

体外评价口服降糖药对 HepG2 细胞线粒体功能的影响

富欣,潘晓靓,李华,汤纳平,王雁,惠涛涛,张泽安*

(上海中医药大学药物安全评价研究中心,中国医药工业研究总院国家上海新药安全评价研究中心,上海 201203)

[摘要] 目的:评价 DPP-IV 抑制剂类口服降糖药 A 化合物的线粒体毒性,从而探讨 A 化合物的可能毒性机制。方法:HepG2 细胞培养基中分别加入曲格列酮 50~300 $\mu\text{mol/L}$,培养 24 h,或加入 A 化合物溶液 100~300 $\mu\text{mol/L}$,培养 24 h,CCK8 细胞计数法测定细胞存活率。HepG2 细胞培养基中分别加入曲格列酮 100、200 和 225 $\mu\text{mol/L}$ 培养 24 h,或加入 A 化合物溶液 100、150 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 培养 24 h,化学发光法检测胞内 ATP 合成水平,荧光探针法检测胞内钙离子浓度、活性氧、线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)变化,透射电镜观察线粒体超微结构。结果:与溶媒对照组相比,曲格列酮 50~300 $\mu\text{mol/L}$ 可以抑制细胞存活率,IC₅₀ 为 178 $\mu\text{mol/L}$;A 化合物 100~300 $\mu\text{mol/L}$ 对细胞存活率有抑制作用,IC₅₀ 为 159 $\mu\text{mol/L}$ 。与溶媒对照组相比,曲格列酮 ≥ 200 $\mu\text{mol/L}$ 时导致线粒体 ATP 显著下降($P < 0.01$)、 $\Delta\Psi_m$ 显著性下降($P < 0.01$), ≥ 100 $\mu\text{mol/L}$ 时可致活性氧水平和钙离子浓度显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。A 化合物 ≥ 100 $\mu\text{mol/L}$ 时 ATP 合成水平显著降低、钙离子浓度显著升高($P < 0.01$), ≥ 150 $\mu\text{mol/L}$ 时活性氧水平明显升高($P < 0.01$), ≥ 200 $\mu\text{mol/L}$ 时 $\Delta\Psi_m$ 显著性下降($P < 0.05$),并可导致线粒体结构发生病变。结论:DPP-IV 抑制剂类口服降糖药 A 化合物可以通过干扰线粒体代谢功能和结构而诱导线粒体损伤。

[关键词] DPP-IV 抑制剂;HepG2 细胞;线粒体毒性

[中图分类号] R977.15

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)05-644-06

doi:10.7655/NYDXBNS20150509

In vitro assessment of mitochondrial dysfunction of hypoglycemic drug on HepG2 cells

Fu Xin, Pan Xiaoliang, Li Hua, Tang Naping, Wang Yan, Hui Taotao, Ma Jing, Zhang Zean*

(Center for Drug Safety Evaluation and Research, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, National Shanghai Center for New Drug Safety Evaluation and Research, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203, China)

[Abstract] Objective: To evaluate the potential mitochondrial toxicity of A compound, one of DPP-IV inhibitor hypoglycemic drugs, and to explore the mechanisms of toxicity of A compound. **Methods:** HepG2 cells were cultured in troglitazone (TRO) 50~300 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h or A compound 100~300 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h. The cell viability was assessed by CCK8 assay. HepG2 cells were cultured in TRO 100, 200 and 225 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h or A compound 100, 150 and 200 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h. The level of cellular ATP was detected by luciferase assay. The levels of intracellular free Ca^{2+} , reactive oxygen species (ROS), mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and mitochondrial permeability transition pore (MPTP) were determined using flow cytometer. **Results:** Compared with the vehicle control group, TRO at 50~300 $\mu\text{mol/L}$ markedly inhibited cell viability (IC₅₀=178 $\mu\text{mol/L}$), A compound at 100~300 $\mu\text{mol/L}$ markedly inhibited cell viability (IC₅₀=159 $\mu\text{mol/L}$). Compared with the vehicle control, levels of ATP and $\Delta\Psi_m$ were significantly decreased in the TRO treated group (≥ 200 $\mu\text{mol/L}$) ($P < 0.01$), levels of ROS were significantly decreased and intracellular free Ca^{2+} were significantly increased in the TRO treated group (≥ 100 $\mu\text{mol/L}$) ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). After A compound treatment, compared with the vehicle control, levels of ATP and intracellular free Ca^{2+} were significantly decreased at 100 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.01$). A compound at 150 $\mu\text{mol/L}$ increased ROS level significantly ($P < 0.01$), A compound at 200 $\mu\text{mol/L}$ decreased $\Delta\Psi_m$ level significantly ($P < 0.05$) and mitochondrial ultra-structural changes were observed. **Conclusion:** DPP-IV inhibitor A compound can induce mitochondrial toxicity by interfering with mitochondrial metabolism.

