

硫丹致生精细胞凋亡及其机制研究

任南琪¹, 张晓丹^{1,2}, 周广红², 陈少军²

(1. 哈尔滨工业大学市政环境工程学院, 哈尔滨 150090; 2. 哈尔滨商业大学药学院, 哈尔滨 150076)

摘要: 即将列入持久性有机污染物(persistent organic pollutants, POPs)的硫丹对生物体的影响已经成为国际关注的焦点. 为探讨硫丹对生精细胞凋亡影响及机制, 以 7.0、3.5 和 1.75 mg/kg 剂量灌胃, 连续染毒小鼠 28 d. 采用激光共聚焦扫描显微镜观察到染毒组小鼠凋亡的生精细胞形态学特征, 二苯胺法测定到各染毒组 DNA 降解率显著升高($p < 0.01$). 利用 Fluo-3 能特异性地与细胞内钙离子结合并激发产生激光的特性, 采用激光共聚焦扫描显微镜观察到染毒后小鼠生精细胞内游离钙离子浓度升高($p < 0.01$). 紫外分光光度法检测到生精细胞 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATPase}$ 及 $\text{Ca}^{2+} \text{Mg}^{2+} \text{-ATPase}$ 活力显著下降($p < 0.01$), 结果硫丹可诱导睾丸生精细胞凋亡, 说明硫丹可抑制 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATPase}$ 及 $\text{Ca}^{2+} \text{Mg}^{2+} \text{-ATPase}$ 活力, 使细胞膜主动转运 Ca^{2+} 的功能受限, 细胞的排钙能力降低, 导致细胞内 Ca^{2+} 浓度持续升高, 即细胞钙超载, 继发细胞钙稳态失衡.

关键词: 硫丹; 生精细胞; 凋亡; 机制

中图分类号: X131; X174 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)02-0386-05

Induced Apoptosis and Mechanism of Endosulfan in Mouse Germ Cells

REN Nan-qi¹, ZHANG Xiao-dan^{1,2}, ZHOU Guang-hong², CHEN Shao-jun²

(1. College of Civil Environmental Engineering, Harbin University of Technology, Harbin 150090, China; 2. School of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract: Endosulfan which is going to be included as POPs in effect of organism have become the focus of international concern. To explore endosulfan on apoptosis of spermatogenic cells and mechanisms, doses of 7.0, 3.5 and 1.75 mg/kg oral administration to mice exposed to 28 consecutive days. Morphology characters of spermatogenic cells observed by laser confocal scanning microscope (LCSM), DNA ladder detected by electricity swims, and increasing of DNA degeneration rate measured through diphenylamine($p < 0.01$). Endosulfan might enhance calcium concentration in the spermatogenic cells and restrained $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+} \text{Mg}^{2+} \text{-ATPase}$ activities that showed endosulfan might induce spermatogenic cells in the testicle to occur apoptosis($p < 0.01$), to cause the function of transporting Ca^{2+} to be limited, reduce the ability of excluding calcium and send Ca^{2+} concentration to hoist sustainingly, i. e. calcium overload in the cells.

Key words: endosulfan; spermatogenic cell; apoptosis; mechanism

目前,少数有机氯农药仍在世界各地广泛使用,其中有硫丹、林丹、甲氧滴滴涕、三氯杀螨醇等 4 种仍在包括美国在内的发达国家登记,主要用于食用农作物.因此,它们的安全性问题自然引起人们的特别关注^[1,2].硫丹(endosulfan)目前已经被国际认同将列入 POPs,是德国 Farbwerk Hoechst 公司 1954 年首先研制开发的,由于其杀虫谱广、效果好,不但目前仍被允许生产与使用,而且随着其他有机氯农药的禁用,硫丹的用量还有增加的趋势.估计目前世界年产量按原料计在 1 万 t 以上,其中我国年产量约 1 500 ~ 2 000 t.据在世界各地的调查结果显示,硫丹在全球已有广泛分布,包括我国的东南沿海地区,而且是所检测的 22 种有机氯化合物中残留浓度最高的 2 种之一^[3].有机氯农药的化学结构多为氯代多环芳烃(PAH),研究认为 PAH 具有拟雌激素样作用,可以影响下丘脑-垂体-睾丸性腺轴的正常调节作用,从而造成雄性生殖系统的发育和功能障碍^[4~7].

