

基于 PC12 细胞的西维因神经损伤作用机理研究

徐梦蕾¹, 王新欣¹, 刘静波¹, 高宇², 熊晋锋³, 赵颂宁¹, 黄延军¹

(1. 吉林大学营养与功能食品实验室, 吉林长春 130062) (2. 吉林农业大学农学院, 吉林长春 130118)

(3. 长春生物制品研究所有限责任公司, 吉林长春 130012)

摘要: 本文以 PC12 细胞为神经细胞模型, 研究了西维因对神经细胞的损伤作用机理。当 PC12 细胞暴露于 0.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~200.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 不同浓度的西维因溶液时, 表现出了一系列显著变化。随着西维因溶液浓度的增大, 细胞的存活率从 (100.00 \pm 0.46)% 下降到了 (27.86 \pm 1.69)%; 细胞内乳酸脱氢酶 (LDH) 漏出率增多; 丙二醛 (MDA) 含量从 19.27 \pm 0.96 nmol/mg prot 逐渐增加到 112.39 \pm 1.59 nmol/mg prot; 超氧化物歧化酶 (SOD) 活力从 4.08 \pm 0.87 U/mg prot 增强到 17.77 \pm 0.43 U/mg prot, 同时其抑制率也从 (19.00 \pm 1.66)% 增加到了 (73.00 \pm 1.71)%; 同时谷胱甘肽 (GSH) 含量从 96.15 \pm 6.10 $\mu\text{mol}/\text{g}$ prot 逐渐减少到 22.91 \pm 3.98 $\mu\text{mol}/\text{g}$ prot; 细胞相对荧光强度 (RFI) 从 37.38 \pm 11.48 先增强到 45.56 \pm 11.96, 后因细胞严重损伤又减弱到 17.11 \pm 1.50。细胞液内乙酰胆碱 (ACh) 含量也逐渐增加。同时, 利用激光共聚焦扫描显微镜观察到了线粒体膜电位的显著下降。西维因对 PC12 细胞表现出很强的神经毒性。

关键词: PC12 细胞; 西维因; 损伤; 细胞毒性; 神经毒性

文章编号: 1673-9078(2016)12-1-5

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.12.001

Mechanism of Neurotoxicity Injuries Induced by Carbaryl in PC12 Cells

XU Meng-lei¹, WANG Xin-xin¹, LIU Jing-bo¹, GAO Yu², XIONG Jin-feng³, ZHAO Song-ning¹,
HUANG Yan-jun¹

(1. Laboratory of Nutrition and Functional Food, Jilin University, Changchun 130062, China)

(2. College of Agriculture, Jilin Agricultural University, Changchun 130018, China)

(3. Changchun Institute of Biological Products Co., Ltd, Changchun 130012, China)

Abstract: The present study was planned to evaluate neurotoxicity injuries induced by carbaryl in PC12 cells, which were used as a model for nervous cell system. In this study, PC12 cells were exposed to carbaryl in different concentrations from 0.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 200.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and showed significant changes. Cells viability rates decreased from (100.00 \pm 0.46)% to (27.86 \pm 1.69)% with a increase of carbaryl concentration. Carbaryl treatment resulted in a significant increase in the levels of LDH leakage rate. MDA content also increased from 19.27 \pm 0.96 nmol/mg:prot to 112.39 \pm 1.59 nmol/mg prot. SOD activity increased from 4.08 \pm 0.87 U/mg prot to 17.77 \pm 0.43 U/mg prot, and SOD inhibition rate increased from (19.00 \pm 1.66)% to (73.00 \pm 1.71)%, however, GSH content decreased from 96.15 \pm 6.10 $\mu\text{mol}/\text{g}$ prot to 22.91 \pm 3.98 $\mu\text{mol}/\text{g}$ prot. RFI increased from 37.38 \pm 11.48 to 45.56 \pm 11.96 firstly, then decreased to 17.11 \pm 1.50 with the damage of cells. ACh in medium increased by carbaryl treatment. A significantly decrease in integrity of mitochondrial membrane potential was observed by laser scanning confocal microscope. Carbaryl can induce neurotoxicity in PC12 cells.