[Key words] DPP-IV inhibitor; HepG2 cells; mitochondrial toxicity

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(05): 644-649]

[基金项目] 国家“十二五”重大专项基金(2012ZX09302002, 2012ZX09505-001-003);上海市研发平台与环境条件基地建设专项基金(14140900901)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zza@shutcm.edu.cn

线粒体是真核细胞中的重要细胞器,是细胞能量代谢生成三磷酸腺苷(ATP)的主要场所。大量的研究表明,线粒体对调控细胞生长、增殖、分化和死亡等生命活动起重要作用^[1-2]。线粒体功能损伤会导致生物能量代谢失常、ATP 合成下降、钙稳态失衡、自由基生成增多,从而诱发细胞的凋亡^[3]。研究提示,因为肝脏、心脏或肾脏毒性而被撤市或研发终止的药物,导致这些脏器的线粒体毒性是主要的毒性机制^[4-6],线粒体作为许多药物可能的毒性靶标,受到国际药物研发机构、制药公司及相关部门的广泛关注和高度重视^[7]。

目前线粒体毒性研究主要包括体内动物实验、体外细胞试验、高通量筛选技术等^[8],而体外毒性研究因为周期短、成本低而被广泛用于线粒体早期筛选模型。HepG2 细胞因为富含线粒体和 mtDNA 而被认为是目前比较理想的线粒体毒性体外筛选模型^[9-10]。

曲格列酮(troglitazone, TRO)是第一个获得批准上市的噻唑烷二酮类口服降糖药,但是已于 2000 年因严重的肝损伤被迫撤市。研究证明,曲格列酮的毒性机制与导致线粒体功能障碍有关^[11-12]。A 化合物是一个目前还未上市的二肽基肽酶 IV (DPP-IV) 抑制剂类新药,该类药物是基于肠促胰素的新型的口服降糖药物,通过增加内源性活性胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 及葡萄糖依赖性促胰岛素肽(GIP)水平,改善 α 及 β 细胞功能障碍。同时还具有增加胰岛素敏感性及调节血脂代谢等胰腺外作用,具有较少发生低血糖,不影响胃排空等特点^[13]。DPP-IV 抑制剂类降糖药已经成为许多制药企业开发的热点,由于 DPP-IV 在哺乳动物组织中广泛表达,存在于肾脏、小肠、胆管、肝、胰腺、前列腺的上皮细胞、血管的内皮细胞、皮肤、关节液、乳腺的成纤维细胞、脑脊液接触的细胞、免疫细胞亚群等^[14],加之已上市的 DPP-IV 抑制剂类降糖药出现了过敏反应以及出血性或坏死性急性胰腺炎和肝毒性报道,故而, DPP-IV 抑制剂的长期安全性仍然需要更多的研究来评价^[15]。因此研究 A 化合物的毒性机制对其临床合理使用具有指导意义。但是目前关于 A 化合物对线粒体功能干扰的研究非常少,且并没有充分的数据证明其毒效应与线粒体功能紊乱有关。因此,本研究以已明确具有线粒体毒性而撤市的药物曲格列酮为对照,综合评价 A 化合物对 HepG2 细胞线粒体功能的影响。从而探讨 A 化合物的可能毒性机制,为临床使用及同类药物研发过程中的

毒性筛选提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

人肝癌细胞系 HepG2 细胞(中科院细胞库);曲格列酮(纯度为 >98%, 分子量为 441.54, 上海翰香生物科技有限公司), A 化合物由本机构自制;胎牛血清、DMEM 葡萄糖培养基、0.25% Trypsin-EDTA (Gibco 公司, 美国); CCK8 细胞计数试剂盒(同仁化学研究所, 日本); 线粒体膜电位检测试剂盒(BD 公司, 美国); Fluro-3AM 钙离子荧光探针、活性氧检测试剂盒、ATP 检测试剂盒(江苏海门碧云天生物技术研究所); 细胞培养瓶、24 孔及 96 孔细胞培养板(Corning 公司, 美国); 酶标仪(Molecular Devices 公司, 美国); Thermo (815) 恒温培养箱(Thermo Scientific 公司, 美国); 生物安全柜(上海瑞仰净化设备有限公司); 倒置荧光显微镜(型号 IX71, OLYMPUS, 日本); 台式低温离心机(Thermo Scientific 公司, 美国); 立式压力蒸汽灭菌锅(SANYO 公司, 日本); FACS Calibur™ 流式细胞仪(Becton Dickinson 公司, 美国); 微孔板检测仪(En-Vision, PerkinElmer 公司, 英国); Tecnai-12 Biotwin 透射电子显微镜(飞利浦公司, 荷兰)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

