

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00139

长期高盐刺激诱导白假丝酵母菌耐受氧化应激

杨 丰^{1,2,△}, 曹永兵^{2,△}, 颜天华¹, 王秋娟¹, 季 晖^{1*}, 姜远英^{2*}

1. 中国药科大学药学院生理学教研室, 南京 210009
2. 第二军医大学药学院新药研究中心, 上海 200433

[摘要] **目的** 观察长期高浓度氯化钠刺激对白假丝酵母菌耐受氧化应激能力的影响。**方法** 选用2株白假丝酵母菌国际标准株 SC5314 和 ATCC76615, 用含有 1 mol/L 氯化钠的 YEPD 培养液连续培养 24 d, 考察子代与亲本菌对氧化应激的耐受能力。采用 real-time RT-PCR 考察白假丝酵母菌抗氧化酶的转录水平, 并测定其抗氧化酶的活性, 利用丙二醛(MDA)测定试剂盒衡量白假丝酵母菌脂质过氧化损伤, 并测量白假丝酵母菌菌体细胞内活性氧水平。**结果** 长期用高浓度氯化钠刺激能增加白假丝酵母菌对过氧化氢(12 mmol/L)和咪康唑(4 μg/ml)的耐受性, 促进其抗氧化酶的转录, 使抗氧化酶 SOD1、CAT1、谷胱甘肽还原酶(GR, 转录基因为 TTR1)的转录水平升高 2~5 倍, 增强抗氧化酶的活性($P < 0.05$), 降低脂质过氧化损伤($P < 0.01$), 减少菌体细胞内活性氧水平($P < 0.001$)。**结论** 长期高浓度氯化钠刺激能够增强白假丝酵母菌耐受氧化应激的能力。

[关键词] 白假丝酵母菌; 氯化钠; 氧化性应激; 抗氧化酶; 脂质过氧化作用; 活性氧

[中图分类号] R 379.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)02-0139-05

Long-term exposure to high concentration of salt stress induces antioxidative response in *Candida albicans*

YANG Feng^{1,2,△}, CAO Yong-bing^{2,△}, YAN Tian-hua¹, WANG Qiu-juan¹, JI Hui^{1*}, JIANG Yuan-ying^{2*}

1. Department of Physiology, School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, Jiangsu, China
2. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of long-term exposure to high concentration of sodium chloride on resistance to oxidative stress in *Candida albicans* (*C. albicans*). **Methods** Two *C. albicans* strains, SC5314 and ATCC76615, were challenged with 1 mol/L NaCl for 24 consecutive days. Spot assay was performed to compare the resistance to hydrogen peroxide and miconazole between the wild-type and derivative strains. The transcription levels of antioxidant enzymes, including superoxide dismutase (SOD1), catalase (CAT1), and glutathione reductase (GR), were determined by real-time RT-PCR, and their activities were also examined. Peroxidation of lipid was examined by determining the contents of malondialdehyde (MDA); the cellular level of reactive oxygen species (ROS) was also determined. **Results** Long-term exposure to high concentration of sodium chloride enhanced the resistance of *C. albicans* to oxidative stress (hydrogen peroxide [12 mmol/L] and miconazole [4 μg/ml]); the exposure increased the transcription of antioxidant enzymes, SOD1, CAT1, and GR by 2-5 folds; and it also significantly increased the activities of the antioxidant enzymes ($P < 0.05$). Meanwhile, it significantly alleviated the peroxidation of lipid ($P < 0.01$) and decreased the intracellular ROS contents ($P < 0.01$). **Conclusion** Long-term exposure to salt stress can increase the resistance to oxidative stress in *C. albicans*.