Key words: PC12 cells; Carbaryl; injury; cytotoxicity; neurotoxicity

农药已经广泛进入到环境、农产品和食品中。尽管农药在设计生产时, 仅仅把农业害虫作为目标, 但

收稿日期: 2016-01-04

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2012BAD33B03); 吉林省世行贷款农产品质量安全项目 (2011-267); 吉林大学研究生创新基金资助项目 (2015052); 吉林农业大学科研启动基金资助项目 (2015010); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (201510193002)

作者简介: 徐梦蕾 (1988-), 女, 博士研究生, 研究方向: 营养与功能食品
通讯作者: 刘静波 (1962-), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 营养与功能食品; 高宇 (1983-), 男, 博士, 讲师, 硕士生导师, 研究方向: 昆虫资源开发利用及害虫综合治理

是农药残留在生态环境中的长期积累, 使人类深受其害。农药的终毒物主要有其代谢产物及活性氧(ROS), 往往具有很强毒性和蓄积性, 造成的结果一般分为初级、次级和三级事件, 主要表现为: 对生物膜的损伤、细胞的抗氧化防御系统 (特别是抗氧化酶) 的功能的损害^[1], 导致脂质过氧化和 DNA 损伤。总之农药残留导致的氧化应激是一个多步骤途径最终表现, 导致促氧化剂和抗氧化防御机制之间不平衡^[2]。即使在较低剂量时, 长期积累仍可以引起人及牲畜健康问题^[3,4]。人类通过食物链或其他途径有暴露于西维因的风险, 长期暴露于低剂量农药, 被认为是癌症的诱发和发展

的重要风险因素^[5]。人体是农药的非靶标生物,为达到尽可能减轻农药残留对人体损伤的目的,有必要研究农药诱导人体损伤机理及可能产生的毒性作用^[6]。

西维因 (Carbaryl, 1-naphthyl N-methylcarbamate, CAS NO. 63-25-2), 又名胺甲萘, 属于兼有内吸、触杀及胃毒型的农药, 是世界上使用最为广泛的氨基甲酸酯类农药之一, 被广泛用于农业和林业防治害虫, 也用于野战快速饮水消毒、空调循环水冷系统消毒和医用消毒等^[7]。它可以抑制昆虫乙酰胆碱酯酶 (AChE) 和羧酸酯酶 (CaEs) 的活性, 从而影响细胞正常的神经传导而致死^[8]。

针对西维因的作用机理, 可以推测西维因对人体可能造成的损伤是对神经细胞乙酰胆碱 (ACh) 能受体功能性的抑制, 以及西维因本身引起细胞的氧化应激反应, 两者结合从而导致病变等。PC12 细胞是一种来自大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤的克隆细胞系, 作为类神经元细胞, 经常用于多巴胺能的神经细胞模型以及神经系统疾病的体外研究^[9]。在正常情况下培养, PC12 细胞不仅在形态上, 而且在生理及生化的许多方面都与肾上腺髓质细胞相似。高度分化后, PC12 细胞在形态上向交感神经元分化, 同时伴有生理及生化方面的变化, 最终导致 PC12 细胞呈现神经元样的功能^[10]。本文以 PC12 细胞为神经细胞模型, 根据农药可能对细胞造成的程度的损害中, 从细胞形态、数量、细胞的抗氧化防御系统 (包括抗氧化酶及非酶抗氧化物质)、细胞培养液中 ACh 含量以及线粒体膜电位变化等方面, 研究了不同浓度西维因溶液神经细胞的损伤作用机理。

1 材料与方法

1.1 原料

大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤 (PC12 细胞) 由中国科学院细胞库提供; 西维因 (Carbaryl, 99%)、2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐 (DCFH-DA, 97.00%) 和二甲基亚砷 (DMSO, 99%) 购自 Sigma-Aldrich 公司; DMEM-低糖培养基、胎牛血清 (FBS)、磷酸盐缓冲生理盐水 (PBS) 和 0.25% EDTA 型胰酶购自美国 Gibco 公司; MTS 单溶液细胞增殖检测试剂盒购自美国 Promega 公司; 青霉素链霉素溶液 (双抗) 购自美国 HyClone 公司; 乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒、总谷胱甘肽检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1) 和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天公司; 细胞丙二醛 (MDA) 测定试剂盒 (微板法)、乙酰胆碱 (ACh) 测定试剂盒 (测培养液) (微板法) 和