HepG2 细胞培养于 DMEM 培养液, 内含 15% 胎牛血清和 1% 双抗, 置 37℃ 饱和湿度 5% CO₂ 培养箱中培养, 接种密度为 1×10^4 个/cm², 2~3 d 换液, 当细胞汇合度达到 80% 左右进行传代, 因 HepG2 细胞易抱团生长, 不易消化, 因此使用 0.25% 胰酶-EDTA 消化液消化 2~3 min。

1.2.2 细胞存活率检测

取对数生长期 HepG2 细胞按照 $(5 \sim 6) \times 10^3$ 个/孔接种在 96 孔板中, 于 24 h 后分别加入曲格列酮 50、100、150、200、225、250 和 300 $\mu\text{mol/L}$, 或加入 A 化合物溶液 100、150、180、200、205、210 和 300 $\mu\text{mol/L}$, 培养 24 h 后, 每孔加入 10 μL 的 CCK8 试剂, 在培养箱内孵育 1 h, 用酶标仪检测每孔在 450 nm 处的吸光度值。其中细胞存活率 (%) = $[(A_s - A_b) / (A_c - A_b)] \times 100\%$, A_s 为试验孔(含有细胞的培养基、CCK8、阳性物质), A_c 为对照孔(含有细胞的培养基、CCK8、没有阳性物质), A_b 为空白孔(不含细胞和阳性物的培养基、CCK8)。

1.2.3 胞内 ATP 水平检测

取对数生长期的 HepG2 细胞按照 $(3\sim 4)\times 10^5$ 个/孔接种在 24 孔板中,于 24 h 后根据细胞存活率按照分组分别加入曲格列酮 100、200 和 225 $\mu\text{mol/L}$ (培养 24 h),A 化合物溶液 100、150 和 200 $\mu\text{mol/L}$ (培养 24 h),设溶媒对照组(曲格列酮溶媒对照组为加入等体积含 0.1% DMSO 的 DMEM 培养基,A 化合物溶液相应溶媒对照组为加入等体积含 0.1% 甲醇的 DMEM 培养基),每浓度每指标设 3 个复孔,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 饱和湿度 5% CO_2 培养箱中培养。按照 ATP 检测试剂盒说明书收集细胞,并使用微孔板检测仪对 ATP 的浓度进行检测。

1.2.4 线粒体膜电位、细胞内 Ca^{2+} 浓度和活性氧检测

如 1.2.3 项细胞处理方式,曲格列酮组和 A 化合物组于给药后 24 h 制备细胞悬液,分别加入不同的荧光染料(JC-1、Fluo-3AM、DCFH-DA),按照各试剂盒检测说明书 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育不同的时间,洗涤、重悬、流式细胞仪检测。细胞内 Ca^{2+} 浓度、活性氧、线粒体膜通透性转换孔(MPTP)和线粒体膜电位的结果分别用荧光强度和 FL2/FL1 表示。

1.2.5 扫描电镜观察线粒体结构

取对数生长期的 HepG2 细胞按照约 1×10^7 个/孔接种在 10 cm 培养皿中,于 24 h 后按照分组分别加入曲格列酮 100、200 和 225 $\mu\text{mol/L}$,A 化合物溶液 100、150 和 200 $\mu\text{mol/L}$,设溶媒对照组(曲格列酮为加入等体积含 0.1% DMSO 的 DMEM 培养基,A 化合物为加入等体积含 0.1% 甲醇的 DMEM 培养基),每浓度每指标设 1 个皿,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 饱和湿度 5% CO_2 培养箱中培养,24 h 后收集细胞沿管壁加入戊二醛固定,缓冲液清洗后饿酸再固定,经过酒精脱水后环氧树脂包埋,超微切片机切片,醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色后上电镜观察。

