

骨髓间充质干细胞培养液对大鼠皮层神经元氧糖剥夺损伤的保护作用及机制

刘 勇¹, 杨 杰¹, 张逸仙², 余建萍¹, 张黎黎¹, 李 明¹, 马 碧¹, 刘 楠²

(1. 成都医学院第一附属医院神经内科, 成都 610500; 2. 福建医科大学附属协和医院神经内科, 福州 350001)

【摘要】目的:探讨骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs)培养液对大鼠皮层神经元氧糖剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)损伤后细胞存活的作用及其影响机制。**方法:**分别取清洁级 6~8 周 60~80 g SD 大鼠和孕 16~18 d 孕鼠进行 BMSCs 和皮层神经元培养。培养第 5 天的皮层神经元建立 OGD 损伤模型, 实验随机分为 4 组: 氧糖剥夺组(OGD 组); 氧糖剥夺+BMSCs 培养液组(OGD+CM 组), 神经元 OGD 后培养基更换为 BMSCs 培养液(CM)继续培养; OGD+CM+LY294002 组及 OGD+LY294002 组, 以上 2 组分别加入 PI3K/AKT 特异性抑制剂 LY294002。各组培养 12 h 后分别通过电子显微镜和光学显微镜观察神经元形态结构。各组培养 2 h 后分别检测 AKT、pAKT(Ser473)、激活型 Caspase-3 蛋白表达量, 在培养 48 h 后检测神经元的存活率。**结果:**OGD 培养后的神经元突起断裂、缩短、溶解, 线粒体、内质网细胞器肿胀。OGD+LY294002 组、OGD+CM 组分别与 OGD 组相比, OGD+LY294002 组的细胞存活率和 pAKT(Ser473)蛋白表达降低($t=3.679, P=0.021$; $t=2.938, P=0.042$), 而激活型 Caspase-3 蛋白表达升高($t=4.733, P=0.009$); OGD+CM 组的细胞存活率和 pAKT(Ser473)蛋白表达升高($t=6.630, P=0.003$; $t=3.288, P=0.030$), 而激活型 Caspase-3 蛋白表达降低($t=3.454, P=0.026$)。与 OGD+CM 组相比, OGD+CM+LY294002 组细胞存活率和 pAKT(Ser473)蛋白表达降低($t=14.255, P=0.000$; $t=3.872, P=0.018$), 而激活型 Caspase-3 蛋白表达升高($t=6.699, P=0.003$)。**结论:**BMSCs 对 OGD 损伤后的神经元具有保护作用, 其作用机制可能与 PI3K/AKT 信号通道的激活相关。

【关键词】骨髓间充质干细胞; 神经元; Caspase-3; PI3K/AKT**【中图分类号】**R743**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-01-04

Effect and mechanism of conditioned medium from bone marrow-derived mesenchymal stem cells on the survival of cortical neurons followed oxygen-glucose deprivation injury

Liu Yong¹, Yang Jie¹, Zhang Yixian², Yu Jianping¹, Zhang Lili¹, Li Ming¹, Ma Bi¹, Liu Nan²

(1. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College;

2. Department of Neurology, Fujian Medical University Union Hospital)

【Abstract】Objective: To explore the effect and mechanism of conditioned medium from bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) on the survival of neurons after oxygen-glucose deprivation (OGD) injury. **Methods:** BMSCs and neurons were respectively cultured from 6 to 8 weeks (60 to 80 g) or pregnant 16 to 18 days Sprague-Dawley rats. After culturing for 5 days, primary cultured neurons were collected to build the model of OGD. Then experiments were randomly divided into four groups, including OGD group, OGD+CM group (the medium of neuron was replaced by culture medium of BMSCs after oxygen-glucose deprivation), OGD+CM+LY294002 group, OGD+LY294002 group (inhibitor LY294002 of PI3K/AKT signaling pathways were added to the above of two groups). Morphology of neurons were observed by electron and light microscope after culturing for 12 h later in 4 groups. All the groups of neurons were cultured for 2 h later, and the protein levels of active Caspase-3 and pAKT(Ser473) were detected by Western blot. After 48 h later, the survival rate of neurons was analyzed. **Results:** The neurite of neurons followed OGD injury were destructive and

