

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20160107001

张瑞刚, 仪慧兰. 活性氧和钙信号参与铅对酵母细胞的毒性作用[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(6): 128-133

Zhang R G, Yi H L. ROS and calcium signal is involved in lead toxicity in yeast cells [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2016, 11(6): 128-133

(in Chinese)

活性氧和钙信号参与铅对酵母细胞的毒性作用

张瑞刚, 仪慧兰*

山西大学生命科学学院, 太原 030006

收稿日期: 2016-01-07 录用日期: 2016-05-17

摘要: 以模式生物酵母菌为材料, 研究铅对细胞的毒性效应, 探讨胞内活性氧(ROS)和 Ca^{2+} 在铅诱导细胞死亡中的作用。结果显示, 浓度为 $5 \sim 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硝酸铅可降低酵母细胞活性, 诱导酵母细胞死亡, 随着铅浓度的提高和作用时间的延长, 细胞死亡率增高。在铅处理组酵母细胞中, ROS 和 Ca^{2+} 水平显著升高, 线粒体膜电位明显下降; 用 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的外源抗坏血酸(AsA)能降低铅引发的酵母细胞死亡, $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的钙离子螯合剂乙二醇四乙酸(EGTA)或 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的质膜 Ca^{2+} 通道特异性抑制剂氯化镧(LaCl_3)亦可明显抑制铅引起的酵母细胞死亡。研究结果表明, 铅诱发的酵母细胞死亡与处理组胞内 ROS 和 Ca^{2+} 升高有关, 高浓度的 Ca^{2+} 可能通过诱导线粒体膜通透性转变孔道开放, 或者高水平 ROS 可能损伤线粒体膜, 致线粒体膜电位下降, 继而激活相关下游信号导致细胞死亡。

关键词: 铅; 酵母; 细胞毒性; ROS; Ca^{2+}

文章编号: 1673-5897(2016)6-128-06 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

ROS and Calcium Signal is Involved in Lead Toxicity in Yeast Cells

Zhang Ruigang, Yi Huilan*

School of Life Sciences, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Received 7 January 2016 **accepted** 17 May 2016

Abstract: This paper was conducted to research the cellular toxicity of lead based on the model yeasts to explore the role that intracellular reactive oxygen species (ROS) and Ca^{2+} play in the mechanism of the cell death induced by lead. The results revealed that the cellular bioactivity of yeasts was inhibited by lead nitrate at the concentration from 5 to $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and the cell death induced by lead was found. Yeast cell mortality increases with the increase of lead concentration and the extension of time. The levels of ROS and Ca^{2+} elevated significantly and the mitochondrial membrane potential decreased dramatically in yeast cells under lead stress. Cell death induced by lead was decreased by ascorbic acid (AsA) at the concentration of $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ and was inhibited by the calcium chelator (EGTA) at the concentration of $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ or the specific inhibitor of plasma membrane Ca^{2+} channel (LaCl_3) at the concentration of $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. The results showed that cell death induced by lead was related to the levels of intracellular ROS and Ca^{2+} . The opening of mitochondrial membrane permeability transition pore channels may be

基金项目: 国家自然科学基金项目(No.30870454, 30470318, 31371868); 山西省科技攻关计划(No.20120322008-02); 山西省回国留学人员科研项目(No.2012013)

作者简介: 张瑞刚(1984-), 男, 博士, 研究方向为环境微生物, E-mail: zhangruigang1224@163.com;

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: yihl@sxu.edu.cn

induced by high levels of Ca^{2+} , or mitochondrial membranes were broken by high levels of ROS, which lead to decreasing membrane potential and cause cell death by activating down-stream relevant signal pathways.

Keywords: lead; yeast cell; cytotoxicity; ROS; Ca^{2+}

随着工业和交通业的发展,含铅废气、废水和废渣的排放量逐年增多,导致大气、水体和土壤中的铅含量不同程度超标。环境中高浓度的铅对人类、动物和植物均具有毒性作用。长期的铅暴露可引发人体神经系统、造血系统、消化系统以及生殖系统等的损伤,且铅蓄积还可致癌^[1]。研究发现,铅可以与人体内蛋白分子的羧基结合,影响细胞内正常钙代谢和凋亡相关基因 *Bcl-2*、*p53* 和 *Fas* 表达^[2-3];铅暴露能影响动物细胞、人体细胞和植物细胞的增殖、分化、DNA 复制和修复^[4-5],亦可致实验动物体内代谢紊乱、生殖细胞畸形,并可产生致死作用^[6]。高浓度铅可影响种子萌发,抑制植物生长,甚至引起植株死亡^[7]。因此,研究铅诱导细胞死亡的毒性机制具有重要意义。