1.3 统计学方法

实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,给药各剂量组分别与溶媒对照组相比,组间比较按照以下方法统计:①用 Levene's 检验检测数据的方差齐性,如果方差齐($P > 0.05$),则进行单因素方差分析(ANOVA);如果方差不齐($P \leq 0.05$),则用 Dunnett's T3 进行组间比较检验(0.05 和 0.01 水平);②如果方差分析结果有统计学差异($P \leq 0.05$),则进一步用 Dunnett t 检验进行组间比较检验(0.05 和 0.01 水平);如果方差分析结果无统计学差异($P > 0.05$),则统计结束。实验中所有统计均采用 SPSS13.0 统计软件分析并用 Graphpad Prism 5.0 作图。

2 结果

2.1 曲格列酮和 A 化合物溶液对 HepG2 细胞存活率的影响

与溶媒对照组相比,曲格列酮 $\geq 50 \mu\text{mol/L}$ 可以明显抑制 HepG2 细胞存活,而且随着浓度的增加,抑制程度越高,IC₅₀ 约为 178 $\mu\text{mol/L}$ 。A 化合物溶液浓度 $\geq 100 \mu\text{mol/L}$ 时,可以抑制 HepG2 细胞存活,而且随着浓度的增加,抑制率明显增加,IC₅₀ 约为 159 $\mu\text{mol/L}$ (图 1)。

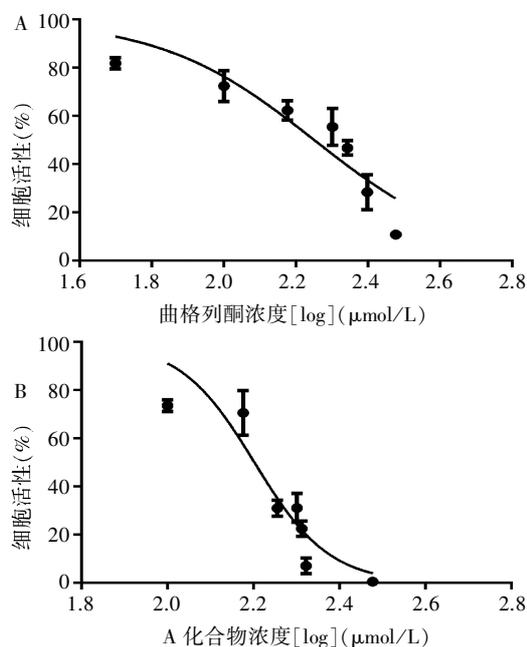


图 1 不同浓度的 TRO(A) 和 A 化合物(B) 对 HepG2 细胞活力的影响

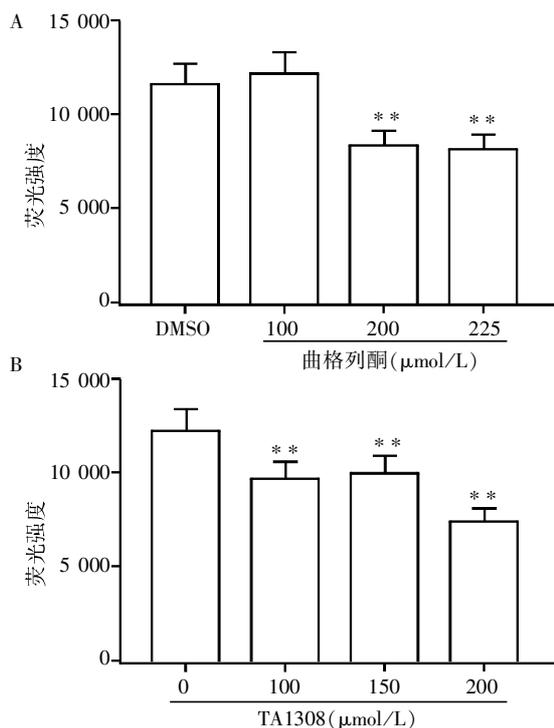
Figure 1 Effect of HepG2 cell viability after treatment with TRO(A) and A compound(B) in different concentrations

2.2 TRO 和 A 化合物溶液对 HepG2 细胞内 ATP 水平的影响

与溶媒对照组(DMSO)相比,曲格列酮 200 和 225 $\mu\text{mol/L}$ 组 HepG2 细胞中 ATP 水平分别降低了 28% 和 31% ($P < 0.01$);与溶媒对照组(甲醇)相比,A 化合物溶液 100、150 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 组 HepG2 细胞中 ATP 水平分别降低了 21%、20% 和 40% ($P < 0.01$, 图 2)。