近年的研究表明,硫丹具有雌激素作用,是一种环境内分泌干扰物^[8,9],大鼠长期大剂量接触硫丹能引起精子生成减少和 DNA 氧化损伤^[10].Singh 等^[11]报道,雄性大鼠急性或亚慢性接触硫丹都可出现生殖毒性,表现为血清促性腺激素水平,血清和睾丸内睾酮水平降低,睾丸组织内某些酶的活性改变等.

硫丹生殖毒性的机制国内外研究尚无定论.本实验在上述研究基础上进一步分析硫丹对生精细胞凋亡的影响及其机制,以期深入探讨硫丹的生殖毒性机制和筛选硫丹暴露者早期生殖健康监护指标提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

收稿日期: 2007-08-09; 修订日期: 2007-09-24

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(50638020)

作者简介: 任南琪(1959~),男,教授,博士生导师,主要研究方向为环境微生物学、分子生态学、废水生物处理等领域, E-mail: mq@hit.edu.cn

硫丹(江苏快达农业有限公司生产),纯度为 95%;胰蛋白酶(Sigma 公司),激光共聚焦扫描显微镜 SP-2 型(德国 Leica 公司);Motic 北航医学图像采集系统;荧光探针 Fluo-3/AM(美国 Biotium 公司);酶标仪(F039300,日本岛津公司);紫外可见分光光度(UV2102C 计,上海 UNICO);昆明种小鼠购于哈尔滨医科大学实验动物中心。

1.2 动物分组及染毒

选用性成熟清洁级健康雄性昆明种小鼠 40 只,体重(20 ± 2)g。随机分为 4 组,每组 10 只,分别为硫丹高、中、低剂量染毒组及对照组。硫丹经口染毒,高、中、低剂量组剂量分别为 7.0、3.5 和 1.75 mg/kg,灌胃量为 0.1 mg/10 g 体重,对照组给予相同体积的花生油^[12]。给药期间每 3 d 称重 1 次,根据体重调整给药量。连续染毒 28 d,于第 29 d 颈椎脱臼处死。

1.3 单细胞悬液的制备及载玻片处理

(1)单细胞悬液的制备 将各染毒组小鼠的睾丸取出以适量的生理盐水洗涤后,在消毒碟皿中将组织剪切成碎块。移入 2 mL 含 0.25% 胰蛋白酶的磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer solution, PBS)中,在 37℃ 水浴中消化 15 min,每隔 5 min 摇荡 1 次。将消化的组织离心 1 000 r/min 10 min,吸去上清液,以 PBS 液漂洗 2~3 min,再离心,去上清,重复 3 次以尽量洗去胰蛋白酶。用 200 目不锈钢网过滤,去除未消化分离的碎组织块、纤维等。再以 PBS 液漂洗,收集细胞悬液^[13]。并将细胞含量调整在 106 个/mL,用 0.3% 台盼蓝染色检测细胞活性(100 个细胞中不被染色的细胞数),当细胞存活率 > 90% 以上方可用于细胞形态学观察和细胞内游离钙离子的检测。

(2)载玻片处理 将超薄载玻片浸入浓度为 0.01% 的多聚赖氨酸的稀溶液中浸泡 5 min。取出后用 25℃ 的烤箱缓慢烤干,待用。盖玻片用酒精处理,消除它对荧光的吸收作用。

1.4 染毒小鼠生精细胞形态学观察

取细胞悬液中上部 2~3 滴,滴于涂有明胶的载玻片上。取 1% 丫啶橙滴于载玻片上,终浓度 1:10 000,37℃ 孵育 15 min, PBS 冲洗 2~3 次,洗去多余的染料。激光共聚焦扫描显微镜观察,扫描^[14]。

1.5 细胞凋亡百分率

不同剂量组连续染毒 28 d,于第 29 d 处死小鼠,取睾丸组织制成单细胞悬液。将样品细胞(细胞数 $> 10^7$)离心 1 000 r/min 10 min,用 PBS 洗涤 3 次;离心所得沉淀于 37℃ 用 0.5 mL 低渗缓冲液处理 1.5 h 以溶胀细胞膜;离心(15 000 r/min)15 min,上清