铅的生物效应问题已在全世界范围内引起广泛关注。目前,关于铅毒性研究多集中于氧化损伤方面,铅可引起动植物细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平增高,由此引发膜脂、蛋白质、DNA 等生物大分子的氧化损伤,导致细胞死亡^[8-9]。但是,有关铅的氧化损伤机制还缺乏进一步探讨,在铅诱导真核细胞死亡过程中胞内 ROS 如何参与以及 ROS 和胞内 Ca^{2+} 信号转导之间的关系尚不清楚。

酵母是一种研究真核生物细胞学机制的模式生物,由于其简单的遗传背景,较短的生长周期等优点,已被广泛用于细胞分裂和死亡过程等复杂信号途径的研究^[10]。因此,本文以酵母细胞作为研究对象,探讨了在铅诱导酵母细胞死亡中 ROS 和 Ca^{2+} 信号的调控作用,旨在为揭示铅毒性作用机理提供科学依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 材料

酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) EGY48 菌株由浙江大学生命科学院朱睦元教授惠赠。

取单菌落至 YPD 液体培养基中活化过夜,转至新 YPD 液体中,于 30 ℃,200 r·min⁻¹ 下培养至对数期。

1.2 酵母细胞染毒

采用 1.5 mL 离心管收集对数期的酵母细胞,用灭菌磷酸缓冲液(PBS)洗涤并悬浮,使菌液细胞

浓度大约为 10⁶ cell·mL⁻¹。菌液中加入一定量的 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$,使处理浓度分别为 2、7、20、60 和 100 mg·L⁻¹,分别于 30 ℃,200 r·min⁻¹ 条件下处理 3、6 和 24 h。

干预组分别采用 1 mmol·L⁻¹ 抗坏血酸(AsA)、0.5 mmol·L⁻¹ 乙二醇双四乙酸(EGTA)和 0.1 mmol·L⁻¹ 氯化镧(LaCl_3)与 20 mg·L⁻¹ 或 60 mg·L⁻¹ $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 同时作用。处理 6 h 后,细胞经 PBS 洗涤备用。

1.3 细胞死亡率测定

采用美蓝染色法测定细胞死亡率,当美蓝进入活细胞时,由于活细胞新陈代谢旺盛,可将蓝色的美蓝还原为无色,而死细胞代谢作用微弱则呈蓝色或者浅蓝色。取酵母细胞进行染色,置于光学显微镜下观察并计数着色细胞和总细胞数,计算细胞死亡率(着色细胞数/总细胞数×100%)。每一处理组重复 3 次,每次观察至少 1 000 个细胞。

1.4 胞内 ROS、 Ca^{2+} 和线粒体膜电位水平的测定

用 PBS 制成体积 90 μL、细胞浓度 10⁶ cell·mL⁻¹ 的细胞悬液 3 份,各自分别加入体积 10 μL、浓度 50 μmol·L⁻¹ 特异性荧光染料二氯荧光黄双乙酸酯(DCFH-DA),体积 10 μL、浓度 50 μmol·L⁻¹ 的 Fluo-3AM 和体积 10 μL、浓度 100 μg·mL⁻¹ 罗丹明 123 (Rh123),用于检测胞内 ROS、 Ca^{2+} 和线粒体膜电位水平。用 BD Accuri C6 流式细胞仪(Becton Dickinson and Company, USA)进行检测,每个样品收集 50 000 个细胞,测其荧光强度变化。数据采集和分析分别用 CellQuest 3.1f 和 ModFitLT3.0 软件。

1.5 数据统计分析

采用 SPSS17.0 软件对实验结果进行方差分析,采用 Duncan 方法检验处理组与对照组差异显著性(* 表示差异显著, $P < 0.05$),以及干预组与铅单独处理组间的差异显著性(& 表示差异显著, $P < 0.05$)。

2 结果与分析 (Results and analysis)

