

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.32.012

小剂量过氧化氢对大鼠心肌细胞钙瞬变及凋亡的作用*

王 昊 李玉泽 王成福 赵美咪 孙英贤 王丽娟[△]

(中国医科大学附属第一医院心内科; 辽宁省人民医院心内科 辽宁 沈阳 110001)

摘要 目的:探讨小剂量过氧化氢导致的氧化应激对大鼠心肌细胞钙瞬变及细胞凋亡的作用。**方法:**解剖取出成年大鼠心脏,应用 langendorff 方法分离心肌细胞,加入 fluo-3 荧光指示剂后,应用不同浓度的过氧化氢作用于心肌细胞,在共聚焦显微镜下测定心肌细胞内钙瞬变。分离并培养新生大鼠心肌细胞,观察过氧化氢处理心肌细胞后其形态的变化,从而评价小剂量过氧化氢对心肌细胞的凋亡作用。**结果:**应用 0.125 mmol/L、0.25 mmol/L 及 0.375 mmol/L 的过氧化氢作用于心肌细胞后,心肌细胞内钙瞬变幅度明显升高,并呈时间剂量依赖性。在培养的大鼠原代心肌细胞中加入 0.25 mmol/L 的过氧化氢后,心肌细胞发生凋亡的形态变化。**结论:**小剂量过氧化氢可开放心肌细胞 L- 钙通道,明显增加心肌细胞内钙瞬变,并导致心肌细胞凋亡。

关键词:过氧化氢;心肌细胞;钙瞬变;凋亡

中图分类号:Q95-3;Q75;Q813;R54 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)32-6250-03

Effect of Low-Dose Hydrogen Peroxide on Intracellular Calcium Transient and Apoptosis in Rat Cardiomyocyte*

WANG Hao, LI Yu-ze, WANG Cheng-fu, ZHAO Mei-mi, SUN Ying-xian, WANG Li-juan[△]

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning, 110001, China)

ABSTRACT Objective: The effect of low-dose hydrogen peroxide on intracellular calcium transient and apoptosis in rat cardiomyocyte are investigated in the experiment. **Methods:** We have anatomized and removed the heart of adult rat, and isolated the cardiomyocyte with langendorff method. The cells were stained with fluo-3 fluorescent indicator and determined for the changes of the intracellular calcium transient at exposing to low-dose hydrogen peroxide with confocal microscope. Moreover, we isolated and cultivated primary rat myocardial cells, and observed the morphological changes of cardiomyocyte apoptosis using different concentrations of low-dose hydrogen peroxide. **Results:** After adding 0.125, 0.25 and 0.375 mmol/L of hydrogen peroxide in isolated cardiomyocyte, the intracellular calcium transient amplitude increased significantly in a dose-and time-dependent manner. The cardiomyocyte apoptotic morphology can be observed in the cultivated rat cardiomyocyte. **Conclusion:** Low dose of hydrogen peroxide increased the intracellular calcium transient amplitude significantly, and led to cardiomyocyte apoptosis.

Key words: Hydrogen peroxide; Cardiomyocyte; Calcium Transient; Apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; Q75; Q813; R54 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)32-6250-03

前言

细胞凋亡是一个极其复杂的过程,它是指生物体内细胞在特定的内源和外源信号诱导下,其死亡途径被激活,并在有关基因的调控下发生的程序性死亡过程^[1]。一些研究证实细胞凋亡过度与心肌缺血再灌注损伤、神经元退行性疾病等有关;细胞凋亡不足与肿瘤、自身免疫病等有关。心肌细胞凋亡是维持心脏组织形态相对稳定的不可缺少的细胞学基础,它与房颤、心力衰竭^[2]、缺血性心肌病、心肌梗死^[3]以及缺血/再灌注损伤^[4]等一系列心血管疾病均密切相关。许多研究表明活性氧(ROS)是心脏疾病时诱导心肌细胞凋亡的重要因素之一。过氧化氢(H₂O₂)是一种 ROS,也是体内氧化代谢的中间产物,它能破坏细胞器,如内质网、线粒体膜以及细胞膜,导致胞内钙离子(Ca²⁺)重新分布^[5]。Ca²⁺是介导细胞凋亡的第二信使,在细胞凋

