

吴丽华, 仪慧兰, 张虎芳. 2012. NO 参与亚砷酸钠诱导酵母细胞死亡的调控[J]. 环境科学学报, 32(10): 2612-2616

Wu L H, Yi H L, Zhang H F. 2012. Involvement of NO in sodium arsenite-induced yeast cell death[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 32(10): 2612-2616

## NO 参与亚砷酸钠诱导酵母细胞死亡的调控

吴丽华<sup>1,2</sup>, 仪慧兰<sup>2,\*</sup>, 张虎芳<sup>1</sup>

1. 太原师范学院 生物系, 太原 030031

2. 山西大学生命科学学院, 太原 030006

收稿日期: 2011-12-13

修回日期: 2012-01-15

录用日期: 2012-02-02

**摘要:**以模式生物酵母细胞为材料, 研究亚砷酸钠胁迫对细胞死亡率和胞内 NO 水平的影响, 以探讨 NO 在砷诱导细胞死亡中的作用. 结果显示, 浓度为 1~7 mmol·L<sup>-1</sup> 的亚砷酸钠可降低酵母细胞活性, 诱导细胞死亡, 随着处理浓度的升高和作用时间的延长, 细胞死亡率增高; 死细胞出现核固缩和核降解等凋亡特征; 凋亡抑制剂 Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB (2 μmol·L<sup>-1</sup>) 与 3 mmol·L<sup>-1</sup> 亚砷酸钠共同作用后, 酵母细胞死亡率下降. 在亚砷酸钠胁迫的过程中, 酵母细胞内 NO 水平升高; 一定浓度的 NO 清除剂 c-PTIO (0.2 mmol·L<sup>-1</sup>) 或 NO 生成抑制剂 NaN<sub>3</sub> (1 mmol·L<sup>-1</sup>) 均可降低亚砷酸钠引起的酵母细胞死亡率. 结果表明, 砷胁迫诱导的胞内 NO 升高是酵母细胞死亡的一个诱因, 亚砷酸钠诱发的酵母细胞死亡中可能存在细胞凋亡过程.

**关键词:**亚砷酸钠; 酵母; 细胞死亡; NO

文章编号: 0253-2468(2012)10-2612-05

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

## Involvement of NO in sodium arsenite-induced yeast cell death

WU Lihua<sup>1,2</sup>, YI Huilan<sup>2,\*</sup>, ZHANG Hufang<sup>1</sup>

1. Department of Biology, Taiyuan Normal University, Taiyuan 030031

2. School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006

Received 13 December 2011;

received in revised form 15 January 2012;

accepted 2 February 2012

**Abstract:** Arsenic is a toxic metalloid widely distributed in the environment. Chronic exposure to arsenic is associated with increased risk of various diseases, such as neurotoxicity, birth defects and metabolic disorders. People exposed to high levels of arsenic are prone to skin, bladder, and lung cancer and occlusive vascular disease. However, the exact mechanisms of arsenic toxicity are not yet well understood. In this study, cytotoxic effects of sodium arsenite on yeast *Saccharomyces cerevisiae* were investigated with or without some antagonists. For arsenic treatments, yeast cells harvested from the early log phase were incubated in the fresh yeast extract peptone dextrose (YPD) media containing varying amounts of sodium arsenite. For other combination treatments, selected antagonists including broad caspase inhibitor Z-Asp-2, 6-dichlorobenzoyloxymethylketone (Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB), nitric oxide (NO) scavenger 2-(4-carboxyphenyl)-4, 4, 5, 5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (c-PTIO) and nitrate reductase inhibitor NaN<sub>3</sub> were respectively added into YPD media in the presence of 3 mmol·L<sup>-1</sup> sodium arsenite. The results showed that sodium arsenite exposure decreased cell viability in a dose- and time- dependent manner. Exposure to 1 to 7 mmol·L<sup>-1</sup> arsenite for 3 to 24 h significantly induced cell death. Dead cells showed some typical features of apoptosis, such as nuclear condensation and fragmentation. Caspase inhibitor Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB (2 μmol·L<sup>-1</sup>) significantly blocked arsenite-induced cell death. The characteristic features of apoptosis and the blockade by apoptosis inhibitor suggested a process of programmed cell death in arsenite-treated yeast cells. Arsenite exposure induced significant cell death and also an obvious increase of intercellular NO levels. Moreover, when either NO scavenger c-PTIO (0.2 mmol·L<sup>-1</sup>) or NR inhibitor NaN<sub>3</sub> (1 mmol·L<sup>-1</sup>) was used to block intracellular NO increase, arsenite-induced cell death significantly decreased. These results clearly demonstrated that arsenite-caused cell death is associated with an increase of the intercellular NO levels. Increased NO triggered arsenite-induced cell death, and may also contribute to arsenite-induced programmed cell death. Our results suggest that arsenite-induced cell death may have dual effects on the organism, since apoptosis is programmed cell death for the good of the organism, but other kinds of cell death may be harmful to the body.