2.1 铅对酵母细胞活性的影响

经美蓝染色后显微镜观察发现,对照组有个别细胞呈淡蓝色,而铅处理组中有较多细胞被染成蓝色,说明铅可对酵母细胞产生毒性,引发细胞死亡。从图 1 可看出,铅作用在 3~24 h 内,死亡率与铅离

子浓度呈现明显剂量效应关系,作用时间越长,死亡率越高;经 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硝酸铅作用 3 h 后,细胞死亡率为 2.3%,与对照无明显差异,但在 24 h 后死亡率达 5.85%,明显高于对照组; $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 硝酸铅处理 3 h 后死亡率为 33.81%,显著高于对照,表明铅对酵母细胞的毒性具有浓度和时间依赖性。

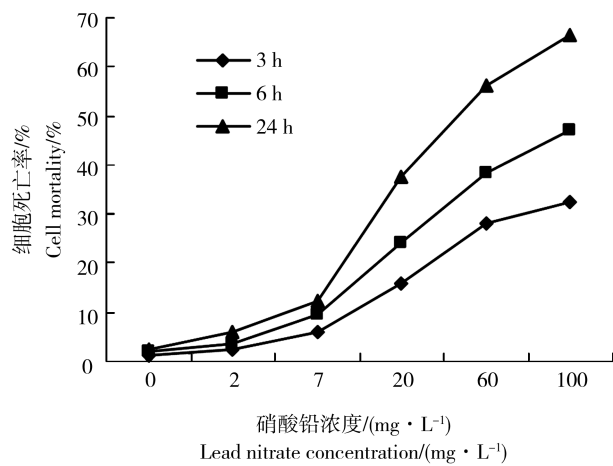


图 1 铅对酵母细胞的致死率

Fig. 1 Effects of lead on mortality of yeast cell

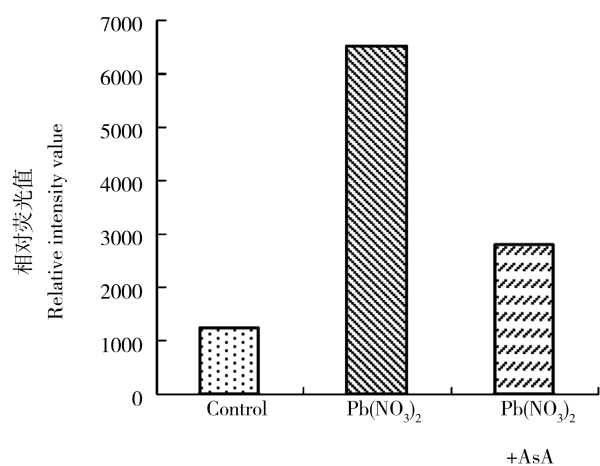


图 2 铅对酵母胞内活性氧(ROS)水平的影响

注: $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 处理组,浓度 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,处理时间为 6 h; $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2 + \text{AsA}$ 为干预组,AsA 表示抗坏血酸,浓度为 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 浓度为 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,处理时间为 6 h。

Fig. 2 Effects of lead on intracellular reactive oxygen species (ROS) levels in yeast cells

Note: $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ is the treatment group, with its concentration being $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ and the treatment time being 6 h. In comparison, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2 + \text{AsA}$ is the intervention group. In this group, the $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ concentration is $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, the ascorbic acid (AsA) concentration is $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, and the treatment time is 6 h.

2.2 ROS 参与铅诱导酵母细胞死亡

经用流式细胞仪检测酵母细胞内的 ROS 水平,发现 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 铅处理 6 h 后,胞内 ROS 水平明显增高(图 2),为对照组的 5.3 倍,而在铅处理液中加入外源抗氧化剂 AsA 可降低铅引发的胞内 ROS 水平。同时检测细胞死亡率,发现 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 AsA 与 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 或 $60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的铅同时作用时,细胞死亡率明显降低(图 3);表明铅处理组胞内 ROS 水平升高与铅对酵母细胞的毒性作用有关。

