

三甲氧苄嘧啶对脂肪来源间充质干细胞氧化应激损伤的影响及机制研究*

唐茂涵, 张艳杰, 刘 银, 苏智广[△]

四川大学华西医院 分子医学研究中心(成都 610041)

【摘要】 目的 研究三甲氧苄嘧啶(TMZ)对脂肪来源间充质干细胞(ADSCs)氧化应激凋亡的影响及其机制。**方法** 使用双酶消化获得 SD 大鼠脂肪组织的 ADSCs,进行流式细胞学鉴定和多向分化潜能评估;应用过氧化氢(H₂O₂)诱导的 ADSCs 损伤凋亡模型,使用不同浓度的 TMZ(250 μmol/L、500 μmol/L)干预氧化应激损伤的过程;Hoechst 33342 染色定性分析凋亡细胞形态;JC-1 线粒体膜电位染色和线粒体电镜检测观察 TMZ 作用下线粒体损伤逆转情况;Western blot 检测 TMZ 对线粒体凋亡通路蛋白的影响;通过检测活性氧簇(ROS)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)水平评价 TMZ 对 ADSCs 抗氧化能力的作用。**结果** 获取的 ADSCs,阳性表达 CD29 和 CD90 抗原,低或不表达 CD34、CD45 及 CD31;ADSCs 能够成功被诱导分化为脂肪细胞和骨性细胞;H₂O₂ 处理 ADSCs,细胞凋亡数量增加,线粒体膜电位降低,线粒体结构破坏崩解,保护性凋亡蛋白(Bcl2)表达下降,凋亡蛋白(Bax、Bad、Caspase3)表达上调;胞内 ROS 含量与 MDA 的质量摩尔浓度上升,SOD 的活性和 GSH 的质量摩尔浓度降低。TMZ 对 ADSCs 有浓度依赖性的保护作用,可降低 H₂O₂ 诱导的细胞凋亡,逆转线粒体低电位,减轻 H₂O₂ 对线粒体结构的损伤,提高 Bcl2 的表达和下调 Bax、Bad 及 Caspase3 的表达,减低过量的 ROS 和 MDA,恢复 SOD 和 GSH 的抗氧化系统功能。**结论** TMZ 通过调控保护性蛋白的表达和提高内源性抗氧化能力,提高 ADSCs 的存活率,从而逆转氧化应激损伤。

【关键词】 脂肪来源间充质干细胞 氧化应激 细胞凋亡 三甲氧苄嘧啶 线粒体

The Mechanisms of Trimetazidine Alleviating the Oxidative Stress in Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells TANG Mao-han, ZHANG Yan-jie, LIU Yin, SU Zhi-guang[△]. *Molecular Medicine Research Center, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China*

[△] Corresponding author, E-mail: zhiguang_su@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of trimetazidine (TMZ) on the oxidative stress injury in adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs). **Methods** ADSCs derived from adipose tissue of SD rats were characterized by flow cytometry and multiline age differentiation. ADSCs apoptosis was induced by H₂O₂ *in vitro*, Different concentration of TMZ (250 μmol/L, 500 μmol/L) was used to protect ADSCs from apoptosis. The morphological features of apoptotic ADSCs were analyzed by Hoechst 33342, mitochondrial potential and structure was analyzed by JC-1 staining and electron microscope, respectively. The apoptotic proteins were detected by Western blot. The effect of TMZ on antioxidant capacity of ADSCs was evaluated by detecting reactive oxygen species (ROS), superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA). **Results** The isolated ADSCs expressed high levels of CD29 and CD90, low levels of CD34 and CD45 and no expression of CD31. ADSCs could be induced to adipocyte and osteoplastic cells. After being treated by H₂O₂, ADSCs displayed apoptosis characteristics with increased number of apoptotic cells, decreased mitochondrial transmembrane potential and damaged mitochondria. The expressions of apoptotic proteins, including Bax, Bad, and Caspase3, were dramatically increased compared to the controls; however, the anti-apoptotic protein Bcl2 was decreased. At the meantime, the contents of ROS and MDA were elevated, but the concentrations of SOD and GSH were reduced. The treatment of TMZ could partly reverse above negative impacts to ADSCs. **Conclusion** TMZ could improve the survival rate of ADSCs by enhancing anti-oxidant defense systems to remove excessive ROS and regulating the expression of protective protein.

