

神经疾病发病机制研究

DOI:10.11699/cyxb20130607

半胱氨酸蛋白酶-12 表达与细胞色素 C 释放在脊髓压迫性损伤后少突胶质细胞凋亡中的作用

黄思琴¹, 漆伟², 孙善全², 汪克建², 陆蔚天², 卓飞², 伍修宇³

(1. 重庆医科大学中医药学院针灸推拿教研室, 重庆 400016, 2. 重庆医科大学基础医学院解剖学教研室, 重庆 400016; 3. 湖南省怀化医学高等专科学校解剖学教研室, 怀化 418000)

【摘要】目的:探讨半胱氨酸蛋白酶-12(Caspase-12)表达与细胞色素 C(cytochrome-C, Cyto-C)释放在脊髓压迫性损伤(compressed spinal cord injury, CSCI)后少突胶质细胞凋亡中的作用。**方法:**采用自行设计的方法制作脊髓压迫模型,通过原位细胞凋亡染色于压迫后 1、3、7 d 检测 CSCI 后少突胶质细胞凋亡;运用 Western blot 技术从分子水平分别检测与细胞凋亡有关的 Caspase-12 和 Cyto-C 的表达。**结果:**不同组别凋亡的少突胶质细胞数目不全相同($F=30.946, P=0.000$), $LSD-t$ 法两两比较, 1、3、7 d 模型组凋亡的少突胶质细胞数目均高于正常组($P=0.000$)。与对照组、1 d 组、3 d 组相比, 7 d 组凋亡的少突胶质细胞数目最多, 组间比较, 差异有统计学意义($P=0.000$)。不同组别 Caspase-12 和 Cyto-C 蛋白表达不全相同(F 分别等于 1 402.646 和 326.638, $P=0.000$), $LSD-t$ 法两两比较, 1、3、7 d 模型组的 Caspase-12 和 Cyto-C 蛋白表达均高于正常组($P=0.000$), 与对照组、1 d 组、3 d 组相比, 7 d 组的 Caspase-12 和 Cyto-C 蛋白表达水平平均最高, 组间比较, 差异有统计学意义($P=0.000$)。**结论:** CSCI 后出现了少突胶质细胞凋亡, 其凋亡机制可能与 Caspase-12 表达增强及 Cyto-C 释放共同作用有关。

【关键词】脊髓压迫性损伤; 细胞色素 C; 半胱氨酸蛋白酶-12; 少突胶质细胞; 凋亡

【中国图书分类法分类号】R826.64

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-10-16

Role of Caspase-12 expression and cytochrome-C release in oligodendrocyte apoptosis induced by compressed spinal cord injury

HUANG Siqin¹, QI Wei², SUN Shanquan², WANG Kejian², LU Weitian², ZHUO Fei², WU Xiuyu³

(1. Teaching and Research Section of Acupuncture and Massage, College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University; 2. Teaching and Research Section of Anatomy, College of Basic Medical Science, Chongqing Medical University; 3. Teaching and Research Section of Anatomy, Huaihua Medical College)

【Abstract】Objective: To evaluate the role of Caspase-12 expression and cytochrome-C(Cyto-C) release in oligodendrocyte apoptosis induced by compressed spinal cord injury (CSCI). **Methods:** CSCI model was established with a self-made device. Oligodendrocyte apoptosis was determined by TdT mediated dUTP-biotin nick end labeling staining at 1, 3, 7 d after compression. Cyto-C release and Caspase-12 expressions were detected by Western blot. **Results:** Numbers of oligodendrocyte apoptosis in different groups were different ($F=30.946, P=0.000$). Numbers of oligodendrocyte apoptosis in 1, 3, 7 d groups were more than those in control group according to $LSD-t$ ($P=0.000$). Numbers of oligodendrocyte apoptosis in 7 d group reached the maximum compared with those in control group, 1 d group and 3 d group, with statistically significant differences among groups ($P=0.000$). Both expressions of Caspase-12 and releases of Cyto-C in different groups were different ($F=1 402.646$ and 326.638 respectively, $P=0.000$). Expressions of Caspase-12 and releases of Cyto-C in 1, 3, 7 d groups were more than those in control group according to $LSD-t$ ($P=0.000$). Expressions of Caspase-12 and releases of Cyto-C in 7 d group reached the maximum compared with those in control group, 1 d group and 3 d group, with statistically significant differences among groups ($P=0.000$). **Conclusions:** Oligodendrocyte apoptosis after CSCI is associated with

enhanced expressions of Caspase-12 and releases of Cyto-C.