**Keywords:** sodium arsenite; yeast; cell death; NO

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (No. 30870454, 30470318); 山西省实验动物专项 (No. 200811)

**Supported by** the National Natural Science Foundation of China (No. 30870454, 30470318) and the Laboratory Animals Science Foundation of Shanxi Province (No. 200811)

**作者简介:** 吴丽华 (1981—), 女, 博士, E-mail: wlh1981622\_510@163.com; \* 通讯作者 (责任作者), E-mail: yihuilan@yahoo.com.cn

**Biography:** WU Lihua (1981—), female, Ph. D., E-mail: wlh1981622\_510@163.com; \* **Corresponding author**, E-mail: yihuilan@yahoo.com.cn

## 1 引言 (Introduction)

砷是一种广泛存在于自然界中的类金属元素,也是对人类健康危害最严重的环境污染物之一 (Binet *et al.*, 2006). 环境中较高浓度的砷对人类、动物和植物均具有毒性作用. 高浓度砷可影响植物光合作用,使营养转化失调,从而影响植物的生长和发育 (Stoeva *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2011), 甚至引发死亡 (Xu *et al.*, 2002). 长期职业性暴露或饮用砷含量较高的水,可导致机体代谢紊乱,引起糖尿病、心血管病等疾病和多种癌症的发生 (Pellizzari *et al.*, 2006). 此外,一定浓度的砷还可诱导动物细胞、人类离体培养细胞和植物细胞的染色体异常,导致染色体畸变率、姊妹染色单体交换率及微核率显著增高,出现细胞固缩和死亡 (Evens *et al.*, 2004; Yih *et al.*, 2005; Patlolla *et al.*, 2005; Mahata *et al.*, 2004; Yi *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2010).

酵母是一种研究真核生物细胞学机制的模式生物,已被广泛用于细胞分裂和死亡等多种复杂信号途径的研究. 一氧化氮 (NO) 是存在于生物体中的信号分子,是促进细胞死亡的介质之一,但在砷诱导的酵母细胞死亡过程中是否有 NO 的参与尚不清楚. 因此,本文以酵母细胞为材料,研究亚砷酸钠胁迫对细胞死亡率和胞内 NO 水平的影响,以探讨 NO 在砷诱导酵母细胞死亡中的作用,为揭示砷毒性作用机理提供实验依据.

## 2 材料与方法 (Materials and methods)

### 2.1 材料

酵母菌株保存于本实验室. YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium) 培养基: 酵母粉 1%, 蛋白胨 2%, 葡萄糖 2%, pH 自然. 固体培养基是在 YPD 培养基中加 2% 琼脂.

