

DOI:10.16781/j.0258-879x.2021.10.1085

· 论 著 ·

## 氢气通过减少活性氧生成抑制线粒体凋亡发挥对小鼠精原细胞的电离辐射防护作用

马 龙<sup>1</sup>, 蔡山林<sup>2</sup>, 郝 伟<sup>3</sup>, 高 福<sup>2</sup>, 李百龙<sup>2</sup>, 郭佳铭<sup>2\*</sup>, 颜宏利<sup>1\*</sup>

1. 海军军医大学(第二军医大学)长海医院生殖医学中心, 上海 200433
2. 海军军医大学(第二军医大学)海军医学系舰船辐射医学防护教研室, 上海 200433
3. 海军军医大学(第二军医大学)长海医院内分泌科, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 探索H<sub>2</sub>对小鼠精原细胞电离辐射损伤的防护效应及机制。**方法** 将小鼠精原细胞系GC-1细胞分为4组: 对照组、H<sub>2</sub>组、照射组和照射加H<sub>2</sub>组。照射组和照射加H<sub>2</sub>组细胞予单次<sup>60</sup>Co γ射线照射, 累积辐射剂量为8 Gy(剂量率为0.897 Gy/min)。H<sub>2</sub>组和照射加H<sub>2</sub>组细胞于照射前使用H<sub>2</sub>细胞培养系统(75% H<sub>2</sub>、20% O<sub>2</sub>和5% CO<sub>2</sub>)培养1 h。照射后24 h, 用CCK-8和流式细胞术分别检测照射和H<sub>2</sub>处理对GC-1细胞活力和凋亡的影响。照射后2 h, 用2', 7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)荧光探针和线粒体膜电位JC-1荧光探针分别检测照射和H<sub>2</sub>处理对GC-1细胞内活性氧(ROS)和线粒体膜电位的影响。照射后24 h, 用蛋白质印迹法检测照射和H<sub>2</sub>处理对GC-1细胞线粒体凋亡通路蛋白B淋巴细胞瘤相关蛋白x(Bax)、细胞色素c(Cyt-c)和cleaved-caspase 3(caspase 3活化产物)表达的影响。**结果** CCK-8检测结果显示H<sub>2</sub>提高了照射后GC-1细胞的活力( $P<0.01$ ), 流式细胞术检测结果显示H<sub>2</sub>降低了照射后GC-1细胞的凋亡率( $P<0.01$ )。特异性荧光探针染色结果显示, H<sub>2</sub>不仅抑制照射后GC-1细胞内ROS的产生, 还抑制照射后GC-1细胞线粒体膜电位的降低( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ )。蛋白质印迹法检测结果显示, H<sub>2</sub>抑制照射后GC-1细胞内线粒体凋亡蛋白Bax、Cyt-c和cleaved-caspase 3的表达( $P<0.01$ 或 $P<0.05$ )。**结论** H<sub>2</sub>通过减少ROS生成保护线粒体膜电位、抑制线粒体凋亡通路, 对<sup>60</sup>Co γ射线导致的小鼠精原细胞电离辐射损伤起防护作用。

**[关键词]** 氢; 电离辐射; 活性氧; 线粒体凋亡通路; 精原细胞

**[中图分类号]** R 818.87 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2021)10-1085-06

## Hydrogen protecting spermatogonia from ionizing radiation by reducing reactive oxygen species production and inhibiting mitochondrial apoptosis

MA Long<sup>1</sup>, CAI Shan-lin<sup>2</sup>, HAO Wei<sup>3</sup>, GAO Fu<sup>2</sup>, LI Bai-long<sup>2</sup>, GUO Jia-ming<sup>2\*</sup>, YAN Hong-li<sup>1\*</sup>