作者介绍: 刘 勇, Email: 410578100@qq.com,

研究方向: 脑血管病基础与临床研究。

通信作者: 刘 楠, Email: xieheliunan1984@sina.com。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180903.1409.004.html>

(2018-09-04)

partially disappeared. Organelle of neurons, such as endoplasmic reticulum and mitochondrion, were swelled. In OGD+LY294002 group, the survival rate of neurons and expression level of pAKT (Ser473) were decreased ($t=3.679, P=0.021$; $t=2.938, P=0.042$), while the level of active Caspase-3 was increased ($t=4.733, P=$

0.009) compared with those in OGD+CM group. The survival rate of neurons and expression level of pAKT(Ser473) were increased($t=6.630, P=0.003; t=3.288, P=0.030$), while the level of active Caspase-3 was decreased($t=3.454, P=0.026$) in OGD+CM group than in OGD+LY294002 group. In comparison with OGD+CM, the survival rate and level of pAKT(Ser473) were decreased($t=14.255, P=0.000; t=3.872, P=0.018$) in OGD+CM+LY294002 group, while level of active Caspase-3 was increased($t=6.699, P=0.003$).

Conclusion: BMSCs promote the survival of neurons after OGD damage, and its mechanisms may be related to the activation of PI3K/AKT protein signaling pathway.

[Key words] bone marrow-derived mesenchymal stem cells; neuron; Caspase-3; PI3K/AKT

骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs)治疗急性缺血性脑卒中已成为神经科学领域研究的热点之一。临床研究也证实 BMSCs 静脉移植治疗急性脑卒中是安全的, 90 d 内并没有产生干细胞急性毒性反应和副作用^[1]。动物模型的研究证明 BMSCs 在体内外均可以促进缺氧受损神经元的存活和神经突起的修复重建^[2-3]。目前认为 BMSCs 通过分泌细胞因子间接保护受损神经组织是其中主要的机制之一^[4-6], 但是影响缺血缺氧后神经元存活的确切内在分子机制仍不清楚。神经元氧糖剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)损伤模型是模拟缺血性脑卒中的常用模型, 目前被广泛用来研究脑卒中损伤过程中可能的分子机制^[7-8]。本研究采用物理缺氧方法来建立神经元 OGD 模型, 探讨 BMSCs 的培养液对缺氧缺糖损伤后神经元存活的影响及其内在分子机制, 为干细胞治疗缺血性脑卒中提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 采用清洁级 6~8 周 60~80 g SD 大鼠和孕 16~18 d SD 大鼠各 20 只, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。

1.1.2 主要试剂 Hoechst33342、L-多聚赖氨酸(Sigma 公司), 低糖 DMEM 培养基、胎牛血清(Hyclone 公司), 无糖 DMEM 培养基、0.25%胰酶、neurobasal medium、B27(GIBCO 公司), LY294002(Beyotime 公司), BCA 蛋白定量试剂盒、5×SDS-PAGE 上样缓冲液、10%SDS、Western 封闭液、ECL 化学发光试剂盒、1 mol/L Tris-HCl pH6.8、1 mol/L Tris-HCl pH8.8、Triton-X 100、RIPA 蛋白裂解液(江苏碧云天公司), Annexin V/PI Staining 细胞凋亡检测试剂盒(德国 Roche 公司), 兔抗大鼠 P-AKT(Ser473)抗体、兔抗大鼠 AKT 抗体、兔抗大鼠激活型 Caspase-3 抗体(Cell Signaling 公司), HRP 标记的山羊抗兔 IgG、山羊抗小鼠 IgG(北京中杉金桥公司), 小鼠抗大鼠 GAPDH 抗体、Cy3 标记驴抗小鼠 IgG(Jackson 公司)、PE 标

记的抗大鼠 CD90、CD45、CD106、CD29 抗体(Biolegend 公司)等。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 BMSCs 的培养、鉴定及培养液的制备 取清洁级 6~8 周 60~80 g SD 大鼠进行 BMSCs 培养, 参见 Liu^[9]采用全骨髓贴壁法分离、培养 BMSCs, 并取第 3 代细胞分别进行成骨和成脂的诱导分化培养 3 周, 然后进行 Vonkossa 染色和油红 O 染色。BMSCs 第 3 代细胞洗涤、消化并制成细胞悬液, 调整每个待检样本的细胞浓度为 1×10^6 个/mL, 分别加入抗 CD106、CD45、CD90、CD29 单克隆抗体各 5 mL, 37 °C 避光孵育 30 min 后上流式仪检测。