### 2.2 药物处理与细胞活性检测

挑取斜面单菌落至 YPD 培养基中活化, 30℃, 200 r·min<sup>-1</sup> 培养至对数期用于实验. 处理组采用 0~7 mmol·L<sup>-1</sup> 的亚砷酸钠溶液, 缓解组分别采用 0.2 mmol·L<sup>-1</sup> 的 NO 清除剂 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide (c-PTIO)、1 mmol·L<sup>-1</sup> 的 NO 生成抑制剂 NaN<sub>3</sub> 或 2 μmol·L<sup>-1</sup> 泛 caspase 抑制剂 Z-Asp-2, 6-dichlorobenzoyloxymethylketone (Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB) 与亚

砷酸钠共同作用. 处理一定时间后取酵母细胞用美兰染色法检测细胞活性,在光学显微镜下观察并统计着色细胞 ( $C_Z$ ) 和总细胞数目 ( $C_T$ ), 根据公式 (1) 计算细胞存活率 ( $S$ ). 每个处理重复 3 次, 每次观察至少 1000 个细胞.

$$S = (1 - C_Z / C_T) \times 100\% \quad (1)$$

### 2.3 核形态观察

药物处理结束后,离心收集细胞,经 PBS 洗涤后用 70% 乙醇 4℃ 固定 2 h 以上. 用 PBS 洗涤并悬浮细胞,加入细胞核 DNA 特异性染料 2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamidine dihydrochloride (DAPI), 避光孵育 10 min 后,常规制片,于荧光显微镜下观察.

### 2.4 胞内 NO 水平检测

药物处理后离心收集细胞, PBS 洗涤后用 5 μmol·L<sup>-1</sup> 的 NO 荧光探针 3-Amino, 4-aminomethyl-2', 7'-difluorescein, diacetate (DAF-FM DA) 悬浮细胞, 30℃ 避光孵育 20 min, 荧光显微镜观察.

### 2.5 统计分析

采用 SPSS 17.0 对所得结果进行  $F$  检验后,用 Duncan 方法比较处理组与对照组间的差异显著性 (<sup>a</sup>  $p < 0.05$ , 差异显著; <sup>b</sup>  $p < 0.01$ , 差异极显著) 及缓解组与砷单独处理组间的差异显著性 (<sup>c</sup>  $p < 0.05$ , 差异显著; <sup>d</sup>  $p < 0.01$ , 差异极显著).

## 3 结果 (Results)

### 3.1 亚砷酸钠对酵母细胞存活率的影响

酵母细胞经美蓝染色后在显微镜下观察, 对照组中大多数细胞为无色, 而砷处理组中很多细胞被染成了蓝色, 说明亚砷酸钠可降低酵母细胞活性, 甚至导致细胞死亡. 从图 1 可以看出, 酵母细胞经 1

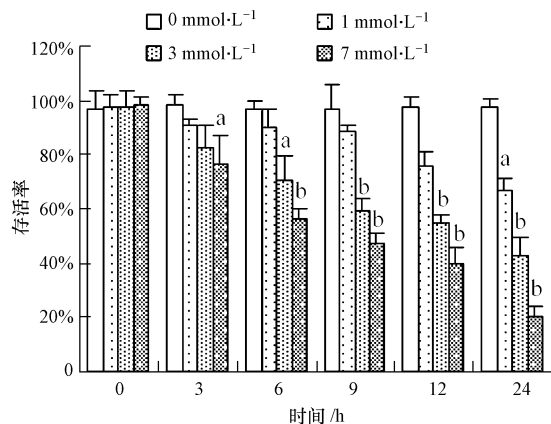


图 1 亚砷酸钠对酵母细胞存活率的影响

Fig. 1 Effects of sodium arsenite on yeast cell viability

$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚砷酸钠处理 3 h 后,细胞死亡率与对照组无显著差异;处理 24 h 后细胞死亡率达 33.15%,显著高于对照组.经  $7\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚砷酸钠处理 24 h 后,细胞死亡率约 80%,与对照组具有极显著差异,说明亚砷酸钠诱导的酵母细胞死亡具有时间和浓度依赖性.