【Key words】compressed spinal cord injury; cytochrome-C; Caspase-12; oligodendrocyte; apoptosis

作者介绍:黄思琴, Email: sisi71254335@126.com,

研究方向: 脊髓损伤的修复及其机制。

通信作者:孙善全, Email: sunsq2151@sohu.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30270437); 重庆市自然科学基金资助项目(编号:cstc2012jjA10020); 重庆市渝中区科技计划资助项目(编号:20110316)。

脊髓压迫性损伤(compressed spinal cord injury, CSCI)后出现的神经元凋亡、轴突变性及神经纤维脱髓鞘等一系列病理变化,是导致不可逆性神经功能障碍的主要原因^[1-3],对人们的精神及身体健康造成巨大的伤害。随着工农业、建筑业及交通运输业的发展,CSCI的发病率有逐渐升高的趋势。然而,目前其发病机理仍未阐明,并缺乏有效治疗手段。有研究表明^[4-5],脑部感染或损伤将引起神经元的凋亡,其机制与内质网应激和线粒体有关。本课题组的前期工作表明:脊髓受压后,神经元发生凋亡,其凋亡机制与内质网应激相关^[6-7]。以上结果提示,中枢神经系统损伤后,神经元凋亡分别与线粒体途径和内质网应激有关,然而这 2 条途径在细胞凋亡中是同时发挥作用还是单独发挥作用,以及两者之间的关系如何,相关研究较少,尤其是 CSCI 后少突胶质细胞凋亡的相关机制鲜见报道。

本实验运用自行设计的方法制作脊髓压迫模型,通过原位细胞凋亡(TdT mediated dUTP-biotin nick end labeling, TUNEL)染色于压迫后 1、3、7 d 检测 CSCI 后少突胶质细胞凋亡;运用 Western blot 技术从分子水平分别检测与细胞凋亡有关的半胱氨酸蛋白酶-12(Caspase-12)和细胞色素 C(cytochrome-C, Cyto-C)的表达,从而探讨 Caspase-12 和 Cyto-C 在 CSCI 后少突胶质细胞凋亡中的作用,并探讨上述途径在少突胶质细胞凋亡中的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

健康成年 SD 大鼠 50 只,雌雄不拘,SPF 级,体质量 250~300 g,由重庆医科大学实验动物中心提供,实验过程中对动物处置方法符合中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。按随机数字表法分为 5 组:正常组、对照组,模型 1、3、7 d 组,每组 10 只。

1.2 主要试剂及仪器

Caspase-12 抗体、Cyto-C 和 TUNEL 试剂盒购自 Santa Cruz 公司;CNP 抗体(少突胶质细胞标记物)购自 Abcam 公司;驴血清、荧光二抗购自 Jackson 公司;多聚甲醛、蔗糖、中性树胶等为国产分析纯试剂;恒冷切片机(Leica CM1900, German),显微照相系统(Olympus-45),激光共聚焦显微镜(LeicaTCS-SP2)。

1.3 实验方法

1.3.1 CSCI 模型的制备 除了正常组和对照组,其余 3 组均用自行设计的大鼠脊髓压迫器[®],用 3.5%的水合氯醛腹腔麻醉动物后,无菌操作显露胸 11 至腰 3 椎板,切除第 1 腰椎的椎板及前后关节突,显露腰 1 椎体对应的脊髓,将脊髓压迫钢板直接置于暴露的脊髓上,然后将内固定器卡在胸 12 的上下后关节突分叉和腰 2 的棘突根部之间。将螺钉从内固定器小孔内拧入,直至螺钉的前端与压迫钢板接触,然后逐层

缝合,将螺帽暴露在皮肤外,待麻醉苏醒后,大鼠下肢及大小便功能须完全正常,显示无脊髓损伤,造模方可成功。术后第 1 天将螺钉拧入相同的圈数造成大鼠均双下肢瘫痪,大小便失禁。每日给大鼠挤尿 4、5 次,并进行抗感染、预防压疮等处理。

