

高糖和光损伤对人视网膜色素上皮细胞 HIF-1 α 、Caspase-9 表达的影响

曲虹 厉泉

【摘要】 目的 探讨高浓度葡萄糖和光损伤对体外培养人视网膜色素上皮(RPE)细胞的影响及缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)和Caspase-9蛋白表达的影响。**方法** 体外培养人RPE(ARPE-19), (2000 $\pm$ 500)Lux光照建立光损伤模型,给予25 mmol/L葡萄糖模拟高糖环境,通过MTT法检测细胞活力。免疫细胞化学、免疫荧光染色和双标荧光染色法观察各组细胞HIF-1 α 、Caspase-9蛋白的表达,酶联免疫吸附试验定量分析各组细胞HIF-1 α 、Caspase-9蛋白的表达。**结果** (2000 $\pm$ 500)Lux光照及25 mmol/L高糖均可引起体外培养的人RPE细胞活性下降,高糖联合光损伤的RPE细胞活力最低。正常对照组无HIF-1 α 、Caspase-9表达,免疫细胞化学染色和双标免疫荧光染色显示光损伤、高糖、高糖联合光损伤均可诱导RPE细胞HIF-1 α 、Caspase-9蛋白的表达。酶联免疫吸附试验检测结果显示,光损伤和高糖均可使HIF-1 α 、Caspase-9蛋白表达增加,高糖组的RPE细胞HIF-1 α 、Caspase-9蛋白表达低于高糖联合光损伤组,但高于光损伤组($P < 0.01$)。**结论** (2000 $\pm$ 500)Lux光照可导致体外培养人RPE细胞的损伤,高浓度葡萄糖可加重RPE细胞光损伤,高糖可使光损伤诱导的RPE细胞HIF-1 α 、Caspase-9蛋白表达增加。

【关键词】 色素上皮,眼; 葡萄糖; 低氧诱导因子-1; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶9; 光损伤

Effects of high glucose and light damage on expression of hypoxia-inducible factor-1 α and Caspase-9 in cultured human retinal pigment epithelium cells *in vitro* QU Hong, LI Quan. Department of Ophthalmology, Qianfoshan Hospital of Shandong Province, Jinan 250014, China
Corresponding author: QU Hong, Email: qh1009@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of high glucose and light damage on the cultured human retinal pigment epithelium cells and the expression of hypoxia-inducible factor-1 α and Caspase-9. **Methods** Retinal pigment epithelium cells (ARPE-19) were cultured *in vitro* and were exposed to light with intensity of (2000 $\pm$ 500) Lux. 25 mmol/L glucose was used to simulate the environment of high glucose. MTT assay was applied to detect cells viability in all groups. Hypoxia-inducible factor-1 α and Caspase-9 were detected by immunochemistry, immunofluorescence, fluorescent double staining and enzyme linked immunosorbent assay. **Results** The cells viability of retinal pigment epithelium cells decreased which were injured by light of (2000 $\pm$ 500) Lux and 25 mmol/L glucose. 25 mmol/L glucose combined with light damage could make the cells viability decreased compared with 25 mmol/L glucose or light. There were no expression of hypoxia-inducible factor-1 α and Caspase-9 in normal control group. Light damage and high glucose could induce the expression of hypoxia-inducible factor-1 α and Caspase-9 by immunochemistry, immunofluorescence and fluorescent double staining. Light damage, high glucose and light damage combined with high glucose would make the expression of hypoxia-inducible factor-1 α and caspase-9 increased. Enzyme linked immunosorbent assay indicated that the expression level of hypoxia-inducible factor-1 α and Caspase-9 were significantly higher in groups of 25 mmol/L glucose compared with light damage groups without high glucose. The expression level of protein were higher in groups of light damage combined with high glucose compared with those groups of 25 mmol/L glucose or light damage. **Conclusions** Light of (2000 $\pm$ 500) Lux could cause the damage of human retinal pigment epithelium cells cultured *in vitro*. High levels of glucose could aggravate the damage of retinal pigment epithelium cells injured by light. High levels of glucose could increase the expression of hypoxia-inducible factor-1 α and Caspase-9 in human retinal pigment epithelium cells induced by light damage *in vitro*.