超氧化物歧化酶 (SOD) WST-1 法试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 透明孔板购自上海宏生生物科技科技有限公司。

1.2 仪器和设备

AG-204 型电子天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司)、DW-86L288 型超低温保存箱 (青岛海尔股份有限公司)、Bio Tek Synergy HT 型多功能酶标仪 (美国博腾仪器有限公司)、BDS-300 倒置生物显微镜 (重庆奥特光学仪器有限公司)、FluoView™ FV 1000 型激光共聚焦扫描显微镜 (日本 OLYMPUS 公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 试剂配制方法

西维因粉末溶于 DMSO 中, 用蒸馏水稀释, 使 DMSO 终浓度小于 0.1%, 保存于 4 °C 冰箱备用。DCFH-DA 粉末溶于 DMSO 中, 终浓度为 10 mM, 贮存于 -20 °C 备用, 使用前用 DMEM 培养基稀释, 终浓度为 10 μM^[11]。

1.3.2 细胞培养、形态观察及存活率计算方法

PC12 细胞 (1×10^5 个/mL, 800 μL/孔) 种入 24 孔板, 37 °C 恒温培养 24 h 后分别加入 200 μL/孔不同浓度西维因溶液 (终浓度为 2.00 μg/mL、20.00 μg/mL、100.00 μg/mL 和 200.00 μg/mL), 其中阳性对照组浓度为 0.00 μg/mL; 再培养 24 h 后用显微镜观察形态。

细胞数量的测定方法为培养结束后加入 200 μL/孔 MTS 试剂, 利用酶标仪测定其在 490 nm 处的吸光度, 计算细胞存活率。公式:

细胞存活率 = (实验孔 - 空白组) / (阳性对照孔 - 空白组) × 100%^[12]。

1.3.3 细胞内 LDH 漏出率、MDA 含量、SOD 活力、SOD 抑制率和 GSH 含量的测定方法

按照 1.3.2 中细胞培养方法, 在细胞培养完成后, 分别利用酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒, 计算 LDH 的漏出率。计算公式:

$$\text{LDH}_{\text{漏出率-1}} = \frac{\text{LDH}_{\text{释放}}}{\text{LDH}_{\text{细胞内}}} \times 100\%$$

$$\text{LDH}_{\text{漏出率-2}} = \frac{\text{LDH}_{\text{释放}}}{\text{LDH}_{\text{释放}} + \text{LDH}_{\text{细胞内}}}$$

利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定细胞蛋白浓度, 再利用细胞丙二醛 (MDA) 测定试剂盒 (微板法) 测定 MDA 含量, 超氧化物歧化酶 (SOD) WST-1 法试剂盒测定总 SOD 活力、SOD 活力的抑制率, 总谷胱甘肽检测试剂盒测定 GSH 含量。

1.3.4 细胞相对荧光强度 (RFI)、细胞液 ACh

含量的测定及线粒体膜电位观察方法

按照 1.3.2 培养细胞完成后, 吸弃各孔培养液, 加入 DCFH-DA 溶液 (10 μM), 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育 15 min, 吸弃 DCFH-DA 溶液, 用 DMEM 培养基润洗细胞, 再加入 DMEM 培养基^[13]。利用酶标仪测定荧光强度 (激发: 485/20, 发射: 528/20), 并测定 OD₄₉₀ 值, 比值为相对荧光强度 RFI。

按照 1.3.2 培养细胞完成后, 利用乙酰胆碱 (ACh) 测定试剂盒 (测培养液) (微板法) 测定细胞液内 ACh 含量; 膜电位检测试剂盒 (JC-1) 染色, 激光共聚焦扫描显微镜观察。

1.3.5 统计学处理

试验数据采用 SPSS 16.0 软件统计分析, 组间比较采用 Duncan 新复极差法 (SSR)。

2 结果与讨论

2.1 西维因对 PC12 细胞形态及存活率的影响

暴露于 2.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~200.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的西维因溶液, PC12 细胞形态与阳性对照组的差别随浓度增加而差别变大 (图 1)。在实验浓度范围内存活率随浓度的增大而降低, 且均与阳性对照组有极显著差异。