液中即含有已降解 DNA(以 S1 表示);离心所得沉淀加入高渗缓冲液 50 μ L,于室温放置 30 min。离心 15 000 r/min 10 min,上清液中含有从核内渗出的降解 DNA(以 S2 表示)。沉淀以 PP 表示;合并 S1 和 S2 为 S,加入等体积 12.5% 三氯醋酸,离心 15 000 r/min 10 min,弃上清,收集沉淀以 SP 表示;SP 和 PP 用 12.5% 三氯醋酸洗涤 3 次后,分别加入 100 μ L 12.5% 三氯醋酸,95℃ 加热 15 min;在各样品中加入 100 μ L 4% 二苯胺溶液,95℃ 加热 10 min,离心 15 000 r/min 10 min^[15];分别取上清液 100 μ L 于酶标仪上读取 620 吸光度值,按下面公式计算 DNA 降解百分率:

$$\text{DNA 降解率} = \frac{\text{SP}_{A_{620}}}{(\text{SP}_{A_{620}} + \text{PP}_{A_{620}})} \times 100\%$$

1.6 硫丹对小鼠生精细胞内游离钙离子浓度的影响

吸取细胞悬液滴于印孔载玻片上,每孔加入稀释 Fluo-3/Am 20 μ L,37℃ 避光孵育 60 min。荷载的小鼠生精细胞在激光共聚焦显微镜下扫描细胞内荧光强度。激发波长 488 nm,发射波长 520 nm。计算细胞内平均荧光强度,以此来衡量细胞内游离钙的水平,荧光强度越大,表示细胞内游离钙浓度越高,反之则浓度越低^[16]。

1.7 硫丹对小鼠睾丸生精细胞内 ATP 酶的影响

ATP 酶可分解 ATP 生成 ADP 及无机磷,测定无机磷的量可判断 ATP 酶活力的高低。于第 29 d 处死小鼠,取出睾丸组织,准确称量组织重量,按重量体积比加 9 倍生理盐水制成 10% 的匀浆,1 000 r/min 离心 10 min,取上清 0.2 mL 加 0.8 mL 生理盐水稀释成 2% 的匀浆,按 ATP 酶测试盒的说明在紫外分光光度仪上进行操作。同时用考马斯亮兰试剂测定 2% 组织匀浆蛋白含量。组织中 ATPase 活力 [$\mu\text{mol} \cdot (\text{mg} \cdot \text{h})^{-1}$] = (测定管 D 值 - 对照管 D 值) / 标准管 D 值 $\times$ 标准管浓度 (0.5 $\mu\text{mol/mL}$) $\times$ 反应体系中样本稀释倍数 (2.5) $\times$ 6 / 匀浆蛋白浓度 (mg/mL)。

1.8 统计学处理

数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,使用 SPSS9.0 统计软件进行处理,采用成组设计资料的 *t* 检验。

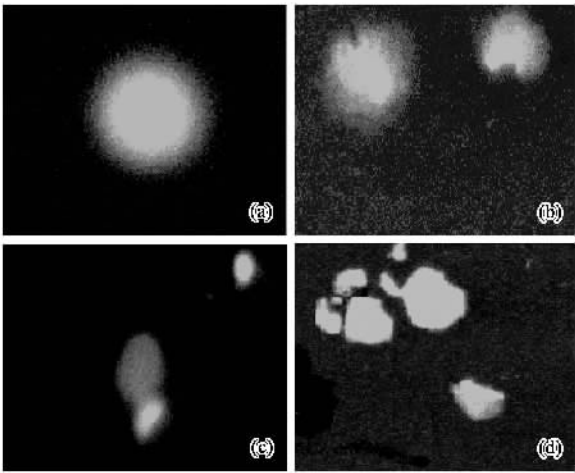
2 结果与分析

2.1 染毒小鼠睾丸生精细胞形态学观察

近年来生物学家逐渐认识到细胞凋亡的特殊生物学意义和功能,由此形成了新的研究热点。细胞凋亡的形态学特征与细胞坏死有着明显的区别^[17]。

激光共聚焦扫描显微镜观察:正常组细胞核呈

亮黄色或绿色均匀荧光,细胞核无缺损或破坏.染毒组凋亡细胞胞体皱缩变形,染色质凝集,在核膜下形成新月形;核固缩,边缘化,连同胞浆突向细胞表面;细胞核碎裂,形成游离的凋亡小体(见图 1).且随硫丹染毒剂量的增加,细胞凋亡程度加重,凋亡细胞数逐渐增多.



