

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2016.03.015

论著·实验研究

PINK1 基因对缺氧缺血性脑损伤新生小鼠 细胞凋亡及自噬的影响

黄阳 陈洪菊 朱将虎 赵凤艳 屈艺 母得志

(四川大学华西第二医院儿科 / 出生缺陷相关妇儿疾病教育部重点实验室, 四川 成都 610041)

[摘要] **目的** 研究 PINK1 基因对缺氧缺血性脑损伤新生小鼠细胞凋亡及细胞自噬的影响。**方法** 将野生型和 PINK1 基因敲除型新生小鼠各 72 只分为野生型假手术组 (SWT)、野生型模型组 (MWT)、基因敲除假手术组 (SKO) 及基因敲除模型组 (MKO)。模型组小鼠行右侧颈总动脉结扎后置于低氧舱中 (含 8% 氧气和 92% 氮气) 2.5 h, 假手术组不予结扎和低氧处理。缺氧缺血处理后 24 h, 采用 TTC 染色法检测各组新生小鼠脑梗死程度; 采用免疫组化法检测各组脑组织中活化型半胱天冬酶-3 (CC3) 的表达; 采用 TUNEL 法检测细胞凋亡; 采用免疫荧光法及 Western blot 法检测细胞自噬相关蛋白 LC3 的表达。**结果** MKO 组小鼠脑组织梗死程度较 MWT 组小鼠明显减轻 ($P<0.05$); 脑组织凋亡阳性细胞数明显减少, 凋亡指数降低 ($P<0.05$); 凋亡蛋白 CC3 表达显著减少 ($P<0.05$)。MKO 组小鼠自噬相关蛋白 LC3 表达较 MWT 组减少, 进一步检测证实自噬指标 LC3 II/LC3 I 比值较 MWT 组降低 ($P<0.05$)。**结论** 敲除 PINK1 基因对新生鼠缺血缺氧脑损伤具有神经保护作用。
[中国当代儿科杂志, 2016, 18(3): 263-269]

[关键词] PINK1 基因; 基因敲除; 缺氧缺血; 脑损伤; 细胞凋亡; 细胞自噬; 新生小鼠

Effects of PINK1 gene on cell apoptosis and cell autophagy in neonatal mice with hypoxic-ischemic brain damage

HUANG Yang, CHEN Hong-Ju, ZHU Jiang-Hu, ZHAO Feng-Yan, QU Yi, MU De-Zhi. Department of Pediatrics, West China Second University Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China (Mu D-Z, Email: mudz@scu.edu.cn)

Abstract: Objective To study the effect of PINK1 (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten induced putative kinase 1) gene on cell apoptosis and cell autophagy in neonatal mice with hypoxic-ischemic brain damage (HIBD). **Methods** Seventy-two wild-type C57BL/6 mice and 72 PINK1 gene knockout neonatal C57BL/6 mice were randomly divided into four groups: sham-operated wild-type (SWT), HIBD model wild-type (MWT), sham-operated knockout (SKO) and HIBD model knockout (MKO). HIBD model was prepared by low oxygen exposure for 2.5 hours after right carotid artery ligation. After 24 hours of hypoxia-ischemia treatment, TTC (2,3,5-triphenyl four azole nitrogen chloride) staining was used to measure brain infarct volume. The immunohistochemical staining was used to measure the expression of cell apoptosis protein cleaved-caspase-3 (CC3) in brain tissues. The TUNEL method was used to measure cell apoptosis. The immunofluorescence staining and Western blot were used to measure the expression of cell autophagy protein LC3. **Results** Compared with the MWT group, the infarct volume of brain tissues was markedly reduced in the MKO group ($P<0.05$), the number of apoptotic cells and the cell apoptosis index were markedly decreased in the MKO group ($P<0.05$), the expression of apoptosis protein CC3 was significantly reduced in the MKO group ($P<0.05$), the expression of cell autophagy protein LC3 was significantly decreased in the MKO group, and the autophagy indicator LC3II/LC3I was also markedly reduced in the MKO group ($P<0.05$). **Conclusions** PINK1 gene knockout can protect neonatal mice from HIBD.
[Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(3): 263-269]