【Key words】 Pigment epithelium of eyes; Glucose; Hypoxia-inducible factor-1; Caspase 9;

Light damage

视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)细胞对维护视网膜正常生理功能具有重要的作用。RPE的损伤直接影响光感受器细胞的代谢和功能,导致视网膜功能异常和视力丧失。近年来的研究表明,RPE在糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)和年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, ARMD)的发病和病程发展中起重要作用。随着人类平均寿命的延长和生活习惯的改变,DR和ARMD是目前重要的两大致盲疾病。研究表明,包括ARMD在内的多种视网膜变性疾病都与可见光的长期照射有关,环境和人造光源都可能是视网膜光损伤的潜在威胁^[1-2]。那么,高糖会对视网膜光损伤产生怎样的影响?有关这方面的研究报道甚少,RPE位于视网膜最外层,在发挥生理功能的时候也容易受到损伤,是视网膜光损伤及ARMD等视网膜疾病中最初损伤的靶组织,因此,研究高糖对RPE细胞光损伤的影响,将有助于阐明糖尿病对ARMD的影响,为临床研究提供依据。我们建立体外培养的人RPE细胞光损伤模型,并给予高糖干预,采用MTT检测细胞活力的改变,免疫细胞化学、免疫荧光染色和酶联免疫吸附试验检测不同实验组RPE细胞缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α)、Caspase-9蛋白的表达变化,为进一步探讨ARMD的发病机制提供理论依据。

材料与方法

一、实验材料

成人ARPE-19细胞株(美国ATCC), Dulbecco改良Eagle培养基、新生牛血清、胰蛋白酶、乙二胺四乙酸;抗人HIF-1 α 、Caspase-9抗体(美国Santa Cruz公司);光照采用Philips公司8 W白色荧光灯,光照度计ST-Ⅲ型(上海光电研究所);BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京博奥森生物公司);PV6001免疫组织化学试剂盒、FITC、TRITC标记二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司产品);激光共聚焦显微镜、倒置相差显微镜(日本Olympus);四甲基偶氮唑盐MTT(美国SIGMA);ELX800酶标分析仪(美国BIO-TEK)。

二、实验方法

1. 实验分组:取生长良好的人RPE传代细胞,根据检测要求接种于不同培养板中,正常培养液培养48 h后,将原培养液吸出,随机分组:正常对照组、光损伤组、高糖组、高糖+光损伤组。正常对照组:继续正常培养液培养,双层高压消毒锡纸包裹培养器皿。光损伤组:换正常培养液,白色荧光灯作光源,控制光照强度为(2000 $\pm$ 500) Lux,光照12 h取下锡纸,终止培

养^[3]。高糖组:换高糖培养液(在DMEM培养基干粉中添加D-葡萄糖,配成葡萄糖浓度为25 mmol/L的培养液),双层高压消毒锡纸包裹培养器皿。高糖+光损伤组:光照方法同光损伤组,光照前换葡萄糖浓度为25 mmol/L的高糖培养液。

2. MTT:96孔培养板培养细胞行各组细胞的MTT检测,接种细胞密度 2×10^4 /ml,常规设8个复孔,并设立空白调零。方法:按上述方法处理细胞后,培养液冲洗后每孔加入100 μ l MTT溶液(0.5 mg/ml),温育4 h后翻板弃去MTT溶液,每孔加200 μ l 二甲基亚砷,酶标仪570 nm波长处测各孔吸光度值(A值)。