【Key words】 Adipose-derived mesenchymal stem cells Oxidative stress Apoptosis
Trimetazidine Mitochondrial

* 国家高技术研究发展计划(863 计划)(No. 2014aa0021604)资助

[△] 通信作者, E-mail: zhiguang_su@hotmail.com

干细胞移植技术可以通过再生心肌来修复梗死后的组织细胞,改善心肌梗死患者心功能。多种干细胞^[1]能够作为心肌梗死再生修复的备选细胞,例如脂肪来源间充质干细胞(ADSCs)^[2]、心脏干细胞(CSCs)^[3]、骨髓来源干细胞(BMSCs)^[4]、骨骼肌细胞(SKM)^[5]以及诱导的多能干细胞(iPSC)^[6]。与其他种子细胞相比,ADSCs具有以下优点:来源于皮下脂肪,可利用侵袭性小的抽脂术获取;可以大量扩增复制且衰老较慢,分化心肌效率高^[7];人白细胞抗原(HLA-DR)为阴性表达,移植后排异反应较小^[2]。在缺血微环境或再灌注损伤期,抗氧化物的降低或氧化应激的增强会导致心肌内活性氧簇(ROS)水平上升,大量氧自由基对移植的ADSCs造成破坏,使其凋亡^[8]。心肌梗死后移植的干细胞一周后存活率仅1%^[9]。因此提高种子细胞对氧化应激损伤的耐受是ADSCs治疗心肌修复的关键。

三甲氧苄嘧啶(TMZ)是一种嘧啶类衍生物,主要用于改善心肌代谢、缓解心肌缺血症状。它可以激活丙酮酸脱氢酶或抑制内毒碱棕榈酰基转运酶-1,促进葡萄糖的利用,提高ATP生成效率。其次, TMZ能够对抗再灌注区黄嘌呤过氧化酶催化氧自由基的产生。TMZ还能与线粒体膜上可通透性蛋白结合使之失活,从而抑制线粒体内钙聚集,减轻Ca²⁺引起的线粒体肿胀,保护线粒体的结构和功能。有关TMZ对移植的ADSCs在氧化应激条件下细胞凋亡的影响鲜有报道。本研究旨在探究TMZ对ADSCs氧化应激凋亡的影响和机制。

1 材料和方法

1.1 材料

SD大鼠(体质量70~90 g)购于成都达硕实验动物有限公司,2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(CDCFH-DA)试剂盒、TMZ、DMSO、I型胶原酶、胰蛋白酶、蛋白酶抑制剂等购自Sigma公司,表面抗原(CD29、CD31、CD34、CD45、CD90)、Caspase、Bcl2、Bax、Bad等抗体及相应二抗购自Santa Cruze,超敏发光液、RIPA蛋白裂解液、电镜固定液购自上海碧云天生物有限公司,胎牛血清(FBS)购自Hyclone。

1.2 ADSCs的分离及培养

双酶消化获得ADSCs。取SD大鼠腹股沟处的白色脂肪, PBS洗涤后剪成0.5 mm×0.5 mm×0.5 mm的组织粒,用I型胶原酶和胰蛋白酶组成的混合消化酶在37℃消化50 min,离心后重悬于

培养液中,24 h后换液除去漂浮细胞。继续培养细胞长至80%融合后,使用胰酶消化传代。本实验中使用的ADSCs为第4代细胞。

1.3 ADSCs表面标记物的鉴定及多向分化评估

ADSCs经PBS洗涤后,加入细胞表面抗原CD29、CD31、CD34、CD45及CD90抗体,避光孵育30 min,进行流式细胞学鉴定。接种于6孔板中的细胞(每孔 5×10^5)贴壁生长稳定后,开始诱导分化。成骨诱导培养液:地塞米松(0.1 μmol/L)、10%FBS、维生素C钠盐(0.05 mmol/L)和β-甘油磷酸钠(10 mmol/L),培养21 d后,使用茜素红染色,评价ADSCs的成骨分化能力。成脂诱导培养液:地塞米松(1 μmol/L)、10%FBS、抗坏血酸(100 μmol/L)、L-谷氨酰胺(2 mmol/L)、1-甲基-3-异丁基黄嘌呤(0.5 mmol/L)和吡啶美辛试剂(1 μmol/L),培养21 d后,使用油红O染色,评价ADSCs的成脂分化能力。