Key words: PINK1 gene; Gene knockout; Hypoxic-ischemia; Brain damage; Cell apoptosis; Cell autophagy; Neonatal mice

[收稿日期] 2016-01-08; [接受日期] 2016-02-03

[基金项目] 国家自然科学基金 (81330016), 四川省科技计划项目 (2014SZ0149)。

[作者简介] 黄阳, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 母得志, 男, 教授。

新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是小儿严重的神经系统疾病,病情严重的患儿病死率高,存活者常留有脑瘫、智力低下等神经系统的后遗症。其发病机制尚不完全明确,临床治疗亦缺乏特异性的治疗方案^[1]。研究认为细胞坏死、凋亡及自噬是神经元细胞死亡的主要方式。凋亡及自噬为延迟发生,给临床治疗带来了时间窗。明确自噬及凋亡在HIE的作用及机制,是寻找治疗靶点的关键。多项研究提示多种死亡机制参与了脑缺血后神经元损伤^[2-3]。自噬及凋亡发生的具体机制尚不明确,但是抑制自噬及抗凋亡可逆转神经元损伤,提示抑制自噬及抗凋亡可能成为治疗HIE的新思路^[1]。

PINK1(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten induced putative kinase 1)是一种蛋白激酶,存在于线粒体外膜,在一些高能耗的组织器官,如心、脑、肌肉中高表达^[4]。研究发现PINK1能够调控线粒体自噬^[5-7]。越来越多的研究显示线粒体自噬参与了细胞程序性死亡^[8-10]。PINK1可以通过磷酸化丝氨酸蛋白酶Omi/HtrA2来促进细胞凋亡^[11];在慢性阻塞性肺病的小鼠模型中,敲除PINK1基因能够明显抑制细胞自噬发生^[12]。因此我们推测PINK1可能参与了HIE过程中的细胞自噬及凋亡的过程。本研究通过建立新生小鼠缺血缺氧性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)模型,模拟HIE发病过程,通过敲除小鼠PINK1基因,检测小鼠缺血缺氧脑组织中细胞凋亡及自噬情况,研究PINK1基因的敲除对新生小鼠脑损伤中凋亡及自噬的作用,为HIE的发病机制及寻找新的治疗靶点提供基础实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

8%氧气和92%氮气混合气(四川大学华西第二医院中央供气站);2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC, Sigma, 美国);二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒(北京天根生化科技公司);ECL底物化学发光试剂(Pierce公司,美国);BCA蛋白定量检测试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司);原位细胞凋亡检测试剂盒(AP, Roche);聚偏氟乙烯(PVDF)膜(O.Roche公司,瑞士);兔抗鼠 β -actin

抗体、辣根过氧化物酶标记的抗兔IgG抗体(Santa Cruz公司,美国);胎牛血清(Gibco公司,美国);兔抗鼠活化型半胱天冬酶-3(CC3)抗体(CST公司,美国);兔抗鼠LC3抗体(Novus公司,美国);荧光标记山羊抗兔IgG抗体(GeneCopoeia公司,美国);4,6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染液(上海碧云天生物技术有限公司);引物的设计与合成由苏州金唯智生物科技公司完成。

1.2 实验动物及分组

10日龄野生型(PINK1^{+/+})新生C57BL/6小鼠和PINK1基因敲除型(PINK1^{-/-})新生C57BL/6小鼠各72只,雌雄不限,由四川大学华西第二医院姜长安实验室提供。野生型和基因敲除型新生小鼠均分为假手术组及模型组,即野生型假手术组(wild-type sham-operated group, SWT)、野生型模型组(wild-type model group, MWT)、基因敲除假手术组(knock-out sham-operated group, SKO)以及基因敲除模型组(knock-out model group, MKO),每组36只。