3. 免疫细胞化学、细胞免疫荧光染色、免疫荧光双标染色:实验细胞以每孔 2×10^4 /ml的密度接种于孔内预置1 cm²盖玻片的24孔板中,每组8个孔。终止培养时吸出培养液,冲洗、固定。取出盖玻片置于载玻片上。免疫细胞化学染色按照PV6001免疫细胞化学试剂盒步骤操作,分别滴加0.1% TritonX-100、0.3% H₂O₂、正常山羊血清、兔抗人HIF-1 α 、小鼠抗人Caspase-9一抗(1:100)孵育2 h、二抗孵育20 min, DAB显色、脱水、透明、封片。细胞免疫荧光(FITC标记)染色:取出长有细胞的盖玻片,0.01 mol/L的PBS冲洗3次;以4%多聚甲醛-PBS液固定20 min, PBS冲洗3次;用0.1% Triton-X100-PBS固定5 min, PBS冲洗3次;羊血清封闭10 min以封闭非特异抗原,甩去多余液体,不洗;滴加兔抗人HIF-1 α 抗体(用含0.1% TritonX-100的0.01 mol/L PBS稀释为1:100)置湿盒内,37 $^{\circ}$ C保湿30~60 min;用PBS冲洗3次,每次5 min,吹干;滴加羊抗兔FITC荧光标记IgG(1:50),置于湿盒内,37 $^{\circ}$ C保湿30~60 min;用PBS冲洗3次,每次5 min,然后用去离子水振洗一次;以50%缓冲甘油封片,荧光显微镜下观察和照相。细胞免疫荧光双标染色:步骤同免疫荧光染色,兔抗人HIF-1 α 一抗, FITC标记山羊抗兔二抗;小鼠抗人Caspase-9一抗, TRITC标记山羊抗小鼠二抗,以50%缓冲甘油封片,激光共聚焦显微镜观察和照相。

4. 酶联免疫吸附试验检测HIF-1 α 、Caspase-9蛋白表达: 2×10^4 /ml的密度接种于6孔板中,加WIP细胞裂解液提取蛋白,测定蛋白质浓度,待测标本包被聚苯乙烯包被板,每组8个孔,每孔加入100 μ l样品,封闭液封闭,加入100 μ l洗涤液稀释的HIF-1 α 、Caspase-9一抗,1:1000辣根过氧化物酶标记二抗,37 $^{\circ}$ C恒温摇床反应1 h;显色、终止反应, $\lambda=495$ nm处测定A值。

5. 统计学分析:采用SPSS 11.0统计学软件进行

统计分析,实验测试指标的数据资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,各组 HIF-1 α 、Caspase-9 蛋白在培养的 RPE 细胞中表达的差异比较采用单因素方差分析,组间的多重比较采用 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、人 RPE 细胞的培养

倒置显微镜下观察,人 RPE 细胞呈梭形或多边形,单层贴壁生长,胞核透亮,胞质丰富,细胞边界清楚,生长活跃,约 5~7 d 传代一次,以 1:3 比例传代(图 1)。

二、MTT

光损伤组(0.61 ± 0.03)、高糖 + 光损伤组(0.46 ± 0.04)、高糖组(0.53 ± 0.03)与正常对照组(0.89 ± 0.02)比较 A 值差异均有统计学意义($q = 28.53$ 、 44.40 、 37.36 , $P < 0.01$),高糖组 A 值低于光损伤组($q = 8.83$, $P < 0.01$),高于高糖 + 光损伤组($q = 7.04$, $P < 0.01$)。

三、免疫细胞化学、免疫荧光染色、双标染色观察 HIF-1 α 、Caspase-9 蛋白的表达

在正常对照组免疫细胞化学染色,未见 HIF-1 α 、Caspase-9 蛋白阳性表达,光损伤组、高糖 + 光损伤组、高糖组均可见 HIF-1 α 、Caspase-9 蛋白阳性表达,免疫细胞化学染色见 Caspase-9 蛋白阳性表达为黄色胞质着染,免疫荧光染色见 HIF-1 α 阳性染色为绿色荧光着染(图 2~4)。免疫荧光双标染色下,正常对照组无 HIF-1 α 、Caspase-9 蛋白阳性表达,无荧光着染。光损伤组、高糖 + 光损伤组、高糖组均可见 HIF-1 α 蛋白、Caspase-9 蛋白阳性表达,HIF-1 α 蛋白为绿色荧光胞质着染,Caspase-9 蛋白为橘红色荧光胞质着染,双标染色可见 HIF-1 α 和 Caspase-9 共表达,呈黄绿色(图 5)。