BMSCs 培养液(conditioned medium, CM)的制备参见第 3 代 BMSCs, 以密度 $(3 \sim 5) \times 10^4$ 个/孔传代于 6 孔板中培养 3 d, 然后更换为神经元培养基 1 mL/孔继续培养, 24 h 后收集各孔培养基离心并用 0.2 μm 滤器过滤去除细胞碎片, -20 °C 保存备用^[9]。

1.2.2 大鼠皮层神经元的分离、培养及鉴定 取孕 16~18 d SD 孕鼠的胎鼠进行皮层神经元培养, SD 孕鼠麻醉良好后, 无菌条件下取出子宫, 在冰面上用显微解剖镊分离出大脑皮层组织, 弃去血管及脑膜组织, 剪碎成 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小的组织块后放入 0.125%胰酶中消化 15 min, 然后用含 20%FBS 的 DMEM 培养基终止消化并轻柔吹打。收集上清液 200 目滤器过滤、离心 3 min(1 000 r/min)。用无血清神经元专用培养基(98% neurobasal medium+2% b27)重悬细胞并接种于 6 孔板上, 培养 24 h 后全量换液, 然后每隔 2~3 d 半量换液。神经元培养第 5 天, 采用小鼠抗大鼠 class III β-Tubulin 抗体做免疫荧光染色, 然后利用激光共聚焦显微镜观察鉴定。

1.2.3 OGD 损伤模型的建立及实验分组 参见 Choi^[10]稍作修改, 神经元培养到第 5 天后弃去培养基, 然后用 PBS 液洗涤培养板后加入无糖 DMEM 培养基, 将培养板置于三气培养箱(37 °C、5%CO₂、95%N₂)中继续培养 90 min; 在 OGD 培养结束后, 将培养板中的无糖 DMEM 更换为神经元专用培养基并置于普通培养箱继续培养。

实验随机分为 4 组: 氧糖剥夺组(OGD 组), 在神经元 OGD 培养后培养基更换为神经元专用培养基(neurobasal medium)置于 5%CO₂ 培养箱继续培养; 氧糖剥夺+BMSCs 培养液组(OGD+CM 组), 在神经元 OGD 培养后培养基更换为

BMSCs 培养液 (CM) 继续培养; OGD+CM+LY294002 组及 OGD+LY294002 组, 以上 2 组分别加入 PI3K/AKT 信号通路特异性抑制剂 LY294002 (20 $\mu\text{mol/L}$)。以上各实验组神经元培养 2 h 后分别检测激活型 Caspase-3、AKT 和 pAKT (Ser473) 蛋白表达量, 各组培养 12 h 后分别进行电镜和光镜观察神经元形态结构, 48 h 后通过流式细胞仪检测神经元细胞的存活率。

1.2.4 AKT、pAKT、激活型 Caspase-3 蛋白表达的测定 按 RIPA 裂解液的说明书操作, BCA 试剂盒进行蛋白定量。取 20 μg 蛋白变性后上样, 10% SDS-PAGE 凝胶进行电泳, 然后转膜。用 Western blot 封闭液室温封闭 2 h, 分别将含不同目的蛋白的膜放入相应一抗 (兔抗大鼠激活型 Caspase-3 抗体 1:1 000; 兔抗大鼠 AKT 抗体 1:1 000; 兔抗大鼠 P-AKT (Ser473) 抗体 1:1 000; 小鼠抗大鼠 GAPDH 单抗 1:500), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。充分洗涤膜后放入相应二抗室温孵育 2 h。暗室曝光、显影、定影、分析。

1.2.5 OGD 损伤后神经元存活率的检测 参照 Annexin V/PI Staining 细胞凋亡检测试剂盒说明书^[3], 利用流式细胞检测仪检测神经元的存活情况。神经元细胞收集后利用 4 $^{\circ}\text{C}$ PBS 洗涤 3 次, 然后重悬细胞并调整浓度至 $(0.5\sim1.0) \times 10^6$ 个/mL。试剂盒染色、流式细胞仪检测。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析, 实验数据经方差齐性检验后以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 BMSCs 的形态及诱导分化