亡过程中发挥重要作用,因此不难得出 H₂O₂ 通过影响胞内 Ca²⁺ 进而诱导细胞凋亡的设想。但对于 H₂O₂ 剂量与细胞凋亡之间定量关系仍值得进一步探讨。本研究通过对胞内钙离子荧光指示强度的测定及对心肌细胞形态的观察,探讨小剂量的过氧化氢对心肌细胞损伤的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 大鼠心肌细胞的分离 应用胎龄为 13-14 周,重量为 350 g 的 Wistar 大鼠,雌雄不限,全麻(1%戊巴比妥钠,浓度为 50 mg/kg,10 分钟起效)后 37℃ 恒温下行气管插管,人工呼吸,迅速开胸,暴露心脏,切断肺动脉放血,分离周围组织,露出升主动脉,逆向插管至冠状动脉口,结扎,切断主动脉,取出大鼠心脏,应用 langendorff 灌注装置逆行灌注心脏,首先应用无钙液

* 基金项目:2012 年辽宁省自然科学基金项目(201202291);2012 年辽宁省教育厅科研项目(L2012286)

作者简介:王昊(1986-),女,硕士研究生,主要研究方向:心血管病的基础及临床研究,电话:13130265088, E-mail: wn_nail1949@sina.com

△ 通讯作者:王丽娟(1963-),女,教授,硕士生导师, E-mail: wlj199810@163.com

(收稿日期:2014-04-23 接受日期:2014-05-20)

灌注 2 分钟,再经胶原酶 I(美国 Sigma 公司)消化约 15 分钟,至心脏变大变软变白,剪下心脏,剪去心房及右心室,并去除结缔组织,保留左心室,将左心室剪成小碎块,用 KB 液终止消化,用尼龙网过滤,去除细胞团块,1000 r/min 离心 3 分钟,去除细胞碎片,将获取的心肌细胞,取 400 μ L 上述液体平铺于 6 组直径为 1.5 厘米的培养皿中。

1.1.2 幼鼠心肌细胞的分离及培养 选择 1-2 天龄 S-D 乳鼠,雌雄不限,将乳鼠用 75% 的酒精进行消毒,取出心脏,放入 D-Hank's 液中,用滴管冲洗心脏,剥离心房及其主动脉,弃去 D-Hank's 液,用剪子将心脏剪成 1 mm³ 的组织块,放入约 2.5 毫升的 0.06% 的胰酶,用滴管吹打将其混匀,放入 37 $^{\circ}$ C 水浴箱中消化 8 分钟,取出后弃去上清液,加入约 2.5 毫升的 0.08% II 型胶原酶,放入 37 $^{\circ}$ C 水浴箱中消化 8 分钟,取出吸出上清液放入含有 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 中,重复该步骤 2 次,即共应用 II 型胶原酶消化 3 次,最后将含上清液的含有 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 放入离心机中,1000 r/min,离心 8 分钟,弃去上清,加入新鲜含有 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液,用滴管吹打使其成为细胞悬液,将悬液接种到 6 孔板中。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 60 分钟,采取差速贴壁法纯化心肌细胞,并用含有 10% 的胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养未贴壁生长的心肌细胞。