1. Department of Reproductive Medicine, Changhai Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China
2. Department of Marine Radiation Medicine, Faculty of Naval Medicine, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China
3. Department of Endocrinology, Changhai Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the protective effect and mechanism of hydrogen (H<sub>2</sub>) on ionizing radiation injury of mouse spermatogonia. **Methods** Mouse spermatogonia GC-1 cells were divided into 4 groups: control group, H<sub>2</sub> group, irradiation group and irradiation plus H<sub>2</sub> group. The cells in the irradiation group and the irradiation plus H<sub>2</sub> group were given single <sup>60</sup>Co γ ray irradiation with a cumulative dose of 8 Gy (dose rate 0.897 Gy/min). The cells in the H<sub>2</sub> group and the irradiation plus H<sub>2</sub> group were cultured in a H<sub>2</sub> cell culture system (75% H<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>) for 1 h before irradiation. Cell counting kit 8 (CCK-8) and flow cytometry were used to detect the effects of irradiation and H<sub>2</sub> treatment on viability and apoptosis of GC-1 cells 24 h after irradiation. The 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) and mitochondrial membrane potential JC-1 fluorescence probes were used to detect the effects of irradiation and H<sub>2</sub> treatment on intracellular

**[收稿日期]** 2021-03-19 **[接受日期]** 2021-07-08

**[基金项目]** 国家重点研发计划(2018YFC1004900, 2018YFC1005002), 上海市科学技术委员会科技英才扬帆计划(19YF1459000), 军队计划生育专项(18JS003)。Supported by National Key Research and Development Plan of China (2018YFC1004900, 2018YFC1005002), Sailing Program of Science and Technology Talents of Shanghai Science and Technology Commission (19YF1459000), and Family Planning Special Fund of PLA (18JS003)。

**[作者简介]** 马 龙, 硕士生。E-mail: sdlyml@126.com

\*通信作者( Corresponding authors )。Tel: 021-81871150, E-mail: smmuguojiaming@126.com; Tel: 021-31162484, E-mail: hongliyan@smmu.edu.cn

reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial membrane potential of GC-1 cells 2 h after irradiation. Western blotting was used to detect the effects of irradiation and H<sub>2</sub> treatment on the expression of mitochondrial apoptosis pathway proteins (B-cell lymphoma-associated protein x [Bax], cytochrome c [Cyt-c] and cleaved caspase 3 [an activation product of caspase 3]) in GC-1 cells 24 h after irradiation. **Results** CCK-8 results showed that H<sub>2</sub> significantly increased the viability of GC-1 cells after irradiation ( $P < 0.01$ ), and flow cytometry showed that H<sub>2</sub> significantly reduced the apoptosis rate ( $P < 0.01$ ). The results of specific fluorescent probe staining showed that H<sub>2</sub> reduced the increase of intracellular ROS and inhibited the decrease of mitochondrial membrane potential after irradiation ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). Western blotting results showed that H<sub>2</sub> inhibited the expression of mitochondrial apoptotic proteins (Bax, Cyt-c and cleaved caspase 3) in GC-1 cells after irradiation ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). **Conclusion** H<sub>2</sub> can protect mouse spermatogonia from ionizing radiation injury of <sup>60</sup>Co  $\gamma$  ray irradiation by reducing ROS production, protecting mitochondrial membrane potential, and inhibiting mitochondrial apoptotic pathway.

[ **Key words** ] hydrogen; ionizing radiation; reactive oxygen species; mitochondrial apoptotic pathway; spermatogonium

[ Acad J Sec Mil Med Univ, 2021, 42(10): 1085-1090 ]

随着核能在军事、医疗和能源等领域的广泛应用,电离辐射对人类健康的影响越来越引起人们的关注。国际癌症研究机构全球癌症观测站报告,2018年全球新增癌症病例总数超过1 800万(<https://gco.iarc.fr/>)。有50%~60%的癌症患者需要应用放射治疗<sup>[1]</sup>。由于医学成像和图像引导干预的需要,美国的电离辐射总暴露剂量从1980年到2014年增加了6倍<sup>[2]</sup>。男性生殖系统对电离辐射极为敏感,即使是非常低的剂量也会对精原细胞造成显著的损伤<sup>[3-4]</sup>。目前对于男性生殖系统电离辐射损伤还缺乏良好的辐射防护措施<sup>[5]</sup>,寻找安全、有效的辐射防护剂对于防护男性生殖系统电离辐射损伤具有重要意义。

