2+}]_i$ 极显著升高 ($P < 0.01$),呈剂量关系。但随着时间的延长, $[Ca^{2+}]_i$ 水平迅速下降,6 h 后即降至对照组水平附近,6、12 和 24 h 镉处理组 $[Ca^{2+}]_i$ 与对

照组相比差异不显著 ($P > 0.05$)。5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Bapta-AM 和 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的镉共同作用于细胞 1.5 h, Bapta-AM 可以极显著降低由 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 镉引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高 ($P < 0.01$) (表 3)。



不同浓度镉和 Bapta-AM 作用肝细胞 24 h, Hoechst 33258 染色。A. 对照组; B. 2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd; C. 5.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd; D. 10.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd; E. 5.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Bapta-AM; F. 10.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd + 5.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Bapta-AM
Hepatocytes treated with Cd for 24 h, Hoechst 33258 stain. A. control; B. 2.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd; C. 5.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd; D. 10.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd; E. 5.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Bapta-AM; F. 10.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd + 5.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Bapta-AM

图 2 镉和 Bapta-AM 对肝细胞凋亡的影响 (400 \times)

Fig. 2 Effect of Cd and Bapta-AM on nuclear chromatin condensation in hepatocytes (400 \times)

表 2 镉对 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响(相对对照组荧光强度, $n=3$)Table 2 Effect of Cd on $[Ca^{2+}]_i$ in hepatocytes (% of control)

Cd ²⁺ / ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	作用时间/h Time/h			
	1.5	6	12	24
0	100.00±10.54	100.00±6.00	100.00±2.02	100.00±5.05
2.5	131.76±4.42**	100.64±5.57	109.55±3.81	90.87±5.70
5	138.15±11.08**	85.72±11.68	101.45±4.28	88.60±6.68
10	161.19±7.41**	90.36±4.70	87.65±5.88	81.08±6.19

与对照组比较, * . $P<0.05$, ** . $P<0.01$

* . $P<0.05$, ** . $P<0.01$, as compared to the control group

表 3 Bapta-AM 对镉致 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响(相对对照组荧光强度, $n=3$)Table 3 Effect of Bapta-AM on $[Ca^{2+}]_i$ in hepatocytes (% of control)

细胞处理 Treatment	荧光强度 Fluorescent intensity
Control	100.00±4.94
5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Bapta-AM	109.30±11.22
10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd	135.99±7.03**
Cd+Bapta-AM	103.34±4.02##

与对照组比较, ** $P<0.01$; 与染镉组比较, ## $P<0.01$

** $P<0.01$ vs. untreated control, ## $P<0.01$ vs. Cd treat-

ted hepatocytes

2.5 镉和 Bapta-AM 对 ROS 生成、 $\Delta\Psi_m$ 变化的影响

镉和 Bapta-AM 共同作用于肝细胞 24 h, 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Bapta-AM 对肝细胞 ROS 生成无影响, 但与 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 镉共同作用可显著降低镉处理组细胞 ROS 水平 ($P<0.05$); 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Bapta-AM 对 $\Delta\Psi_m$ 没有显著影响, 但与 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 镉共同作用可极显著提高镉处理细胞的 $\Delta\Psi_m$ ($P<0.01$), 见表 4。

表 4 Bapta-AM 对镉致 ROS 和 $\Delta\Psi_m$ 的影响(相对对照组荧光强度, $n=3$)Table 4 Effects of Bapta-AM on Cd-induced ROS generation and $\Delta\Psi_m$ collapse (% of control)

细胞处理 Treatment	ROS	$\Delta\Psi_m$
Control	100.00±5.96	100.00±12.68
5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Bapta-AM	109.94±15.11	126.94±14.51
5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd	141.37±6.92**	56.73±3.53**
Cd+Bapta-AM	114.83±10.10#	94.92±11.80##