1.4 ADSCs氧化应激凋亡模型的建立

使用过氧化氢(H₂O₂)诱导ADSCs凋亡。当ADSCs培养至80%融合后,弃掉培养液,PBS洗涤后加入含0.3 mmol/L H₂O₂的无血清DMEM培养基,37℃、体积分数为5%的CO₂中培养12 h,诱导其凋亡。

1.5 TMZ干预H₂O₂诱导的ADSCs凋亡

使用不同浓度的TMZ,干预H₂O₂诱导的细胞凋亡:培养的细胞至80%融合后,加入浓度为0(等量PBS,对照组)、250 μmol/L、500 μmol/L的TMZ于培养基中(10%FBS+L-DMEM),37℃、体积分数为5%的CO₂中预处理12 h。弃掉培养液,PBS洗涤后更换为含0.3 mmol/L H₂O₂的无血清DMEM,培养12 h后,倒置显微镜观察细胞形态和细胞凋亡。

1.6 Hoechst 33342染色分析细胞凋亡

ADSCs经体积分数为4%的多聚甲醛固定20 min后,加入Hoechst 33342(5 μg/mL),避光培育30 min,PBS洗涤后,用倒置显微镜检测结果。

1.7 线粒体检测

1.7.1 ADSCs线粒体膜电位的检测 线粒体膜电位的变化是细胞凋亡的早期特征性改变,是线粒体结构受损的重要信号。使用线粒体膜电位染色(JC-1染色),正常细胞线粒体呈高电位,表现为红色荧光。当线粒体损伤后,其膜电位崩解,电势能下降,出现绿色荧光。利用荧光探针JC-1检测ADSCs线粒体膜电位的改变,H₂O₂和TMZ处理后的

ADSCs 以及对照组,分别与 JC-1 (2.5 g/mL) 在 37 ℃ 中避光培养 30 min, PBS 洗涤后,用倒置荧光显微镜观察结果。

1.7.2 线粒体电镜检测 1% 钨酸和 0.1 mol/L PBS 在 20 ℃ 固定细胞 2 h。经 PBS 洗涤 3 次(每次 15 min)后,酒精梯度脱水,然后在丙酮和 812 包埋剂(体积比 1 : 1)混合液、纯 812 包埋剂中分别渗透过夜,再在 60 ℃ 下聚合 48 h 后,进行 60~80 nm 超薄切片,切片经铀铅双染色(2% 醋酸铀饱和水溶液,枸橼酸铅,各染色 15 min)后,室温干燥过夜。透射电子显微镜(TECNAI G2 20 TWIN)下观察并采集图像分析。

1.8 ROS、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)的检测

经 H₂O₂、TMZ 处理的细胞,去除细胞培养液,加入 ROS 染液(10 μmol/L),37 ℃ 细胞培养箱内孵育 20 min。用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次,倒置显微镜下定性分析胞内 ROS 含量变化;按照 DCFH-DA 试剂盒(Sigma 公司)说明书,使用酶标仪分析 SOD、GSH 和 MDA 的水平变化。

1.9 Western blot 检测凋亡通路蛋白

裂解 ADSCs 提取总蛋白,150 g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转移至 PVDF 膜后室温封闭,加入 β-actin (1 : 2 000)、Caspase3 (1 : 2 000)、Bcl2 (1 : 2 000)、Bax (1 : 2 000)、Bad (1 : 1 000) 等抗体,4 ℃ 孵育过夜。TBST 洗膜后加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1 : 2 000),室温反应 45 min。

TBST 常规漂洗 3 遍后使用 ECL 发光液曝光显影。通过 Quantity One 软件采集信号,以目的蛋白与内参蛋白灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.10 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,两组间比较用 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ADSCs 的生长形态、多向分化评估及表面标记物的鉴定