H<sub>2</sub>是自然状态下最小的气体分子,无色、无味且无毒。由于人体内缺乏代谢H<sub>2</sub>的酶,H<sub>2</sub>在医学领域一直被认为是一种惰性气体。2007年,Ohsawa等<sup>[6]</sup>报道H<sub>2</sub>通过选择性清除羟自由基和硝基过氧化物阴离子,可有效减轻氧化应激导致的损伤。之后陆续有研究发现,H<sub>2</sub>在缺血/再灌注损伤、器官移植、代谢综合征、炎症和急性放射病等领域发挥了保护性作用。其中,H<sub>2</sub>的辐射防护效应已经在多项体内、外研究中得到证实,尤其值得关注<sup>[7]</sup>。本课题组前期研究也表明,富H<sub>2</sub>溶液在动物水平和细胞水平都有较好的辐射防护效果<sup>[8-9]</sup>。本研究以小鼠精原细胞系GC-1细胞为研究对象,观察在细胞培养系统中添加H<sub>2</sub>对GC-1细胞的辐射防护效果,探讨H<sub>2</sub>的辐射防护作用机制,为H<sub>2</sub>在辐射防护方面的研究提供理论和实验基础。

## 1 材料和方法

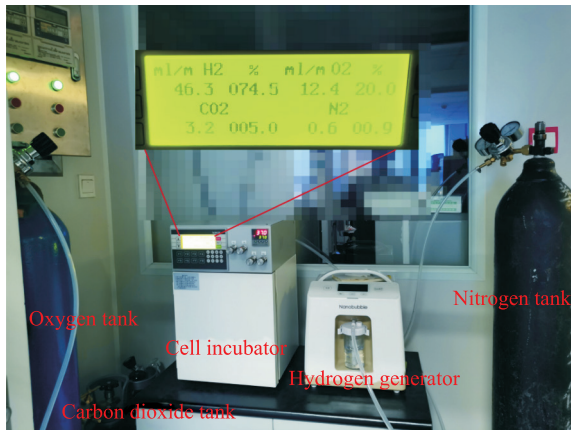
1.1 细胞、试剂与仪器 小鼠精原细胞系GC-1细胞购自通派(上海)生物科技有限公司,培养类型为贴壁

培养。

CCK-8试剂盒购自美国MCE公司(货号:59920),膜联蛋白V-FITC细胞凋亡试剂盒购自美国BD公司(货号:0027279),2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA)荧光探针和线粒体膜电位JC-1荧光探针试剂盒购自武汉伊莱瑞特科技股份有限公司(货号:E-CK-A301和E-BC-K138-F), $\beta$ -actin和细胞色素c(cytochrome c, Cyt-c)抗体购自美国Proteintech公司(货号:66009-I-Ig和10993-1-AP),B淋巴细胞瘤相关蛋白x(B-cell lymphoma-associated protein x, Bax)抗体购自美国ABclone公司(货号:A12009),cleaved-caspase 3(caspase 3活化产物)抗体购自美国Affinity公司(货号:AF7022),抗兔IgG购自武汉赛维尔生物科技有限公司(货号:GB23303),BCA蛋白浓度测定试剂盒购自杭州碧云天生物技术有限公司(货号:P0010S)。

SynergyNeo2型酶标仪(美国BioTek公司),CytoFlex型流式细胞仪(美国Beckman Counter公司),Axio Vert.A1型荧光显微镜(德国ZEISS公司)。辐射源为海军军医大学(第二军医大学)海军医学系舰船辐射医学防护教研室辐照中心<sup>60</sup>Co辐射源。

1.2 细胞处理与照射 将GC-1细胞分为4组:对照组、H<sub>2</sub>组、照射组和照射加H<sub>2</sub>组。照射组和照射加H<sub>2</sub>组细胞予<sup>60</sup>Co  $\gamma$ 射线单次照射,累积辐射剂量为8 Gy(剂量率为0.897 Gy/min)。H<sub>2</sub>组和照射加H<sub>2</sub>组细胞在照射前使用自行设计的H<sub>2</sub>细胞培养系统(75% H<sub>2</sub>、20% O<sub>2</sub>和5% CO<sub>2</sub>,图1)培养1 h。照射后将GC-1细胞放入不含H<sub>2</sub>的细胞培养箱中继续培养,并进行后续实验。