[Key words] *Candida albicans*; sodium chloride; oxidative stress; antioxidant enzymes; lipid peroxidation; reactive oxygen species

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(2):139-143]

假丝酵母菌种类很多, 其中白假丝酵母菌最为常见, 其致病力最强^[1]。白假丝酵母菌通常存在于人的口腔、上呼吸道、肠道及阴道黏膜。白假丝酵母

菌在这些生存环境中必须经受多种生理性应激反应, 包括温度变化、离子胁迫、渗透压改变和氧化应激。正是由于白假丝酵母菌具有高适应性, 决定了

[收稿日期] 2010-12-09 **[接受日期]** 2010-12-28

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(2008AA02Z128), 国家重点基础研究发展计划(2005CB523105), 上海市基础研究重点项目(08JC1405900)。Supported by National High Technology Research and Development Program of China (2008AA02Z128), National Program on Key Basic Research Projects (2005CB523105), and Shanghai Major Basic Research Development Program (08JC1405900)。

[作者简介] 杨 丰, 博士生。E-mail: yangf0405@sina.com; 曹永兵, 副教授。E-mail: ybcao@vip.sina.com

△共同第一作者(Co-first authors)。

* 通信作者(Corresponding authors)。Tel: 025-83271341, E-mail: huijicpu@163.com; Tel: 021-81871201, E-mail: jiangyy@smmu.edu.cn

它可在人的多个系统或器官与宿主共栖生存,也决定了它是一种重要的条件致病菌^[2-3]。一般而言,病原念珠菌比酿酒酵母菌更耐受高盐刺激^[4],而在病原念珠菌中,白假丝酵母菌对高盐刺激的耐受性较强^[5]。机体对病原念珠菌的防御主要由免疫系统完成,吞噬细胞发挥吞噬作用,并通过呼吸爆发释放活性氧等物质,活性氧和其他细胞因子共同作用使被吞噬的病原微生物经受致死性打击^[6]。白假丝酵母菌存在完备的抗氧化应激机制,从而可以逃避机体免疫系统的杀伤作用^[7]。

目前已有文献报道了短时间的盐胁迫对白假丝酵母菌基因表达谱学和蛋白质组学的影响^[8-9]。白假丝酵母菌的高适应性是在长期进化过程中形成的,很有必要模拟长期盐胁迫环境下白假丝酵母菌的适应性反应。因此,本研究用高浓度氯化钠体外长期刺激2株白假丝酵母菌国际标准株得到子代,考察子代对氧化应激和氧化损伤的敏感性,从而探讨白假丝酵母菌对高盐的耐受性与对氧化应激耐受性的关系。

1 材料和方法

1.1 菌株 白假丝酵母菌(*Candida albicans*) ATCCMYA-2876 (SC5314)由 William A Fonzi 教授(Department of Microbiology and Immunology, Georgetown University, Washington, USA)馈赠。白假丝酵母菌(*Candida albicans*) ATCC76615 由第二军医大学长征医院真菌室馈赠。

1.2 培养基 沙堡葡萄糖琼脂培养基(SDA):蛋白胨 10 g,葡萄糖 40 g,琼脂 18 g,加三蒸水 900 ml 溶解,加入 2 mg/ml 氯霉素水溶液 50 ml,调整 pH 至 7.0,定容至 1 000 ml,高压灭菌,4℃ 保存。YEPD 培养液:酵母浸膏 10 g,蛋白胨 20 g,葡萄糖 20 g,加三蒸水 900 ml 溶解,定容至 1 000 ml,高压灭菌,4℃ 保存。0.1 mol/L PBS 液:NaCl 8.0 g,KCl 0.4 g,Na₂HPO₄ 0.133 g,KH₂PO₄ 0.06 g,NaHCO₃ 0.35 g,加三蒸水定容至 1 000 ml,高压灭菌,4℃ 保存。

1.3 主要试剂 30% 过氧化氢(国药集团化学试剂有限公司),咪康唑(miconazole, MCZ, Sigma), 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(2',7'-dichlorofluorescein-diacetate, DCFH-DA, Sigma),二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)为国产分析纯,用前重蒸。真菌 RNA_{out} 试剂盒(北京天恩泽基因科技有限公司),柱式 RNA_{clean} 试剂盒(北京天恩泽基因科技有限公司),DNase I [TaKaRa, 宝生物工程(大连)有限公司],PrimeScript RT Reagent Kit [TaKaRa, 宝生物工程(大连)有限公司]。Yeast Protein Kit (Zymo

Research)。以下产品均购自碧云天生物技术研究所以:BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型),总 SOD 活性检测试剂盒(NBT 法),过氧化氢酶检测试剂盒,谷胱甘肽还原酶检测试剂盒,脂质氧化(丙二醛,MDA)检测试剂盒。