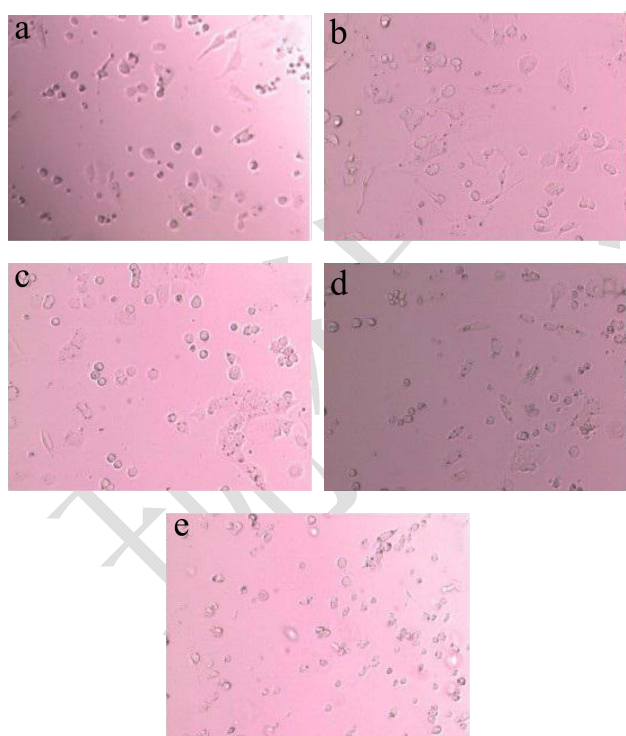


图 1 西维因对 PC12 细胞形态的影响

Fig.1 Effects of carbaryl on PC12 morphology

注: a, 0.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组; b, 2.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组; c, 20.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组; d, 100.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组; e, 200.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组。

溶液浓度为 2.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 存活率为

(92.44 \pm 6.43)%, 细胞形态基本保持完好 (图 1b)。浓度为 20.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 存活率为 (82.17 \pm 3.69)%, 已有个别细胞皱缩 (图 1c)。浓度为 100.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 存活率为 (47.71 \pm 4.98)%, 细胞部分皱缩且突触减少 (图 1d)。浓度为 200.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 存活率仅为 (27.86 \pm 1.69)%, 细胞严重皱缩、变小, 细胞核变大、颜色变深, 且出现了形态怪异的细胞 (图 1e)。说明西维因对 PC12 细胞有显著的细胞毒性, 且随西维因浓度的增加损伤程度加大。

2.2 西维因对 PC12 细胞抗氧化功能指标的影响

西维因对 PC12 细胞形态及存活率的影响结果表明西维因可以改变细胞的形态, 细胞膜受到损伤。LDH 的漏出率可以衡量细胞膜受损伤的程度。LDH 主要存在于细胞内, LDH 漏出率越高, 说明细胞膜受损伤程度越大, 通透性被改变。西维因浓度 2.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~200.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 漏出率随浓度的增加而增大, 且均与阳性对照组有极显著差异, 说明细胞膜损伤的程度随浓度增加而严重。MDA 则是细胞膜脂过氧化最重要的产物之一, 其含量可以反映机体内脂质的氧化水平即细胞受到氧化攻击的程度^[14]。在实验浓度内, 丙二醛 (MDA) 含量从 19.27 \pm 0.96 nmol/mg·prot 逐渐增加到 112.39 \pm 1.59 nmol/mg·prot。浓度在 2.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~100.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围时, MDA 含量与阳性对照组无显著差异; 浓度为 200.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, MDA 含量与阳性对照组有极显著差异, 说明在此浓度下细胞受到了强烈的自由基攻击, 产生大量的 MDA。