光镜下观察, BMSCs 经传代培养第 3 代后, 继续培养至第 5 天, 细胞贴满瓶底, 多呈梭形、多角形, 漩涡样生长 (图 1A)。BMSCs 的成骨诱导分化经 Vonkossa 染色可见细胞间钙化物形成, 呈黑色 (图 1B), 成脂诱导分化后经油红 O 染色呈橘黄色, 可见细胞内大量橘黄色脂滴沉积 (图 1C)。

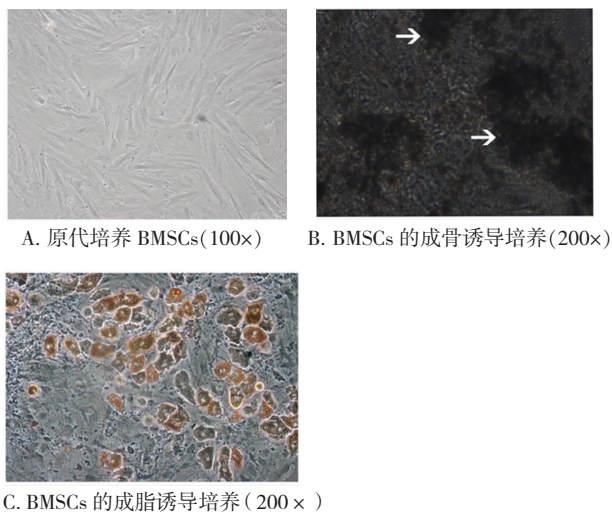


图 1 BMSCs 的培养及诱导分化

2.2 BMSCs 细胞表面免疫分子鉴定结果

第 3 代 BMSCs 高表达细胞表面分子 CD29、CD90、CD106, 细胞表面分子阳性率均达 85% 左右; 基本不表达血细胞表面标志 CD45, 阳性率仅在 2.33% (图 2)。

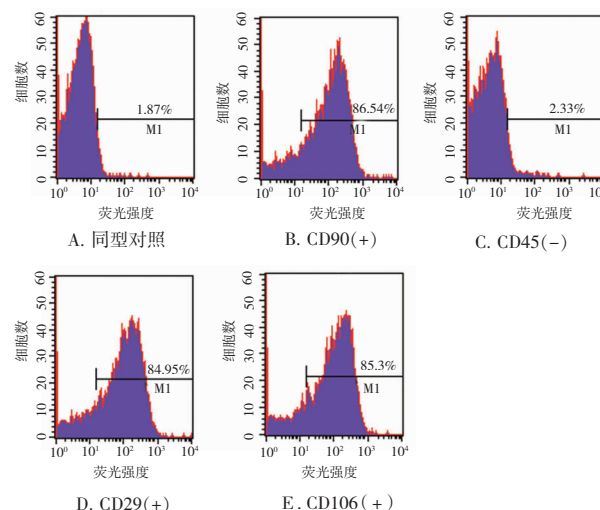


图 2 BMSCs 表型分子鉴定

2.3 各组皮层神经元形态结构的变化

光镜下观察, 神经元原代培养第 5 天, 可见细胞贴壁生长, 胞体饱满, 折光性强, 轮廓清晰, 部分细胞聚集生长, 突起光滑完整, 形态明显, 交织成网络状 (图 3A)。神经元 OGD 损伤培养后 12 h, 在光镜下观察可见部分细胞死亡, 细胞肿胀呈空泡状, 部分神经元突起损伤断裂、消失 (图 3B)。激光共聚焦显微镜观察, 神经元原代培养纯度达 85% 以上 (图 3C)。OGD 损伤后各实验组光镜下观察, OGD+CM 组神经元形态结构较完好 (图 3D), 而 OGD+LY294002 组神经元结构损伤较重, 细胞成簇、抱团生长, 胞体空泡状、折光性消失, 部分突起结构消失 (图 3F)。

电镜下观察, 原代培养第 5 天的神经元可见清晰形态结构的线粒体和内质网, 细胞核轮廓清晰, 染色质分布均匀一致 (图 3G)。在 OGD 损伤后各实验组中, OGD 组可见部分线粒体、内质网肿胀明显, 形态结构模糊, 线粒体嵴模糊不清, 细胞核固缩 (图 3H)。OGD+CM 组神经元结构损伤较轻, 可见部分线粒体等细胞器肿胀 (图 3I), 而 OGD+LY294002 组神经元结构损伤较重, 内质网、线粒体等细胞器水肿、空泡状及部分结构消失 (图 3K)。

