

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.05.011

慢性缺血性脑白质脱髓鞘比格犬模型中 Tau 蛋白表达及可能原因

章洪智¹, 刘静², 杨树², 王多姿², 魏本³, 郭富强^{2△}

(1. 电子科技大学医学院生物医学工程, 成都 610054; 2. 四川省医学科学院/四川省人民医院/电子科技大学附属医院神经内科, 成都 610072; 3. 中国人民解放军成都军区总医院神经内科, 成都 610083)

[摘要] **目的** 探讨慢性缺血性脑白质脱髓鞘比格犬模型中 Tau 蛋白表达水平变化及可能原因。**方法** 将 16 只成年比格犬按照完全随机数字表法分为 A 组(假手术组)及 B、C、D 组(观察组), 每组各 4 只, 应用四血管结扎法制作不同程度脑缺血动物模型。选取双侧侧脑室边缘部位脑白质, 用神经胶质抗原 2(NG2) 标记少突胶质前体细胞(OPCs)、2,3-环核苷 3-磷酸二酯酶(CNPase) 标记成熟少突胶质细胞(OLs), 采用免疫组织化学法检测 Tau、NG2、CNPase, 以平均光密度值量化表达水平。采用 Pearson 直线相关分析法分析 Tau、NG2、CNPase 之间的相关性。**结果** 苏木精-伊红(HE)染色可见慢性脑缺血后脑白质明显脱髓鞘改变, A、B、C、D 组 LFB 染色后评分分别为(0.75±0.71)、(1.38±0.06)、(1.63±0.52)、(1.88±0.64)分, 与 A 组比较, B、C、D 组评分更高($P<0.05$)。与 A 组比较, B、C、D 组 Tau 蛋白及 NG2 表达水平明显增高($P<0.05$); CNPase 表达水平明显降低($P<0.05$)。Pearson 线性相关分析显示 Tau 与 NG2 的表达水平呈正相关($r=0.277, P=0.006$); Tau、NG2 与 CNPase 的表达水平呈负相关($r=-0.303, -0.402, P=0.003, 0.001$)。**结论** Tau 蛋白在慢性缺血性脑白质脱髓鞘比格犬模型中的表达增加可能与 OPCs 分化成熟障碍相关。

[关键词] Tau 蛋白; 脑白质脱髓鞘; 慢性脑缺血; 少突胶质前体细胞; 少突神经胶质

[中图分类号] R744.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)05-0610-04

Tau protein expression and possible reasons in Beagle dog model of chronic ischemic cerebral white matter demyelination

ZHANG Hongzhi¹, LIU Jing², YANG Shu², WANG Duozi², WEI Ben³, GUO Fuqiang^{2△}

(1. Department of Biomedical Engineering, School of Medicine, University of Electronic Science and

Technology of China, Chengdu, Sichuan 610054, China; 2. Department of Neurology, Sichuan Provincial People's Hospital/Sichuan Provincial Academy of Medical Sciences/the Affiliated Hospital of University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu, Sichuan 610072, China; 3. Department of Neurology, General Hospital of Chengdu Military Region, Chengdu, Sichuan 610083, China)

[Abstract] **Objective** To explore the expression level and possible reasons of Tau protein in Beagle dog model of ischemic cerebral white matter(WM) demyelination. **Methods** Sixteen adult Beagle dogs were divided into the sham operation group(A) and observation group B,C and D according to the completely random number table method, 4 cases in each group. Different degrees of cerebral ischemia animal models were established by 4-vessel occlusion(4-VO) method. The bilateral ventricle edge white matter(WM) was selected. The oligodendrocyte precursors(OPCs) were labeled by NG2. The mature oligodendrocytes(OLs) were labeled by CNPase. Tau, NG2 and CNPase were detected by using the immunohistochemical method. The expression level was quantified by the mean optical value. The correlation among Tau, NG2 and CNPase was analyzed by adopting the Pearson linear correlation analysis. **Results** The HE staining showed obvious changes of WM demyelination after chronic cerebral ischemic. The scores after LFB staining in the group A, B, C and D were(0.75±0.71) points, (1.38±0.06) points, (1.63±0.52) points and(1.88±0.64) points. Compared with the group A, the scores in the group B, C and D were much higher($P<0.05$). Compared with the group A, the expression levels of Tau protein and NG2 were significantly increased($P<0.05$), while the CNPase expression level was significantly decreased($P<0.05$). The Pearson correlation analysis showed that Tau expression level was positively correlated with the NG2 expression level($r=0.277, P=0.006$); Tau and NG2 were negatively correlated with the CNPase level($r=-0.303, -0.402, P=0.003, 0.001$). **Conclusion** The increase of Tau expression in Beagle dog model of ischemic cerebral WM demyelination may be related to the differentiation dysmaturity of OPCs.