### 3.2 亚砷酸钠对酵母细胞核形态的影响

经 DAPI 染色后,将酵母细胞置于荧光显微镜下观察,可以看到清晰的核形态.对照组酵母细胞中细胞核形状规则,而经  $3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和  $7\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚砷酸钠处理 6~24 h 后,酵母细胞中出现核染色质高度凝集,细胞核形状不规则,核碎片等凋亡特征(图 2),由此推断亚砷酸钠诱导的酵母细胞死亡过程中可能存在细胞凋亡.

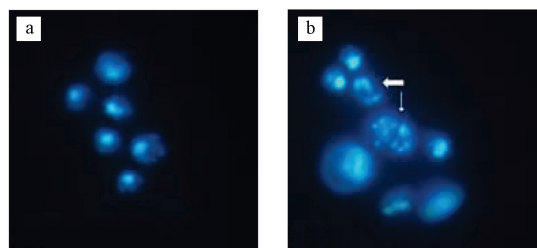


图 2 亚砷酸钠诱导酵母细胞核异常(a.对照;b.  $3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚砷酸钠处理 6 h,细箭头示核碎片,粗箭头示核形状不规则)

Fig. 2 Characterization of sodium arsenite-induced abnormal nuclei in yeast cells(a. control; b. yeast cells were treated with  $3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  sodium arsenite for 6 h, nuclear fragmentation (thin arrows), irregular nuclear shape (thick arrows))

### 3.3 Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB 对亚砷酸钠致酵母细胞死亡的缓解作用

泛 caspase 抑制剂 Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB 与亚砷酸钠

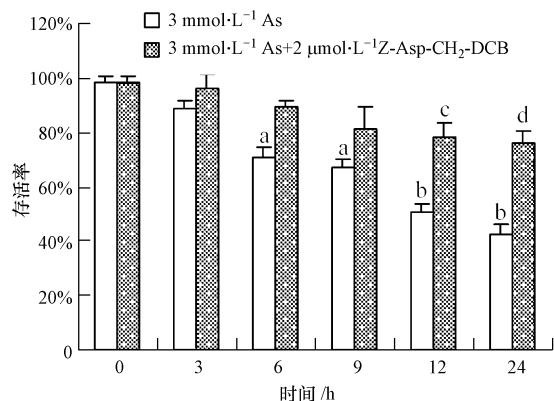


图 3 泛 caspase 抑制剂对亚砷酸钠诱导酵母细胞死亡的影响

Fig. 3 Effects of caspase inhibitor on sodium arsenite-induced cell death in yeast

共同作用后,酵母细胞死亡率降低(图 3).  $2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Z-Asp-CH<sub>2</sub>-DCB 与  $3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚砷酸钠共同作用 12 h 和 24 h 后,细胞存活率显著高于砷单独处理组.结果表明,在亚砷酸钠诱导的细胞死亡过程中有类 caspase 蛋白酶的参与.

### 3.4 亚砷酸钠对酵母胞内 NO 水平的影响

经荧光探针标记后,酵母细胞内 NO 荧光信号清晰可辨.在对照组细胞中,仅可见微弱的荧光信号;经  $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和  $3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的亚砷酸钠处理 6 h 后,胞内 NO 荧光信号强度明显增强,且随着浓度的升高而增强(图 4).结果表明,亚砷酸钠可诱导酵母细胞内 NO 水平升高,并具有浓度效应.

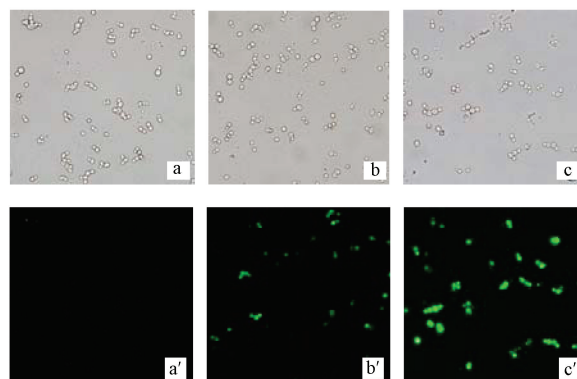


图 4 亚砷酸钠对酵母胞内 NO 水平的影响(a 和 a'.对照; b 和 b'.  $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚砷酸钠; c 和 c'.  $3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 亚砷酸钠)