2.3 TRO 和 A 化合物溶液对 HepG2 细胞内活性氧(ROS)水平的影响

分别与对照组相比,曲格列酮 $\geq 100 \mu\text{mol/L}$ 作用于 HepG2 细胞 24 h 后胞内 ROS 显著性升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);A 化合物溶液 100 $\mu\text{mol/L}$



与溶媒对照组比较, ** $P < 0.01$, $n=5$ 。

图 2 不同浓度的 TRO(A)和 A 化合物(B)对 HepG2 细胞内 ATP 水平的影响

Figure 2 Effect of TRO(A) and A compound(B) were treated with different concentrations on intracellular ATP levels

作用于 HepG2 细胞 24 h 胞内 ROS 有升高趋势,但无显著性改变, $\geq 150 \mu\text{mol/L}$ 剂量组 HepG2 细胞内 ROS 显著性升高($P < 0.01$, 图 3)。

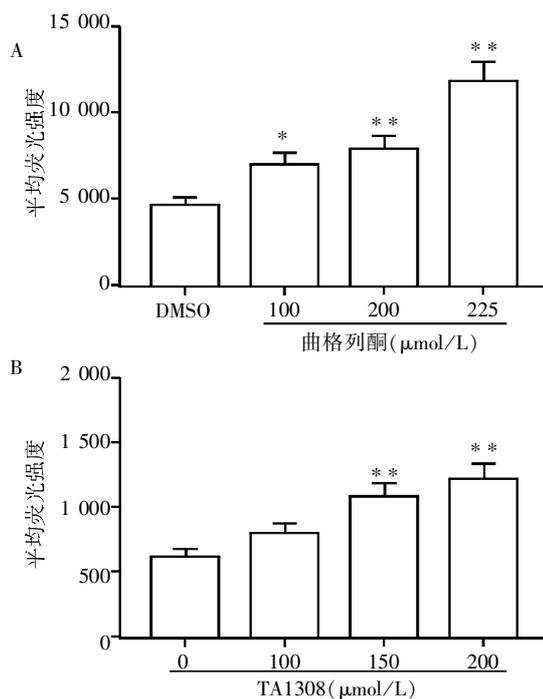
2.4 TRO 和 A 化合物溶液对 HepG2 细胞内钙离子水平的影响

分别与各自对照组相比, 曲格列酮 $\geq 100 \mu\text{mol/L}$ 作用于 HepG2 细胞 24 h 后, 胞内钙离子水平有显著性升高 ($P < 0.01$); A 化合物溶液 100、150 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 时 HepG2 细胞内胞内钙离子水平分别是溶媒对照组的 2.09、3.00 和 4.03 倍, 较溶媒对照组均显著性升高($P < 0.01$, 图 4)。

2.5 TRO 和 A 化合物溶液对 HepG2 细胞线粒体膜电位的影响

曲格列酮 $\geq 100 \mu\text{mol/L}$ 时 HepG2 细胞线粒体膜电位明显下降, 当 $\geq 200 \mu\text{mol/L}$ 时较对照组显著性下降 ($P < 0.01$); A 化合物溶液 $< 200 \mu\text{mol/L}$ 时 HepG2 细胞线粒体膜电位与对照组比较几乎没有任何变化, 但是在 200 $\mu\text{mol/L}$ 剂量时 HepG2 细胞线粒体膜电位是对照组的 0.15 倍, 较对照组显著下降($P < 0.01$, 图 5)。