1.3.2 TUNEL 取材 各组时间点选择 5 只大鼠,麻醉动物后,开胸暴露心脏,经左心室,主动脉插管,并剪开右心耳,用微量泵灌注 4 ℃生理盐水 200 ml,待流出液清亮后,灌注 40 g/L 多聚甲醛 450 ml 灌注固定,然后取出以伤段脊髓为中心,长约 2 cm 的脊髓,30%蔗糖脱水过夜(4 ℃);待脱水完全后,用恒冷冰冻切片机连续切片,片厚 10 μm,备用。

1.3.3 TUNEL 细胞凋亡检测 将不同时间点的冰冻组织切片在 0.01 mol/L PBS 缓冲液冲洗 10 min × 3 次。用驴血清 37 ℃水浴箱封闭 1 h。滴加小鼠来源的一抗 CNP,覆盖标本,切片置于湿盒,4 ℃冰箱孵育 24 h。0.01 mol/L PBS 缓冲液冲洗 10 min × 3 次。滴加驴抗小鼠的荧光二抗,37 ℃水浴箱孵育 1 h。0.01 mol/L PBS 冲洗 10 min × 3 次。TUNEL 反应液 50 μl,37 ℃避光孵育 60 min;然后用 PBS 冲洗 10 min × 3 次;甘油封片。用共聚焦显微镜在 800 倍视野下观察并进行阳性细胞计数:每时间点 5 张切片,由 2 名非本课题组并且熟悉凋亡细胞形态的实验人员,对所有 TUNEL 标记切片进行计数。计数标准为 TUNEL 与 CNP 共双标呈黄色、并符合凋亡细胞形态特征的阳性细胞。

1.3.4 Western blot 检测 以 β-actin 作为内参照,分别取各时间点 CSCI 脊髓标本约 30 mg。加入液氮,研磨组织。根据细胞量吸取全蛋白裂解液 1 ml,加入一定量的蛋白酶抑制剂后加入到细胞内,12 000 r/min 离心 10 min,吸上清,测蛋白浓度。提取总蛋白,Lowry 法进行蛋白定量,取上清液煮变性后按照蛋白定量结果进行加样。经 12%十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 2 h。然后转移至硝酸纤维素膜,5%脱脂奶粉 37 ℃封闭,室温反应 2 h。TBST 洗膜后加入 Cyto-C 和 Caspase-12 抗体孵育,4 ℃过夜。TBST 洗膜后加入辣根过氧化物标记的相应二抗,室温反应 2 h。TSBT 洗膜后加入 DAB 显色。采用化学发光法进行显影,凝胶成像系统捕获图片。并以 image J 软件进行半定量分析,结果以相对光密度值 × 面积表示。蛋白的相对含量=目的蛋白条带/β-actin 条带。

1.4 统计学处理

数据采用 SPSS 17.0 和 IPP 6.0 统计软件处理,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组均数进行比较采用方差分析,其两两比较采用 LSD-t 法。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧),以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TUNEL 染色结果

正常组和对照组凋亡的少突胶质细胞数目较少,分别为 (6.00 ± 1.00 , 7.00 ± 0.80),散在分布于白质内(图 1C);不同组别凋亡的少突胶质细胞数目不全相同($F=30.946$, $P=0.000$),LSD-t 法两两比较,1、3、7 d 模型组凋亡的少突胶质细胞数目均高于正常组($P=0.000$);与对照组,1 d 组、3 d 组相比,7 d 组凋亡的少突胶质细胞数目最多,组间比较,差异有统计学意义($P=0.000$)(图 2C)。