图1 H<sub>2</sub>细胞培养系统Fig 1 H<sub>2</sub> cell culture system

1.3 CCK-8法检测细胞活力 照射前24 h, 将状态良好的对数生长期GC-1细胞铺于4块96孔板中, 每组1块96孔板, 设5个复孔, 每孔接种5 000个细胞。照射后24 h更换为100 μL含10 μL CCK-8试剂的培养基。继续在细胞培养箱内孵育2 h, 用酶标仪检测450 nm波长处的光密度(*D*)值。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡 采用膜联蛋白V-FITC/PI双染流式细胞术检测GC-1细胞凋亡情况。照射前24 h, 将状态良好的对数生长期GC-1细胞铺于4块6孔板中, 每组1块6孔板, 设3个复孔, 每孔接种 $3 \times 10^5$ 个细胞。照射后24 h, 用不含EDTA的胰酶消化细胞, 用原细胞培养基终止消化。采用预冷的PBS洗涤细胞3次, 加入100 μL预冷的结合缓冲液重悬细胞。加入膜联蛋白V-FITC和PI各5 μL, 室温避光孵育20 min。加入400 μL预冷的结合缓冲液, 上流式细胞仪检测。

1.5 细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测 采用DCFH-DA荧光探针法检测GC-1细胞内ROS水平。照射前24 h, 将状态良好的对数生长期GC-1细胞铺于4块24孔板中, 每组1块24孔板, 设3个复孔, 每孔接种 $5 \times 10^4$ 个细胞。照射后2 h弃培养基, 用PBS洗涤1次, 加入500 μL的DCFH-DA(10 μmol/L)染液, 置于细胞培养箱内孵育20 min。用清洗液清洗2次, 加入1 mL细胞培养基, 在显微镜下拍照分析。

1.6 细胞线粒体膜电位检测 采用JC-1荧光探针法检测细胞线粒体膜电位。当线粒体膜电位较高时, JC-1聚集在线粒体的基质中形成聚合物(JC-1 aggregate), 产生红色荧光; 当线粒体膜电位较低时, JC-1不能聚集在线粒体的基质中, 为单体(JC-1

monomer), 产生绿色荧光。照射前24 h, 将状态良好的对数生长期GC-1细胞铺于4块24孔板中, 每组1块24孔板, 设3个复孔, 每孔接种 $5 \times 10^4$ 个细胞。照射后2 h弃培养基, 用PBS洗涤1次, 加入500 μL JC-1工作液, 置于细胞培养箱内孵育20 min。用JC-1染色缓冲液清洗2次, 加入1 mL细胞培养基, 在显微镜下拍照分析。

1.7 蛋白质印迹法 照射前24 h, 将状态良好的对数生长期GC-1细胞铺于4块6孔板中, 每组1块6孔板, 每孔接种 $5 \times 10^4$ 个细胞。照射后24 h于冰上用含0.1%蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的蛋白质裂解液裂解细胞, 超声破碎细胞后离心, 得到细胞蛋白。采用BCA蛋白浓度测定试剂盒测蛋白浓度后, 依次上样、电泳、电转膜、封闭、标记一抗、洗膜、标记二抗和洗膜, 最后加HRP标记的显影液, 曝光分析。

1.8 统计学处理 应用SPSS 13.0软件进行统计分析, 应用GraphPad Prism 8.0软件绘图。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本*t*检验。检验水准( $\alpha$ )为0.05。

## 2 结果

2.1 H<sub>2</sub>升高照射后GC-1细胞活力 CCK-8检测结果显示, 照射组GC-1细胞的活力[(93.00±2.03)%]较对照组[(100.00±3.49)%]降低( $P < 0.01$ ), 照射加H<sub>2</sub>组细胞活力[(102.76±4.93)%]较照射组升高( $P < 0.01$ )。结果表明H<sub>2</sub>对电离辐射导致的GC-1细胞活力降低有防护作用。

2.2 H<sub>2</sub>缓解照射后GC-1细胞凋亡率升高 流式细胞术检测结果(图2)显示, 照射组GC-1细胞凋亡率[(27.54±1.68)%]较对照组[(16.90±0.08)%]升高( $P < 0.01$ ), 照射加H<sub>2</sub>组细胞凋亡率[(21.10±0.40)%]较照射组降低( $P < 0.01$ )。结果表明H<sub>2</sub>对电离辐射导致的GC-1细胞凋亡率升高有防护作用。