四、酶联免疫吸附试验检测 HIF-1 α 、Caspase-9 蛋白的表达

光损伤组、高糖组和高糖 + 光损伤组 HIF-1 α 、Caspase-9 蛋白表达与正常对照组比较差异有统计学意义,蛋白表达均高于正常对照组,高糖组 HIF-1 α 、Caspase-9 蛋白表达高于光损伤组($q = 31.23$ 、 19.80 , $P < 0.01$),低于高糖 + 光损伤组($q = 36.57$ 、 11.85 , $P < 0.01$)。见表 1。

讨 论

视网膜是眼组织中最易受光损害的部位,不同波长的光对视网膜组织的损伤机制不同,其中光化学损伤是最常见的类型。视网膜光化学损伤的病理过程与 ARMD 及视网膜色素变性有许多相似之处。RPE 构成

表 1 酶联免疫吸附试验检测各实验组 HIF-1 α 、Caspase-9 蛋白的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	HIF-1 α	Caspase-9
正常对照组	0.09 ± 0.02	0.08 ± 0.01
光损伤组	0.31 ± 0.02^a	0.24 ± 0.02^a
高糖组	0.55 ± 0.02^a	0.44 ± 0.04^a
高糖组 + 光损伤组	0.83 ± 0.02^a	0.55 ± 0.03^a
F 值	1708.57	437.60
P 值	0.00	0.00

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.01$

血-视网膜外屏障,除了具有吞噬视网膜光感受器外节、维持视网膜神经上皮的电解质平衡、参与维生素 A 的转化过程等作用外,还可分泌多种神经营养因子,对于保护包括感光细胞在内的神经细胞、促进眼球发育以及维护眼内的平衡状态有着重要的作用^[4]。研究发现,很多临床常见的严重致盲眼底疾病,如 ARMD、DR 等,其发病机制与 RPE 有着极为密切的关系。RPE 损伤是上述眼底疾病中共同的病理现象,可以导致血-视网膜外屏障破坏,诱发视网膜下新生血管等严重后果,危害患者视力^[5]。随着糖尿病发病率的升高,糖尿病患者逐年增加,高糖环境对视网膜光损伤的影响,日益引起人们的关注。研究 RPE 光损伤及高糖干预的影响,对上述眼底疾病的研究具有重要意义。与光的慢性损害密切相关的 ARMD 的早期病变为玻璃膜疣,提示 RPE 的损伤变性。研究表明,视网膜光化学损伤过程中 RPE 的改变最先发生,而光感受器的改变为继发性的,因此 RPE 光损伤是视网膜光损伤的关键部位^[6]。

MTT 被活细胞摄取后经线粒体代谢生成甲臆,线粒体活力越旺盛,甲臆生成越多,吸光度也越高。实验中发现(2000 ± 500) Lux 的光照和高糖均可以引起体外培养的人 RPE 细胞活性下降,引起细胞损伤,同样光照条件下,高糖培养可以使光损伤 RPE 细胞活性进一步下降。RPE 细胞作为视网膜的外屏障,运送大量的葡萄糖由脉络膜毛细血管进入视网膜,满足视网膜外层视细胞的高代谢活动,以往研究发现高血糖具有细胞毒性,早期糖尿病大鼠的 RPE 细胞基底膜面褶皱增多,高糖刺激还可以使 RPE 细胞表达的葡萄糖转运蛋白发生变化。高糖培养的光损伤 RPE 细胞活性低于光损伤组和高糖组的细胞活性,高糖组的细胞活性低于光照组,结果提示 RPE 细胞对光照和葡萄糖浓度的改变都是敏感的,高糖环境可以加重 RPE 细胞的光损伤。