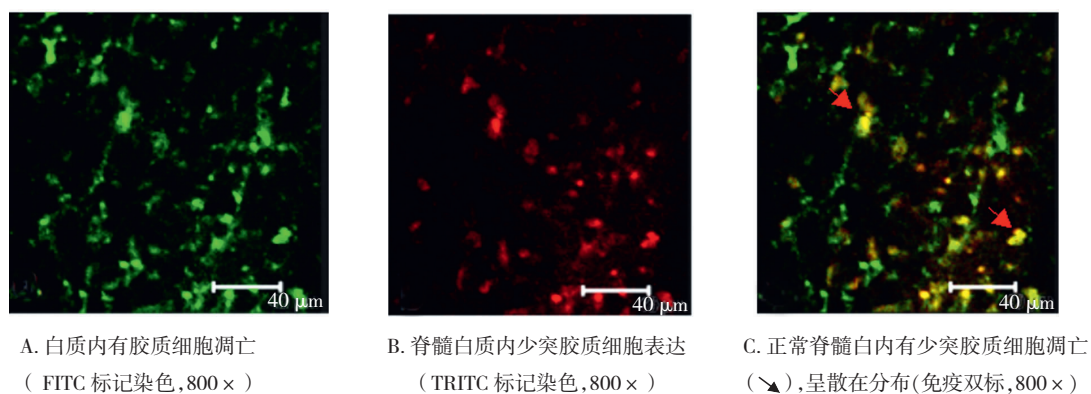


图 1 正常大鼠脊髓白质内少突胶质细胞凋亡情况 (TUNEL 染色, 800 ×)

Fig.1 Oligodendrocyte apoptosis in white matter of control cord segments (TUNEL staining, 800 ×)

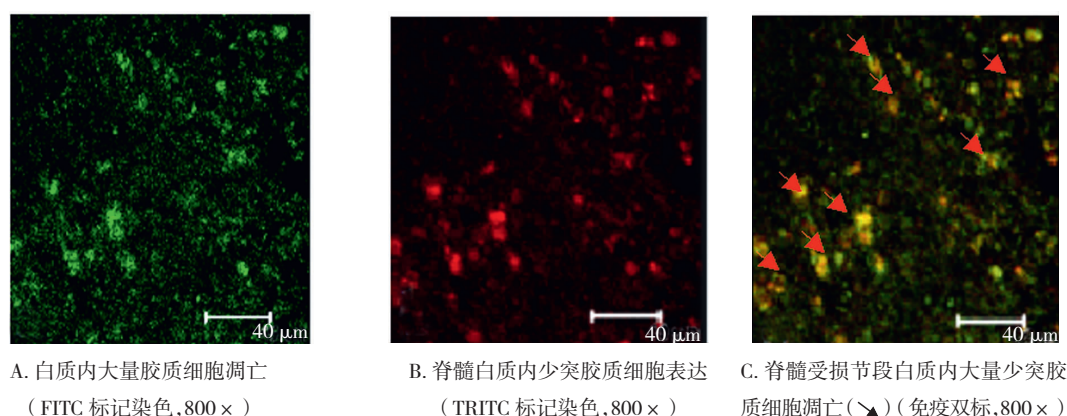


图 2 CSCI 后 7 d, 大鼠脊髓受损节段白质内少突胶质细胞凋亡情况 (TUNEL 染色, 800 ×)

Fig.2 Oligodendrocyte apoptosis in white matter of damaged cord segments on the 7th d after CSCI (TUNEL staining, 800 ×)

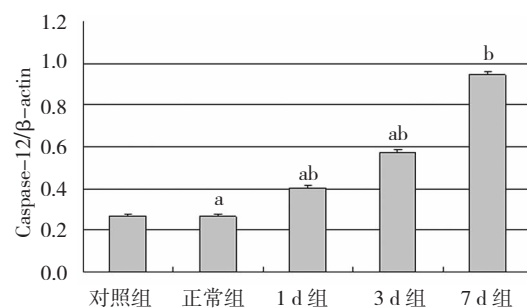
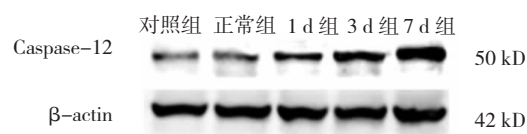
表 1 CSCI 后不同时间点凋亡的少突胶质细胞计数 (个, $\bar{x} \pm s$)Tab.1 Number of oligodendrocyte apoptosis at corresponding time points after CSCI (cell, $\bar{x} \pm s$)

分组	细胞计数
正常组	6.00 ± 1.00
对照组	7.00 ± 0.80 ^a
1 d 组	10.00 ± 1.73 ^{ab}
3 d 组	13.00 ± 2.00 ^{ab}
7 d 组	16.70 ± 0.57 ^b