2.4 BMSCs 提取液 (CM)、LY294002 对细胞存活及 p-AKT、激活型 Caspase-3 蛋白表达的影响

流式细胞检测结果显示, 神经元 OGD 损伤后细胞平均存活率为 $(61.07 \pm 2.61)\%$ 。与 OGD 组比较, OGD+CM 组细胞平均存活率升高, $[(73.75 \pm 2.04)\%]$ OGD+LY294002 组细胞平均存活率降低 $[(54.59 \pm 1.58)\%]$, 差异有统计学意义 ($t=6.630$, $P=0.003$; $t=3.679$, $P=0.021$); 与 OGD+CM 组比较, OGD+CM+LY294002 组细胞平均存活率降低 $[(50.75 \pm 1.91)\%]$, 差异有统计学意义 ($t=14.255$, $P=0.000$), 如图 4 所示。

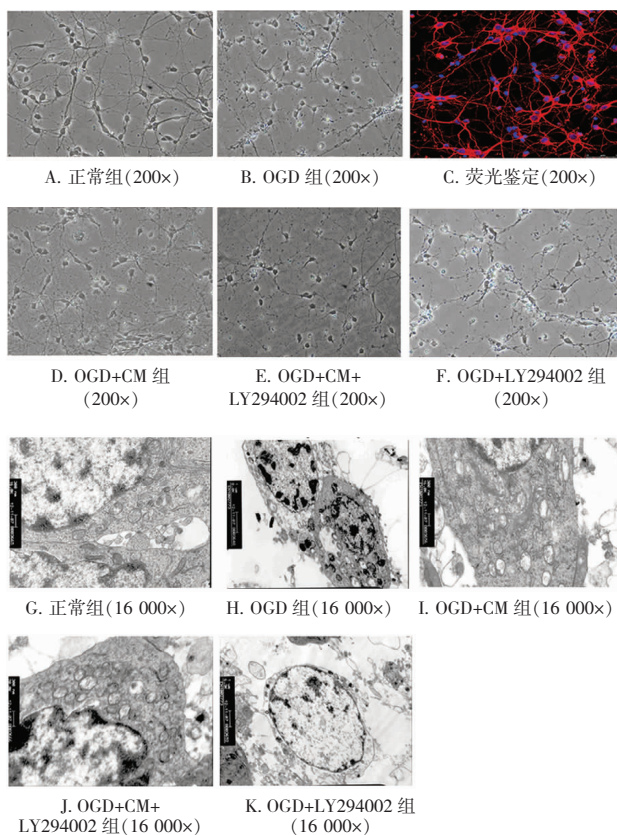
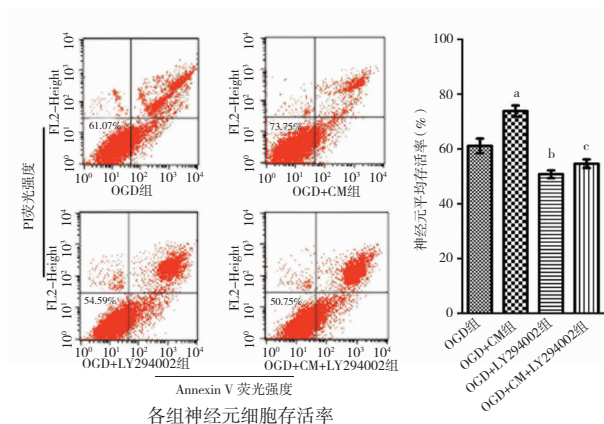


图 3 原代皮层神经元及 OGD 损伤后的形态观察

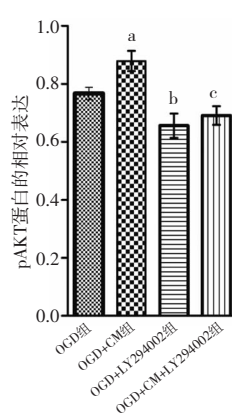
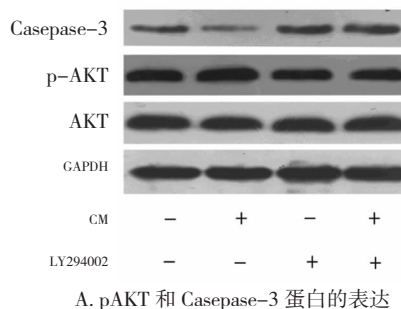