细胞凋亡和新生血管形成是 DR 和 ARMD 共同的重要发病机制,HIF-1 α 是与缺氧关系最密切的转录因子,具有促进 VEGF 表达的作用,VEGF 是新生血管形

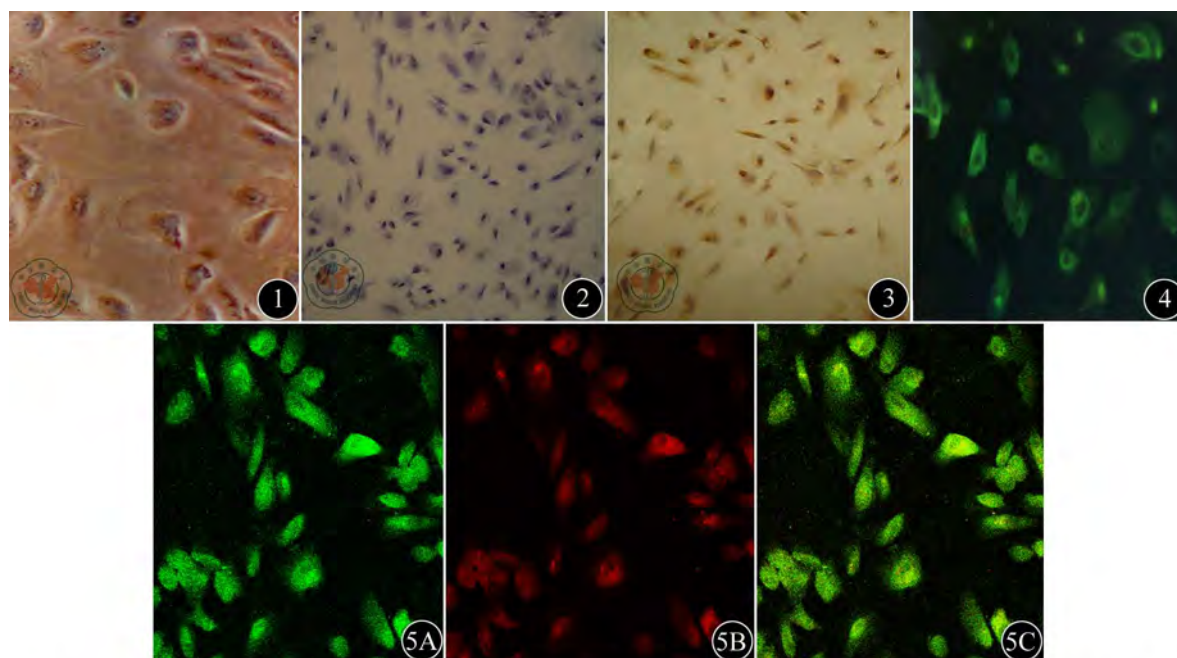


图1 传代培养的人RPE细胞($\times 400$) 图2 免疫细胞化学法检测无阳性表达($\times 100$) 图3 免疫细胞化学法检测见RPE细胞中Caspase-9阳性表达位于胞浆,呈黄色染色($\times 100$) 图4 细胞免疫荧光法检测见RPE细胞中HIF-1 α 阳性表达位于胞浆,呈绿色染色($\times 400$) 图5 细胞免疫荧光双标染色。5A: HIF-1 α 蛋白阳性表达呈绿色; 5B: Caspase-9蛋白阳性表达呈橘红色; 5C: HIF-1 α 和Caspase-9蛋白共表达呈黄绿色