1.4 主要仪器及装置 Eppendorf 5417R 高速冷冻离心机(Eppendorf),Biofuge Stratos 高速冷冻离心机(Heraeus),Tgradient PCR 仪(Biometra),XW-80A 型漩涡混合器(江苏海门市麒麟医用仪器厂),7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems),Infinite M200 型多功能酶标仪(Tecan)。

1.5 高盐刺激子代的获取 白假丝酵母菌国际标准株 SC5314 和 ATCC76615 用含有 1 mol/L NaCl 的 YEPD 培养液中培养 16 h,将菌液涂布于含有 1 mol/L NaCl 的 YEPD 固体培养基上培养 24 h,挑取生长良好的单个菌落转移到 1 ml 新鲜的含有 1 mol/L NaCl 的 YEPD 培养液中,继续培养 16 h,同样方法依次传代 24 d,得到子代 SC5314-NaCl 和 ATCC76615-NaCl。菌株保存:每 300 μl 菌悬液与 700 μl 80% 甘油混合,-70℃ 保存。所有实验用菌株均在 SDA 平板上接种活化,30℃ 静置培养 24 h,挑单个菌落。

1.6 点板实验 首先配制含药的 YEPD 平板,参考文献报道选择药物浓度为:H₂O₂ 12 mmol/L^[10],MCZ 4 μg/ml^[11]。白假丝酵母菌 SC5314 和 SC5314-NaCl,ATCC76615 和 ATCC76615-NaCl 在 YEPD 培养液中分别连续 2 次活化 16 h,达到对数生长期后期,3 000×g 离心 5 min,用 1 mol/L PBS 洗 2 次,调整菌密度为 1×10⁷ cells/ml,10 倍倍比稀释,得到 5 个密度梯度,即:1×10⁷、1×10⁶、1×10⁵、1×10⁴、1×10³ cells/ml,取 3 μl 菌液点在含药平板上。30℃ 静置培养 48 h,拍照记录实验结果。

1.7 抗氧化酶转录水平的测定 菌株培养方法如前所述,采用小量酵母菌总 RNA 抽提试剂盒(天恩泽基因工程有限公司)进行总 RNA 抽提。用 DNA 酶去除基因组 DNA 污染,用反转录试剂盒反转录为 cDNA。-20℃ 保存。目的基因的引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,其序列见表 1。按照以下体系冰上配置 RT-PCR 反应液:2×SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa 公司) 10 μl、Primer FWD 0.5 μl、Primer RV 0.5 μl、模板 cDNA 2 μl、ddH₂O 7 μl。混匀后按如下条件进行 RT-PCR 反应:90℃ 1 min,95℃ 10 s,60℃ 20 s,72℃ 30 s,40 个循环。熔解曲线程序为 60~95℃,每秒加热 0.1℃,最后 40℃ 冷却。记录反应终止循环阈值(cycle threshold, Ct),用内参 18S rRNA 的 Ct 值校正目的基因 Ct 值,得到 ΔCt,比

较实验组和对照组的 ΔC_t 得到 $\Delta\Delta C_t$, 基因表达量比值(实验组/对照组) = $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

表 1 Real-time RT-PCR 所用的引物序列

Tab 1 Sequences of primers for real-time RT-PCR

Primer name	Sequence	Amplicon size(bp)
SOD1	F: CTT TTC AGT CGC TGT TGT CA R: CAT TTG GAT CAT TAC CTT CA	119
CAT1	F: ATA AAT GGT CCA ACA AAA AA R: GGT CAA ATC AAA CAC AGA AA	142
TTR1	F: TTC ATT GCC TCC AAA TCC TAT R: CAC CGT CGT CAA CTT CGT CTA	109
18S rRNA	F: TCT TTC TTG ATT TTG TGG GTG G R: TCG ATA GTC CCT CTA AGA AGT G	150

F: Forward primer; R: Reverse primer

1.8 抗氧化酶活力及脂质过氧化损伤的测定 菌株培养方法如前所述,用 YEPD 调整菌浓度达到 $D_{600}=0.1$,用 100 ml YEPD 继续培养至 $D_{600}=1.0$, $3\ 000\times g$ 离心 5 min,收集菌体,采用 Yeast Protein Kit 提取总蛋白,BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)测量总蛋白的浓度。采用总 SOD 活性检测试剂盒(NBT 法)、过氧化氢酶检测试剂盒、谷胱甘肽还原酶检测试剂盒分别检测超氧化物歧化酶(SOD1),过氧化氢酶(CAT1)和谷胱甘肽还原酶(GR,转录基因为 TTR1)的活性。采用脂质氧化(丙二醛,MDA)检测试剂盒测定脂质过氧化损伤。