1.3 模型建立

通过改良Rice-Vannucci法^[13]建立新生小鼠HIBD模型。将C57BL/6小鼠进行术前称重及编号,乙醚麻醉,于手术台上固定;常规消毒铺巾,颈部正中偏右作长约6mm切口;分离并用5-0丝线双重结扎右侧颈总动脉;缝合皮肤切口,术后恢复1h,然后放入缺氧舱中给予含8%氧气和92%氮气混合气2.5h(氧流量2L/min),即为HIBD模型。而后置于常氧母鼠笼中饲养。假手术组仅作颈部皮肤切口分离右侧颈总动脉,不予结扎,缝合切口,不做缺氧处理。操作过程保持恒温。

1.4 聚合酶链式反应法检测PINK1基因表达

用高压灭菌1.5mL离心管,加入适量50mM NaOH,酒精消毒鼠尾及器械后,剪尾尖1~2mm置于其中,100℃水浴40min,观察组织基本溶解时涡漩数秒,加入1mol/L tris-HCl(pH:8.3),涡漩数秒后14000转/min离心5min,取上清即得基因组DNA。取1 μ L DNA分别加入引物、2 $\times$ Master Mix等组成26 μ L反应体系。Pink1引物序列:Common: 5'-GAGCCTGAAGTGCAAACCTCC-3'; WT: 5'-GCTCTGGCTTCTGAGGAAGA-3'; KO: 5'-CTAAAGCGCATGCTCCAGAC-3'。反应条件:95℃预变性2min;95℃变性15s,64℃退火

15 min, 72℃延伸 75 s, 3个循环; 95℃变性 15 s, 61℃退火 15 min, 72℃延伸 75 s, 3个循环; 95℃变性 15 s, 58℃退火 15 min, 72℃延伸 75 s, 3个循环; 95℃变性 15 s, 55℃退火 15 min, 72℃延伸 75 s, 33个循环; 最后 72℃延伸 75 s。PCR产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 在凝胶成像仪长波紫外光下观察条带结果。野生型小鼠扩增片段为 350 bp。

1.5 TTC 染色法观察脑组织梗死程度

缺氧缺血后 24 h, 每组取 9 只小鼠麻醉后, 直接取脑, 将脑组织放置于脑切片模具中, -20℃冻 10~15 min。从视交叉开始沿冠状位向后切片, 切片厚度为 2 mm。切片后置于 2% 浓度的 TTC 中, 37℃温箱孵育 30 min, 期间保证脑片均匀接触染液, 多聚甲醛固定后观察结果。染色结果红色为正常组织, 白色为梗死组织。每个脑组织标本选取 4 张脑片评估梗死程度, 梗死体积通过梗死面积积分公式计算得到^[14]。

1.6 TUNEL 法检测脑组织凋亡情况

缺氧缺血后 24 h, 每组取 9 只小鼠脑组织, 固定后放入包埋模框, 填入琼脂糖, 待琼脂糖完全凝固, 修理琼脂糖模块, 将组织块固定到托盘上, 于震荡切片机上切片, 厚度为 40 μm, 挑片, 置于 6 孔板中, PBS 洗 5 min × 3, 于含 0.1% TRITON X-100 的 0.1% 柠檬酸钠溶液中冰上作用 5 min, PBS 洗 5 min × 3, 按比例滴加 TUNEL 反应液, 37℃作用 1 h, PBS 洗 5 min × 3, 加入 DAPI 孵育 5 min, PBS 洗 5 min × 3, 滴加抗荧光淬灭剂, 封片, 在激光共聚焦显微镜 (Olympus 公司, 日本) 下观察结果, 每个标本观察 3 张脑组织切片, 每张脑组织切片随机选取 3~4 个视野, 计数凋亡细胞, 计算凋亡指数 = (凋亡细胞 / 总细胞数) × 100%。

1.7 免疫组化法检测促凋亡蛋白 CC3 表达水平及分布

缺氧缺血后 24 h, 每组分别取 9 只小鼠脑组织, 常规固定、脱水、包埋制做石蜡切片。将切片脱蜡, 梯度酒精水化, 微波抗原修复, PBS 充分淋洗后, 3% H₂O₂ 封闭内源性过氧化氢酶室温避光 10 min, PBS 充分淋洗后, 山羊血清封闭 20 min, 加兔抗小鼠 CC3 抗体 (1:150) 4℃过夜。PBS 充分淋洗后, 滴加生物素化的抗兔 IgG 抗体孵育 20 min, PBS 充分淋洗后, 滴加 HRP-链酶卵白素, 37℃孵育