[Key words] Tau protein; cerebral white matter demyelination; chronic cerebral ischemic; oligodendrocyte precursors cells; oligodendroglia

据世界卫生组织预测, 到 2050 年中国将成为世界上老龄化最严重的国家之一, 在老年患者中可常见侧脑室周围脑白质脱髓鞘病变, 随着脱髓鞘病变的进展, 可逐渐出现认知、运动、排尿等功能障碍。leukoaraiosis and disability study(LADIS) 研究发现重度脑白质脱髓鞘病患者出现生活能力下降的风险为轻度脑白质脱髓鞘病患者的两倍^[1]。而目前缺血性脑白质脱髓鞘病变病理机制尚未有学界共识。

脑白质主要由胶质细胞、轴突、髓鞘和血管组成。动脉病变引起的缺血缺氧性损伤是脑白质脱髓鞘病变主要原因之一^[2]。缺血性脱髓鞘改变常伴有脑室周围白质区少突胶质细胞(OLs)变性死亡、髓鞘水平下降等病理改变^[3]。有研究发现, 缺血后神经元中 Tau 蛋白(脑内含量最多的微管相关蛋白)过度磷酸化与凋亡现象共存, Tau 蛋白也可作为预测和诊断神经退行性疾病的标志^[4-5], Tau 蛋白在缺血缺氧后神经细

胞的损伤与凋亡现象中扮演重要的角色。为探索 Tau 蛋白在慢性缺血性脑白质脱髓鞘病理改变中的影响及可能机制,本实验利用成年比格犬制备慢性缺血性脑白质脱髓鞘模型,苏木精-伊红(HE)染色、卢卡斯快蓝(luxol fast blue, LFB)染色后观察脑白质脱髓鞘病变及病变程度,免疫组织化学法(IHC)检测 Tau、神经胶质抗原 2(NG2)、2,3-环核苷 3-磷酸二酯酶(CNPase)等表达水平,描述慢性脑缺血对 OLs 分化成熟的影响,分析 Tau 与 NG2、CNPase 表达水平之间的关系,探讨在慢性缺血性脑白质脱髓鞘病变中 Tau 蛋白表达水平的变化及可能的原因。

1 材料与方法

1.1 材料 动物:健康成年比格犬 16 只,由四川省人民医院实验动物中心提供,年龄 1.5~2.0 岁,体质量为 10~12 kg。主要试剂:LFB 染色液购自 Sigma-Aldrich(上海)贸易有限公司;兔多克隆 Tau 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司;兔多克隆 NG2 抗体及兔多克隆 CNPase 抗体均购自英国 abcam 艾博抗(上海)贸易有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及慢性脑白质缺血缺氧模型的制备 将 16 只比格犬按随机数字表法平均分为 A 组(假手术组)和 B、C、D 组(观察组),每组 4 只。参考文献[6]的方法经颅外制作脑缺血缺氧模型,对 A 组比格犬术前 12 h 禁食,4 h 禁水,用 30 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,颈部去毛消毒后正中切开皮肤 5.0 cm 左右,然后经颈前肌及筋膜,在胸锁乳突肌内侧钝性分离出颈总动脉,另一侧操作相同。B、C、D 组采用两步手术法。第一步:将 B、C、D 组的 12 只比格犬双侧颈总动脉结扎。具体方法:参照假手术组,术后普通饲料喂养 1 个月。第二步:B 组不结扎椎动脉,C 组结扎右侧椎动脉,D 组即结扎犬双侧椎动脉。具体方法:同上术前准备及麻醉后,颈部脱毛消毒,仰卧位固定,于 5、6 颈椎间做一切口,正中略偏右,分离各层组织,在颈长肌内下放钝性分离出椎动脉,另一侧同此操作方法。术后 16 只比格犬全部存活,以普通饲料喂养 1 个月后处死。