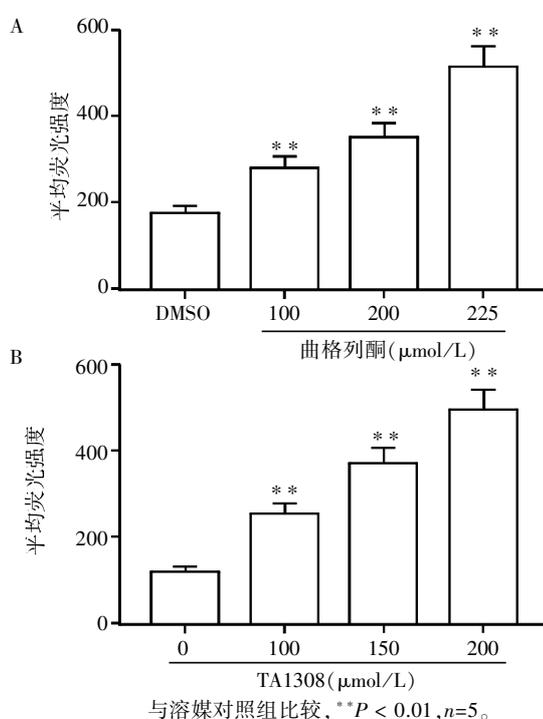
2.6 TRO 和 A 化合物溶液对 HepG2 细胞线粒体结构的影响



与溶媒对照组比较, * $P < 0.01$, ** $P < 0.01$, $n=5$ 。

图 3 不同浓度的 TRO(A)和 A 化合物(B)对 HepG2 细胞内活性氧水平的影响

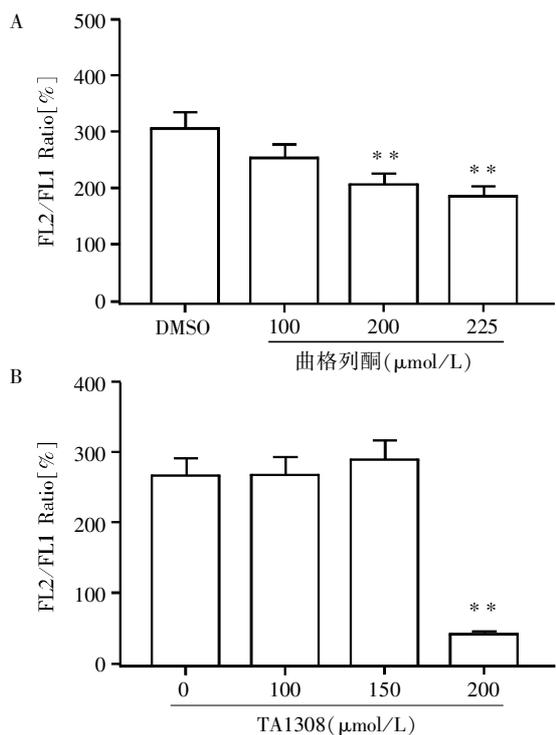
Figure 3 Effect of TRO(A) and A compound(B) were treated with different concentrations on intracellular ROS level



与溶媒对照组比较, ** $P < 0.01$, $n=5$ 。

图 4 不同浓度的 TRO(A)和 A 化合物(B)对 HepG2 细胞钙离子水平的影响

Figure 4 Effect of TRO(A) and A compound(B) were treated with different concentrations on intracellular free Ca^{2+} level



与溶媒对照组比较, ** $P < 0.01, n=5$ 。

图5 不同浓度的TRO(A)和A化合物(B)对HepG2细胞内线粒体膜电位的影响

Figure 5 Effect of TRO(A) and compound(B) were treated with different concentrations on mitochondriol membrane potential

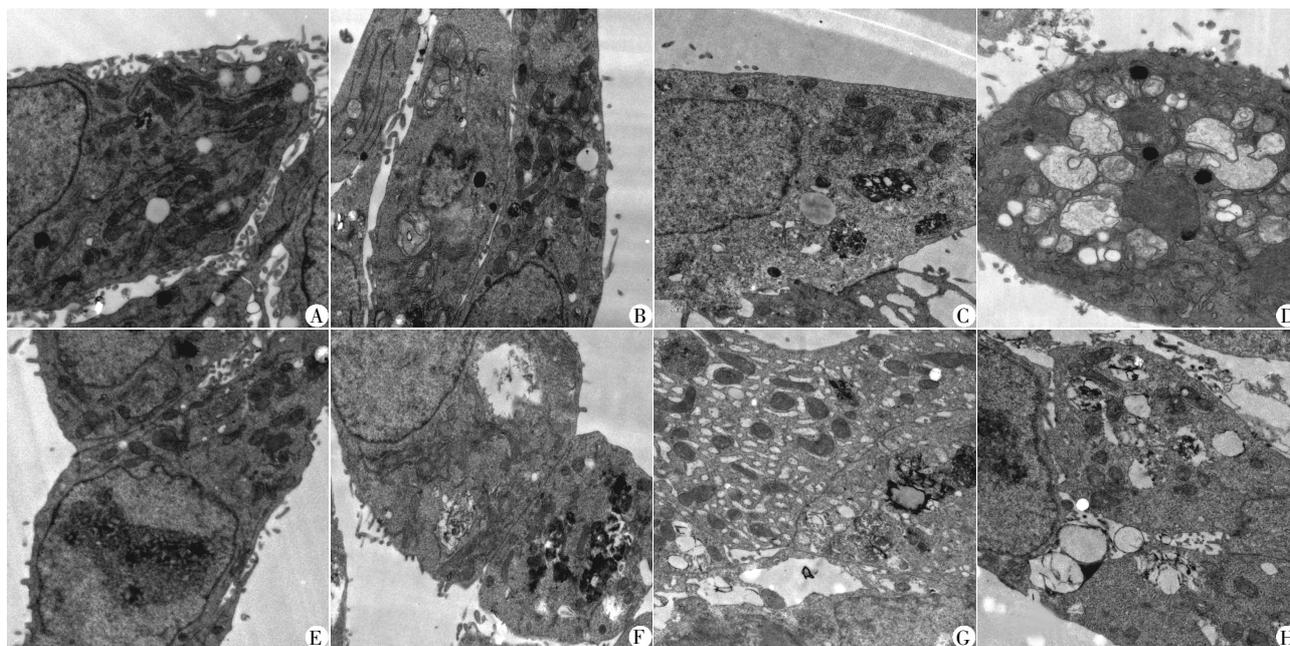
曲格列酮 100 μmol/L 时部分线粒体肿胀、基质电子密度降低、嵴形态异常, 200 μmol/L 时部分