20 min, PBS 充分淋洗后, DAB 显色, 适时终止显色, 苏木素复染, 适时终止显色, 脱水后中性树脂封片, 于光学显微镜下 (Olympus 公司, 日本) 观察、拍照。镜下阳性细胞显色为棕黄色。每个标本观察 3 张脑组织切片, 每张脑组织切片随机选取 3~4 个视野, 采用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件对其进行定量分析。

1.8 免疫荧光法检测自噬相关蛋白 LC3 表达水平及分布

缺氧缺血后 24 h, 每组取 9 只小鼠脑组织, 固定后放入包埋模框, 填入琼脂糖, 待琼脂糖完全凝固, 修理琼脂糖模块, 将组织块固定到托盘上, 于震荡切片机上切片, 厚度为 40 μm, 挑片, 置于 6 孔板中, PBS 洗 5 min × 3, 于含 0.3% TRITON X-100 的 PBS 溶液中作用 30 min, PBS 洗 5 min × 3, 封闭液封闭 1 h, 置于 4℃冰箱, 滴加一抗孵育过夜; 滴加荧光素标记的二抗, 湿盒避光室温孵育 1 h; PBS 洗 5 min × 3, 加入 DAPI 孵育 5 min, PBS 洗 5 min × 3, 滴加抗荧光淬灭剂, 封片, 在激光共聚焦显微镜下观察结果、拍照。

1.9 Western blot 法检测自噬相关蛋白 LC3 表达水平

LC3 是自噬过程中的关键调控蛋白, 当细胞自噬被激活时, 在 Atg4 调控下由 LC3- I 型蛋白向 LC3- II 型蛋白 (膜结合形式) 转变, 对自噬体的形成起关键调控作用, LC3- II 与 LC3- I 的比值常用作检测细胞自噬启动程度的指标^[15-16]。因此本研究采用 Western blot 法进一步检测比对两组脑组织中 LC3 II / LC3 I 的比值。缺氧缺血后 24 h, 每组取 9 只小鼠右侧脑组织, 加入蛋白裂解液提取总蛋白, BCA 蛋白定量检测试剂盒测定蛋白浓度, 调整蛋白浓度至同一浓度, 以 60 μg/孔上样, 在 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶中 110 V 电泳 90 min 后, 以 0.3 A 转膜 70 min 将蛋白转印至 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶室温下封闭 1 h 后加入一抗, 置于摇床室温孵育 1 h 后 4℃过夜。β-actin 抗体作为内参。TBST 洗膜 3 次, 每次 7 min, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 1 h, 洗膜 3 次, 每次 7 min。在膜上加 ECL 发光剂, 将膜放入凝胶成像仪成像。采用 Quantity one 4.6.2 (美国) 软件行定量分析。

1.10 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行统计学处理, 计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 野生型和基因敲除型新生小鼠 PINK1 基因表达情况

PCR 结果表明, 野生型 (PINK1^{+/+}) 小鼠出现一条 350 bp 的条带, 基因敲除型 (PINK1^{-/-}) 小鼠未出现 350 bp 的条带, 见图 1。

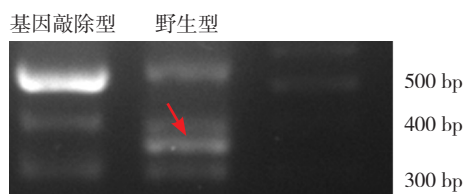


图1 野生型和基因敲除型新生小鼠 PINK1 基因的表达 野生型 (PINK1^{+/+}) 小鼠 PINK1 基因扩增片段长度为 350 bp (箭头所示), PINK1 基因敲除 (PINK1^{-/-}) 小鼠未扩增出 350 bp 片段。