第 4 代 ADSCs 贴壁培养 24 h 后,倒置显微镜观察,细胞数量较少,体积较小,呈短棒状散于培养瓶中;48 h 后,ADSCs 数量增多,缓慢铺展呈细长形、三角形或多角样等多种形态;72~96 h 细胞数量继续增加,体积变大,呈长梭状、漩涡样(图 1A)。在成脂分化培养液中,ADSCs 油滴体积随培养周期延长数量增加、体积增大,2 周后,油红 O 染色为橘红色,提示 ADSCs 成功诱导分化成脂肪细胞(图 1B);在成骨分化条件下,ADSCs 由长梭形逐渐变为圆形,体积增大、聚集成团,3 周后,茜素红染色呈红色,提示 ADSCs 成功诱导分化成骨性细胞(图 1C)。

ADSCs 抗原中,间充质干细胞特性 CD90 和 CD29 高表达(98.92% 和 82.97%),造血干细胞标记物 CD45、CD34、CD31 低表达(0.52%、0.20% 和 0.37%)。表明提取的 ADSCs 纯度较高。

2.2 TMZ 对 H₂O₂ 诱导的 ADSCs 细胞凋亡的影响

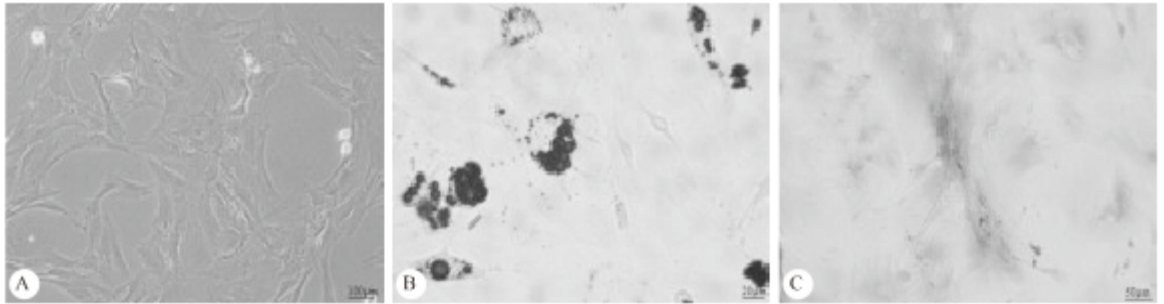


图 1 ADSCs 的生长情况和成骨成脂分化。×40

Fig 1 Isolation osteogenic differentiation and adipogenic differentiation of ADSCs. ×40

A: ADSCs' isolation and culture; B: Identification of adipogenic differentiation; C: Identification of osteogenic differentiation

正常生长的 ADSCs 细胞紧密排列、铺展生长、表现均一(图 2A_a);H₂O₂ 处理的细胞形态杂乱、聚集、漂浮(图 2A_b);TMZ(250 μmol/L 或 500 μmol/L)干预后可抑制上述改变(图 2A_c)。Hoechst 33342 染色后,正常生长细胞核呈均一着色、类椭圆形(图 2B_a);H₂O₂ 处理的细胞核呈不规则状、分叶

状、或出现核破裂及染色质浓染(图 2B_b);TMZ 干预后可减轻上述变化(图 2B_c)。提示 TMZ 对氧化应激诱导的 ADSCs 细胞凋亡具有抑制作用。

2.3 TMZ 对 H₂O₂ 诱导的 ADSCs 线粒体损伤的影响

实验观察到(图 3),ADSCs 经 H₂O₂ 处理后,线

粒体由红色荧光转变为绿色荧光,提示线粒体损伤。分别用 250 $\mu\text{mol/L}$ 或 500 $\mu\text{mol/L}$ TMZ 干预后,观察到红、绿荧光共存,表明 TMZ 可以部分逆转 H_2O_2 的损伤作用。同时,电镜下观察到 H_2O_2 处理使正常的梭形线粒体变为肿胀的圆形,且内部嵴结构消失,出现空泡。500 $\mu\text{mol/L}$ TMZ 预处理后可一定程度降低 H_2O_2 对线粒体的损伤作用(图 4)。