线粒体变性, 225 μmol/L 时可见多数线粒体明显肿胀、基质稀少、胞质内陷, 嵴的形态明显异常改变; A 化合物在 100 和 150 μmol/L 线粒体未见明显异常, 200 μmol/L 时可见部分线粒体肿胀、基质电子密度降低、嵴形态异常(图 6)。

3 讨论

本实验结果显示, TRO ≥ 100 μmol/L 导致细胞内活性氧显著性升高、胞内游离钙离子浓度明显升高、部分线粒体超微结构出现异常改变, 并随剂量增加形态改变越明显, ≥ 200 μmol/L 将干扰 HepG2 细胞线粒体 ATP 合成、导致线粒体膜电位显著性下降。提示本次试验探索建立的体外线粒体毒性评价方法稳定可靠。

本研究表明, A 化合物作用于 HepG2 细胞时, 在细胞存活率较高(73.6%)的浓度时(100 μmol/L)可以诱导线粒体氧化磷酸化功能失常, 降低 HepG2 细胞线粒体 ATP 合成、影响钙稳态平衡, 在 150 μmol/L 导致线粒体自由基生成增高, 即细胞内活性氧显著性升高, 在 200 μmol/L 线粒体膜电位显著性下降, 并导致部分线粒体形态出现异常, 如肿胀、基质电子密度降低、嵴形态异常。提示 A 化合物可能是通过干扰线粒体氧化磷酸化途径, 破坏线粒体的氧化-抗氧化平衡, 导致线粒体功能紊乱和形态结构异常, 从而加速细胞的凋亡。



A: 溶媒对照(DMSO); B: 100 μmol/L TRO; C: 200 μmol/L TRO; D: 225 μmol/L TRO; E: 溶媒对照(甲醇); F: 100 μmol/L A 化合物; G: 150 μmol/L A 化合物; H: 200 μmol/L A 化合物。

图6 不同浓度的TRO和A化合物对HepG2细胞线粒体超微结构的影响(×6 000)

Figure 6 Effect of TRO and A compound were treated with different concentrations on mitochondria ultra-structure(×6 000)

被撤市的曲格列酮(TRO)、西立伐他汀和耐法唑酮,先后都被证实具有线粒体毒性^[16-19]。鉴于药物存在的潜在线粒体毒性风险及其可能的严重毒性反应,人用药品注册技术要求国际协调会(ICH)推荐在药物研发过程中密切关注药物对线粒体功能的影响。而作为人类健康重要威胁的糖尿病已被认为与线粒体 DNA 的缺失和破坏有关^[20],携带受损线粒体的患者可能对能够影响线粒体功能的药物更加敏感。本研究使用文献报道有明显线粒体毒性的降糖药曲格列酮作为阳性药^[21-22],在细胞水平从线粒体功能以及超微结构方面,全面准确地评价了新型口服降糖药 A 化合物潜在的线粒体毒性。该结果为深入研究 A 化合物的毒性作用机制提供了理论依据,并且为其临床合理使用及其同类新药的开发提供了参考。

[参考文献]