1.2 心肌细胞钙瞬变的测定

在上述分离的成鼠心肌细胞中加入 DMSO 液稀释至 25 μ mol/L 的 Fluo-3 40 μ L 染色,将培养皿置于 37 $^{\circ}$ C 水浴箱中,避光水浴 30 分钟后,加入无钙液 400 μ L 冲洗 2 次,去除多余染料;应用 FV300 激光扫描共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司)于镜下找到形态较好,染色程度最佳的细胞,用该显微镜实时监测心肌细胞荧光值变化,代表钙离子浓度变化。参数设置如下:激发波长(入 ex)488 nm,发射波长(入 em)520 nm。分别加入浓度为 5 mmol/L 过氧化氢 10 μ L,20 μ L,30 μ L,使过氧化氢终浓度为 0.125 mmol/L、0.25 mmol/L、0.375 mmol/L,使用 Time Course 程序对 XY 平面进行扫描,每个实验组扫描 60 张,每张间隔 10 秒,连续观察各实验组 500 秒内钙离子荧光强度(FI)的变化。

1.3 心肌细胞凋亡的形态检测

分离的幼鼠心肌细胞培养 48 小时后换液,将原培养基吸出后应用 D-Hank's 液冲洗 2 次,向 2 孔中加入 500 μ L 培养基继续培养。经过 48 小时后将其中一孔设为对照组,另一孔为实验组,向实验组加入浓度为 5 mmol/L H₂O₂ 25 μ L。再次将两组 6 孔板置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 3 小时后取出,向各孔中加入 500 μ L Hoechst33342 染色液,以充分覆盖住待染色的样品,再次置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 30 分钟。弃染色液,用 D-Hank's 液洗涤 2 次,然后行荧光检测。

1.4 统计学方法

将每 10 秒对应钙离子荧光值减去基线钙离子荧光值所得数据作为某时钙瞬变荧光强度,共取 50 个时间点,计算其平均值,表示为钙瞬变荧光强度值。应用 SPSS18.0 软件进行统计学处理,正态分布计量资料采用均值 $\pm$ 标准差表示,多个样本比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 低剂量 H₂O₂ 对心肌细胞内钙瞬变的作用

加入 0.125 mmol/L H₂O₂ 后,心肌细胞内钙瞬变荧光强度迅速升高,并于 100 秒达到平台期(如图 1),加入 0.25 mmol/L H₂O₂ 后,心肌细胞内钙瞬变荧光强度 400 秒内迅速升高,后趋于平台期(如图 2),加入 0.375 mmol/L H₂O₂ 后,心肌细胞内钙瞬变荧光强度 100 秒内迅速升高,后续 400 秒缓慢上升(如图 3)。由上述结果可见,不同浓度的小剂量 H₂O₂ 可引起心肌细胞内 Ca²⁺ 浓度呈时间依赖性升高。