2.3 H<sub>2</sub>缓解照射后GC-1细胞内ROS水平的升高 DCFH-DA荧光探针法检测结果(图3)显示, 照射组GC-1细胞内ROS水平(灰度值219.41±10.44)较对照组(灰度值80.46±14.43)升高( $P < 0.01$ ), 照射加H<sub>2</sub>组细胞内ROS水平(灰度值143.37±10.26)较照射组降低( $P < 0.01$ )。结果表明H<sub>2</sub>能缓解电离辐射后GC-1细胞内ROS水平的升高。

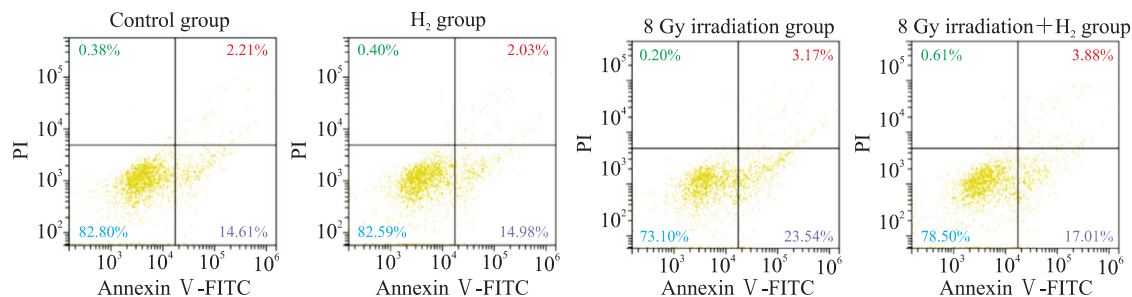


图2 流式细胞术检测小鼠精原细胞 GC-1 的凋亡率

Fig 2 Apoptosis rate of mouse spermatogonia GC-1 detected by flow cytometry

PI: Propidium iodide; FITC: Fluorescein isothiocyanate.

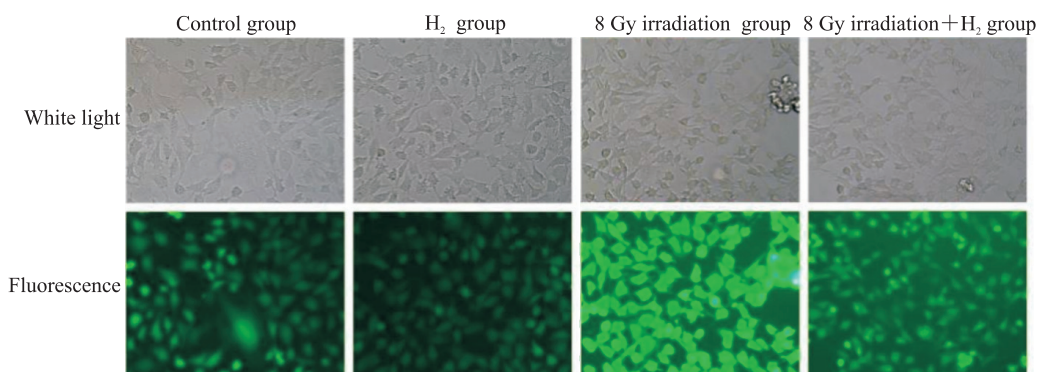


图3 DCFH-DA 荧光探针法检测小鼠精原细胞 GC-1 内 ROS 水平 (200×)

Fig 3 ROS level in mouse spermatogonia GC-1 detected by DCFH-DA fluorescence probe (200×)

DCFH-DA: 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; ROS: Reactive oxygen species.