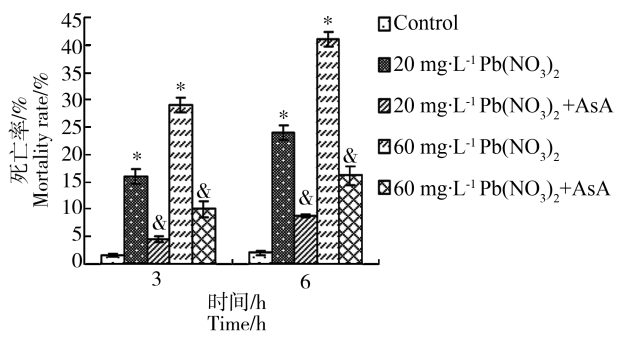


图 3 AsA 对铅毒性的干预作用

注: $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Pb}(\text{NO}_3)_2$ 和 $60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Pb}(\text{NO}_3)_2$ 处理组的处理时间分别为 3 h 和 6 h; $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2 + \text{AsA}$ 为干预组,AsA 浓度均为 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Pb}(\text{NO}_3)_2 + \text{AsA}$ 和 $60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Pb}(\text{NO}_3)_2 + \text{AsA}$ 的处理时间分别为 3 h 和 6 h。* 处理组与对照组的差异显著 $P<0.05$,& 干预组与铅单独处理组间的差异显著 $P<0.05$ 。

Fig. 3 Intervention effects of AsA on Pb-induced yeast cell death

Note: in $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Pb}(\text{NO}_3)_2$ and $60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Pb}(\text{NO}_3)_2$ treatment group, the treatment time is 3 h and 6 h respectively. In $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2 + \text{AsA}$ intervention group, the AsA concentration is $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. The treatment time for $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Pb}(\text{NO}_3)_2 + \text{AsA}$ and $60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Pb}(\text{NO}_3)_2 + \text{AsA}$ is 3 h and 6 h. * significant difference between $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ treatment group and control group, $P<0.05$; & significant difference between single $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ treatment group and intervention group with AsA, $P<0.05$.

2.3 Ca^{2+} 参与铅诱导的酵母细胞死亡

流式细胞仪检测发现, $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 铅处理酵母细胞 6 h 后胞内 Ca^{2+} 水平明显增高(图 4),为对照组的 1.7 倍,而在铅处理液中加入 EGTA 或者 LaCl_3 都能降低铅引发的胞内 Ca^{2+} 水平的增高。同时,在铅处理液中加入钙离子干扰剂降低胞内 Ca^{2+} 水平后检测细胞死亡率,发现 $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的钙离子螯合剂 EGTA 或 $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的质膜 Ca^{2+} 通道抑制剂 LaCl_3 能显著降低 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 铅的细胞毒性,使细胞死亡率显著降低(图 5)。这表明铅处理组胞内 Ca^{2+} 水平升高与铅对酵母细胞的毒性作用有关。

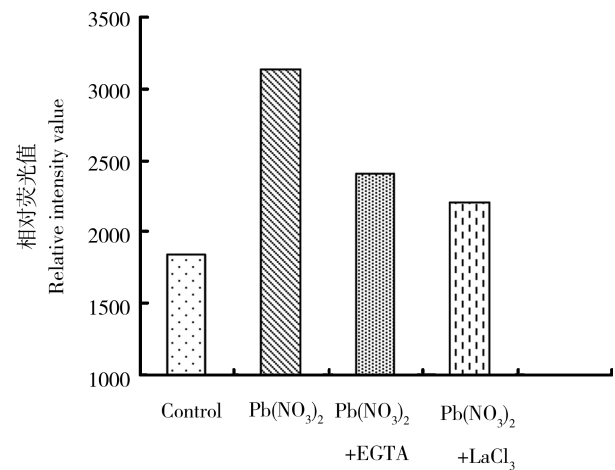


图 4 铅对酵母胞内 Ca²⁺水平的影响

注: Pb(NO₃)₂ 处理组, 浓度为 20 mg·L⁻¹, 处理时间为 6 h; Pb(NO₃)₂+EGTA 为干预组, EGTA 表示乙二醇四乙酸, 浓度为 0.5 mmol·L⁻¹, Pb(NO₃)₂ 浓度为 20 mg·L⁻¹, 处理时间为 6 h; Pb(NO₃)₂+LaCl₃ 为干预组, LaCl₃ 表示氯化镧, 浓度为 0.1 mmol·L⁻¹, Pb(NO₃)₂ 浓度为 20 mg·L⁻¹, 处理时间为 6 h。

Fig. 4 Effects of lead on intracellular Ca²⁺ levels in yeast cells

Note: in Pb(NO₃)₂ treatment group, Pb(NO₃)₂ concentration is 20 mg·L⁻¹ and the treatment time is 6 h. The Pb(NO₃)₂+EGTA is the intervention group, in which group the concentration of the ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) is 0.5 mmol·L⁻¹, the Pb(NO₃)₂ concentration is 20 mg·L⁻¹, and the treatment time is 6 h. In the Pb(NO₃)₂+LaCl₃ intervention group, the concentration of lanthanum chloride (LaCl₃) is 0.1 mmol·L⁻¹, the Pb(NO₃)₂ concentration is 20 mg·L⁻¹, and the treatment time is 6 h.