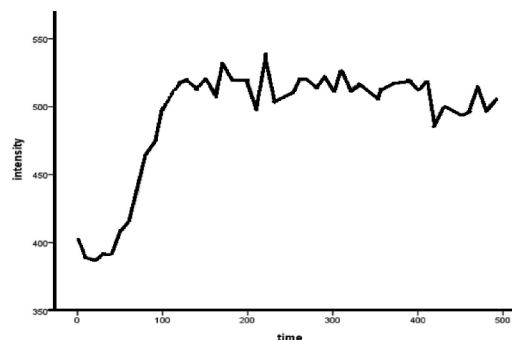


图 1 0.125 mmol/L H₂O₂ 导致心肌细胞内钙瞬变的变化

Fig. 1 Change of intracellular Ca²⁺ transient induced by 0.125 mmol/L of H₂O₂

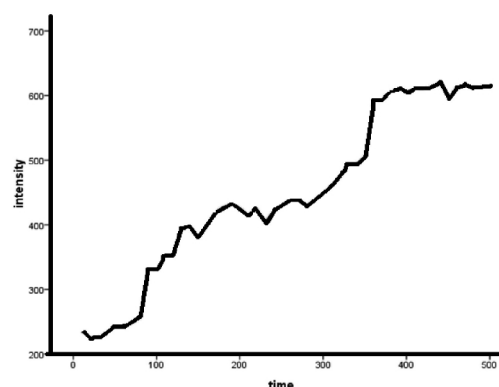


图 2 0.25 mmol/L H₂O₂ 导致心肌细胞内钙瞬变的变化

Fig. 2 Change of intracellular Ca²⁺ transient induced by 0.25 mmol/L of H₂O₂

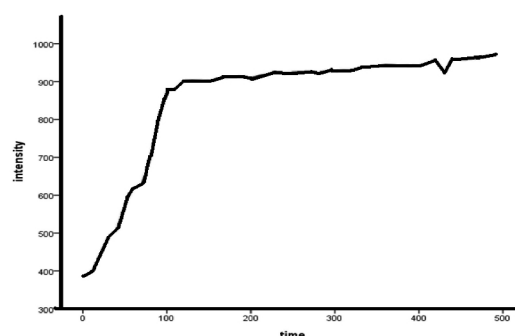


图 3 0.375 mmol/L H₂O₂ 导致心肌细胞内钙瞬变的变化

Fig. 2 Change of intracellular Ca²⁺ transient induced by 0.375 mmol/L of H₂O₂

2.2 不同浓度 H₂O₂ 作用于心肌细胞后钙瞬变的比较(表 1)

由表 1 可见:0.125 mmol/L、0.25 mmol/L、0.375 mmol/L H₂O₂ 均引起心肌细胞内 Ca²⁺ 瞬变增加,其中 0.375 mmol/L 所引起的 Ca²⁺ 瞬变增加幅度高于 0.125 mmol/L、0.25 mmol/L 所引起的 Ca²⁺ 瞬变增加幅度高于 0.125 mmol/L。

表 1 不同浓度小剂量 H_2O_2 作用于心肌细胞后钙瞬变的比较Table 1 Intracellular Ca^{2+} transient induced by different concentrations of H_2O_2

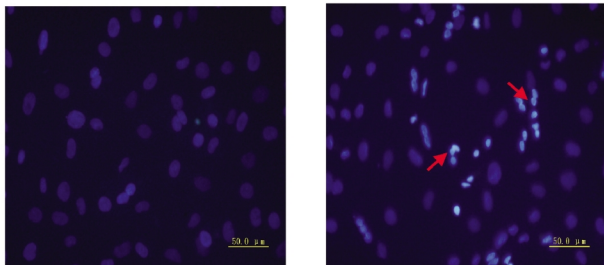
H_2O_2 concentrations(mmol/L)	Ca^{2+} transient
0.125	89.74± 42.199
0.25	213.05± 128.253*
0.375	468.46± 163.449* [△]

注: * $P<0.01$, 与 0.125 mmol/L H_2O_2 比较, [△] $P<0.01$, 与 0.25 mmol/L H_2O_2 比较。

Note: * $P<0.01$, compared with 0.125 mmol/L H_2O_2 ; [△] $P<0.01$ compared with 0.25 mmol/L H_2O_2 .

2.3 心肌细胞凋亡的形态变化

如图 4 所示,加入 0.25 mmol/L H_2O_2 后,可见幼鼠心肌细胞出现细胞体积缩小,呈圆形。细胞核凝聚、断裂,染色体分叶,存在凋亡小体。

图 4 小剂量 H_2O_2 引起的心肌细胞凋亡形态变化Fig. 4 Morphologic changes of cardiomyocyte apoptosis induced by low-does H_2O_2