正常细胞核呈绿色荧光,无核形态变化(a)即阴性对照组;凋亡细胞胞体皱缩变形,在核膜下形成新月形(b)即 1.75 mg/kg 组;核固缩、边缘化(c)即 3.5mg/kg 组;核碎裂及凋亡小体形成(d)即 7.0 mg/kg 组

图 1 激光共聚焦显微镜下生精细胞

Fig.1 Descent sperm cells in Confocal laser scanning microscopy

2.2 细胞凋亡百分含量

实验结果如表 1 所示, DNA 片断化百分含量随染毒剂量的增加而升高且硫丹 3.5 mg/kg 染毒组 DNA 片断化百分含量与阴性对照组相比有显著差异($p < 0.05$),而 7.0 mg/kg 染毒组与阴性对照组相比有非常显著差异($p < 0.01$).

表 1 硫丹对小鼠睾丸生精细胞 DNA 含量的影响¹⁾

Table 1 Effects of endosulfan on DNA content of spermatogenic cells in miousse testis($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	凋亡百分含量/%
硫丹 7.0 mg/kg	10	47.02 ± 4.02 * *
硫丹 3.5 mg/kg	10	40.40 ± 6.68 *
硫丹 1.75 mg/kg	10	37.91 ± 7.23
对照组	10	33.58 ± 5.57

1) * 表示 $p < 0.05$ 与对照组比较, * * 表示 $p < 0.01$ 与对照组比较,下同

2.3 硫丹对小鼠睾丸生精细胞内游离钙离子浓度的影响

细胞凋亡是一种程序性细胞死亡形式,它与生物的生长发育和疾病发生等生理和病理过程密切相关. Ca^{2+} 是哺乳动物细胞最重要的信号因子,有调控细胞多种生理功能的作用,包括调节细胞生长、发育及死亡.近来,在细胞凋亡研究中发现有 Ca^{2+} 稳态失调的发生.早期的工作显示许多凋亡模型中内源性核酸内切酶的激活为 Ca^{2+} 依赖性,此后大量的研究发现胞内 Ca^{2+} 稳态失调是细胞凋亡中一个保守的生化事件,提示 Ca^{2+} 参与了凋亡中的信号转导^[18].

由图 2 可见,在 488 nm 氩激光激发下,与细胞内 Ca^{2+} 结合的 Fluo-3 发出绿色荧光,呈点状散布于胞浆、胞核中.随着硫丹染毒剂量的升高, Ca^{2+} 荧光强度逐渐升高,以胞核更为明显.对数据处理分析后可知:1.75 mg/kg 组与 3.5 mg/kg 组的荧光强度明显高于阴性对照组,差异有显著性($p < 0.05$),而 7.0 mg/kg 组与阴性对照组比,差异非常显著($p < 0.01$),见表 2.

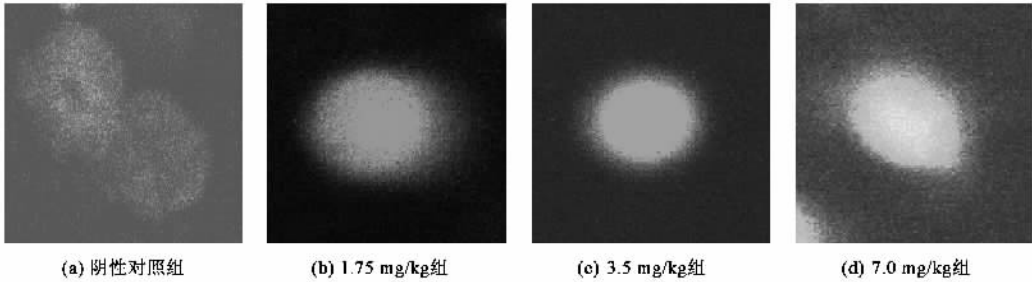


图 2 Fluo-3/AM 探针激光共聚焦显微镜检测细胞内游离钙离子浓度

Fig.2 Fluo-3/AM Probe Confocal laser scanning microscopy detection of intracellular free calcium concentration