2.4 H<sub>2</sub> 缓解照射后 GC-1 细胞内线粒体膜电位降低 (JC-1 聚合物/单体 1.65±0.04) 降低 (P<0.01), 照射加 H<sub>2</sub> 组细胞内线粒体膜电位 (JC-1 聚合物/单体 1.50±0.05) 较照射组升高 (P<0.05)。结果表明 H<sub>2</sub> 能缓解电离辐射诱导的 GC-1 细胞内线粒体膜电位降低。

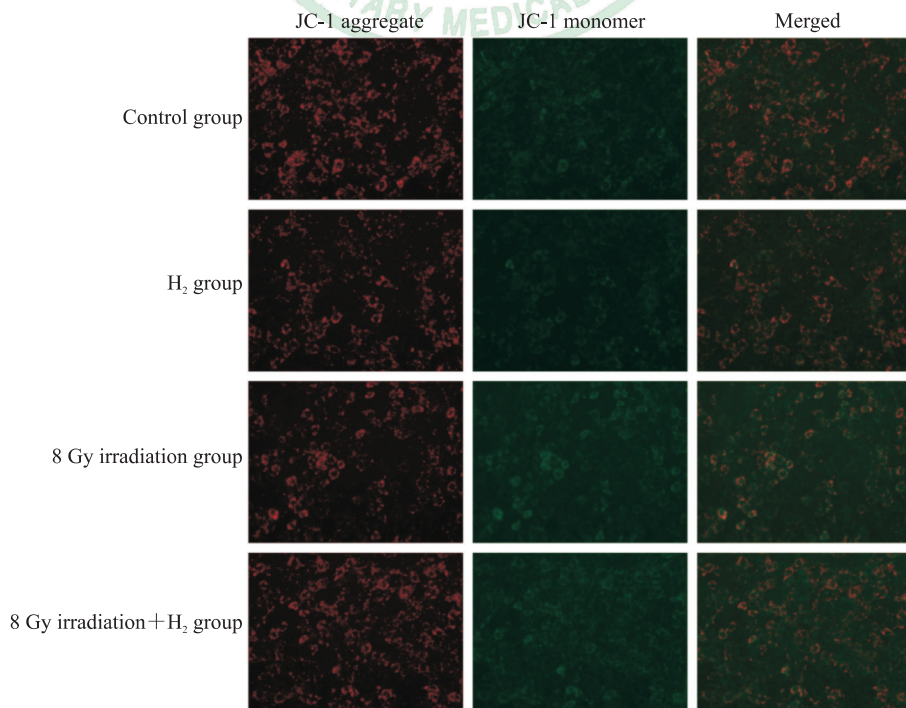


图4 JC-1 荧光探针法检测小鼠精原细胞 GC-1 内线粒体膜电位 (200×)

Fig 4 Mitochondrial membrane potential of mouse spermatogonia GC-1 detected by JC-1 fluorescence probe (200×)

2.5 H<sub>2</sub> 缓解照射后 GC-1 细胞中线粒体凋亡通路蛋白的表达升高 蛋白质印迹法检测结果(图 5)显示,照射组 GC-1 细胞中 Bax、Cyt-c 和 cleaved-caspase 3 的表达水平(分别为  $0.49 \pm 0.03$ 、 $0.49 \pm 0.03$ 、 $0.76 \pm 0.04$ )均高于对照组(分别为  $0.26 \pm 0.03$ 、 $0.11 \pm 0.02$ 、 $0.24 \pm 0.02$ ,  $P$  均  $< 0.01$ ),而照射加 H<sub>2</sub> 组细胞中 Bax、Cyt-c 和 cleaved-caspase 3 的表达水平(分别为  $0.40 \pm 0.03$ 、 $0.33 \pm 0.03$ 、 $0.53 \pm 0.02$ )均低于照射组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。结果表明 H<sub>2</sub> 能缓解电离辐射后 GC-1 细胞中线粒体凋亡通路蛋白的表达水平升高。

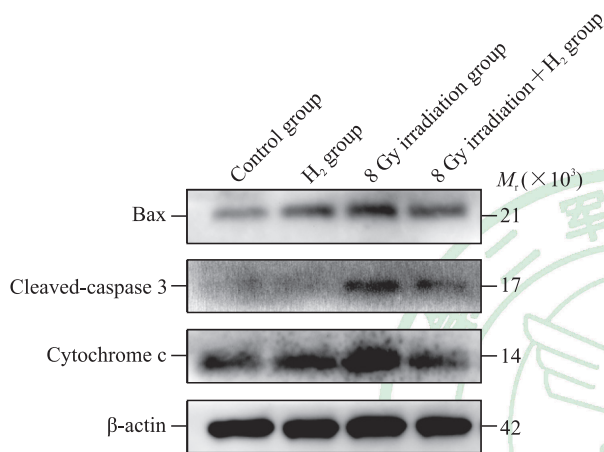


图 5 蛋白质印迹法检测小鼠精原细胞 GC-1 中线粒体凋亡通路蛋白的表达

Fig 5 Expression of mitochondrial apoptosis pathway proteins in mouse spermatogonia GC-1 detected by Western blotting

Bax: B-cell lymphoma-associated protein x.