2.4 铅对酵母细胞线粒体膜电位的影响

经 20 mg·L⁻¹ 铅处理 6 h 后, 线粒体膜电位下降, 为对照组的 73% (图 6)。这说明铅的细胞毒性伴随着线粒体膜电位的下降, 对线粒体膜的损伤参与了介导酵母细胞死亡的途径。

3 讨论 (Discussion)

铅是一种极其重要的工业和环境化学污染物, 通过食物和饮水等方式进入机体后, 可在体内长期蓄积, 对人体造成严重危害。ROS 是细胞受环境刺激后产生的一种胞内信号分子, 可以介导生物适应, 也能引发细胞死亡^[1]。本文在检测到铅对酵母细胞的毒性作用后, 采用流式细胞仪检测证实了铅处理组酵母细胞内 ROS 水平同期升高, 用 AsA 降低铅处理组胞内 ROS 水平后, 可发现细胞死亡率下降, 从而说明铅毒性与胞内 ROS 水平升高有关, 铅引起 ROS 水平升高介导了其毒性作用, 胞内 ROS 升高是

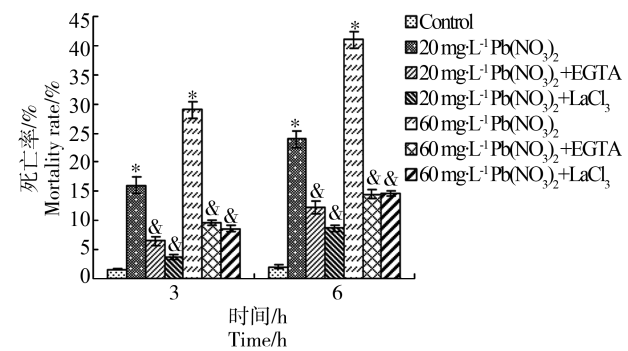


图 5 EGTA 和 LaCl₃ 对铅毒性的干预作用

注: 20 mg·L⁻¹ Pb(NO₃)₂ 和 60 mg·L⁻¹ Pb(NO₃)₂ 处理组的处理时间分别为 3 h 和 6 h; Pb(NO₃)₂+EGTA 为干预组, EGTA 浓度均为 0.5 mmol·L⁻¹, 20 mg·L⁻¹ Pb(NO₃)₂+EGTA 和 60 mg·L⁻¹ Pb(NO₃)₂+EGTA 的处理时间分别为 3 h 和 6 h; Pb(NO₃)₂+LaCl₃ 为干预组, LaCl₃ 浓度均为 0.1 mmol·L⁻¹, 20 mg·L⁻¹ Pb(NO₃)₂+LaCl₃ 和 60 mg·L⁻¹ Pb(NO₃)₂+LaCl₃ 的处理时间分别为 3 h 和 6 h。* 处理组与对照组的差异显著 $P<0.05$, & 干预组与铅单独处理组间的差异显著 $P<0.05$ 。

Fig. 5 Intervention effects of EGTA and LaCl₃ on Pb-induced yeast cell death

Note: in 20 mg·L⁻¹ Pb(NO₃)₂ and 60 mg·L⁻¹ Pb(NO₃)₂ treatment group, the treatment time is 3 h and 6 h respectively. In Pb(NO₃)₂+EGTA intervention groups, the EGTA concentration is 0.5 mmol·L⁻¹. The treatment time for 20 mg·L⁻¹ Pb(NO₃)₂+EGTA and 60 mg·L⁻¹ Pb(NO₃)₂+EGTA is 3 h and 6 h. In Pb(NO₃)₂+LaCl₃ intervention groups, the LaCl₃ concentration is 0.1 mmol·L⁻¹. The treatment time for 20 mg·L⁻¹ Pb(NO₃)₂+LaCl₃ and 60 mg·L⁻¹ Pb(NO₃)₂+LaCl₃ is 3 h and 6 h. * significant difference between Pb(NO₃)₂ treatment group and control group, $P<0.05$; & significant difference between single Pb(NO₃)₂ treatment group and intervention group with EGTA or LaCl₃, $P<0.05$.