2.4 硫丹对小鼠睾丸生精细胞内 ATP 酶的影响

该实验结果表明(见表 3),3 个染毒剂量组的

$Na^{+} K^{+}$ -ATPase 及 $Ca^{2+} Mg^{2+}$ -ATPase 活力与对照组相比均非常显著地降低($p < 0.01$).说明硫丹可能是

表 2 硫丹对小鼠睾丸生精细胞内游离钙离子浓度的影响

Table 2 Effect of endosulfan on [Ca²⁺]i of spermatogenic cells in mouse testis($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	细胞内荧光强度
硫丹 7.0 mg/kg	10	180.94 ± 19.74 * *
硫丹 3.5 mg/kg	10	162.74 ± 21.73 *
硫丹 1.75 mg/kg	10	159.09 ± 13.82 *
对照组	10	143.00 ± 8.72

表 3 硫丹对小鼠睾丸生精细胞内 ATP 酶的影响¹⁾/μmol·(mg·h)⁻¹

Table 3 Effects of endosulfan on ATPase activities of spermatogenic cells in mouse testis($\bar{x} \pm s$)/μmol·(mg·h)⁻¹

组别	例数	Na ⁺ K ⁺ -ATP 酶	Ca ²⁺ Mg ²⁺ -ATP 酶
硫丹 7.0 mg/kg	10	4.37 ± 0.46 *	4.96 ± 0.65 *
硫丹 3.5 mg/kg	10	4.51 ± 0.69 *	5.17 ± 0.66 *
硫丹 1.75 mg/kg	10	5.72 ± 0.52 *	5.55 ± 0.50 *
对照组	10	10.48 ± 0.80	9.75 ± 0.85

1) * 表示 $p < 0.01$ 与对照组比较

由于抑制 Na⁺ K⁺ -ATPase 及 Ca²⁺ Mg²⁺ -ATPase 活力,使细胞膜主动转运 Ca²⁺ 的功能受限,细胞的排钙能力降低,导致细胞内 Ca²⁺ 浓度持续升高,即细胞钙超载,继发细胞钙稳态失衡,而致细胞凋亡。

3 讨论

细胞凋亡是一种特殊形式的细胞死亡,具有典型的形态学和生化学特征.细胞核形态变化的主要特征表现为:早期细胞核浓缩,细胞浆中细胞器密集,细胞体积缩小;中期胞膜出现突起小泡,部分胞膜内陷将细胞分割为有胞膜包裹的凋亡小体;晚期周围的巨噬细胞吞噬凋亡小体.激光共聚焦扫描显微镜因可对活细胞清晰成像,灵敏度高,使其在对细胞凋亡的形态学观察中备受重视.本实验对睾丸单细胞悬液进行丫啶橙染色,通过激光共聚焦扫描显微镜扫描成像图 1 可见细胞核染色质浓缩,核碎裂成块状凋亡小体形成等典型的凋亡特征,表明硫丹可致生精细胞凋亡。

DNA 片段化^[19]是凋亡细胞的显著特征之一,因而通过 DNA 变化检测凋亡是重要的方法.凋亡细胞的 DNA 断裂发生在质膜溶解之前,坏死细胞的 DNA 断裂发生在质膜溶解之后,提取具有完整质膜的细胞 DNA 片段进行定量代表细胞凋亡的程度.本实验采用二苯胺法测定睾丸生精细胞凋亡百分含量,其原理是利用 DNA 中的脱氧核糖在酸性条件下生成 ω-羟基-γ 酮基戊醛,后者与二苯胺生成蓝色物质,在可见光区 595nm 波长处有最大吸收,从而通过比色

定量脱氧核糖来测定 DNA 含量.表 1 中二苯胺法测定 DNA 降解率的实验结果显示,硫丹可增加 DNA 的片断化,说明硫丹可促进睾丸生精细胞凋亡的发生,造成生精功能受损。