Fig. 4 Effects of sodium arsenite on intracellular NO levels in yeast cells(a and a'. control; b and b'.  $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  sodium arsenite; c and c'.  $3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  sodium arsenite)

### 3.5 c-PTIO 和 $\text{NaN}_3$ 对亚砷酸钠致酵母细胞死亡的缓解作用

用一定浓度的 c-PTIO 和  $\text{NaN}_3$  与亚砷酸钠共同作用后,酵母细胞死亡率明显降低.从图 5a 可以看出,  $0.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 c-PTIO 与  $3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的亚砷酸钠共同处理 12 h 和 24 h 后,细胞存活率明显增高,与砷单独处理组具有极显著差异;  $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的  $\text{NaN}_3$  与亚砷酸钠共同作用 12 h 和 24 h 后,细胞存活率比砷单独处理组分别提高了 39.38% 和 45.51%,与砷单独处理具有显著差异(图 5b).结果表明,亚砷酸钠诱导的酵母细胞死亡与胞内 NO 水平的升高有关,即 NO 参与了砷诱导的酵母细胞死亡过程.

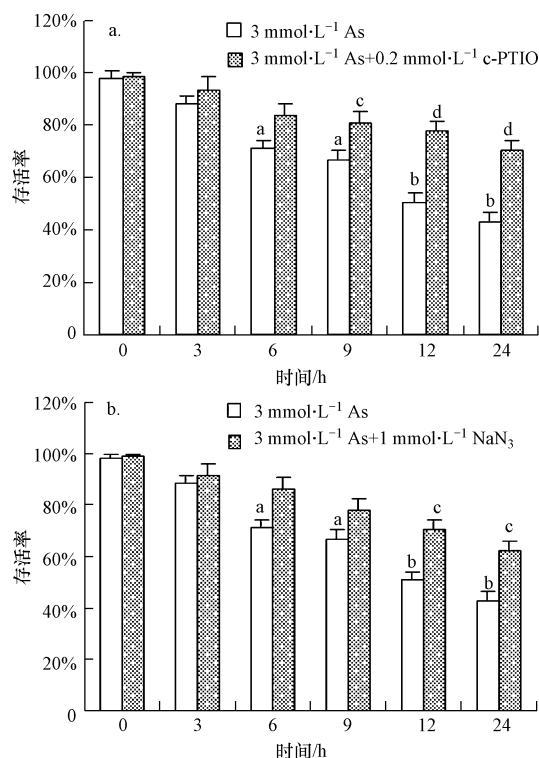


图5 c-PTIO 和  $\text{NaN}_3$  对亚砷酸钠诱导酵母细胞死亡的影响

Fig. 5 Effects of c-PTIO and  $\text{NaN}_3$  on sodium arsenite-induced cell death in yeast

#### 4 讨论 (Discussion)

砷化物是一种具有遗传毒性的环境诱变剂,进入生物体后可与含巯基的酶结合,抑制酶活性,进而影响生物体的正常生理功能,严重时导致细胞死亡。Wu 等(2010)研究发现,砷化物可抑制骨髓瘤细胞生长,并诱导细胞凋亡。本研究发现,亚砷酸钠可降低酵母细胞活性,诱发细胞死亡。这可能是由于亚砷酸钠进入酵母细胞内,使能量代谢发生异常(Mandal *et al.*, 2002),导致细胞活性降低及部分细胞死亡。Caspase 活性是反映细胞凋亡的标志,已有实验证明 caspase 抑制剂 Z-Asp- $\text{CH}_2$ -DCB、TLCK、TPCK 等均可不同程度地抑制细胞死亡(Woltering *et al.*, 2002; Iakimova *et al.*, 2008; Yakimova *et al.*, 2007)。本研究中,泛 caspase 抑制剂 Z-Asp- $\text{CH}_2$ -DCB 与亚砷酸钠共同作用后,酵母细胞存活率显著高于砷单独处理组,说明 caspase 蛋白酶参与了亚砷酸钠引起的酵母细胞死亡,与 Du 等(2007)用 YCA1 突变体得到的结果一致。结合 DAPI 染色后砷处理组中出现的染色质高度凝集、核碎片等凋亡特征,推测亚砷酸钠诱导的酵母细胞死亡中可能存在