1.2.2 标本留取及 HE 染色、LFB 髓鞘染色 将 4 组比格犬术后普通饲料喂养 1 个月后处死并留取脑组织,分别取左右两侧侧脑室边缘脑白质,用 4%多聚甲醛固定液固定,石蜡包埋,做好编码。HE 染色及 LFB 髓鞘染色均采用常规切片、脱蜡、染色、脱水、封固等方法步骤。

1.2.3 IHC 检测 防脱片处理:3-氨丙基三乙氧基硅烷(APES)浸泡,捞片后置烤箱 60 °C 60 min 使切片紧密黏附;切片常规脱蜡至水;30%过氧化氢 1 份+蒸馏水 10 份混合,室温 10 min 以灭活内源性过氧化物酶,蒸馏水洗 3 次;热修复抗原:将切片浸入 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0),微波炉中高火加热至沸腾后断电,间隔 5 min 后,重复 1 次,冷却后,PBS(pH 7.2~7.4)洗 2 次;滴加山羊血清封闭液,室温 20 min;滴加稀释的一抗(Tau 抗体 1:200、NG2 抗体 1:100、CNPase 抗体 1:200),4 °C 过夜,PBS 洗 3 次;滴加生物素化山羊抗鼠/兔 IgG 二抗,37 °C 30 min,PBS 洗 3 次;滴加辣根过氧化物酶标记链霉素卵蛋白试剂 30 min(37 °C),PBS 洗 4 次;DAB 显色:使用 DAB 显色试剂盒,取 1 mL 蒸馏水,加试剂盒 A、B、C 试剂各 1 滴,混匀后滴加到切片上,室温显色,镜下控制反映时间,一般 2 min 左右,蒸馏水洗涤;苏木精轻度复染,脱水,透明,中性树胶封片。

1.2.4 采图及检测平均光密度(IOD)值 采用数码三目显微摄影系统对切片进行图像采集,每张切片先于 100 倍下观察全部组织,再根据组织大小及表达情况分别选取 3 个不重叠区域

400 倍下采集图像;后采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统测定所采集全部图像的 IOD 值,对每张切片采集的 3 张图像 IOD 取平均值。

1.2.5 评价标准 脑组织脱髓鞘病变程度 LFB 染色后评分参照文献[7]的标准:正常神经纤维及髓鞘形态为 0 分;紊乱的神经纤维、髓鞘染色深浅不一为 1 分;髓鞘肿胀、断裂、明显的液泡形成为 2 分;有髓神经纤维消失、髓鞘彻底溃变并被吞噬细胞清除、不能再显示染色阳性表达为 3 分。Tau 蛋白及 NG2、CNPase 阳性表达均为棕色。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,方差不齐时采用 Tamhane 检验;相关性分析采用 Pearson 直线相关分析法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组动物髓鞘 LFB 染色评分及 HE 染色比较 A、B、C、D 组 LFB 染色评分分别为 (0.75 ± 0.71) 、 (1.38 ± 0.06) 、 (1.63 ± 0.52) 、 (1.88 ± 0.64) 分,与 A 组比较,各组动物脱髓鞘病变程度均明显加重($P < 0.05$)。HE 染色可见慢性脑缺血后脑白质明显脱髓鞘病理改变,A 组 OLs 髓鞘及 OLs 形态结构正常完整,OLs 丰富;B、C、D 组中则可见 OLs 明显减少及不同程度脱髓鞘表现,如髓鞘肿胀、髓鞘断裂,变性的髓鞘最后变为中性脂肪,被吞噬细胞吞噬后变成格子细胞,少数可见脂滴空泡或含铁血黄素沉积等,亦可见随着缺血程度加重 OLs 数量明显减少,见图 1。