与空白对照组比较, ** . $P<0.01$; 与染镉组比较, # . $P<0.05$, ## . $P<0.01$

** . $P<0.01$ vs. untreated control, # . $P<0.05$, ## . $P<0.01$ vs. Cd treated hepatocytes

3 讨论

研究证明, 细胞凋亡与 $[Ca^{2+}]_i$ 的升高有关^[8, 17]。Ca²⁺ 引起的细胞凋亡与以下几个方面相关: 激活钙依赖性内源性核酸酶, 使 DNA 降解; 激活谷氨酰胺转移酶, 使胞质蛋白质交联, 形成凋亡小体; 激活钙-钙调素依赖的磷脂酶, 参与细胞凋亡

时的磷酸化过程; 激活钙依赖性中性蛋白酶, 使细胞骨架破坏, 细胞皱缩; 可直接作用于核内转录因子, 如 fos、jun 等; 激活其他一些钙离子敏感的蛋白激酶, 如降解核基质蛋白所需的酶^[18]。研究表明, 很多细胞在凋亡初期, $[Ca^{2+}]_i$ 迅速出现持续性升高, 随之出现核酸内切酶活化、DNA 降解和细胞死亡^[3]。Lemarie 等^[9]报道 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 镉可引起 Hep3B 细

胞 24 h 内 $[Ca^{2+}]_i$ 水平持续升高, $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 镉可使 10 h 内肝 L-02 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 持续升高^[10]。

本研究选用有强荧光强度的 Fluo-4/AM 作为分子探针检测 $[Ca^{2+}]_i$, 同时用 Ca^{2+} 抑制剂 Bapta-AM 和镉同时作用于细胞检测 $[Ca^{2+}]_i$ 等相关指标变化。Bapta-AM 可通过细胞膜进入细胞, 进入细胞后脂酶水解作用下释放出 Bapta 而与 Ca^{2+} 络合, 从而降低细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 。所以如果在镉作用下细胞内 Ca^{2+} 升高而导致如凋亡等生化现象的发生, 在镉作用同时加入 Bapta-AM 能使这些现象发生的程度降低或消失, 则说明钙稳态失调在这些现象发生中起重要作用。

试验表明镉可使肝细胞内 Ca^{2+} 浓度短暂性升高, 即 1.5 h 时 $[Ca^{2+}]_i$ 极显著升高 ($P < 0.01$), 呈剂量关系, 说明 $[Ca^{2+}]_i$ 升高是肝细胞凋亡的早期现象, 但 6、12 和 24 h 时各剂量组 $[Ca^{2+}]_i$ 与对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$)。这与 Lemarié 等^[9] 报道 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 镉可引起 Hep3B 细胞 24 h 内 $[Ca^{2+}]_i$ 水平持续升高、Ye 等^[10] 研究表明 $60 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 镉可使肝 L-02 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 10 h 内持续升高不同。这种差异与使用细胞类型、镉剂量浓度和作用时间等有关。在凋亡启动的过程中, 导致 $[Ca^{2+}]_i$ 稳态失调涉及到胞外 Ca^{2+} 内流、胞内钙库动员和空间分布的改变等^[3], 因此具体机制有待进一步探讨。同时 Bapta-AM 可以极显著降低镉引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高, 显著提高镉引起的细胞存活率降低, 明显改善镉暴露组细胞形态和使凋亡细胞明显减少, 说明镉引起 $[Ca^{2+}]_i$ 稳态失调是镉引发细胞凋亡的重要机制。