2.2 PINK1 基因敲除对 HIBD 新生小鼠脑组织梗死程度的影响

脑组织 TTC 染色结果表明: 与假手术组相比, 新生小鼠缺氧缺血后 24 h 脑组织梗死明显。MKO 组脑梗死体积占脑总体积百分数 ($16\% \pm 3\%$) 低于 MWT 组 ($31\% \pm 4\%$) ($t=9.0$, $P < 0.05$), 提示 PINK1 基因敲除可致新生小鼠缺氧缺血后 24 h 脑组织梗死程度减轻。见图 2。

2.3 PINK1 基因敲除对 HIBD 新生小鼠脑组织细胞凋亡的影响

TUNEL 结果表明: SWT 组 ($0.76\% \pm 0.12\%$) 与 SKO 组 ($0.89\% \pm 0.36\%$) 几乎不存在细胞凋亡; 与各假手术组相比, 两模型组凋亡阳性细胞数均明显增加 ($P < 0.05$), 且 MKO 组 ($13.2\% \pm 2.5\%$) 凋亡指数低于 MWT 组 ($51.9\% \pm 3.4\%$) ($P < 0.05$), 提示 PINK1 基因敲除可致新生小鼠缺氧缺血后 24 h 脑组织细胞凋亡减少。见图 3~4。

2.4 PINK1 基因敲除对 HIBD 新生小鼠脑组织凋亡蛋白 CC3 表达的影响

免疫组化结果表明: SWT 组 (0.011 ± 0.002) 与 SKO 组 (0.009 ± 0.004) 几乎不表达凋亡蛋白; 与假手术组相比, MKO 组 (0.0878 ± 0.033) 和 MWT 组 (0.151 ± 0.048) CC3 蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$), 且 MWT 组 CC3 蛋白表达水平明显高于 MKO 组 ($P < 0.05$)。提示 PINK1 基因敲除新生小鼠在缺氧缺血后 24 h 脑组织凋亡蛋白 CC3 表达明显减弱。见图 5~6。

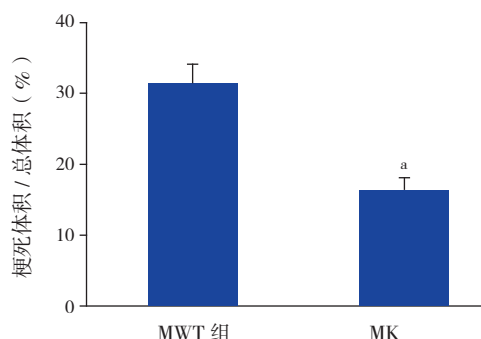
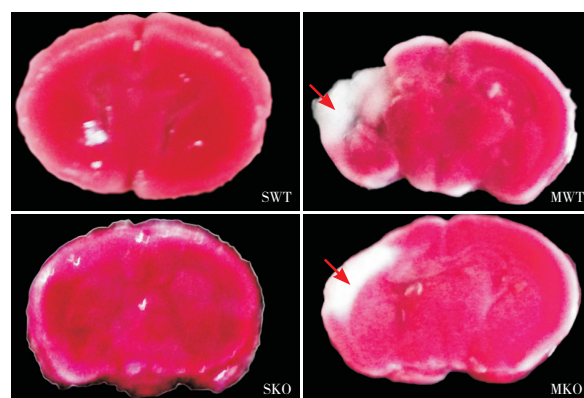


图2 野生型和基因敲除型新生小鼠脑梗死程度比较 上图为 TTC 染色结果, 箭头所示为梗死区域。下图为统计图 ($n=9$), a 示与 MWT 组相比, $P < 0.05$ 。

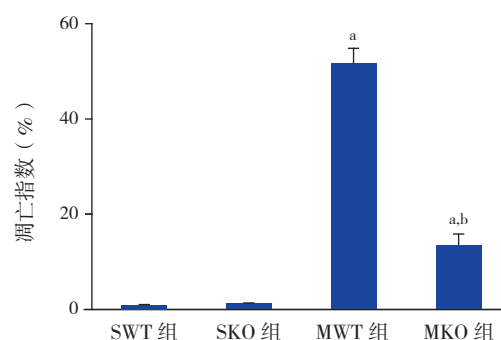


图3 各组新生小鼠脑组织细胞凋亡指数比较 ($n=9$) a 示与各型假手术组比较, $P < 0.05$; b 示与 MWT 组比较, $P < 0.05$ 。