3 讨论

活性氧(ROS)是体内一类氧的单电子还原产物,包括氧的超氧阴离子、过氧化氢、羟基自由基以及一氧化氮等^[6]。在心肌细胞活性氧的来源可能是线粒体电子传递链,一氧化氮合酶(NOS),NADPH 氧化酶,黄嘌呤氧化酶和脂氧合酶/环氧和各种物质的氧化,特别是儿茶酚胺^[7]。已有许多研究表明 ROS 是心脏疾病时诱导心肌细胞凋亡的重要因素之一^[8]。通常在生物体内存在的抗氧化系统,能够清除部分 ROS,维持代谢平衡。在一些损伤因素的作用下,体内抵制 ROS 的保护机制发生变化,诱导大量的自由基堆积,产生氧化和抗氧化的不平衡——氧化应激。氧化应激反应可以导致细胞内 Ca^{2+} 稳态失调,从而诱导细胞损伤。依据来源的不同可以将 ROS 分为内源性 ROS 和外源性 ROS。许多类型的刺激能够造成内源性 ROS 的产生,介导细胞凋亡;外源性 ROS 作用于细胞也可诱导细胞凋亡^[9]。

本实验中的小剂量 H_2O_2 是一种少量外源性 ROS,它可作为信号,诱导线粒体通透性转变孔(MPTP)开放,促进线粒体 Ca^{2+} 内流,同时促进自身线粒体及其他线粒体产生 ROS——氧化应激。氧化应激通过影响电压依赖性钙离子通道使非特异性细胞膜钙离子通透性变化和 Na^+ / Ca^{2+} 交换等,并影响 Ca^{2+} 从内质网释放^[10],从而破坏内质网内 Ca^{2+} 的稳态,导致内质网超负荷反应。该反应以激活核转录因子 $NF_2\kappa B$ 为主要特点,启动多种前炎性蛋白和细胞粘附分子的转录表达,对凋亡进行调

控。由此可推断诱导心肌细胞凋亡的过程为外源性 ROS 可使心肌细胞抗氧化防御系统受损而导致内源性 ROS 生成增加,产生氧化应激,导致细胞内钙离子重新分布,从而进一步诱导心肌细胞凋亡^[11]。

本研究结果证实小剂量 H_2O_2 能明显增加心肌细胞的钙离子浓度,且呈时间及剂量依赖性,而且它可以诱导心肌细胞凋亡,因此,本实验为研究外源性 ROS 诱导细胞凋亡的途径提供了佐证。有研究报道大剂量 H_2O_2 能引起心肌细胞死亡^[12]。

由于认识到氧化应激-心肌细胞凋亡-心脏疾病之间有着密切的联系,抗氧化治疗将有望成为治疗心血管疾病的一种潜在治疗药物^[13]。近年已有各种合成抗氧化剂被证实能够抑制心肌梗死、主动脉缩窄或快速心房起搏老鼠心脏重塑^[14]。但由于到目前为止,对于氧化应激介导的心肌细胞凋亡的分子机制的研究尚无定论,抗氧化治疗还有许多问题需要进一步明确。

Ca^{2+} 可作为许多细胞凋亡的信号载体,对细胞的生存与凋亡有着重要的作用。近年研究揭示出凋亡是由十分复杂的信号传导通路所调控的,目前已知有三个主要的信号传导通路:线粒体通路,死亡受体通路和内质网通路^[15-18]。由于 Ca^{2+} 通过肌浆/内质网钙离子 ATP 酶(SERCA)从胞浆中摄入,通过肌醇-1,4,5-三磷酸受体(InsP3R)/钙离子通道或 RyR/钙离子通道释放^[19],可见这些信号转导通路都与 Ca^{2+} 有密切关系。因此,降低细胞内 Ca^{2+} ,对保护心肌细胞免于损伤起着非常重要的作用^[20],临床上应用钙拮抗剂可明显抑制氧化应激参与的心血管疾病。但是,关于 Ca^{2+} 如何激活凋亡调节因子的分子机制的研究目前刚刚起步,随着我们下一步研究的进展,我们会更清楚地认识 Ca^{2+} 在细胞凋亡过程中的确切作用。

参考文献(References)