注: 不同组别凋亡的少突胶质细胞数目不全相同 ($F=30.946, P=0.000$), a, 与 7 d 组相比, $P=0.000$; b, 与正常组相比, $P=0.000$

2.2 Caspase-12 Western blot 结果

各时间点的样本在特定的位置均出现特异的免疫染色反应条带, 将 Western blot 结果条带与标准蛋白分子质量相对比, 不同组别 Caspase-12 蛋白表达不全相同 ($F=1\ 402.646, P=0.000$), $LSD-t$ 法两两比较, 1、3、7 d 模型组 Caspase-12 蛋白表达均高于正常组 ($P=0.000$); 与对照组、1 d 组、3 d 组相比, 7 d 组 Caspase-12 蛋白表达水平最高, 组间比较, 差异有统计学意义 ($P=0.000$) (图 3)。



$F=1\ 402.646, P=0.000$; a: 与 7 d 组相比, $P=0.000$

b: 与正常组相比, $P=0.000$

图 3 Western blot 检测不同组别大鼠 Caspase-12 蛋白表达不全相同

Fig.3 Different expressions of Caspase-12 protein in different groups detected by Western blot

2.3 Cyto-C Western blot 结果

各时间点的样本在特定的位置均出现特异的免疫染色

反应条带,将 Western blot 结果条带与标准蛋白分子质量相对比,不同组别 Cyto-C 蛋白表达不全相同($F=326.638$, $P=0.000$), $LSD-t$ 法两两比较,1、3、7 d 模型组的 Cyto-C 蛋白表达均高于正常组($P=0.000$),与对照组、1 d 组、3 d 组相比,7 d 组的 Cyto-C 蛋白表达水平最高,组间比较,差异有统计学意义($P=0.000$)(图 4)。

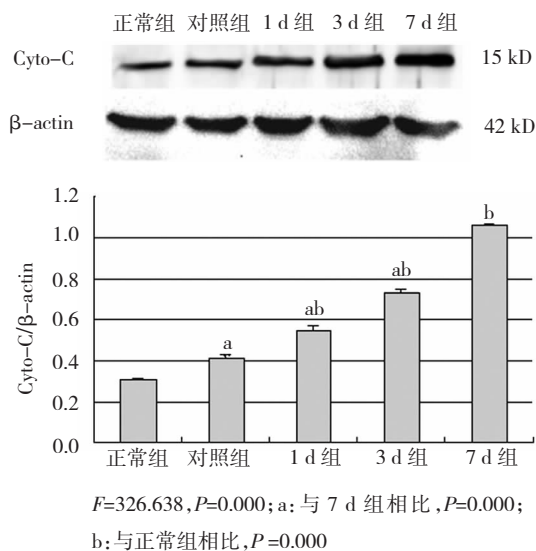


图 4 Western blot 检测不同组别大鼠 Cyto-C 蛋白表达不全相同

Fig.4 Different expressions of Cyto-C protein in different groups detected by Western blot

3 讨论

中枢神经系统在发育或损伤过程中,各类细胞均存在不同比例的凋亡;凋亡在维持细胞数量的稳定和突触连接中发挥着重要的作用^[9]。本实验TUNEL染色显示:CSCI后第1天,脊髓白质内即出现少突胶质细胞的凋亡,随着压迫时间延长,少突胶质细胞凋亡数目逐渐增多,在第7天达到高峰,与正常组相比较,差异有统计学意义。该结果与Li等^[3]研究的相一致。众所周知,中枢神经系统内,少突胶质细胞是形成髓鞘的最主要细胞,在维持髓鞘的结构完整和功能传导方面起着至关重要的作用^[10]。该细胞一旦发生死亡,将导致髓鞘变性,直至崩解,从而影响传导束的功能,出现神经功能缺陷。相关文献报道^[11-12],脊髓损伤后,大量少突胶质细胞的凋亡,是造成神经纤维脱髓鞘病变的主要原因之一。然而,少突胶质细胞凋亡的机制目前尚不清楚。有研究表明^[13],内质网应激和线粒体内 Cyto-C 的释放介导了中枢神经系统损伤后的细胞凋亡。