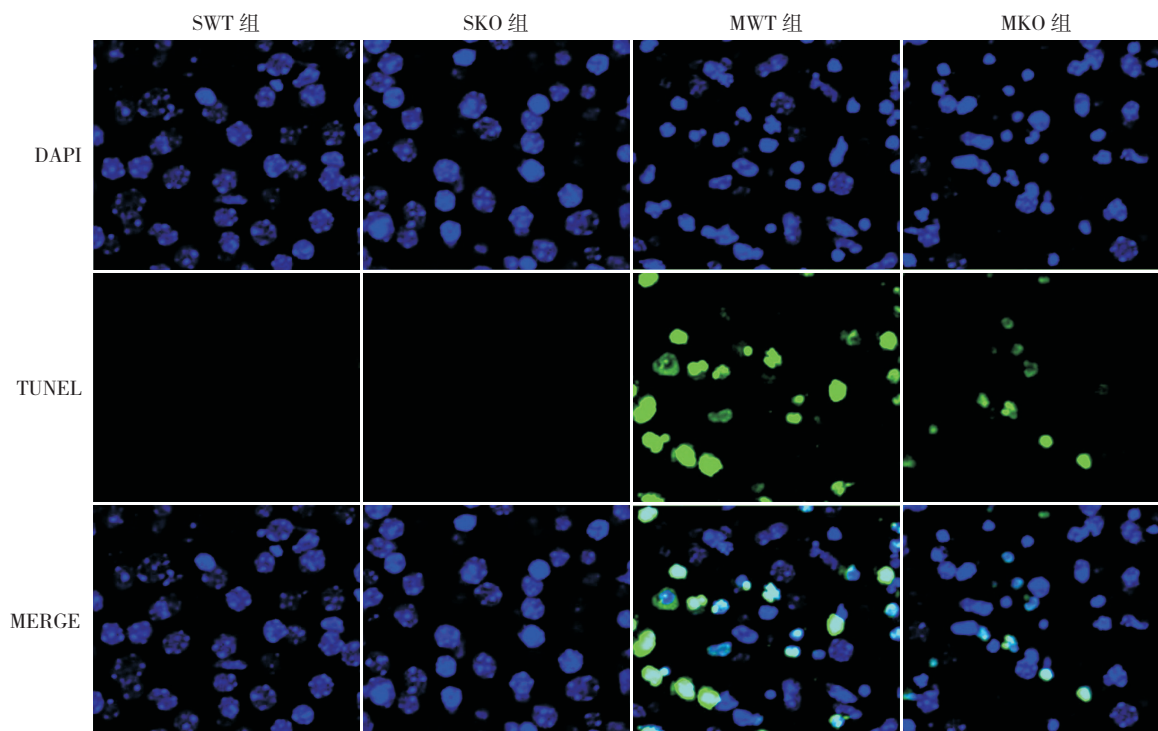


图4 TUNEL染色法检测各组新生小鼠脑组织细胞凋亡情况(DAPI, $\times 400$) SWT组和SKO组几乎不存在凋亡细胞, MWT组和MKO组凋亡细胞均明显增加, 且MKO组凋亡细胞数明显少于MWT组, 阳性凋亡细胞呈绿色荧光。

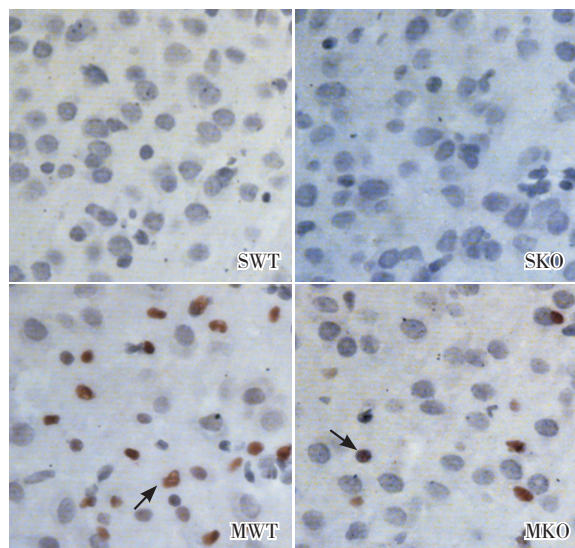


图5 免疫组化检测各组新生小鼠脑组织凋亡蛋白CC3表达(DAB显色, $\times 400$), SWT组和SKO组均几乎不表达CC3蛋白; MWT组和MKO组CC3蛋白表达均明显增加, CC3蛋白阳性表达呈棕色(箭头所示)。