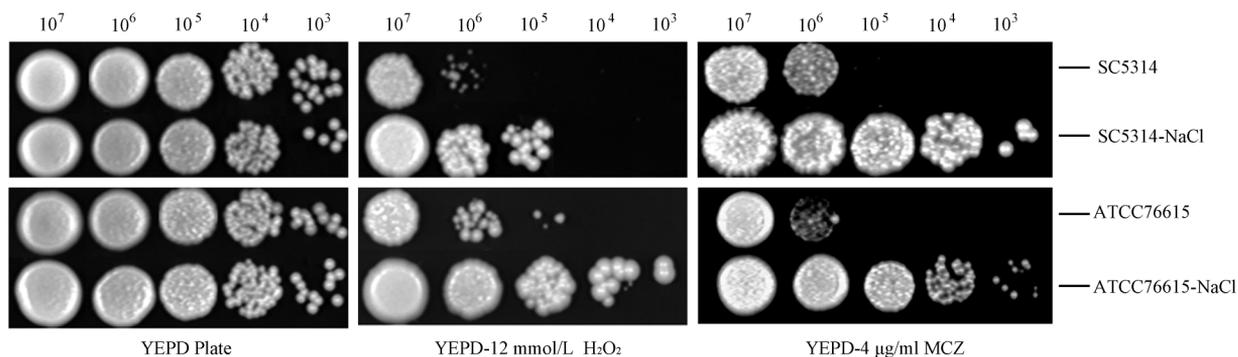


图 1 点板实验结果

Fig 1 Results of spot assay

Each strain was grown from $D_{600}=0.1$ until $D_{600}=1.0$; $3\ \mu\text{l}$ of each dilution was spotted onto YEPD-agar plates supplemented with drugs. Plates were incubated for 48 h at 30°C

2.2 抗氧化酶转录水平 结果表明(图 2):在相同的生长时期,经过 NaCl 长期刺激的菌株,其抗氧化酶的转录水平高于未经刺激的野生菌。但是不同菌株中抗氧化酶基因转录升高的幅度不同,对于菌株 SC5314,长期高盐刺激使过氧化氢酶(CAT1)转录升高幅度最大,而菌株 ATCC76615 中则是超氧化物歧化酶(SOD1)转录的升高幅度最大。

1.9 白假丝酵母菌细胞内活性氧水平测定 白假丝酵母菌 SC5314 和 SC5314-NaCl, ATCC76615 和 ATCC76615-NaCl 在 YEPD 培养液中分别连续 2 次活化 16 h,达到对数生长期后期,离心收集菌体 ($3\ 000\times g$, 4°C , 离心 5 min),用 1 mol/L PBS 洗涤 3 次,彻底除去培养基。湿菌用 PBS 重悬,调整菌浓度至 $D_{600}=1.0$ 。实验设计严格的对照,即:重悬于 PBS 的菌液组,菌液+DCFH-DA 组, PBS+DCFH-DA 组。DCFH-DA 事先配制成 2 mg/ml 的母液,用时加入母液使得 DCFH-DA 终浓度为 $20\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 。 30°C 孵育 30 min,记为 0 h,经过 0.5 h 和 1 h 分别检测荧光信号的强度。利用多功能酶标仪检测荧光信号,激发波长为 485 nm,发射波长为 520 nm。

1.10 统计学处理 RT-PCR 实验操作 3 次,抗氧化酶活性测定、脂质过氧化损伤测定、细胞内活性氧水平测定均操作 3 次,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,统计学分析用 t 检验,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 点板实验 经过高浓度 NaCl 连续刺激 24 d 后,白假丝酵母菌对过氧化氢和咪康唑的耐受能力明显增强。与野生菌 SC5314、ATCC76615 相比,长期高盐刺激后的 SC5314-NaCl 与 ATCC76615-NaCl 更加耐受过氧化氢和咪康唑,而在空白 YEPD 平板上生长状况没有差别(图 1)。