2.4 TMZ 对 ADSCs 自身抗氧化能力的调节作用

见图 5,附表。使用 ROS 探针,可见 H_2O_2 处理使胞内 ROS 含量上升,而 TMZ 可部分降低过量的 ROS。 H_2O_2 处理后,MDA 的质量摩尔浓度增加,而 SOD 的活性和 GSH 的质量摩尔浓度则降低(P 均 <0.05)。TMZ 处理可降低 MDA,提高 SOD 和 GSH 水平,与 H_2O_2 组比较差异有统计学意义(P 均 <0.05)。

2.5 线粒体凋亡关键通路蛋白变化

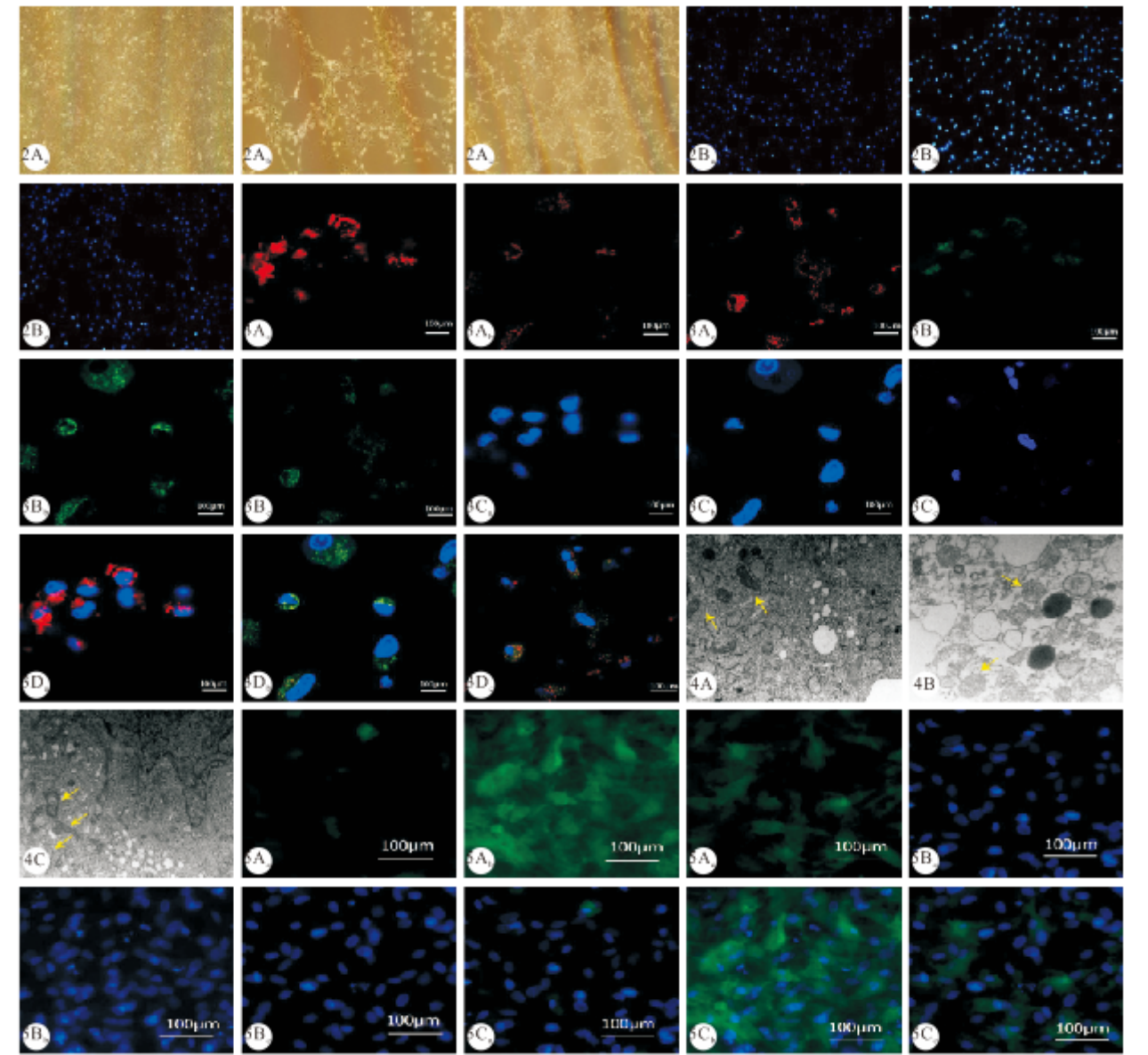


图 2 TMZ 干预 ADSCs 凋亡。 $\times 40$ 图 3 线粒体膜电位染色。 $\times 40$ 图 4 线粒体电镜检测。 $\times 20\ 000$ 图 5 氧化应激条件下细胞内 ROS 的变化。 $\times 40$

Fig 2 TMZ intervened the apoptosis of ADSCs. $\times 40$ Fig 3 Fluorescence staining of mitochondrial membrane potential. $\times 40$ Fig 4 Electron microscope detection of mitochondrial (yellow arrows show changes of mitochondrial ultrastructure). $\times 20\ 000$ Fig 5 Changes of ROS in ADSCs under oxidative stress. $\times 40$