线粒体是生成 ROS 的场所^[19], ROS 在 III 型呼吸链中以过氧化物阴离子生成, 然后过氧化物歧化酶将过氧化物阴离子转化为 H_2O_2 , H_2O_2 可自由释放入细胞质。Lemarié 等^[9] 研究表明, 钙使 Hep3B 细胞线粒体内电子从电子传递链中逸出而形成 ROS, 线粒体抑制剂鱼藤酮和黄素蛋白抑制剂二联苯碘均可阻止镉引起的 ROS 生成, 说明镉可致线粒体生成 ROS。ROS 产生的氧化应激与 $[Ca^{2+}]_i$ 稳态密切相关, ROS 能直接损害线粒体、内质网及质膜上的 Ca^{2+} 转运系统, 导致胞内 Ca^{2+} 稳态失调^[20], 花生四烯酸的代谢产物氧化二十碳烯酸可使胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 升高而破坏 Ca^{2+} 稳态^[21], 但也有研究表明 $[Ca^{2+}]_i$ 升高早于并导致 ROS 生成^[22]。这些机制尚未完全阐明。镉引起凋亡的另一个重要原因是镉与细胞核和内质网中钙依赖性 ATP 酶的硫醇基团

结合而抑制其活性^[5], 导致细胞核内 $[Ca^{2+}]_i$ 的动态平衡而显著增加, 细胞质中 Ca^{2+} 的升高而导致其在线粒体体积聚使 $\Delta\Psi_m$ 下降^[9, 23] 并导致细胞凋亡, 而 $\Delta\Psi_m$ 是线粒体功能是否正常的一个重要指标。因此镉的毒性与其引起 $[Ca^{2+}]_i$ 升高、ROS 生成、线粒体功能紊乱(表现为 $\Delta\Psi_m$ 下降等)^[24-25] 并导致细胞凋亡密切相关。已有研究证明镉可引起大鼠肝细胞 ROS 生成并使 $\Delta\Psi_m$ 下降, 最终导致肝细胞凋亡^[26]。本试验条件下, Ca^{2+} 抑制剂 Bapta-AM 可显著降低镉致肝细胞 ROS 的生成量和阻止镉引起的 $\Delta\Psi_m$ 下降, 表明镉致 $[Ca^{2+}]_i$ 升高并通过损伤线粒体而导致 ROS 升高和 $\Delta\Psi_m$ 下降。

综上所述, 镉可导致大鼠肝细胞 Ca^{2+} 超载并通过损伤线粒体是引起肝细胞凋亡的重要原因。

参考文献:

- [1] WAALKES M P, COOGAN T P, BARTER R A. Toxicological principles of metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium [J]. *Crit Rev Toxicol*, 1992, 22(3-4): 175-201.
- [2] MÉPLAN C, MANN K, HAINAUT P. Cadmium induces conformational modifications of wild-type p53 and suppresses p53 response to DNA damage in cultured cells [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(44): 31663-31670.
- [3] 敖琳, 曹佳. 细胞凋亡中 Ca^{2+} 稳态失调机制的研究进展[J]. 国外医学分子生物学分册, 2001, 23(2): 106-109.
- [4] BIAGIOLI M, PIFFERI S, RAGGHIANI M, et al. Endoplasmic reticulum stress and alteration in calcium homeostasis are involved in cadmium-induced apoptosis[J]. *Cell Calcium*, 2008, 43(2): 184-195.
- [5] BEYERSMANN D, HECHTENBERG S. Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1997, 144(2): 247-261.
- [6] SHEN H, DONG S, ONG C. Critical role of calcium overloading in cadmium-induced apoptosis in mouse thymocytes [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2001, 171(1): 12-19.
- [7] 汪纪仓, 裔传卉, 邹辉, 等. 镉致大鼠肝细胞凋亡及 N-乙酰半胱氨酸的保护作用[J]. 中国兽医学报, 2010, 30(5): 665-668.
- [8] ORRENIUS S, MCCABE M, NICOTERA P. Ca^{2+} -dependent mechanisms of cytotoxicity and programmed cell death[J]. *Toxicol Lett*, 1992, 64/65:

- 357-364.
- [9] LEMARIÉA, LAGADIC G D, MORZADÉC C, et al. Cadmium induces caspase-independent apoptosis in liver Hep3B cells: role for calcium in signaling oxidative stress-related impairment of mitochondria and relocation of endonuclease G and apoptosis-inducing factor[J]. *Free Radical Bio Med*, 2004, 36(12): 1517-1531.
- [10] YE J, MAO W, WU A, et al. Cadmium-induced apoptosis in human normal liver L-02 cells by acting on mitochondria and regulating Ca^{2+} signals[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2007, 24(1):45-54.
- [11] LI L, CAO Z, JIA P, et al. Calcium signals and caspase-12 participated in paraoxon-induced apoptosis in EL4 cells[J]. *Toxicology in vitro*, 2010, 24(3): 728-736.
- [12] KOBAYASHI D, AHMED S, ISHIDA M, et al. Calcium/calmodulin signaling elicits release of cytochrome c during 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced apoptosis in the human lymphoblastic T-cell line, L-MAT[J]. *Toxicology*, 2009, 258(1): 25-32.
- [13] ZHANG H, DUNCAN G, WANG L, et al. Arsenic trioxide initiates ER stress responses, perturbs calcium signalling and promotes apoptosis in human lens epithelial cells[J]. *Exp Eye Res*, 2007, 85(6): 825-835.
- [14] ZHANG L, YANG H, ZHAO H, et al. Calcium-related signaling pathways contributed to dopamine-induced cortical neuron apoptosis[J]. *Neurochem Int*, 2011, 58(3): 281-294.
- [15] 裔传卉, 汪纪仓, 刘宗平. 大鼠原代肝细胞分离培养方法的改良[J]. *江苏农业科学*, 2009, (5): 201-203.
- [16] PATHAK N, KHANDELWAL S. Influence of cadmium on murine thymocytes: potentiation of apoptosis and oxidative stress[J]. *Toxicol Lett*, 2006, 165(2): 121-132.
- [17] REKASI Z, CZOMPOLY T, SCHALLY A, et al. Antagonist of growth hormone-releasing hormone induces apoptosis in LNCaP human prostate cancer cells through a Ca^{2+} -dependent pathway [J]. *PNAS*, 2005, 102(9):3435-3440.
- [18] 刘胜中, 杨双强. 细胞凋亡与心肌缺血/再灌注损伤[J]. *心血管病学进展*, 2007, 28(4): 613-617.
- [19] FLEURY C, MIGNOTTE B, VAYSSIERE J. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling[J]. *Biochimie*, 2002, 84(2-3): 131-141.
- [20] MACHO A, HIRSCHT, MARZO I, et al. Glutathione depletion is an early and calcium elevation is a late event of thymocyte apoptosis[J]. *J Immunol*, 1997, 158(10): 4612-4619.
- [21] HENNET T, RICHTER C, PETERHANS E. Tumour necrosis factor-alpha induces superoxide anion generation in mitochondria of L929 cells[J]. *Biochem J*, 1993, 289(Pt2): 587-592.
- [22] DREIEM A, SEEGAL R F. Methylmercury-induced changes in mitochondrial function in striatal synaptosomes are calcium-dependent and ROS-independent [J]. *Neurotoxicology*, 2007, 28(4): 720-726.
- [23] ORRENIUS S, ZHIVOTOVSKY B, NICOTERA P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link [J]. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2003, 4(7):552-565.
- [24] WTJEN W, BEYERSMANN D. Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: influence of oxidative stress[J]. *Biomaterials*, 2004, 17(1): 65-78.
- [25] OH S, LIM S. A rapid and transient ROS generation by cadmium triggers apoptosis via caspase-dependent pathway in HepG2 cells and this is inhibited through N-acetylcysteine-mediated catalase upregulation [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006, 212(3):212-223.
- [26] 汪纪仓, 卞建春, 刘学忠, 等. 氧化应激在镉致大鼠肝细胞凋亡中的作用[C]//中国畜牧兽医学学会第二届中国兽医临床大会论文集, 长春:中国畜牧兽医学学会, 2010: 324-330.

(编辑 白永平)