细胞的抗氧化防御系统包括抗氧化酶及非酶抗氧化物质两个部分。SOD 是重要的抗氧化酶, 与防御细胞内过度的氧化应激与过量的 ROS 有重要作用。在浓度 2.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~100.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内, PC12 细胞 SOD 活力随西维因浓度的增加从 4.08 \pm 0.87 U/mg·prot 增强到 17.77 \pm 0.43 U/mg·prot, 均与阳性对照组有极显著差异, 说明细胞通过增强 SOD 的活力来对抗西维因带来的压力。有趣的是, SOD 的抑制率也随西维因浓度的增加从 (19.00 \pm 1.66)% 提高到了 (73.00 \pm 1.71)%, 说明西维因会抑制 SOD 的活动, 但是没有被抑制的 SOD 会被激发更大的活性来应对细胞氧化应激。GSH 是细胞非酶抗氧化系统的重要成分, 其含量随西维因浓度的增加从 96.15 \pm 6.10 $\mu\text{mol}/\text{g}\cdot\text{prot}$ 逐渐减少到 22.91 \pm 3.98 $\mu\text{mol}/\text{g}\cdot\text{prot}$, 说明 GSH 在逐渐被消耗以对抗不断产生的有毒代谢物。浓度 2.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~100.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内, RFI 数值与阳性对照组有显著差别,

从 37.38±11.48 增强到 45.56±11.96, 说明细胞受到了 ROS 的攻击; 在浓度为 200.00 μg/mL 时, RFI 数值有

极显著差异, 但数值偏低为 17.11±1.50, 原因是由于细胞凋亡数量增多, 荧光强度下降。

表 1 西维因对 PC12 细胞抗氧化功能指标的影响

Table 1 Effects of carbaryl on antioxidant indexes in PC12 cell

浓度/(μg/mL)	LDH 漏出-1/%	LDH 漏出-2/%	MDA 含量/(nmol/mg·prot)	SOD 活力/(U/mg·prot)
0.00	102.25±0.30	27.27±0.80	19.27±0.96	4.08±0.87
2.00	93.80±3.70**	29.03±0.39**	15.14±0.58	7.31±0.91**
20.00	130.15±27.80**	30.31±0.95**	19.00±0.79	12.11±0.49**
100.00	238.87±17.58**	25.57±0.86**	64.35±5.87	13.70±1.57**
200.00	486.04±35.79**	17.10±0.98**	112.39±1.59**	17.77±0.43**

浓度/(μg/mL)	SOD 抑制率/%	GSH 含量/(μmol/g·prot)	RFI
0.00	19.00±1.66	96.15±6.10	37.38±11.48
2.00	34.00±1.69**	79.38±1.00**	36.30±2.91*
20.00	56.00±1.68**	62.42±4.77**	32.10±10.26*
100.00	62.00±1.62**	47.03±36.15**	45.56±11.96*
200.00	73.00±1.71**	22.91±3.98**	17.11±1.50**

注: 表内数据为平均值±标准差, *表示 α=0.05 水平组间差异显著; **表示 α=0.01 水平组间差异极显著。

2.3 西维因对 PC12 细胞液中 ACh 含量的影响

西维因对人体可能造成的损既包括引起细胞的氧化应激反应, 也包括神经细胞乙酰胆碱 (ACh) 能受体功能性的抑制。西维因与 AChE 结合, 在和 ACh 的竞争中取得优势, 导致 ACh 在细胞中的大量累积, 过量的 ACh 随细胞释放到培养基中, 同西维因本身一起对细胞有氧化应激的损伤, 影响细胞正常的神经传导而致死。西维因浓度在 2.00 μg/mL~100.00 μg/mL 范围内, ACh 含量与阳性对照组无显著差异; 浓度达到 200.00 μg/mL 时, 含量与阳性对照组有极显著差异, 对细胞产生了强烈的危害。

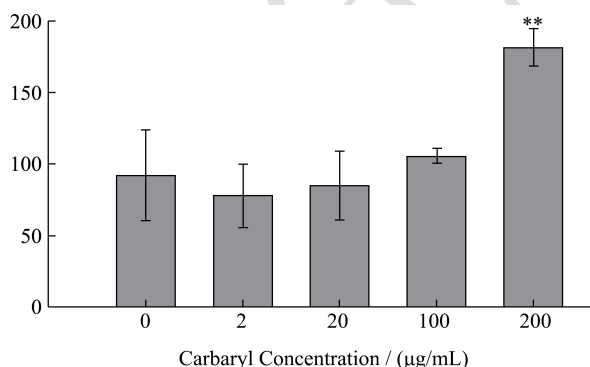


图 2 西维因对 PC12 细胞液中 ACh 的影响

Fig.2 Effects of carbaryl on PC12 ACh content in medium

2.4 西维因对 PC12 细胞线粒体膜电位的影响

线粒体膜电位是衡量细胞状态的重要指标, 可以说明细胞处于正常、损伤、凋亡或者是坏死的状态。通过荧光染色, 随细胞状态不同而呈现由红到黄到绿

的不同颜色过度。红色时, 细胞边缘清晰, 细胞核中空, 说明细胞状态良好; 黄色是红和绿两色的叠加颜色, 说明细胞膜电位发生下降, 受到损伤, 但仍有活力; 绿色时, 说明细胞已不能保持正常的膜电位, 处于凋亡和坏死等状态。