2.3 抗氧化酶活力 我们比较了菌株处于相同的生长时期时抗氧化酶的活力。我们首先提取了总蛋白,计算出其浓度,然后用相关试剂盒分别检测抗氧化酶的活力,最后计算得出样品中的酶活力。从图 3 我们可以看出,长期高盐刺激能够显著增加抗氧化酶的活力($P<0.05$ 或 0.01)。

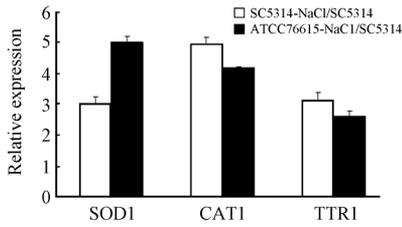


图 2 抗氧化酶的相对转录水平

Fig 2 Relative transcription level of antioxidant enzymes

Each strain was cultured in YEPD medium from $D_{600} = 0.1$ until $D_{600} = 1.0$. Cells were harvested for real-time RT-PCR. Relative transcription level was calculated by comparing the NaCl challenged strain with the wild-type strain. 18S rRNA was used as the internal Control. $n=3, \bar{x} \pm s$

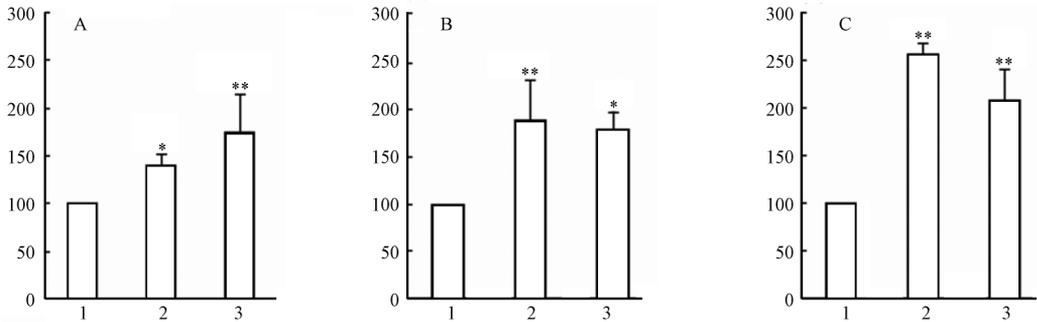


图 3 抗氧化酶活力分析

Fig 3 Analysis of antioxidant enzyme activities

The figure shows changes in the enzymatic activities of superoxide dismutase (A), catalase (B), and glutathione reductase (C) in wild-type strains and strains exposed to 1 mol/L NaCl for 24 consecutive days. 1: Control; 2: SC5314-NaCl; 3: ATCC76615-NaCl. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs Control group; $n=3, \bar{x} \pm s$

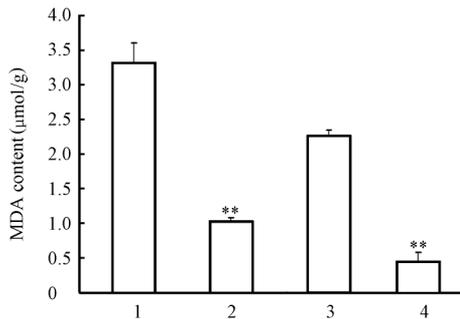


图 4 细胞内丙二醛含量分析

Fig 4 Malondialdehyde (MDA) contents in test strains

1: SC5314; 2: SC5314-NaCl; 3: ATCC76615; 4: ATCC76615-NaCl. ** $P < 0.01$ vs SC5314 or ATCC76615; $n=3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

白假丝酵母菌之所以具有高致病性,与其具有高适应性是分不开的。由于白假丝酵母菌对盐的耐受能力较强,本研究试图探讨高盐环境是否有利于白假丝酵母菌的高适应性。在预实验中,我们发现白假丝酵母菌在含有 1.5 mol/L NaCl 的 YEPD 培养液中生长缓慢,经过 48 h 菌液才变得浑浊。因此我们选择的 NaCl 浓度为 1 mol/L,在此浓度下,白假