2A: Changes in cell morphology under optical microscope; 2B: Identified the apoptotic cells by Hoechst 33342; 3A: JC-1 red, normal mitochondria; 3B: JC-1 green, damaged mitochondria; 3C,5B: DAPI; 3D,5C: Merged; 5A: ROS; a: Control group; b: H_2O_2 group; c: 500 $\mu\text{mol/L}$ TMZ+ H_2O_2 group

见图 6。ADSCs 经 H_2O_2 处理后,Caspase3、Bax 和 Bad 凋亡蛋白的表达升高,保护性蛋白 Bcl2 的表达降低(P 均 <0.05),TMZ 处理可以部分逆转上述蛋白变化,与 H_2O_2 组比较差异有统计学意

附表 TMZ 对脂肪干细胞 SOD、GSH 和 MDA 水平的影响

Table Expressions of SOD,GSH and MDA in ADSCs				
Group	n	GSH/(nmol/mg)	SOD/(U/mg)	MDA/(nmol/mg)
Control	5	18.11±3.57	125.33±26.44	1.56±0.77
H ₂ O ₂	5	10.27±2.65*	68.84±22.16*	4.07±1.06*
250 μmol/L TMZ+H ₂ O ₂	5	12.10±2.53*·#	87.63±19.43*·#	3.36±0.97*·#
500 μmol/L TMZ+H ₂ O ₂	5	16.55±3.12#·△	103.47±24.68#·△	2.23±1.22#·△

* $P<0.05$, vs. control group; # $P<0.05$, vs. H_2O_2 group; △ $P<0.05$, vs. 250 μmol/L TMZ+ H_2O_2 group