- [1] Reeve V, Janice L, Duffy Angela M, O, Brien Timothy, et al. Don't lose heart-therapeutic value of apoptosis prevention in the treatment of cardiovascular disease [J]. Cell Mol Med, 2005, 9(3):609-622
- [2] Olivetti G, Abbi R, Quaini F. Apoptosis in the failing human heart [J]. NEngl J Med, 1997, 336:1131-1134
- [3] 徐俊,马强,段海峰,等.应激对大鼠心室肌细胞 L-型钙离子通道的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2003, 19(3):216-219
Xu Jun, Ma Qiang, Duan Hai-feng, et al. Effect of stress on L-type calcium channels in rat ventricular myocytes [J]. Chinese Journal of Applied Physiology, 2003, 19(3):216-219
- [4] Toth Ambrus, Nickson Philip, Mandl Adel, et al. Endoplasmic Reticulum Stress as a Novel Therapeutic Target in Heart Diseases [J]. Cardiovascular & Haematological Disorders-Drug Targets, 2007, 7: 205-218
- [5] 唐海林,苏琦.钙离子信号与细胞凋亡关系的研究进展[J]. 南华大学学报医学版,2006,34(5):663-666
Tang Hai-lin, Su Qi. Progress in research on the relationship between calcium signaling and apoptosis [J]. Journal of Nanhua University Medical Edition, 2006, 34(5):663-666
- [6] 吴强,陈吉.氧化应激与心肌细胞凋亡[J].中国心血管病研究杂志, 2004,2(7):570-572
Wu Qiang, Chen Ji. Oxidative stress and apoptosis of myocardial cells [J]. Chinese Journal of Cardiovascular Review, 2004, 2(7):570-572
- [7] Misra Mithilesh K, Sarwat Maryam, Bhakuni Pushpa Tuteja, et al. Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes [J]. Med Sci Monit, 2009,15(10): RA209-219

- [8] Bordeira-Carriço R, Ferreira D, Mateus DD, et al. Rescue of wild-type E-cadherin expression from nonsense-mutated cancer cells by a suppressor-tRNA[J]. *Eur J Hum Genet*, 2014,15(1):132-136
- [9] Berx G, Cleton-Jansen AM, Strumane K, et al. E-cadherin is inactivated in a majority of invasive human lobular breast cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain [J]. *Oncogene*, 1996,13(9): 1919-1925
- [10] De Leeuw WJ, Berx G, Vos CB, et al. Simultaneous loss of E-cadherin and catenins in invasive lobular breast cancer and lobular carcinoma in situ[J]. *J Pathol*, 1997, 183(4): 404-411
- [11] Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, et al. E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas[J]. *Cancer Res*, 1994, 54(14): 3845-3852
- [12] Cavallaro U, Christofori G. Christofori. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(2): 118-132
- [13] Semb H, Christofori G. The tumor-suppressor function of E-cadherin [J]. *Am. J. Hum. Genet*, 1998, 63(6): 1588-1593
- [14] Wong AS, Gumbiner BM. Adhesion-independent mechanism for suppression of tumor cell invasion by E-cadherin [J]. *J. Cell Biol*, 2003, 161 (6): 1191-1203
- [15] Milne ANI, Carneiro F, O'Morain C, et al. Nature meets nurture: molecular genetics of gastric cancer [J]. *Hum Genet*, 2009, 126(5): 615-628
- [16] Blair V, Martin I, Shaw D, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: diagnosis and management [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2006, 4 (3): 262-275
- [17] Chu CM, Chen CJ, Chan DC, et al. CDH1 polymorphisms and haplotypes in sporadic diffuse and intestinal gastric cancer: a case-control study based on direct sequencing analysis [J]. *World J Surg Oncol*, 2014,12:80
- [18] Zhang J, Zhan Z, Wu J, et al. Association among lifestyle, clinical examination, polymorphisms in CDH1 gene and Traditional Chinese Medicine syndrome differentiation of gastric cancer [J]. *J Tradit Chin Med*, 2013,33(5):572-579
- [19] Huntsman DG, Carneiro F, Lewis FR, et al. Early gastric cancer in young, asymptomatic carriers of germ-line E-cadherin mutations[J]. *N Engl J Med*, 2001, 344(25): 1904-1909
- [20] Humar B, P Guilford. Hereditary diffuse gastric cancer: a manifestation of lost cell polarity [J]. *Cancer Sci*, 2009, 100 (7): 1151-1157
- [21] Humar B, Guilford P. E-cadherin deficiency initiates gastric signet-ring cell carcinoma in mice and man [J]. *Cancer Res*, 2009, 69 (5): 2050-2056
- [22] Machado JC, Oliveira C, Carvalho R, et al. E-cadherin gene (CDH1) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma[J]. *Oncogene*, 2001, 20(12): 1525-1528
- [23] Yu XW, Xu Q, Xu Y, et al. Expression of the E-cadherin/ β -catenin/tcf-4 pathway in gastric diseases with relation to Helicobacter pylori infection: clinical and pathological implications[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014,15(1):215-220
- [24] Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009,9(4): 265-273
- [25] Tsalikidis C, Papachristou F, Pitiakoudis M, et al. Soluble E-cadherin as a diagnostic and prognostic marker in gastric carcinoma [J]. *Folia Med (Plovdiv)*, 2013,55(3-4):26-32