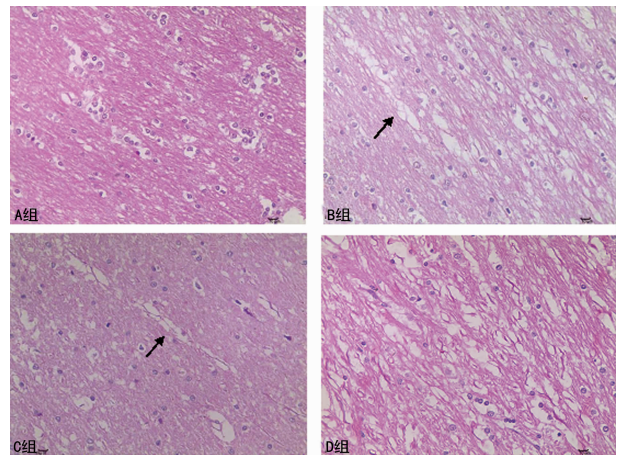


图 1 各组动物髓鞘形态(HE, ×400)

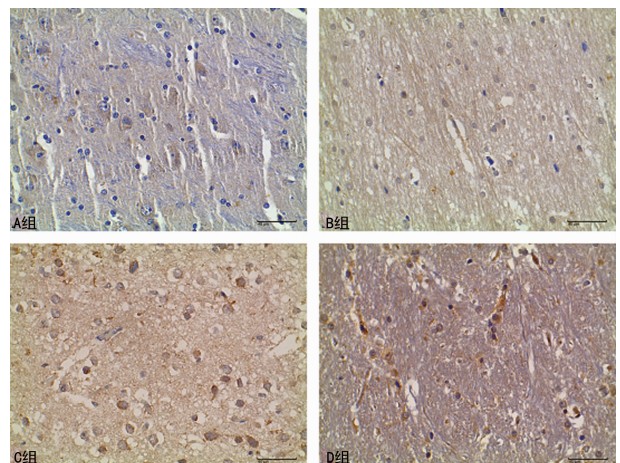


图 2 各组动物脑白质 Tau 蛋白表达比较(IHC, ×400)

2.2 各组动物脑白质 Tau 蛋白及 NG2、CNPase 表达比较

与 A 组比较, B、C、D 组 Tau 蛋白及 NG2 表达水平明显增高 ($P < 0.05$); CNPase 表达水平明显降低 ($P < 0.05$), 见图 2~4 及表 1。

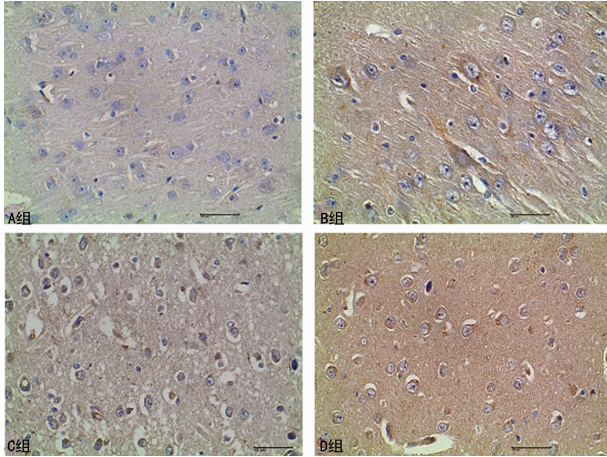


图 3 各组动物脑白质 NG2 表达比较 (IHC, $\times 400$)

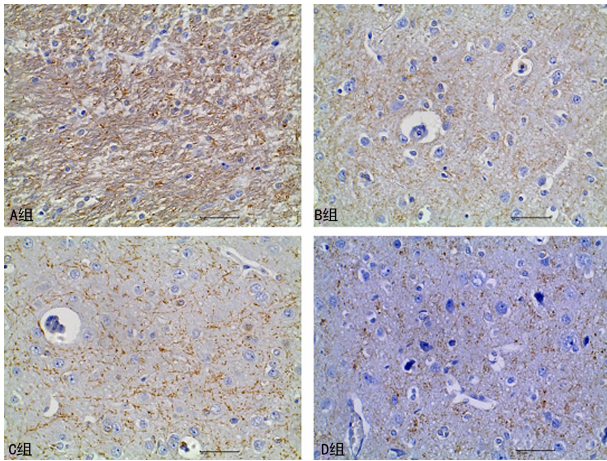


图 4 各组动物脑白质 CNPase 表达比较 (IHC, $\times 400$)