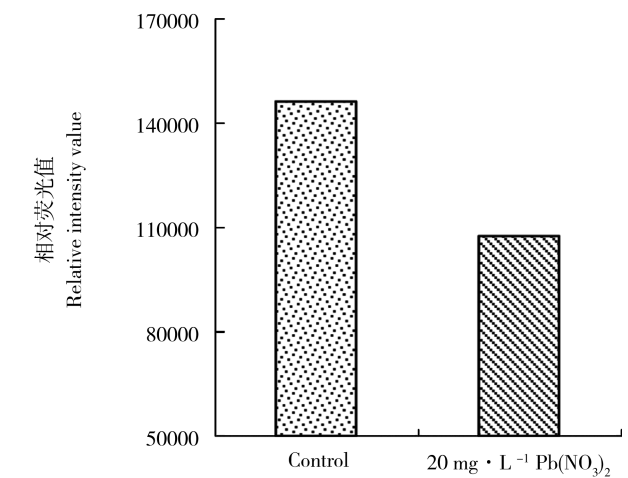


图 6 铅对酵母细胞线粒体膜电位的影响

Fig. 6 Effects of lead on mitochondrial membrane potential in yeast cell

诱发细胞死亡的重要原因。该结果与其他学者报道的铅通过 ROS 水平升高介导动植物细胞死亡的结果一致^[8-9],说明 ROS 是触发铅毒性作用的关键因素。

研究发现,ROS 主要通过以下 2 种途径导致细胞死亡:(1)ROS 具有很高的反应活性,可以与细胞中各类大分子物质,如蛋白质、脂类和核酸等发生反应,从而破坏细胞结构,最终导致细胞死亡;(2)ROS 作为重要的信号分子,可通过调节下游信号事件,启动细胞的凋亡级联反应,导致细胞死亡^[12]。

已有研究表明,Ca²⁺水平的失衡可调控细胞内凋亡相关因子 Bcl-2/Bax 的表达,导致能量代谢等发生改变,继而引发细胞凋亡^[13-14]。文中铅可诱导酵母细胞胞内 Ca²⁺水平显著升高,用一定浓度 Ca²⁺螯合剂 EGTA 或 Ca²⁺通道抑制剂 LaCl₃降低铅处理组胞内 Ca²⁺水平后,酵母细胞死亡率显著降低,即胞内 Ca²⁺下降可缓解铅对酵母细胞的毒性,说明胞内 Ca²⁺升高介导了铅的毒作用,而胞外 Ca²⁺内流是胞内 Ca²⁺升高的重要原因。铅诱发的酵母细胞内 ROS 水平升高可能是通过激活质膜 Ca²⁺通道,使胞外 Ca²⁺内流,导致胞内 Ca²⁺水平升高,继而引发酵母细胞死亡,该研究结果与有关学者报道相一致^[15-16]。

线粒体是多种促细胞凋亡信号转导分子的靶点,在细胞凋亡中起着决定性作用。当细胞受到外界胁迫时,胞内自由基水平升高,线粒体膜发生脂质过氧化反应^[17];或者胞内 Ca²⁺超载时,诱导线粒体通透性转换孔(PTP)开放,进而影响线粒体功能,导致线粒体膜电位发生改变,细胞色素 c(cytc)释放,从而激活下游的凋亡途径,最终导致细胞凋亡^[18]。Rh123 是一种线粒体膜电位指示剂,细胞处于存活状态时,Rh123 通过细胞膜,积聚于线粒体发出绿色荧光,而在细胞凋亡时,线粒体膜电负性降低,细胞线粒体积聚 Rh123 的能力也丧失,荧光强度降低^[19]。本研究发现经铅处理后,Rh123 的相对荧光值降低,即胞内线粒体膜电位明显下降,说明胞内高浓度的 Ca²⁺可能通过诱导线粒体膜通透性转变孔道开放,或者高水平 ROS 可能损伤线粒体膜,致线粒体膜电位下降,继而激活相关下游信号导致细胞死亡。