成的关键因子,而 Caspase-9 是受 HIF-1 α 调控的众多下游靶基因之一,介导了细胞凋亡的线粒体途径,两者是否共同参与了高糖和光损伤,对 DR 和 ARMD 发病机制的研究具有重要意义。HIF-1 是一种与氧平衡调控相关的真核细胞转录因子,因首先发现于低氧诱导上调促红细胞生成素基因转录而得名。HIF-1 可以被多种细胞外刺激活化,广泛参与多种基因转录的调控,具有重要的生理和病理作用^[7-8]。在正常对照组,免疫化学染色无 HIF-1 α 蛋白阳性表达,高糖组和光损伤组 RPE 细胞均有 HIF-1 α 蛋白阳性表达。酶联免疫吸附试验检测发现高糖联合光损伤可使 HIF-1 α 蛋白表达进一步上升。在正常对照组,并未发现 HIF-1 α 蛋白的阳性表达,这与 HIF-1 α 蛋白的自身特性有关,HIF-1 是由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 两个亚基组成,HIF-1 α 是它的活性亚基,HIF-1 β 起结构作用,常氧条件下,HIF-1 α mRNA 转录合成的蛋白很快被分解,所以正常对照组无法检测到 HIF-1 α 蛋白的表达^[9]。通过实验发现光损伤可引起 RPE 细胞 HIF-1 α 蛋白表达,高糖可诱导光损伤后的 RPE 细胞 HIF-1 α 表达进一步增加,HIF-1 α 是氧敏感的因子,但有研究发现无论缺氧或非缺氧情况,氧自由基和非自由基氧活性物质均可参与 HIF-1 活性的调节^[10]。氧化应激是 ARMD 和糖尿病共同的发病机制,光损伤和高浓度葡萄糖能诱发活性氧自由基的产生,引起视网膜组织发生脂质过氧化反应,使视网膜处

于氧化应激状态,从而刺激细胞 HIF-1 α 蛋白的表达,自由基、过氧化氢等活性物质被认为参与了视网膜光化学损伤和糖尿病视网膜病变的发生和发展,HIF-1 α 与其他转录因子协调作用,促进 VEGF 的表达,VEGF 是新生血管形成的关键因子^[11-13]。HIF-1 和 VEGF 都是有双重作用的因子,在一定条件下,HIF-1 可产生抗凋亡等保护作用,但是超过一定的量,就会发挥促凋亡和促新生血管的作用^[14]。

凋亡发生是一个复杂的、由 Caspases 蛋白酶家族介导的蛋白酶级联反应过程,其中包括 Caspase-9 介导的线粒体途径。RPE 细胞含有丰富的线粒体,代谢旺盛,对氧需求量大,光损伤和高糖均可引起 RPE 细胞活性氧增加。RPE 细胞氧化损伤的主要靶位是线粒体,损伤程度取决于活性氧的量,RPE 细胞的线粒体 DNA 对活性氧介导的损伤非常敏感,而线粒体 DNA 的损伤又可以使活性氧的产生增加,进一步加重 RPE 功能障碍^[15-16]。实验发现光损伤和高糖均可诱导 RPE 细胞 Caspase-9 表达,高糖联合光损伤可使 Caspase-9 蛋白表达量增加,这提示线粒体途径可能参与了 RPE 细胞的光损伤,高糖也可通过线粒体损伤加重 RPE 细胞光损伤。免疫荧光双标发现 HIF-1 α 和 Caspase-9 有共表达现象,酶联免疫吸附试验检测发现,Caspase-9 蛋白的表达在高糖联合光损伤组高于光损伤组和高糖组,并没有因为细胞中 HIF-1 α 蛋白表达增加而受到抑制,

细胞活性也并没有因为 HIF-1 α 的表达增加而提高,这提示此实验条件下 HIF-1 α 的表达可能不发挥抗凋亡作用,而是促凋亡和促新生血管生成的作用。

通过实验,可以认为一定程度的持续光照可以引起 RPE 细胞活性下降、线粒体凋亡因子表达增加,造成细胞光损伤,同时伴有 HIF-1 α 蛋白的表达,高糖干预可以加重 RPE 细胞光损伤,刺激 RPE 细胞 HIF-1 α 蛋白表达进一步增加,而 HIF-1 α 蛋白和 Caspase-9 蛋白表达规律一致,提示 HIF-1 α 及其 Caspase-9 蛋白在 ARMD、DR 的发病机制中具有重要作用,高糖和光照对 RPE 细胞的损伤具有累加、协同作用,由此,对于合并糖尿病的 ARMD 患者视网膜光损伤的保护就具有更为重要的意义,这个实验结果对于临床工作具有重要的指导意义。