表 1 各组动物脑白质 Tau 蛋白、NG2 及 CNPase 表达比较 ($n=4, \bar{x} \pm s$)

指标	A 组	B 组	C 组	D 组
Tau	0.14 ± 0.03	0.21 ± 0.02 ^a	0.19 ± 0.03 ^b	0.18 ± 0.05 ^b
NG2	0.15 ± 0.02	0.18 ± 0.02 ^b	0.17 ± 0.02 ^b	0.17 ± 0.02 ^b
CNPase	0.29 ± 0.02	0.24 ± 0.03 ^b	0.22 ± 0.01 ^a	0.22 ± 0.02 ^a

^a: $P < 0.01$, ^b: $P < 0.05$, 与 A 组比较

2.3 Tau、NG2 及 CNPase 表达水平相关性分析 对各指标两两进行相关性分析结果显示, Tau 与 NG2 的表达水平呈正相关 ($r=0.277, P=0.006$); Tau、NG2 与 CNPase 的表达水平呈负相关 ($r=-0.303, -0.402, P=0.003, 0.001$)。

3 讨论

从解剖学特点来看, 脑室周围的深部白质主要通过穿支动脉供血, 很少或者完全没有侧支循环可供代偿, 这决定了其易受脑缺血缺氧的影响。有研究发现脑缺血患者较健康者在各个脑组织部位都有更多脑白质脱髓鞘改变^[8]。本研究通过 HE 染色从病理形态学证实了慢性脑缺血缺氧会引起脑白质脱髓鞘病理改变, 对 LFB 髓鞘染色后对脱髓鞘病变评分结果表明, B、C、D 组中脱髓鞘病变程度均加重 ($P < 0.05$), 说明慢性脑缺血缺氧可导致脑白质脱髓鞘。

有研究表明, 缺血缺氧引起的脑白质病变可能为脑缺血引

起 OLS 的损伤所致^[9], OLS 是中枢神经系统髓鞘形成细胞。Tau 蛋白在窒息缺氧后新生儿血清中的表达水平可预测神经系统损伤预后^[10], 高灵敏度的 Tau 蛋白检测可对缺氧性脑损伤后的脑功能进行评估和预测^[11]。

Tau 蛋白在轴突的通信传导和神经系统的形成中有至关重要的作用, 轴索延伸刺激 Tau 蛋白在髓鞘细胞中表达, 其 DNA 通过转录翻译可促进髓鞘形成^[12]。在大鼠大脑中动脉闭塞 (MCAO) 动物模型中, Tau 蛋白在 OLS 中的阳性表达增强 6~8 倍^[13]。本研究结果显示, B、C、D 组中 Tau 蛋白的表达较 A 组表达明显增加 ($P < 0.05$), 且随缺血程度加重 Tau 的表达水平亦明显升高。少突胶质前体细胞 (OPCs) 可分化为 OLS、星状胶质细胞和小胶质细胞, NG2 是分化早期 OPCs 重要的免疫性标记物。脑室周围白质 OPCs 中有 NG2 表达的细胞数量占大多数^[14]。NG2 细胞对缺氧缺血损伤高度敏感, 通过使早产动物缺氧缺血建立脑室周围白质损伤 (PWMID) 模型, 形成选择性脑白质损伤, 发现 NG2 细胞加速形成, 但多不分化为 OLS, 亦不形成髓鞘^[15]。

目前认为 Tau 蛋白在 OLS 尤其是 OPCs 中表达, 并参与调控髓鞘化进程, 为进一步阐明 Tau 蛋白在 OLS 中的作用, VERONIKA 等^[16]通过下调 Tau 蛋白 siRNA 的技术, 发现 Tau 蛋白的缺失导致了髓鞘碱性蛋白 (MBP) 的表达减少。有研究也发现 MBP mRNA 到远端细胞的扩展运输受损且细胞仍然维持在 NG2 阶段^[17]。本研究在缺血缺氧的 B、C、D 组中 NG2 表达水平较 A 组明显增加 ($P < 0.05$), 这说明慢性脑缺血损伤时 OPCs 表达水平增高。