内质网在很多细胞内广泛分布,是真核细胞中

蛋白质翻译、合成和 Ca^{2+} 存储的场所,对细胞应激反应起调节作用。有资料显示^[14-16]:当脊髓损伤后,局部可出现缺氧、钙离子平衡失调、自由基侵袭等变化,使内质网正确折叠蛋白的能力被削弱或抑制,导致非折叠蛋白在内质网沉积,进而激活钙蛋白酶,钙蛋白酶再裂解 Caspase-12 的前体(procaspase-12),使之具有活性;Caspase-12 再依次激活 Caspase-9 及 Caspase-3;活化的Caspase-3又裂解细胞的多种结构蛋白并激活脱氧核糖核酸酶,引起细胞脱落和细胞形态异常,并最终引起细胞凋亡。半胱氨酸蛋白酶(Caspase)被认为是细胞凋亡过程中最重要的蛋白酶,它可直接水解或激活与凋亡密切相关的蛋白,又被称为死亡蛋白酶;在Caspase家族里,Caspase-12是内质网应激介导细胞凋亡的主要因素和代表分子^[17]。本实验 Western blot 结果显示,脊髓受压后各时间点 Caspase-12 的表达水平均高于正常组,在受压后第7天达到高峰。Caspase-12 的表达变化与采用TUNEL染色所观察到的少突胶质细胞凋亡的时空变化规律一致,提示CSCI后继发的少突胶质细胞凋亡与内质网应激有关。不仅如此,CSCI后第1天,Cyto-C蛋白表达即明显上调,并随着受压时间延长,在7d达到峰值,与正常组、对照组、1d组、3d组相比较,差异有统计学意义。Cyto-C的表达变化也与少突胶质细胞凋亡的时空变化规律一致,提示CSCI后,线粒体内Cyto-C大量释放,可能参与了少突胶质细胞凋亡过程。Cyto-C定位于线粒体膜间隙,是线粒体呼吸链的重要组成部分,被称为线粒体起源的死亡信号。有研究证实^[18],当细胞发生凋亡时,内质网应激引起大量 Ca^{2+} 释放,导致线粒体吸收过量的 Ca^{2+} ,造成线粒体外膜破裂,继而大量 Cyto-C 被释放到细胞质,引发一系列 Caspase 级联反应: Cyto-C 结合 Caspase-9 的前体(procaspase-9),使 Caspase-9 自发激活,活化的 Caspase-9 继续激活下游 Caspase-3,最终导致细胞凋亡。由此可见,在上述 Cyto-C 引起细胞凋亡的过程中,内质网应激引起 Ca^{2+} 释放是其始动因素。有关内质网应激和 Cyto-C 释放在细胞凋亡中的相互关系,有资料显示,内质网可以通过 Caspase-12 单独诱导细胞凋亡反应^[19],也有人认为细胞凋亡机制需要与线粒体共同作用^[20]。反之,线粒体引发细胞凋亡途径也必须依赖内质网应激,其原因是主要是多数线粒体和内质网有紧密接触点以及两者交流的共同信号通路即 Ca^{2+} 依赖的通路^[20]。

总之,CSCI 后发生少突胶质细胞凋亡,并随着压迫时间延长,凋亡数目逐渐增多;Caspase-12 表达和 Cyto-C 的释放与少突胶质细胞凋亡规律基本一致,提示 Cyto-C 和 Caspase-12 均参与了 CSCI 后少突胶质细胞凋亡,是引起少突胶质细胞凋亡的机制之一。因此,可通过抑制 Cyto-C 的释放和 Caspase-12 表达,减少少突胶质细胞凋亡,从而为临床治疗脊髓损伤提供新的策略和思路。