2.4 脂质过氧化损伤水平 丙二醛含量检测结果表明:经过 NaCl 长期刺激的 2 株菌(SC5314-NaCl 和 ATCC76615-NaCl)细胞内丙二醛含量低于未经 NaCl 刺激的野生菌 ($P < 0.01$),提示持续性高盐刺激可以诱使白假丝酵母菌适应性降低脂质过氧化损伤水平。

2.5 白假丝酵母菌细胞内活性氧水平 本研究采用 DCFH-DA 作为探针^[12]来检测实验菌株处于相同生长时期细胞内 ROS 水平,结果(图 5)表明:长期高盐刺激后的菌株内源性 ROS 水平比野生菌显著降低 ($P < 0.01$)。

丝酵母菌可以很好地生长。据报道,盐胁迫除了可以诱发渗透压胁迫,还可以诱发氧化应激胁迫,表现为细胞内活性氧的升高,抗氧化酶的转录水平升高和抗氧化代谢物质的积累^[13-15]。

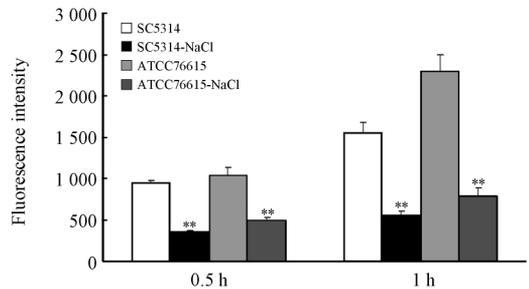


图 5 细胞内 ROS 水平测定

Fig 5 Levels of ROS in cells of *C. albicans*

** $P < 0.01$ vs SC5314 or ATCC76615; $n=3, \bar{x} \pm s$

活性氧是指氧的某些代谢产物和一些反应的含氧物,是细胞内的重要自由基,主要包括超氧阴离子 (O_2^-)、羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 和过氧化氢 (H_2O_2) 等。活性氧在细胞内蓄积会破坏多种细胞成分,包括 DNA、蛋白质和脂质等^[16]。脂质过氧化损伤是指脂质过氧化过程中发生的 ROS 氧化生物膜的过程,即

ROS 与生物膜的磷脂、酶和膜受体相关的多不饱和脂肪酸的侧链及核酸等大分子物质起脂质过氧化反应,形成脂质过氧化产物(lipid peroxide, LPO),如丙二醛、4-羟基壬烯酸(4-hydroxynonenal, HNE)等,从而使细胞膜的流动性和通透性发生改变,最终导致细胞结构和功能的改变。因此,测定脂质过氧化损伤水平可以很好地反映细胞抵抗活性氧损伤的能力^[17]。

白假丝酵母菌细胞内重要的抗氧化酶有超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽还原酶(GR, 由 TTR1 编码)。SOD 可以将 O_2^- 转变成 H_2O_2 , CAT 不但能使组织 H_2O_2 转变成 $\cdot OH$, 还能使之分解为 H_2O 和 O_2 。SOD 与 CAT 在抗脂质过氧化方面有协同作用。GR 也能催化 H_2O_2 的分解,降低细胞内 $\cdot OH$ 的水平。GR 还可以直接保护细胞免受脂质过氧化损伤的作用,其机制是可使脂质过氧化物分解,从而保护生物膜^[18]。本研究表明,高盐刺激可以增强白假丝酵母菌抵抗氧化应激的能力,经过高盐长期刺激的菌株中,抗氧化酶(SOD、CAT、GR)的转录水平高于野生菌,抗氧化酶的活力也显著性高于野生菌。因此,高盐刺激不仅可以促进抗氧化酶的转录,而且可以提高抗氧化酶的活力。在表型上,高盐刺激的菌株比亲本菌耐受过氧化氢和咪康唑,后者虽然是唑类抗真菌剂,但也可以升高细胞内 ROS^[19]。抗氧化能力的增强,可以减少细胞内 ROS 的积累,从而降低 ROS 对细胞的损伤,表现为丙二醛含量的降低,即脂质过氧化的降低。

综上所述,白假丝酵母菌之所以嗜盐,是因为高盐环境有利于白假丝酵母菌增强抗氧化应激的能力,从而增强其适应性和生存能力。

[参 考 文 献]