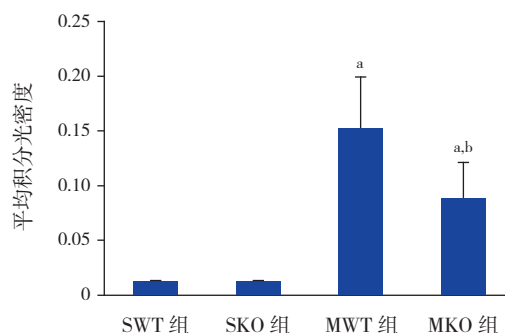


图6 各组新生小鼠脑组织凋亡蛋白CC3表达比较($n=9$) a示与SWT组和SKO组比较, $P<0.05$; b示与MWT组比较, $P<0.05$ 。

2.5 PINK1基因敲除对HIBD新生小鼠脑组织自噬相关蛋白LC3表达的影响

免疫荧光结果表明: SWT组与SKO组自噬相关蛋白LC3荧光点数很少; 与假手术组相比, 两组模型组LC3荧光点数明显增多; 与MWT组相比, MKO组LC3荧光点数减少, 分布弥散, 密集程度

降低(图7)。Western blot 结果表明,与SWT组(0.206 ± 0.049)和SKO组(0.186 ± 0.061)相比,MWT组(0.590 ± 0.117)和MKO组(0.382 ± 0.089)LC3 II/LC3 I的比值均升高($P < 0.05$);且MKO