参 考 文 献

- [1] All A H, Bazley F A, Gupta S, et al. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors aid in functional recovery of sensory pathways following contusive spinal cord injury[J]. *PLoS One*, 2012, 7 (10): e47645.
- [2] Crowe M J, Bresnahan J C, Shuman S L, et al. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys[J]. *Nat Med*, 1997, 3(1): 73-76.
- [3] Li G L, Brodin G, Farooque M, et al. Apoptosis and expression of Bcl-2 after compression trauma to rat spinal cord[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1996, 55(3): 280-289.
- [4] Chen L, Liu J, Xu C, et al. HIV-1 g p120 induces neuronal apoptosis through enhancement of 4-aminopyridine-sensitive outward K⁺ currents[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e25994.
- [5] Zhao C Q, Zhang Y H, Jiang S D, et al. Both endoplasmic reticulum and mitochondria are involved in disc cell apoptosis and intervertebral disc degeneration in rats[J]. *Age (Dordr)*, 2010, 32(2): 161-177.
- [6] 黄柏南, 孙善全, 汪克建, 等. 大鼠脊髓缺血再灌注损伤后 caspase-12 表达与细胞凋亡[J]. *解剖学杂志*, 2008, 31(2): 222-225.
Huang B N, Sun S Q, Wang K J, et al. Cellular apoptosis and caspase-12 expression following rat spinal cord ischemia/reperfusion injury[J]. *Chinese Journal of Anatomy*, 2008, 31(2): 222-225.
- [7] 黄柏南, 孙善全, 汪克建, 等. 内质网分子伴侣 GRP78 在大鼠脊髓缺血再灌注损伤中的表达变化[J]. *基础医学与临床*, 2007, 27(11): 1198-1202.
Huang B N, Sun S Q, Wang K J, et al. Changes of endoplasmic reticulum molecular chaperon GRP78 expression in spinal cord of ischemia/reperfusion injured rat[J]. *Basic Medical Sciences and Clinics*, 2007, 27(11): 1198-1202.
- [8] 梁益建, 孙善全, 汪克建, 等. 大鼠脊髓慢性压迫性损伤实验模型的建立[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2006, 24(3): 318-324.
Liang Y J, Sun S Q, Wang K J, et al. The establishment of chronic compressed spinal cord injury model in the rat[J]. *Chinese Journal of Clinical anatomy*, 2006, 24(3): 318-324.
- [9] Liu X Z, Xu X M, Hu R, et al. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury[J]. *J Neurosci*, 1997, 17(14): 5395-5406.
- [10] 傅强, 侯铁胜, 鲁凯伍, 等. 大鼠脊髓急性损伤后神经细胞的凋亡[J]. *中华创伤杂志*, 2001, 17(4): 222-224.
Fu Q, Hou T S, Lu K W, et al. Apoptosis of neural cells after acute spinal cord injury in rats[J]. *Chinese Journal of Traumatology*, 2001, 17(4): 222-224.
- [11] Casha S, Yu W R, Fehlings M G. Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in the rat[J]. *Neuroscience*, 2001, 103(1): 203-218.
- [12] Takagi T, Takayasu M, Mizuno M, et al. Caspase activation in neuronal and glial apoptosis following spinal cord injury in mice[J]. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 2003, 43(1): 20-29.
- [13] 卢敏, 张华, 漆洪波, 等. 内质网应激联合线粒体在宫内窘迫胎鼠脑神经细胞凋亡中的作用研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2008, 33(6): 704-707.
Lu M, Zhang H, Qi H B, et al. Study of unification of endoplasmic reticulum and mitochondrium in fetal rat cerebral neuron apoptosis induced by intrauterine distress[J]. *Journal of Chongqing Medical University*, 2008, 33(6): 704-707.
- [14] Ferri K F, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways[J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(11): e255-263.
- [15] Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families: activation of caspase-12 by calpain in apoptosis[J]. *J Cell Biol*, 2000, 150(4): 887-894.
- [16] Garrido R, Mattson M P, Hennig B, et al. Nicotine protects against arachidonic-acid-induced caspase activation, cytochrome c release and apoptosis of cultured spinal cord neurons[J]. *J Neurochem*, 2001, 76(5): 1395-1403.
- [17] Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta[J]. *Nature*, 2000, 403(6765): 98-103.
- [18] Franklin J L. Redox regulation of the intrinsic pathway in neuronal apoptosis[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14(8): 1437-1448.
- [19] Park J B, Lee J K, Park S J, et al. Mitochondrial involvement in fas-mediated apoptosis of human lumbar disc cells[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2005, 87(6): 1338-1342.
- [20] Walter L, Hajnoczky G. Mitochondria and endoplasmic reticulum: the lethal interorganelle cross-talk[J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2005, 37(3): 191-206.

(责任编辑:冉明会)