凋亡过程。由于细胞凋亡是一种主动过程,可能对机体产生有益影响,而其它死亡过程可能对机体产生有害效应,因此,砷化合物诱发的细胞死亡可能对机体具有双重作用。

NO 是 L-精氨酸和分子氧在 NO 合酶作用下生成的一种自由基,在细胞死亡中起着信号分子的作用。已有实验证明,砷化物进入人体内可改变外周血单核细胞内 NO 水平(Luna *et al.*, 2010)。本研究表明,亚砷酸钠可诱导酵母细胞产生 NO,且处理组细胞内 NO 水平明显高于对照组,与其他学者报道的砷可诱导食管癌细胞内 NO 水平升高的结果一致(Korhonen *et al.*, 2001)。砷化物胁迫导致酵母胞内产生和积累 NO,而 NO 可通过多种途径使细胞代谢紊乱,生理功能异常,甚至死亡(De Michele *et al.*, 2009; Shiva, 2010)。c-PTIO 是一种常用的 NO 清除剂,可以和 NO 反应生成 carboxy-PTI 衍生物和亚硝酸盐或硝酸盐,从而起到清除 NO 的作用。 $\text{NaN}_3$  为硝酸还原酶抑制剂,能有效降低胞内合成 NO 的量。实验结果显示,当一定浓度 c-PTIO 和  $\text{NaN}_3$  分别与亚砷酸钠共同作用时,可降低砷引起的细胞死亡率,说明砷诱导的酵母细胞死亡与胞内 NO 水平的升高有关,即胞内 NO 参与调节砷诱导的酵母细胞死亡。

本实验采用模式生物酵母,研究亚砷酸钠对酵母细胞的毒性效应,发现了砷诱导的细胞死亡及胞内 NO 水平在此过程中的作用。Zheng 等(2007)采用酵母细胞阐述了铝的致死效应及作用机制。因此,酵母细胞对环境毒物具有灵敏快速的反应,且具有生长周期短,易于培养,遗传背景简单等优点,可作为研究环境化学物作用的模式系统。

#### 5 结论 (Conclusions)

本文用模式生物酵母研究了砷化物的毒性效应,发现亚砷酸钠可通过诱导胞内 NO 水平升高介导酵母细胞死亡,且砷诱导的酵母细胞死亡可能存在 caspase 介导的凋亡过程。

**责任作者简介:** 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 3 项,省部级研究课题 10 余项。发表研究论文 70 余篇。

#### 参考文献 (References):

Binet F, Cavalli H, Moisan E, *et al.* 2006. Arsenic trioxide (AT) is a novel human neutrophil pro-apoptotic agent: effects of catalase on