注:a,与 OGD 组相比较, $P<0.01$;b,与 OGD 组相比较, $P<0.05$;
c:与 OGD+CM 组相比较, $P<0.01$

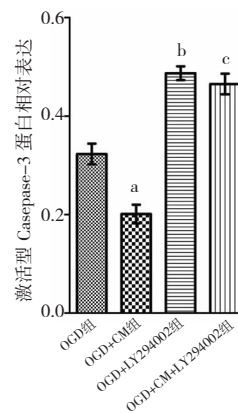
图 4 各组神经元细胞平均存活率的分析

经 Western blot 检测各组 p-AKT(Ser473)蛋白和激活型 Caspase-3 蛋白表达,与 OGD 组比较,OGD+CM 组 p-AKT(Ser473)蛋白表达升高($t=3.288, P=0.030$),激活型 Caspase-3 蛋白表达降低($t=3.454, P=0.026$),OGD+LY294002 组 p-AKT(Ser473)蛋白表达降低($t=2.938, P=0.042$),激活型 Caspase-3 蛋白表达升高($t=4.733, P=0.009$),差异有统计学意义。与 OGD+CM 组比较,OGD+CM+LY294002 组 p-AKT(Ser473)蛋白表达降低($t=3.872, P=0.018$),激活型 Caspase-

3 蛋白表达升高($t=6.699, P=0.003$),差异有统计学意义(图5)。



注:a,与 OGD 组相比较, $P<0.05$;b,与 OGD 组相比较, $P<0.05$;c:与 OGD+CM 组相比较, $P<0.05$

B. pAKT 蛋白表达
定量分析结果

注:a,与 OGD 组相比较, $P<0.05$;b,与 OGD 组相比较, $P<0.01$;c:与 OGD+CM 组相比较, $P<0.01$

C. 激活型 Caspase-3 蛋白
定量分析结果

图 5 pAKT(Ser473)蛋白和激活型 Caspase-3 蛋白的表达测定

3 讨论

在急性缺血性脑卒中的发生发展过程中,OGD 损伤是导致神经元坏死和凋亡的主要原因,而且大多数哺乳动物的神经元对缺氧是低耐受的,缺氧 4~6 min 就可能导致神经元不可逆性损伤和死亡。目前急性缺血性卒中的治疗方法很多,但疗效非常有限,对于受损神经回路的重塑和功能重建仍然是神经科的难题。BMSCs 作为诸多疾病细胞移植治疗中比较有前景的种子细胞之一,近年来也用于脑卒中的治疗研究。目前对于 BMSCs 治疗急性缺血性卒中的基础研究认为有一定的疗效,而临床研究并未得到有力的临床治疗证据,从基础到临床应用的过渡

仍是任重而道远。近期公布的最新 MASTERS II 临床研究认为对于急性缺血性卒中,虽然多能干细胞移植治疗并没有看到 90 d 神经功能预后显著意义改善,但是再次证明了缺血性卒中干细胞移植治疗是安全的、可耐受的,这为神经科卒中治疗领域带来了新的曙光^[1]。PI3K/AKT 分子信号通道与细胞的生命活动密切相关,近年来多项研究证实该信号通道参与了神经元的存活和凋亡^[11-12]及突起的生长^[13]等生理过程。Caspases 是与细胞凋亡密切相关的半胱氨酸激酶家族成员,而 Caspases-3 作为细胞凋亡的主要执行者,其活化是凋亡级联反应的关键环节,激活型 Caspases-3 可以活化 DNA 断裂因子,从而导致细胞死亡^[14]。