CNPase 为一种髓鞘形成相关蛋白, 特异性地表达在 OLS 中, 被广泛用于标记 OLS。相较于 MBP 和蛋白脂质蛋白 (PLP) 等髓鞘蛋白, CNPase 在 OLS 的表达更早出现, 在病理状态下 OPCs 的分化成熟障碍、髓鞘形成减少均会导致 CNPase 的减少^[17-18]。本研究中 B、C、D 组较 A 组 CNPase 的表达水平降低 ($P < 0.05$), 结合 NG2 表达水平的变化, 可以说明在慢性脑缺血时 OPCs 存在分化成熟障碍。通过对各组动物 Tau、NG2、CNPase 在侧脑室边缘白质表达水平进行 Pearson 线性相关性分析, Tau 与 NG2 的表达水平呈正相关, NG2 与 CNPase 的表达水平呈负相关, 提示 Tau 蛋白在慢性脑缺血时的高表达可能与 OPCs 分化成熟障碍相关。SEIBERLICH 等^[19]研究也发现, Tau 蛋白的平衡失调会导致 OLS 分化异常, 以及神经胶质细胞的接触形成和髓鞘早期形成过程的异常。

综上所述, Tau 蛋白在慢性缺血性脑白质脱髓鞘比格犬模型中的表达增加, 可能与 OPS 分化成熟障碍相关。本研究结果为今后脱髓鞘病理机制研究提供了一定的参考和可能的方向。

参考文献

- [1] INZITARI D, PRACUCCI G, POGGESI A, et al. Changes in white matter as determinant of global functional decline in older independent outpatients; three year follow-up of LADIS (leukoaraiosis and disability) study cohort [J]. BMJ, 2009, 339(7715): b2477.
- [2] PANTONI L, GARCIA J H. Pathogenesis of leukoaraiosis; a review [J]. Stroke, 1997, 28(3): 652-659.
- [3] BOWLER V. Editorial comment-The progression of leukoaraiosis [J]. Stroke, 2003, 34(8): 1916-1917.
- [4] WEN Y, YANG S, LIU R. Transient cerebral ischemia induces aberrant neuronal cell cycle re-entry and Alzheimer'

- s disease-like tauopathy in female rats[J]. *Biol Chem*, 2004, 279(21):22684-22692.
- [5] SCHRAEN-MASCHKE S, SERGEANT N, DHAENENS C, et al. Tau as a biomarker of neurodegenerative diseases[J]. *Bio Med*, 2008, 2(4):363-384.
- [6] 孙永明, 郑祖根, 沈忆新. 经颅外制作犬后脑缺血模型[J]. *中华实验外科学杂志*, 1998, 15(6):565.
- [7] HIDEAKI W, HIDEKAZU T, AKIGUCHI I, et al. Axonal damage and demyelination in the white matter after chronic cerebral hypoperfusion in the rat[J]. *Brain Res*, 2002, 924(1):63-70.
- [8] TOMIMOTO H, IHARA M, WAKITA H, et al. Chronic cerebral hypoperfusion induces white matter lesions and loss of oligodendroglia with DNA fragmentation in the rat[J]. *Acta Neuropathol*, 2003, 106(6):527-534.
- [9] GABRIELLA M, CHRISTIAN Z, MUSCAT R, et al. Oligodendrocyte pathophysiology and treatment strategies in cerebral ischemia[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2014, 20(7):603-612.
- [10] TAKAHASHI K, HASEGAWA S, MAEBA S, et al. Serum tau protein level serves as a predictive factor for neurological prognosis in neonatal asphyxia[J]. *Brain Dev*, 2014, 36(8):670-675.
- [11] RANDALL J, MÖRTBERG E, PROVUNCER G, et al. Tau proteins in serum predict neurological outcome after hypoxic brain injury from cardiac arrest: Results of a pilot study[J]. *Resuscitation*, 2013, 84(3):351-356.
- [12] TATEBAYASHI Y, HAQUE N, TUNG Y C, et al. Role of tau phosphorylation by glycogen synthase kinase-3beta in the regulation of organelle transport[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt9):1653-1663.
- [13] IRVING E A, YATSUSHIRO K, MCCULLOCH J, et al. Rapid alteration of tau in oligodendrocytes after focal ischemic injury in the rat: involvement of free radicals[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1997, 17(6):612-622.
- [14] DAWSON M R, POLITO A, LEVINE J, et al. NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2003, 24(2):476-488.
- [15] AGUIRRE A, GALLO V. Postnatal neurogenesis and gliogenesis in the olfactory bulb from NG2-expressing progenitors of the subventricular zone[J]. *J Neurosci*, 2004, 24(46):10530-10541.
- [16] VERONIKA S, BAUER N G, LISA S, et al. Downregulation of the microtubule associated protein Tau impairs process outgrowth and myelin basic protein mRNA transport in oligodendrocytes[J]. *Glia*, 2015, 63(9):1621-1635.
- [17] KURSULA P. Structural properties of proteins specific to the myelin sheath[J]. *Amino Acids*, 2008, 34(2):175-185.
- [18] JESERICH G, KLEMPAHN K, PFEIFFER M, et al. Features and functions of oligodendrocytes and myelin proteins of lower vertebrate species[J]. *J Mol Neurosci*, 2008, 35(1):117-26.
- [19] SEIBERLICH V, BAUER N G, SCHWARZ L, et al. Downregulation of the microtubule associated protein Tau impairs process outgrowth and myelin basic protein mRNA transport in oligodendrocytes[J]. *Glia*, 2015, 3(9):1621-1635.