研究表明,细胞质钙离子浓度的改变调节多种细胞活动,细胞对游离钙水平升高的反应,取决于钙信号持续的时间及强度,高浓度长时间的游离钙水平升高会促使细胞凋亡^[20].细胞内游离钙水平的升高,主要来自于细胞外钙离子的内流及细胞内钙储存库的释放,细胞内的钙储存库主要是内质网.在一些刺激作用下,内质网将其储存的钙离子释放,然后线粒体摄取钙离子,线粒体钙超载导致线粒体损伤,细胞色素 c 释放,活化天冬氨酸(caspase),诱导凋亡^[21~24].本研究采用 Ca²⁺ 荧光指示剂 Fluo-3,利用激光共聚焦扫描技术来观察胞内 Ca²⁺ 的变化. Fluo-3/AM 是第 3 代的敏感性钙指示剂,能进入细胞与钙特异性的结合,并在一定波长激发光激发后产生荧光,它和 Ca²⁺ 结合后荧光强度增强 40 倍,且与 Ca²⁺ 结合后其荧光光谱发生变化, Fluo-3/AM 的荧光强度与 Ca²⁺ 浓度呈正比,因而灵敏地反映细胞内 Ca²⁺ 的浓度变化.图 2 结果显示随着硫丹染毒剂量的升高,Ca²⁺ 荧光强度逐渐加强,提示硫丹可增加细胞内的钙离子浓度,致胞内钙离子稳态失衡,而诱导凋亡。

细胞内钙稳态是一个极为复杂的生理过程,Ca²⁺ Mg²⁺ -ATPase 以及 Na⁺ K⁺ -ATPase 作为细胞质膜上一类重要的酶,对于调节细胞内游离 Ca²⁺ 水平,维持细胞内钙稳态具有重要的作用.有研究表明^[25],Ca²⁺ Mg²⁺ -ATPase 的抑制,可直接抑制胞浆内游离 Ca²⁺ 移出胞外和移入细胞器,使胞浆内 Ca²⁺ 浓度升高,而 Na⁺ K⁺ -ATPase 活性的抑制,可使细胞内外 Na⁺、K⁺ 不均匀分布状况被打乱,导致 Na⁺ /Ca²⁺ 交换发生障碍.因此,睾丸 ATPase 活性的抑制有可能打破睾丸细胞内游离 Ca²⁺ 水平的动态平衡,破坏了细胞质膜对钙的隔离和调节作用.而 ATPase 被抑制所致胞浆内游离 Ca²⁺ 浓度升高可作为激活剂激活了磷酸化酶-a,使其活性升高,从而进一步扰乱细胞内外的钙平衡,最终将可能导致睾丸细胞钙稳态的失调,从而诱导生精细胞凋亡.表 3 表明,硫丹可显著地抑制小鼠睾丸 Ca²⁺ Mg²⁺ -ATPase 和 Na⁺ K⁺ -ATPase 的活性.这可能是硫丹钙稳态失衡的重要机制.硫丹诱导生精细胞凋亡的时间规律及对睾丸支持细胞有何影响尚待进一步研究。

4 结 论

硫丹对小鼠具有诱导生精细胞凋亡作用;硫丹诱导生精细胞凋亡作用呈剂量依赖性;硫丹诱导细胞凋亡的机制可能与抑制 Ca^{2+} Mg^{2+} -ATPase 和 Na^{+} K^{+} -ATPase 的活性而增加细胞内的钙离子浓度,致胞内钙离子稳态失衡有关.

参考文献:

[1] 詹宁宁. 农药杀虫剂的雄性生殖毒理学研究进展[J]. 国外医学卫生学分册, 2000, **27**(2): 92-95.

[2] Samanta L, Roy A, Chainy G B, *et al.* Changes in rat testicular antioxidant defence profileasa function of age and its impairment by hexachlonocyclihexane during critical stages of maturation [J]. Andrologia, 1999, **31**(2): 83-90.

[3] Simonich S L, Hites R A. Global distribution of persistent organochlorine compounds[J]. Science, 1995, **269**: 1851-1854.