本文以模式生物酵母菌研究了铅对酵母细胞的毒性效应,发现了铅诱导的细胞死亡及胞内 ROS 和 Ca²⁺的调节作用,证实了铅致死的线粒体途径,与某些学者在人和动物细胞中的研究结果相似^[9,20],说明

铅毒性作用过程在动物细胞和酵母细胞中具有较高的一致性,而酵母细胞具有生长周期短,易培养,遗传背景简单等优点,有望作为研究铅毒性作用的模式系统。

通讯作者简介:仪慧兰(1963—),女,博士,教授,博士生导师,主要从事环境生物学与逆境生理学方面的研究,承担和完成国家级研究课题 5 项,省部级研究课题 10 余项,发表研究论文 90 余篇。

参考文献 (References):

- [1] Flora G, Gupta D, Tiwari A. Toxicity of lead: A review with recent updates [J]. *Interdisciplinary Toxicology*, 2012, 5(2): 47-58
- [2] Papanikolaou N C, Hatzidaki E G, Belivanis S, et al. Lead toxicity update. A brief review [J]. *Medical Science Monitor*, 2005, 11(10): 329-336
- [3] Xu J, Ji L D, Xu L H. Lead induced apoptosis in PC12 cells: Involvement of p53, bcl-2 family and caspase-3 [J]. *Toxicology Letters*, 2006, 166: 160-167
- [4] Senut M C, Sen A, Cingolani P, et al. Lead exposure disrupts global DNA methylation in human embryonic stem cells and alters their neuronal differentiation [J]. *Toxicological Sciences*, 2014, 139(1): 142-161
- [5] Pourrut B, Shahid M, Dumat C, et al. Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants [J]. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 2011, 213: 113-136
- [6] Hamadouche N A, Nesrine S, Abdelkeder A. Lead toxicity and the hypothalamic-pituitary-testicular-axis [J]. *Notulae Scientia Biologicae*, 2013, 5(1): 1-6
- [7] Shu X, Zhang Q, Wang W. Lead induced changes in growth and micronutrient uptake of *Jatropha curcas* L [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2014, 93(5): 611-617
- [8] Kaur G, Singh H P, Batish D R, et al. A time course assessment of changes in reactive oxygen species generation and antioxidant defense in hydroponically grown wheat in response to lead ions (Pb²⁺) [J]. *Protoplasma*, 2012, 249(4): 1091-1100
- [9] Flora S J, Saxena G, Mehta A. Reversal of lead-induced neuronal apoptosis by chelation treatment in rats: Role of reactive oxygen species and intracellular Ca²⁺ [J]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2007, 322(1): 108-116
- [10] Wu L H, Yi H L, Zhang H F. Reactive oxygen species and Ca²⁺ are involved in sodium arsenite-induced cell

killing in yeast cells [J]. FEMS Microbiology Letters, 2013, 343(1): 57-63

[11] Panieri E, Gogvadze V, Norberg E, et al. Reactive oxygen species generated in different compartments induce cell death, survival, or senescence [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2013, 57(2): 176-187

[12] Ray P D, Huang B W, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling [J]. Cellular Signaling, 2012, 24(5): 981-990

[13] Pei Z M, Murata Y, Benning G, et al. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signaling in guard cells [J]. Nature, 2000, 406(6797): 731-734

[14] Rosario R, Paolo P, Davide F, et al. Calcium and apoptosis: Facts and hypotheses [J]. Oncogene, 2003, 22(53): 8619-8627

[15] Sanders T, Liu Y, Buchner V, et al. Neurotoxic effects and biomarkers of lead exposure: A review [J]. Reviews on Environmental Health, 2009, 24(1): 15-45

[16] Ma Y, Fu D, Liu Z. Effect of lead on apoptosis in cultured rat primary osteoblasts [J]. Toxicology and Industrial Health, 2012, 28(2): 136-146

[17] Balaban R, Nemoto S T. Mitochondria, oxidants, and aging [J]. Cell, 2005, 120(4): 483-495

[18] Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015, 460(1): 72-81

[19] Oconnor J E, Vargas J L, Kimler B F, et al. Use of rhodamine 123 to investigate alterations in mitochondrial activity in isolated mouse liver mitochondria [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1988, 151(1): 568-573

[20] Gillis B S, Arbieva Z, Gavin I M. Analysis of lead toxicity in human cells [J]. BMC Genomics, 2012, 13(1):1-12

◆