(上接第 6252 页)

- [8] Ferrari G, Agnoletti L, Comini L, et al. Oxidative stress during myocardial ischemia and heart failure [J]. *Eur Heart J*, 1998,19(suppl B):B2-B11
- [9] Forrest VJ, Kang YH, McClain DE, et al. Oxidative stress-induced apoptosis prevented by trolox [J]. *Free Radic Biol Med*, 1994, 16: 675-684
- [10] 东方,高世勇,季宇彬. Ca^{2+} 介导的细胞凋亡通路研究进展[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2008,29(13):1602-1604
Dong Fang, Gao Shi-yong, Ji Yu-bin. Progress of research on Ca^{2+} mediated apoptosis pathway [J]. *Journal of Qiqihar Medical College*, 2008,29(13):1602-1604
- [11] Peng TI, Jve MJ. Mitochondrial swelling and generative of reactive oxygen species induced by photoirradiation are heterogeneously distributed [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2004, 1011:112-122
- [12] Lennons V, Martins J, Cottert G. Dose-dependend induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stiiumuli [J]. *Cell Prolif*, 1991, 24:203-214
- [13] 徐长庆,张伟华. 心血管系统钙敏感受体的研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2010,26(2):409-413
Xu Chang-qing, Zhang Wei-hua. Investigation progress of CaSR in cardiovascular system [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2010, 26(2):409-413
- [14] McCarty Mark F. Practical prevention of cardiac remodeling and atrial fibrillation with full-spectrum antioxidant therapy and ancillary strategies [J]. *Med Hypotheses*, 2010,75(2): 141-147
- [15] Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling [J]. *Annual Review of Biochenisly*, 2000, 69:217-245
- [16] Wang X. The expanding role of mitochondfia in apoptosis [J]. *Genes Dev*, 2001,15(22):2922-2933
- [17] Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors:signaling and modulation [J]. *Science*, 1998, 281(5381):1305-1308
- [18] Nakamura K, Bossy-Wetzel E, Burns K, et al. Michalak M Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis [J]. *Cell Biol*, 2000, 150(4):731-740
- [19] Ferri FK, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways [J]. *Nat Cell Bid*, 2001,31(11):255-263
- [20] 冯全洲,李天德,王兆霞,等. 钙离子拮抗剂对大鼠心肌梗死后心肌细胞凋亡的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2004,16(3):133-136
Feng Quan-zhou, Li Tian-de, Wang Zhao-xiao, et al. Effects of Ca^{2+} antagonist on cardiomyocytic apoptosis after experimental myocardial infarction [J]. *Chin Crit Care Med*, 2004,16(3):133-136