(收稿日期:2017-06-22 修回日期:2017-09-26)

(上接第 609 页)

- [12] PAOLICCHI A, DOMINICI S, PIERI L, et al. Glutathione catabolism as a signaling mechanism[J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, 64(5/6):1027-1035.
- [13] KIM H P, WANG X, CHEN Z H, et al. Autophagic proteins regulate cigarette smoke-induced apoptosis: protective role of heme oxygenase-1[J]. *Autophagy*, 2008, 4(7):887-895.
- [14] QIAO H, LI L Y, QU Z C, et al. Cobalt-induced oxidant stress in cultured endothelial cells: prevention by ascorbate in relation to HIF-1alpha[J]. *Biofactors*, 2009, 35(3):306-313.
- [15] WAGNER A E, BOESCH-SAADATMANDI C, BRECKWOLDT D, et al. Ascorbic acid partly antagonizes resveratrol mediated heme oxygenase-1 but not paraoxonase-1 induction in cultured hepatocytes - role of the redox-regulated transcription factor Nrf2[J]. *BMC Complement Altern Med* 2011(11):1-10.
- [16] BATTAGLIA V, COMPAGNONE A, BANDINO A A, et al. Cobalt induces oxidative stress in isolated liver mitochondria responsible for permeability transition and intrinsic apoptosis in hepatocyte primary cultures[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41(3):586-594.
- [17] CAROPPI P, SINIBALDI F, FIORUCCI L, et al. Apoptosis and human diseases: mitochondrion damage and lethal role of released cytochrome C as proapoptotic protein[J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16(31):4058-4065.
- [18] LANDSHAMER S, HOEHN M, BARTH N, et al. Bid-induced release of AIF from mitochondria causes immediate neuronal cell death[J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(10):1553-1563.
- [19] GARLAND J M, RUDIN C. Cytochrome c induces caspase-dependent apoptosis in intact hematopoietic cells and overrides apoptosis suppression mediated by bcl-2, growth factor signaling, MAP-kinase-kinase, and malignant change[J]. *Blood*, 1998, 92(4):1235-1246.
- [20] YANG W, SHI L, CHEN L, et al. Protective effects of perindopril on D-galactose and Aluminum trichloride induced neurotoxicity via the apoptosis of mitochondria-mediated intrinsic pathway in the hippocampus of mice[J]. *Brain Res Bull*, 2014, 109(1):46-53.

(收稿日期:2017-06-24 修回日期:2017-09-02)