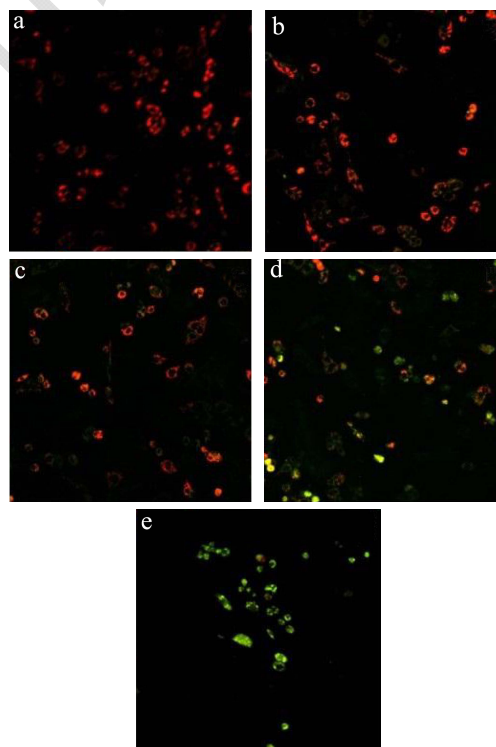


图 3 西维因对 PC12 细胞线粒体膜电位的影响

Fig.3 Effects of carbaryl on PC12 mitochondrial membrane potential

注: a, 0.00 μg/mL 组; b, 2.00 μg/mL 组; c, 20.00 μg/mL 组; d, 100.00 μg/mL 组; e, 200.00 μg/mL 组。

随着西维因浓度的增大, 细胞线粒体膜电位颜色呈现由红到黄, 最终到绿色的过渡。浓度为 2.00 $\mu\text{g/mL}$ 时 (图 3b), 颜色与阳性对照组 (图 3a) 无极大差别不大, 略可见黄色的出现。浓度为 20.00 $\mu\text{g/mL}$ 时 (图 3c), 红色减少, 黄色增多; 浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时 (图 4d), 绿色出现, 且占有半数视野范围; 浓度为 200.00 $\mu\text{g/mL}$ (图 3e) 时, 线粒体膜电位发生了显著的变化, 颜色上呈现绿色, 个别细胞呈现红色, 说明细胞处于早期凋亡状态。随着西维因浓度的增大, PC12 细胞膜受到逐渐强烈的损伤, 表现为细胞线粒体膜电位的逐渐下降, 荧光染色由红到绿。

3 结论

西维因随浓度的增加对 PC12 细胞产生了不同程度的损伤, 既包括引起细胞的氧化应激反应, 也包括 ACh 能受体功能性的抑制。细胞数量及形态方面, 随西维因浓度的增加形态逐渐破坏、细胞皱缩严重, 存活率显著下降。在细胞抗氧化防御系统方面, 细胞膜受到损伤, LDH 漏出率增加以及 MDA 数量增多; 抗氧化酶方面 SOD 活力显著增强, 抑制率也显著增加; 非酶抗氧化物质中 GSH 数量迅速减少; RFI 从弱到强, 后因细胞处于严重损伤状态又减弱的过程。细胞培养液中 ACh 数量显著增加, 同时导致线粒体膜电位的显著下降。西维因对 PC12 细胞可能的损伤机理是代谢产生了 ROS, 破坏细胞膜, 造成对细胞的氧化应激反应; 同时和 AChE 结合, 导致 ACh 在细胞中的大量累积并释放到培养基中; ACh 再同西维因一起对细胞产生强烈的攻击, 导致线粒体膜电位的改变, 使细胞处于凋亡状态。进一步的研究重点是具体到细胞信号通路, 澄清生化机理, 对西维因毒理的作用机制有更深入的研究。