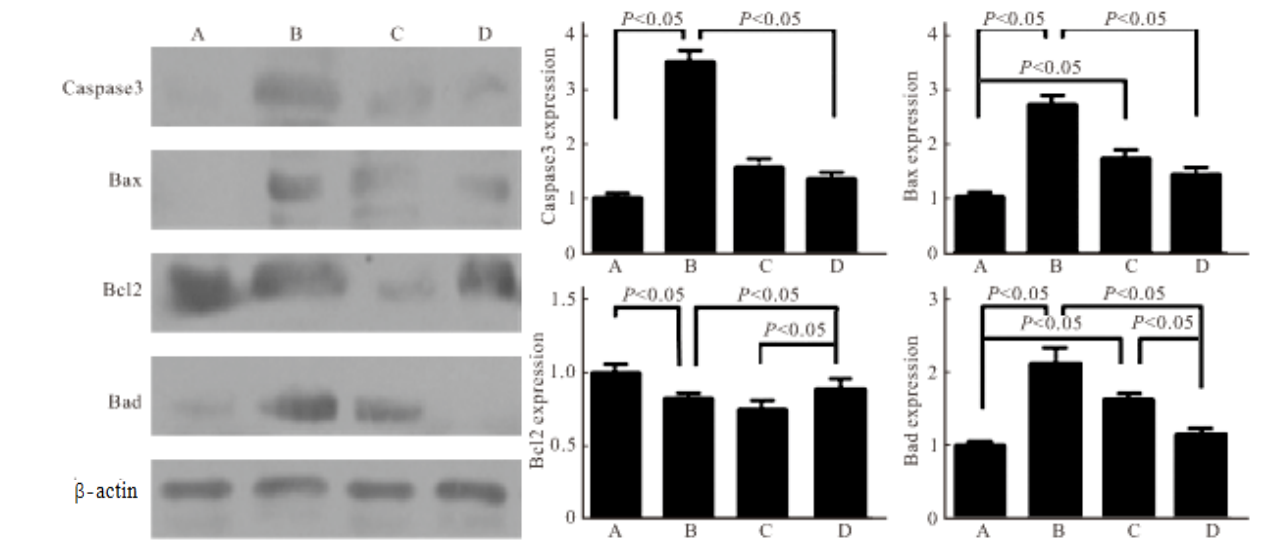


图 6 线粒体凋亡相关通路蛋白变化

Fig 6 Changes of mitochondrial apoptosis-associated proteins

A: Control group; B: H_2O_2 group; C: 250 μmol/L TMZ+ H_2O_2 group; D: 500 μmol/L TMZ+ H_2O_2 group

义(P 均 <0.05)。

3 讨论

干细胞移植再生心肌治疗,已经成为改善心肌梗死患者心功能的治疗方法,并且在很多临床和动物实验中开展。虽然近年来已经有很大进展,但移植后干细胞有效存活率低是其在未来应用中的重要难题。心肌梗死缺血的微环境中,缺氧、氧化应激、炎症等导致组织内 ROS 明显上升,大量氧自由基严重损害移植后干细胞的活性,致使其坏死凋亡。移植后的细胞一周内仅有 1% 的存活率^[9]。因此,如何有效提高干细胞对氧化应激损伤的耐受从而提高其存活是干细胞治疗心肌修复的关键。

TMZ 是一种嘧啶类衍生物,它可以激活丙酮酸脱氢酶或抑制内毒素棕榈酰基转运酶-1,促进葡萄糖的利用,提高 ATP 生成效率。其次,TMZ 还能够对抗再灌注区黄嘌呤过氧化酶催化氧自由基的产生。最重要的是,TMZ 能与线粒体膜上的可通透性

蛋白结合使之失活,从而减轻线粒体内钙聚集和线粒体肿胀,保护线粒体的结构和功能。基于此,在本研究中,我们使用 TMZ 来预处理干细胞,并观察其在氧化应激中的生存状态,以此来探讨 TMZ 对 ADSCs 的影响及机制。Caspase3 依赖的凋亡通路是公认的导致细胞程序性凋亡的通路,而 Bcl2 对保护线粒体膜电势有着重要作用^[10]。我们发现 H_2O_2 处理后的干细胞线粒体损伤,Caspase3 活化,从而激活细胞凋亡通路,最终导致细胞凋亡,这提示 H_2O_2 是通过线粒体死亡通路诱导其凋亡,而 TMZ 的干预可以稳定线粒体膜电位,提高保护性蛋白 Bcl2 的表达阻断凋亡信号,稳定线粒体结构和功能,保护 ADSCs。

此外,本研究观察到 H_2O_2 可以提高细胞内 MDA 的质量摩尔浓度,降低内源性抗氧化因子 SOD 的活性和 GSH 的质量摩尔浓度。SOD 和 GSH 可以清除过量的氧自由基 ROS^[11],而氧化应激所致的细胞凋亡,很大程度上与细胞内过量的

ROS 直接相关^[12-13]。TMZ 干预后可以降低 MDA 的质量摩尔浓度,提高 SOD 的活性和 GSH 的质量摩尔浓度。因此我们认为 H₂O₂ 损坏 ADSCs 的抗氧化系统,而 TMZ 能够恢复或增强 ADSCs 的内源性抗氧化能力,清除过量的 ROS,减轻自身损伤程度。另外,细胞内过量的 ROS 氧自由基会攻击线粒体膜结构,损伤其功能,TMZ 可以清除过量的 ROS,这一作用也可能参与了其对线粒体的维稳作用。