- AT-induced apoptosis, degradation of cytoskeletal proteins and *de novo* protein synthesis[J]. *British Journal of Haematology*, 132: 349-358
- De Michele R, Vurro E, Rigo C, *et al.* 2009. Nitric oxide is involved in cadmium-induced programmed cell death in *Arabidopsis* suspension cultures[J]. *Plant Physiology*, 150: 217-228
- Du L, Yu Y, Chen J, *et al.* 2007. Arsenic induces caspase- and mitochondria-mediated apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *FEMS Yeast Research*, 7: 860-865
- Evens A M, Tallman M S, Gartenhaus R B. 2004. The potential of arsenic trioxide in the treatment of malignant disease: past, present, and future[J]. *Leukemia Research*, 28: 891-900
- Iakimova E T, Woltering E J, Kapchina-Toteva V M, *et al.* 2008. Cadmium toxicity in cultured tomato cells-role of ethylene, proteases and oxidative stress in cell death signaling [J]. *Cell Biology International*, 32: 1521-1529
- Korhonen R, Kankaanranta H, Lahti A, *et al.* 2001. Bi-directional effects of the elevation of intracellular calcium on the expression of inducible nitric oxide synthase in J774 macrophages exposed to low and to high concentration of endotoxin [J]. *Biochemical Journal*, 354: 351-358
- Li W X, Chen T B, Huang Z C, *et al.* 2006. Effect of arsenic on chloroplast ultrastructure and calcium distribution in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L[J]. *Chemosphere*, 62: 803-809
- Luna A L, Acosta-Saavedra L C, Lopez-Carrillo L, *et al.* 2010. Arsenic alters monocyte superoxide anion and nitric oxide production in environmentally exposed children [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 245: 244-251
- Mahata J, Chaki M, Ghosh P, *et al.* 2004. Chromosomal aberrations in arsenic-exposed human populations: a review with special reference to a comprehensive study in West Bengal, India[J]. *Cytogenetic and Genome Research*, 104: 359-364
- Mandal B K, Suzuki K T. 2002. Arsenic around the world: a review [J]. *Talanta*, 58: 201-235
- Patlolla A K, Tchounwou P B. 2005. Cytogenetic evaluation of arsenic trioxide toxicity in Sprague-Dawley rats [J]. *Mutation Research*, 587: 126-133
- Pellizzari E D, Clayton C A. 2006. Assessing the measurement precision of various arsenic forms and arsenic exposure in the national human exposure assessment survey (NHEXAS) [J]. *Environmental Health Perspectives*, 114: 220-227
- Shiva S. 2010. Mitochondria as metabolizers and targets of nitrite [J]. *Nitric Oxide*, 22: 64-74
- Singh N, Ma L Q, Srivastava M, *et al.* 2006. Metabolic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Pteris vittata* L and *Pteris ensiformis* L[J]. *Plant Science*, 170: 274-282
- Stoeva N, Bineva T. 2003. Oxidative changes and photosynthesis in oat plants grown in As-contaminated soil [J]. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 29: 87-95
- Wang Q, Xiong D, Zhao P, *et al.* 2011. Effect of applying an arsenic-resistant and plant growth-promoting rhizobacterium to enhance soil arsenic phytoremediation by *Populus deltoides* LH05-17[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 111: 1065-1074
- Woltering E J, van der Bent A, Hoeberichts F A. 2002. Do plant caspases exit[J]. *Plant Physiology*, 130:1764-1769
- Wu L H, Yi H L, Yi M. 2010. Assessment of arsenic toxicity using *Allium/Vicia* root tip micronucleus assays[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 176: 952-956
- Wu X, Shi J, Wu Y, *et al.* 2010. Arsenic trioxide-mediated growth inhibition of myeloma cells is associated with an extrinsic or intrinsic signaling pathway through activation of TRAIL or TRAIL receptor 2 [J]. *Cancer Biology and Therapy*, 10: 1201-1214
- Xu Y, Nakajima T, Ohki A. 2002. Adsorption and removal of arsenic (V) from drinking water by aluminum-loaded shirasu-zeo-lite[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 92: 275-287
- Yakimova E T, Kapchina-Toteva V M, Woltering E J. 2007. Signal transduction events in aluminum-induced cell death in tomato suspension cells[J]. *Journal of Plant Physiology*, 164: 702-708
- Yi H L, Wu L H, Jiang L. 2007. Genotoxicity of arsenic evaluated by *Allium*-root micronucleus assay [J]. *Science of the Total Environment*, 383: 232-236
- Yih L H, Hsueh S W, Luu W S, *et al.* 2005. Arsenite induces prominent mitotic arrest via inhibition of G2 checkpoint activation in CGL-2 cells[J]. *Carcinogenesis*, 26: 53-63
- Zheng K, Pan J W, Ye L, *et al.* 2007. Programmed cell death-involved aluminum toxicity in yeast alleviated by antiapoptotic members with decreased calcium signals[J]. *Plant Physiology*, 143: 38-49