[4] 华小梅,江希流. 我国农药的生产及对环境的影响[J]. 精细与专用化学品, 2000, (2): 10-12.

[5] 刘长令. 杀虫剂及杀螨剂的研究进展[J]. 农药科学与管理, 1998, (2): 28-31.

[6] Romieu I, Hernarde-Avila M, Lazcano P E, *et al.* Breast cancer, lactation history, and serum organochlorines [J]. Am J Epidmiol, 2000, **152**(4): 363-370.

[7] Daston G P. Environmental estrogens and reproductive health: A discussion of the human and environmental data Reproductive [J]. Toxicology, 1997, **11**(4): 465-481.

[8] Bisson M, Hontela A. Cytotoxic and endocrine-disrupting potential of atrazine, diazinon, endosulfan, and mancozeb in adrenocortical steroidogenic cells of rainbow trout exposed in vitro[J]. Toxicol ApplPharmacology, 2002, **180**: 110-117.

[9] Sinha N, Adhikari N, Saxena D K. Effect of endosilfan during detal gonadal differentiation on spermatogenesis in rats[J]. Environmental Toxicology Pharmacology, 2002, **10**: 29-32.

[10] 朱心强,郑一凡,张群卫,等. 硫丹对成年大鼠生精功能的影响和氧化损伤[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2002, **16**(5): 391-395.

[11] Singh S K, Narayan R, Shanker R, *et al.* Endosulfan induced biochemical changes in the testis of rats[J]. Vet Hum Toxicol, 1995, **37**(6): 547-549.

[12] 裴炯良,常艳,朱心强. 用多终点体内试验法研究硫丹的雌激素活性[J]. 癌变·畸变·突变, 1999, **11**: 252-255.

[13] 沈静,谢苗荣,徐雍,等. 乳鼠心肌细胞培养及纯化方法的改良[J]. 中国医药导刊, 2001, **3**(3): 225-226.

[14] 徐虹,夏雨. 应用于激光扫描共聚焦显微镜的活细胞标本制作方法[M]. 现代诊断与治疗, 2000, **11**(5): 266-268.

[15] 刘艳红,刘先洲,邓兆群,等. 二苯胺法定量检测细胞凋亡[J]. 武汉大学学报(医学版), 2002, **1**(23): 63-65.

[16] 王健,宋书凯,李敬田,等. 慢性心房重构犬心房肌细胞内游离钙离子浓度的变化[J]. 潍坊医学院学报, 2006, **28**(5): 347-348.

[17] 程尉新,金丽娟. 细胞凋亡与坏死的鉴别及研究方法进展[J]. 细胞生物学杂志, 1998, **20**(2): 58.

[18] 敖琳,曹佳. 细胞凋亡中 Ca^{2+} 的分子靶点[J]. 癌变·畸变·突变, 2001, **3**(13): 196-199.

[19] Davis A R, Wivel N A, Palladino J L, *et al.* Construction of adenoviral vectors [J]. MolBiotechnol, 2001, **18**(1): 63-70.

[20] Apati A, Janossy J, Brozik A, *et al.* Effects of intracellular calcium on cell survival and the MAPK pathway in a human hormone-dependent leukemia cell line (TF-1) [J]. Ann N Y Acad Sci, 2003, **1010**: 70-73.

[21] Kadenbach B, Arnold S, Lee I, *et al.* The possible role of cytochrome c oxidase in stress-induced apoptosis and degenerative diseases[J]. Biochim Biophys Acta, 2004, **1655**(123): 400-448.

[22] McConkey D J, Nutt L. Measurement of changes in intracellular calcium during apoptosis[J]. Methods Mol Biol, 2004, **282**: 117-130.

[23] Breckenridge D G, Stojanovic M, Marcellus R C, *et al.* Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endopasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol[J]. J Cell Biol, 2003, **160**(7): 1115-1127.

[24] Pu Y, Luo K Q, Chang D C. A Ca^{2+} signal is found up stream of cytochrome c release during apoptosis in HeLa cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, **299**(5): 762-769.

[25] 张正东,金复生,王心如,等. 丙烯腈染毒对大鼠肝脏钙稳态某些指标的影响[J]. 卫生毒理学杂志, 1999, **13**(4): 252-254.