### 3 讨论

本研究结果发现, H<sub>2</sub> 对 8 Gy  $\gamma$  射线照射后 GC-1 细胞有防护效应。CCK-8 检测结果显示,照射加 H<sub>2</sub> 组于照射后 24 h 细胞活力相较照射组升高( $P < 0.01$ )。膜联蛋白 V-FITC/PI 双染流式细胞术检测结果显示,照射加 H<sub>2</sub> 组于照射后 24 h 细胞凋亡率相较照射组降低( $P < 0.01$ )。这些结果表明, H<sub>2</sub> 可以增加辐射后 GC-1 细胞的活力、降低辐射后的细胞凋亡率、减轻细胞的辐射损伤。

电离辐射对机体的损伤分为直接效应和间接效应,其中后者占据主导地位。间接辐射损伤的核心机制是电离使生物体内的水分子发生辐射分解反应,产生诸如超氧阴离子( $O_2^-$ )、过氧化氢、羟自由基( $\cdot OH$ )及一氧化氮等 ROS 或活性氮自

由基,进而攻击生物大分子。线粒体是细胞生存、死亡和信号转导所必需的细胞器,是产生 ROS 的主要细胞器之一,同时也是 ROS 的损伤靶点<sup>[10]</sup>。在正常的生理条件下,由线粒体产生的 ROS 被细胞的抗氧化防御系统清除。一旦 ROS 产生过度,就会导致过量自由基积累,从而损害线粒体和细胞<sup>[11]</sup>。在细胞凋亡过程中,外部刺激如辐射也可导致线粒体膜孔形成,降低线粒体膜电位。线粒体膜电位的降低是线粒体功能障碍的主要表现,会导致线粒体电子传递链的缺陷和 ATP 合成障碍<sup>[12]</sup>。线粒体膜电位降低也是细胞凋亡早期的特征,会导致促凋亡蛋白 Cyt-c 释放,诱导细胞凋亡。本研究结果表明, H<sub>2</sub> 可以降低照射后 GC-1 细胞内 ROS 的水平、抑制线粒体膜电位的降低,对细胞内线粒体起保护作用。

目前,公认的细胞凋亡通路主要有 3 条,分别是以 Fas 介导的 caspase 8 激活为标志的死亡受体通路、以 caspase 9 和 caspase 3 激活为标志的线粒体通路及内质网通路<sup>[13-15]</sup>。细胞受到凋亡刺激(如  $\gamma$  射线、ROS 过高)后会引发 Bax 与 B 淋巴瘤 2 同源拮抗剂(B-cell lymphoma 2 antagonist/killer, Bak)形成低聚物复合体,插入到线粒体外膜孔隙,导致线粒体渗透压改变、跨膜电位丢失,促使 Cyt-c 从线粒体释放到细胞质。Cyt-c 与细胞凋亡激活因子 1 结合形成凋亡复合体,活化 caspase 9 前体,从而激活 caspase 3 和 caspase 7 引发 caspase 级联反应,进而诱发细胞凋亡<sup>[16]</sup>。本研究结果表明, H<sub>2</sub> 可以抑制照射后 GC-1 细胞内 Bax 和 Cyt-c 的表达、抑制 caspase 3 的激活,最终抑制线粒体凋亡通路的激活,发挥电离辐射损伤防护效应。

综上所述, H<sub>2</sub> 对 GC-1 细胞具有较好的辐射防护作用,作用机制与其清除 ROS、保护线粒体膜电位、抑制线粒体凋亡通路有关,在辐射防护方面有广泛的应用前景。