本研究采用贴壁法培养 BMSCs,通过分化诱导实验及细胞表面特异性免疫分子的检测来鉴定得到 BMSCs。研究中还运用神经元选择性培养基来进行大鼠皮层神经元的原代培养,通过特异性神经蛋白 class III β -Tubulin 的荧光染色鉴定证实该培养方法稳定可靠且神经元纯度高达 85%。在建立神经元 OGD 损伤模型研究中,采用国内外常用的神经元 OGD 培养模型,通过三气培养箱对胎鼠皮层神经元 OGD 培养来有效模拟体外脑缺血损伤,然后经光镜和透射电镜来观察受损神经元的形态和细胞器等超微结构的损伤性改变。本研究发现缺氧损伤后的神经元突起萎缩断裂、降解消失,线粒体和内质网等细胞器肿胀呈空泡状,从而影响神经元的蛋白质合成及能量代谢,最终导致细胞核碎裂及细胞死亡。研究还发现 BMSCs 的提取液对 OGD 培养后的神经元结构损伤具有保护作用,细胞流式结果也发现受损神经元细胞经提取液培养后其存活率明显升高,表明 BMSCs 可能分泌了某些细胞因子或是其代谢产物对缺氧损伤的神经元起保护作用。此外,本研究发现加入提取液培养的神经元细胞存活率升高的同时,p-AKT(Ser473)蛋白的表达也随之增加,而激活型 Caspase-3 蛋白的表达下降,以上保护性作用被 PI3K/AKT 通道特异性抑制剂 LY294002 药物所抑制。因此,本研究认为 PI3K/AKT 信号通道参与了 OGD 损伤后神经元形态结构的改变及细胞存活和凋亡的发生发展,BMSCs 可通过分泌细胞因子或代谢产物来对神经元 OGD 损伤起保护性作用,其作用机制可能与 PI3K/AKT 信号通道的激活密切相关。本研究仍存在不足,BMSCs 确切产生哪一种细

胞保护因子发挥作用不明确,有待深入探索研究。

参 考 文 献

- [1] Hess DC, Wechsler LR, Clark WM, et al. Safety and efficacy of multipotent adult progenitor cells in acute ischaemic stroke (MASTERS): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial[J]. *Lancet Neurol*, 2017, 16(5):360-368.
- [2] Sammal E, Alia C, Vegliante G, et al. Intravenous infusion of human bone marrow mesenchymal stromal cells promotes functional recovery and neuroplasticity after ischemic stroke in mice[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):6962.
- [3] Liu Y, Zhang Y, Lin L, et al. Effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on the axonal outgrowth through activation of PI3K/AKT signaling in primary cortical neurons followed oxygen-glucose deprivation injury[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11):e78514.
- [4] Dharmasaroja P. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of ischemic stroke[J]. *J Clin Neurosci*, 2009, 16(1):12-20.
- [5] Liu N, Chen R, Du H, et al. Expression of IL-10 and TNF- α in rats with cerebral infarction after transplantation with mesenchymal stem cells[J]. *Cell Mol Immunol*, 2009, 6(3):207-213.
- [6] Wei L, Fraser JL, Lu ZY, et al. Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats[J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 46(3):635-645.
- [7] Tabakman R, Lazarovici P, Kohen R. Neuroprotective effects of carnosine and homocarnosine on pheochromocytoma PC12 cells exposed to ischemia[J]. *J Neurosci Res*, 2002, 68(4):463-469.
- [8] Koretz B, von BAK, Wang N, et al. Pre- and post-synaptic modulators of excitatory neurotransmission: comparative effects on hypoxia/hypoglycemia in cortical cultures[J]. *Brain Res*, 1994, 643(1-2):334-337.
- [9] Liu N, Zhang Y, Fan L, et al. Effects of transplantation with bone marrow-derived mesenchymal stem cells modified by survivin on experimental stroke in rats[J]. *J Transl Med*, 2011, 9(1):105.
- [10] Choi IY, Yan H, Park YK, et al. Sauchinone reduces oxygen-glucose deprivation-evoked neuronal cell death via suppression of intracellular radical production[J]. *Arch Pharm Res*, 2009, 32(11):1599-1606.
- [11] Isele NB, Lee HS, Landshamer S, et al. Bone marrow stromal cells mediate protection through stimulation of PI3K/Akt and MAPK signaling in neurons[J]. *Neurochem Int*, 2007, 50(1):243-250.
- [12] Zhang H, Gao J, Wang M, et al. Effects of scalp electroacupuncture on the PI3K/Akt signalling pathway and apoptosis of hippocampal neurons in a rat model of cerebral palsy[J]. *Acupunct Med*, 2017, 11:4.
- [13] Jiang H, Guo W, Liang X, et al. Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3 β and its upstream regulators[J]. *Cell*, 2005, 120(1):123-135.
- [14] Grutter MG. Caspases: key players in programmed cell death[J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2000, 10(6):649-655.

(责任编辑:张辉洁)