综上所述,本研究证实了 H₂O₂ 通过 Caspase9 介导的线粒体凋亡通路诱导 ADSCs 的凋亡,因此阻断 Caspase9 依赖的凋亡通路,保护线粒体氧化应激下的功能可能是提高 ADSCs 存活率的关键。也有报道表明,其他凋亡通路,例如 Caspase8 介导的凋亡受体通路^[14]及 Caspase12 介导的内质网应激通路^[15]也可能参与到 ADSCs 的氧化应激损伤中。上述通路是否存在交互作用以及移植手术后下游信号和线粒体的具体作用,还需要进一步研究。尽管本研究发现 TMZ 可以降低 ADSCs 的氧化应激损伤,但是细胞抗氧化应激凋亡能力的提高能否最终提升移植细胞的存活率从而提升移植效率,仍然需要更多的研究来证实。

参 考 文 献

- [1] STERNECKERT JL, REINHARDT P, SCHOLER HR. Investigating human disease using stem cell models. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(9): 625-639.
- [2] CAWTHORN WP, SCHELLER EL, MACDOUGALD OA. Adipose tissue stem cells: the great WAT hope. *Trends Endocrinol Metab*, 2012, 23(6): 270-277.
- [3] MESSINA E, ANGELIS L, FRATI G, *et al.* Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res*, 2004, 95(9): 911-921.
- [4] MAZO M, ARANA M, PELACHO B, *et al.* Mesenchymal stem cells and cardiovascular disease: a bench to bedside roadmap. *Stem Cells Int*, 2012, 2012: 175979 [2015-11-08]. <http://www.hindawi.com/journals/sci/2012/175979/>. doi: 10.1155/2012/175979.
- [5] SEGERS VF, LEE RT. Stem-cell therapy for cardiac

disease. *Nature*, 2008, 451(7181): 937-942.

- [6] TEMPLIN C, ZWEIGERDT R, SCHWANKE K, *et al.* Transplantation and tracking of human-induced pluripotent stem cells in a pig model of myocardial infarction: assessment of cell survival, engraftment, and distribution by hybrid single photon emission computed tomography/computed tomography of sodium iodide symporter transgene expression. *Circulation*, 2012, 126(4): 430-439.
- [7] LEISTNER DM, FISCHER-RASOKAT U, HONOLD J, *et al.* Transplantation of pr-oenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCAREAMI): final 5-year results suggest long-term safety and efficacy. *Clin Res Cardiol*, 2011, 100(10): 925-934.
- [8] LOGUE SE, GUSTAFSSON AB, SAMALI A, *et al.* Ischemia/reperfusion injury at the intersection with cell death. *J Mol Cell Cardiol*, 2005, 38(1): 21-33.
- [9] TOMA C, PITTENGER MF, CAHILL KS, *et al.* Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*, 2002, 105(1): 93-98.
- [10] DESAGHER S, MARTINOU JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol*, 2000, 10(9): 369-377.
- [11] CAI B, LI X, WANG Y, *et al.* Apoptosis of bone marrow mesenchymal stem cells caused by homocysteine via activating JNK signal. *PLoS One*, 2013, 8(5): e63561 [2015-12-22]. <http://journals.plos.org/plosone/article? id = 10.1371/journal.pone.0063561>.
- [12] AHMED FN, NAQVI FN, SHAFIQ F. Lipid peroxidation and serum antioxidant enzymes in patients with type 2 diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1084: 481-489.
- [13] EBERT R, ULMER M, ZECK S, *et al.* Selenium supplementation restores the antioxidative capacity and prevents cell damage in bone marrow stromal cells *in vitro*. *Stem Cells*, 2006, 24(5): 1226-1235.
- [14] THORBURN A. Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal*, 2004, 16(2): 139-144.
- [15] SHORE GC, PAPA FR, OAKES SA. Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response. *Curr Opin Cell Biol*, 2011, 23(2): 143-149.

(2016-03-08 收稿, 2016-05-16 修回)

编辑 余琳