- Colombo A L, Janini M, Salomao R, Medeiros E A, Wey S B, Pignatari A C. Surveillance programs for detection and characterization of emergent pathogens and antimicrobial resistance: results from the Division of Infectious Diseases, UNIFESP[J]. An Acad Bras Cienc, 2009, 81: 571-587.
- Cannon R D, Lamping E, Holmes A R, Niimi K, Tanabe K, Niimi M, et al. *Candida albicans* drug resistance another way to cope with stress[J]. Microbiology, 2007, 153: 3211-3217.
- Ramirez-Zavala B, Reuss O, Park Y N, Ohlsen K, Morschhauser J. Environmental induction of white-opaque switching in *Candida albicans*[J]. PLoS Pathog, 2008, 4: e1000089.
- Kinclova-Zimmermannova O, Sychrova H. Plasma-membrane Cnh1 Na^+/H^+ antiporter regulates potassium homeostasis in *Candida albicans*[J]. Microbiology, 2007, 153: 2603-2612.
- Krauke Y, Sychrova H. Functional comparison of plasma-membrane Na^+/H^+ antiporters from two pathogenic *Candida* species[J]. BMC Microbiol, 2008, 8: 80.
- Destin K G, Linden J R, Laforce-Nesbitt S S, Bliss J M. Oxidative burst and phagocytosis of neonatal neutrophils confronting *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* [J]. Early Hum Dev, 2009, 85: 531-535.
- Chauhan N, Latge J P, Calderone R. Signalling and oxidant adaptation in *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* [J]. Nat Rev Microbiol, 2006, 4: 435-444.
- Enjalbert B, Nantel A, Whiteway M. Stress-induced gene expression in *Candida albicans*: absence of a general stress response[J]. Mol Biol Cell, 2003, 14: 1460-1467.
- Yin Z, Stead D, Walker J, Selway L, Smith D A, Brown A J, et al. A proteomic analysis of the salt, cadmium and peroxide stress responses in *Candida albicans* and the role of the Hog1 stress-activated MAPK in regulating the stress-induced proteome[J]. Proteomics, 2009, 9: 4686-4703.
- Abegg M A, Lucietto R, Alabarse P V, Mendes M F, Benfato M S. Differential resistance to oxidants and production of hydrolytic enzymes in *Candida albicans*[J]. Mycopathologia, 2010, 171: 35-41.
- Jha S, Dabas N, Karnani N, Saini P, Prasad R. ABC multidrug transporter Cdr1p of *Candida albicans* has divergent nucleotide-binding domains which display functional asymmetry[J]. FEMS Yeast Res, 2004, 5: 63-72.
- LeBel C P, Ischiropoulos H, Bondy S C. Evaluation of the probe 2', 7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress [J]. Chem Res Toxicol, 1992, 5: 227-231.
- Avsian-Kretschmer O, Gueta-Dahan Y, Lev-Yadun S, Gollop R, Ben-Hayyim G. The salt-stress signal transduction pathway that activates the gpx1 promoter is mediated by intracellular H_2O_2 , different from the pathway induced by extracellular H_2O_2 [J]. Plant Physiol, 2004, 135: 1685-1696.
- Kozioł S, Zagulski M, Bilinski T, Bartosz G. Antioxidants protect the yeast *Saccharomyces cerevisiae* against hypertonic stress[J]. Free Radic Res, 2005, 39: 365-371.
- Galli F, Piroddi M, Annetti C, Aisa C, Floridi E, Floridi A. Oxidative stress and reactive oxygen species[J]. Contrib Nephrol, 2005, 149: 240-260.
- Wellen K E, Thompson C B. Cellular metabolic stress; considering how cells respond to nutrient excess[J]. Mol Cell, 2010, 40: 323-332.
- Kwak K G, Wang J H, Shin J W, Lee D S, Son C G. A traditional formula, Chunggan extract, attenuates thioacetamide-induced hepatofibrosis via GSH system in rats[J]. Hum Exp Toxicol, 2010-11-11[Epub ahead of print]
- Barzilai A, Rotman G, Shiloh Y. ATM deficiency and oxidative stress: a new dimension of defective response to DNA damage [J]. DNA Repair (Amst), 2002, 1: 3-25.
- Kobayashi D, Kondo K, Uehara N, Otokozaawa S, Tsuji N, Yagihashi A, et al. Endogenous reactive oxygen species is an important mediator of miconazole antifungal effect[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2002, 46: 3113-3117.