参考文献

- [1] M Abdollahi, A Ranjbar, S Shadnia, et al. Pesticides and oxidative stress: A review [J]. Medical Science Monitor International Medical Journal of Experimental and Clinical Research, 2004, 10(6): RA141-7
- [2] Banerjee B, Seth V, Ahmed R. Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends [J]. Reviews on Environmental Health, 2001, 16(1): 1-40
- [3] Wang H, Wang J, Timchalk C, et al. Magnetic electrochemical immunoassays with quantum dot labels for detection of phosphorylated acetylcholinesterase in plasma [J]. Analytical Chemistry, 2008, 80(22): 8477-8484
- [4] Moser V C, Padilla S, Simmons J E, et al. Impact of chemical proportions on the acute neurotoxicity of a mixture of seven carbamates in preweanling and adult rats [J]. Toxicological Sciences, 2012, 129(1): 126-134
- [5] Xu M L, Liu J B, Lu J. Determination and control of pesticide residues in beverages: A review of extraction techniques, chromatography, and rapid detection methods [J]. Applied Spectroscopy Reviews, 2014, 49(2): 97-120
- [6] Xu M L, Liu J B, Zhu C, et al. Interactions between soy isoflavones and other bioactive compounds: a review of their potentially beneficial health effects [J]. Phytochemistry Reviews, 2015, 14(3): 459-467
- [7] 何扩, 张秀媛, 杜欣军, 等. 西维因单链抗体同源建模及与西维因对接模拟研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(6): 59-63
- [8] HE Kuo, ZHANG Xiu-yuan, DU Xin-jun, et al. Homology modeling of anti-carbaryl ScFv and molecular simulation study between ScFv and its antigen Carbaryl [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(6): 59-63
- [9] Smulders C J G M, Bueters T J H, Van Kleef R G D M, et al. Selective effects of carbamate pesticides on rat neuronal nicotinic acetylcholine receptors and rat brain acetylcholinesterase [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2003, 193(2): 139-146
- [10] 刘静波, 刘文超, 徐梦蕾, 等. 基于 PC12 细胞模型分析大豆蛋白水解物对神经元氧化损伤的保护作用[J]. 现代食品科技, 2015, 31(4): 8-12
- [11] LIU Jing-bo, LIU Wen-chao, XU Meng-lei, et al. Neuroprotective effects of soybean protein isolate hydrolysates against neuronal oxidative damage in PC12 neuronal cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(4): 8-12
- [12] Goldstein D S, Sullivan P, Cooney A, et al. Vesicular uptake blockade generates the toxic dopamine metabolite 3, 4-dihydroxyphenylacetaldehyde in PC12 cells: relevance to the pathogenesis of Parkinson's disease [J]. Journal of Neurochemistry, 2012, 123(6): 932-943
- [13] Liu J, Chen Z, He J, et al. Anti-oxidative and anti-apoptosis effects of egg white peptide, Trp-Asn-Trp-Ala-Asp, against H₂O₂-induced oxidative stress in human embryonic kidney 293 cells [J]. Food and Function, 2014, 5(12): 3179-3188
- [14] 刘晓娟, 何凤林, 赵力超, 等. 番薯提取液与茶多酚、葛根黄酮对 PC12 细胞的协同抗氧化研究[J]. 现代食品科技, 2015, 31(12): 14-18
- [15] LIU Xiao-juan, HE Feng-lin, ZHAO Li-chao, et al. Synergistic antioxidant activity of sweet potato extracts in combination with tea polyphenols and pueraria flavonoid on

- PC12 cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(12):14-18
- [13] 陈志飞.蛋清源抗氧化肽对 HEK293 细胞氧化应激损伤的抑制作用及机制研究[D].长春:吉林大学,2014
- CHEN Zhi-fei. The anti-oxidative effects and mechanism of antioxidant peptides from egg white against oxidative stress injury in human embryonic kidney 293 cells [D]. Changchun: Jilin University, 2014
- [14] 黄赛金,尹爱武,龚灯,等.淡竹叶多糖的抗衰老作用研究[J].现代食品科技,2015,31(11):51-55
- HUANG Sai-jin, YIN Ai-wu, GONG Deng, et al. Anti-aging effects of polysaccharides from *Lophatherum gracile* Brongn [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(11): 51- 55