参 考 文 献

- [1] Degenring RF, Cordes A, Schrage NF. Autologous translocation of the retinal pigment epithelium and choroid in the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol*, 2011, 89: 654-659.
- [2] Wang B, Atherton P, Patel R, et al. Antiangiogenic effects and transcriptional regulation of pigment epithelium-derived factor in diabetic retinopathy. *Microvasc Res*, 2010, 80: 31-36.
- [3] 孟岩,牛膺筠,曲虹. 重组人促红细胞生成素对人视网膜色素上皮细胞光化学损伤保护性作用的研究. *中华眼科杂志*, 2008, 44: 50-55.
- [4] Sparrow JR, Hicks D, Hamel CP. The retinal pigment epithelium in health and disease. *Curr Mol Med*, 2010, 10: 802-823.
- [5] Salminen A, Kauppinen A, Hyttinen JM, et al. Endoplasmic reticulum stress in age-related macular degeneration; trigger for neovascularization. *Mol Med*, 2010, 16: 535-542.
- [6] Samuels IS, Sturgill GM, Grossman GH, et al. Light-evoked responses of the retinal pigment epithelium; changes accompanying photoreceptor loss in the mouse. *J Neurophysiol*, 2010, 104: 391-402.
- [7] 孟岩,牛膺筠. 促红细胞生成素对人视网膜色素上皮细胞光化学损伤的保护作用. *中华眼底病杂志*, 2007, 23: 414-417.
- [8] 邓爱军,姜德咏. 缺氧时视网膜血管内皮细胞 HIF-1 α 及其 mRNA 的表达. *眼科研究*, 2006, 24: 356-358.
- [9] Ratcliffe PJ. HIF-1 and HIF-2; working alone or together in hypoxia? *J Clin Invest*, 2007, 117: 862-865.
- [10] Lee SJ, Hwang AB, Kenyon C. Inhibition of respiration extends C. elegans life span via reactive oxygen species that increase HIF-1 activity. *Curr Biol*, 2010, 20: 2131-2136.
- [11] Yeh PT, Yang CM, Huang JS, et al. Vitreous levels of reactive oxygen species in proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmology*, 2008, 115: 734-737.
- [12] Yoshida T, Zhang H, Iwase T, et al. Digoxin inhibits retinal ischemia-induced HIF-1 α expression and ocular neovascularization. *FASEB J*, 2010, 24: 1759-1767.
- [13] Hughes JM, Groot AJ, van der Groep P, et al. Active HIF-1 in the normal human retina. *J Histochem Cytochem*, 2010, 58: 247-254.
- [14] McLaren AT, Marsden PA, Mazer CD, et al. Increased expression of HIF-1 α , nNOS, and VEGF in the cerebral cortex of anemic rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2007, 292: 403-414.
- [15] King A, Gottlieb E, Brooks DG, et al. Mitochondria-derived reactive oxygen species mediate blue light-induced death of retinal pigment epithelial cells. *Photochem Photobiol*, 2004, 79: 470-475.
- [16] 唐敏,樊莹,傅扬,等. 视网膜色素上皮细胞线粒体 DNA 的氧化损伤研究. *眼科研究*, 2007, 25: 861-864.

(收稿日期:2012-07-02)

(本文编辑:梁雷)

曲虹, 历泉. 高糖和光损伤对人视网膜色素上皮细胞 HIF-1 α 、Caspase-9 表达的影响[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2012, 6(21): 6744-6748.