- [1] Narayanan PK, Hart T, Elcock F, et al. Troglitazone-induced intracellular oxidative stress in rat hepatoma cells: a flow cytometric assessment[J]. *Cytometry A*, 2003, 52(1): 28-35
- [2] Shishido S, Koga H, Harada M, et al. Hydrogen peroxide overproduction in megamitochondria of troglitazone-treated human hepatocytes [J]. *Hepatology*, 2003, 37(1): 136-147
- [3] Bova MP, Tam D, McMahon G, et al. Troglitazone induces a rapid drop of mitochondrial membrane potential in liver HepG2 cells[J]. *Toxicol Lett*, 2005, 155(1): 41-50
- [4] Dykens JA, Will Y. The significance of mitochondrial toxicity testing in drug development [J]. *Drug Discov Today*, 2007, 12(17-18): 777-785
- [5] Nadanaciva S, Will Y. New insights in drug-induced mitochondrial toxicity [J]. *Curr Pharm Des*, 2011, 17(20): 2100-2112
- [6] Nadanaciva S, Will Y. Investigating mitochondrial dysfunction to increase drug safety in the pharmaceutical industry [J]. *Curr Drug Targets*, 2011, 12(6): 774-782
- [7] Nadanaciva S, Will Y. The role of mitochondrial dysfunction and drug safety [J]. *J Drugs*, 2009, 12(11): 706-710
- [8] Tsiper MV, Sturgis J, Avramova LV, et al. Differential mitochondrial toxicity screening and multi-parametric data analysis [J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e45226
- [9] Pinti M, Troiano L, Nasi M, et al. Hepatoma HepG2 cells as a model for in vitro studies on mitochondrial toxicity of antiviral drugs: which correlation with the patient? [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2003, 17(2): 166-171
- [10] EMEA. Reflection paper on *in vitro* investigation of mitochondrial toxicity of anti-hiv nucleoside reverse transcriptase inhibitors [EB/OL]. [2007-12-13] http://www.ema.europa.eu/docs/en_gb/document_library/scientific_guideline/2009/09/wc500-003465.pdf
- [11] Haskins JR, Rowse P, Rahbari R, et al. Thiazolidinedione toxicity to isolated hepatocytes revealed by coherent multiprobe fluorescence microscopy and correlated with multiparameter flow cytometry of peripheral leukocytes [J]. *Arch Toxicol*, 2001, 75(7): 425-438
- [12] Tirmenstein MA, Hu CX, Gales TL, et al. Effects of troglitazone on HepG2 viability and mitochondrial function [J]. *Toxicol Sci*, 2002, 69(1): 131-138
- [13] Thornberry NA, Gallwitz B. Mechanism of action of inhibitors of dipeptidyl-peptidase-4 (DPP-4) [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2009, 23(4): 479-486
- [14] 娄伦美,董志,傅洁民,等. 二肽基肽酶 IV 抑制剂不良反应及其可能机制的研究进展 [J]. *中国药房*, 2012, 24(10): 35
- [15] Pinti M, Troiano L, Nasi M, et al. Hepatoma HepG2 cells as a model for in vitro studies on mitochondrial toxicity of antiviral drugs: which correlation with the patient? [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2013, 17(2): 166-171
- [16] Ong MM, Latchoumycandane C, Boelsterli UA. Troglitazone-induced hepatic necrosis in an animal model of silent genetic mitochondrial abnormalities [J]. *Toxicol Sci*, 2007, 97(1): 205-213
- [17] Nadanaciva S, Dykens JA, Bernal A, et al. Mitochondrial impairment by PPAR agonists and statins identified via immunocaptured OXPHOS complex activities and respiration [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007, 223(3): 277-287
- [18] Kaufmann P, Török M, Zahno A, et al. Oxidative damage to rat skeletal muscle mitochondria [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63(19-20): 2415-2425
- [19] Dykens JA, Jamieson JD, Marroquin LD, et al. In vitro assessment of mitochondrial dysfunction and cytotoxicity of nefazodone, trazodone, and buspirone [J]. *Toxicol Sci*, 2008, 103(2): 335-345
- [20] Suzuki S, Hinokio Y, Komatu K, et al. Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to diabetic complications [J]. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 1999, 45(2): 161-168
- [21] Birkus G, Hitchcock MJ, Cihlar T. Assessment of mitochondrial toxicity in human cells treated with tenofovir: comparison with other nucleoside reverse transcriptase inhibitors [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(3): 716-723
- [22] White AJ. Mitochondrial toxicity and HIV therapy [J]. *Sex. Transm Infect*, 2001, 77(3): 158-173