### [参考文献]

- [1] ROSENBLATT E, IZEWSKA J, ANACAK Y, PYNDA Y, SCALLIET P, BONIOL M, et al. Radiotherapy capacity in European countries: an analysis of the Directory of Radiotherapy Centres (DIRAC) database[J]. Lancet Oncol, 2013, 14: e79-e86. DOI: 10.1016/S1470-2045(12)70556-9.
- [2] FAZEL R, GERBER T C, BALTER S, BRENNER D J,

- CARR J J, CERQUEIRA M D, et al. Approaches to enhancing radiation safety in cardiovascular imaging: a scientific statement from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2014, 130: 1730-1748.
- [3] DE FELICE F, MARCHETTI C, MARAMPON F, CASCIALLI G, MUZZI L, TOMBOLINI V. Radiation effects on male fertility[J]. *Andrology*, 2019, 7: 2-7.
- [4] FUKUNAGA H, BUTTERWORTH K T, YOKOYA A, OGAWA T, PRISE K M. Low-dose radiation-induced risk in spermatogenesis[J]. *Int J Radiat Biol*, 2017, 93: 1291-1298.
- [5] DEL-POZO-LÉRIDA S, SALVADOR C, MARTÍNEZ-SOLER F, TORTOSA A, PERUCHO M, GIMÉNEZ-BONAFÉ P. Preservation of fertility in patients with cancer (Review)[J]. *Oncol Rep*, 2019, 41: 2607-2614.
- [6] OHSAWA I, ISHIKAWA M, TAKAHASHI K, WATANABE M, NISHIMAKI K, YAMAGATA K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals[J]. *Nat Med*, 2007, 13: 688-694.
- [7] HU Q, ZHOU Y, WU S, WU W, DENG Y, SHAO A. Molecular hydrogen: a potential radioprotective agent[J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 130: 110589. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110589.
- [8] CHUAI Y, SHEN J, QIAN L, WANG Y, HUANG Y, GAO F, et al. Hydrogen-rich saline protects spermatogenesis and hematopoiesis in irradiated BALB/c mice[J]. *Med Sci Monit*, 2012, 18: BR89-BR94.
- [9] CHUAI Y, GAO F, LI B, ZHAO L, QIAN L, CAO F, et al. Hydrogen-rich saline attenuates radiation-induced male germ cell loss in mice through reducing hydroxyl radicals[J]. *Biochem J*, 2012, 442: 49-56.
- [10] GOTTLIEB R A. Mitochondria and apoptosis[J]. *Biol Signals Recept*, 2001, 10(3/4): 147-161.
- [11] ZOROV D B, FILBURN C R, KLOTZ L O, ZWEIER J L, SOLLOTT S J. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes[J]. *J Exp Med*, 2000, 192: 1001-1014.
- [12] VAYSSIERE J L, PETIT P X, RISLER Y, MIGNOTTE B. Commitment to apoptosis is associated with changes in mitochondrial biogenesis and activity in cell lines conditionally immortalized with Simian virus 40[J]. *PNAS*, 1994, 91: 11752-11756.
- [13] LI X, FANG F, GAO Y, TANG G, XU W, WANG Y, et al. ROS induced by KillerRed Targeting Mitochondria (mtKR) enhances apoptosis caused by radiation via Cyt c/caspase-3 pathway[J/OL]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 4528616. DOI: 10.1155/2019/4528616.
- [14] OBEXER P, AUSSERLECHNER M J. X-linked inhibitor of apoptosis protein—a critical death resistance regulator and therapeutic target for personalized cancer therapy[J/OL]. *Front Oncol*, 2014, 4: 197. DOI: 10.3389/fonc.2014.00197.
- [15] MA L, WEI J, WAN J, WANG W, WANG L, YUAN Y, et al. Low glucose and metformin-induced apoptosis of human ovarian cancer cells is connected to ASK1 via mitochondrial and endoplasmic reticulum stress-associated pathways[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38: 77. DOI: 10.1186/s13046-019-1090-6.
- [16] XIONG S, MU T, WANG G, JIANG X. Mitochondria-mediated apoptosis in mammals[J]. *Protein Cell*, 2014, 5: 737-749.

[本文编辑] 尹 茶