组低于MWT组($P < 0.05$)。提示PINK1基因敲除新生小鼠在缺氧缺血后24 h脑组织自噬指标LC3 II/LC3 I比值明显下降(图8)。

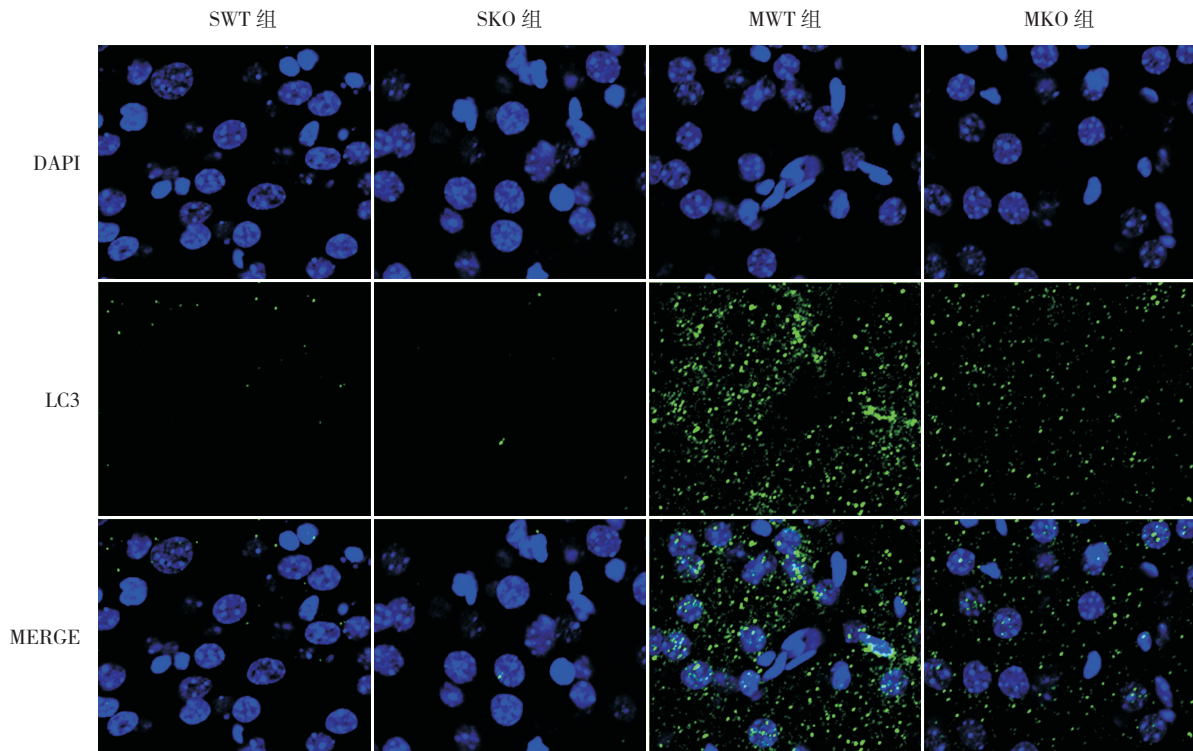


图7 各组脑组织自噬相关蛋白LC3表达(免疫荧光, $\times 400$) SWT组和SKO组LC3荧光点数很少;MWT组和MKO组LC3荧光点数明显增多;MKO组LC3荧光点数及聚集程度较MWT组减少。

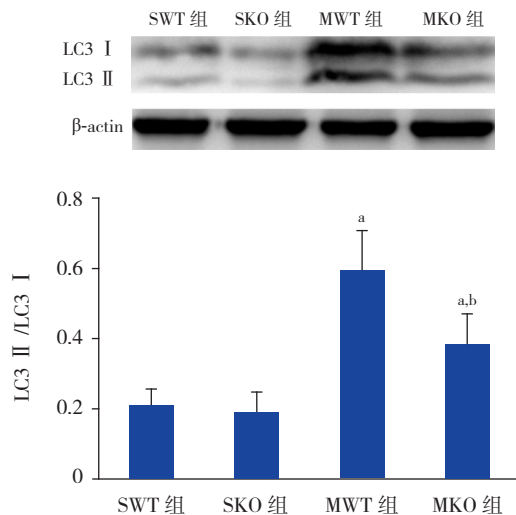


图8 Western blot检测各组脑组织自噬相关蛋白LC3表达 上图为电泳条带图,下图为统计图($n=9$),a示与SWT组和SKO组比较, $P < 0.05$;b示与MWT组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

细胞凋亡是缺氧缺血时脑损伤的重要机制之一,减少caspase-3表达或增加Bcl-2表达等抗凋亡手段均能对缺氧缺血性脑损伤起到保护作用^[1]。PINK1是最早在遗传性帕金森病的筛查中发现的突变基因位点^[17]。目前研究认为PINK1能够通过调节线粒体自噬调节细胞凋亡^[9-11]。本研究发现,野生型和基因敲除型假手术组小鼠之间凋亡指标无差异,说明PINK1基因敲除后不会诱发正常脑组织的细胞发生凋亡。与假手术组小鼠相比,缺氧缺血小鼠脑组织发生大量细胞凋亡,是缺氧缺血脑损伤细胞死亡的重要途径。敲除PINK1可以明显降低脑组织细胞凋亡的发生。我们推测敲除PINK1基因后,线粒体膜蛋白发生改变,线粒体

损伤介导的细胞凋亡途径被抑制,从而抑制了细胞凋亡的发生。

无论是局灶性缺血还是全脑缺血动物模型中^[2-3],缺氧缺血均能激活脑组织细胞自噬。Puyal等^[2]发现在新生大鼠短暂性大脑中动脉闭塞模型中,缺血核心区自噬体指标LC3 II水平在再灌注后2 h开始升高,并持续至24 h,电子显微镜下观察可见大量自噬体的形成。不同的研究结果表明,在缺氧缺血性脑损伤中,自噬激活的程度和持续时间不同,对脑组织的作用存在差异。在正常情况下及轻度缺氧缺血时,存在一定水平的自噬维持细胞稳态;而在严重缺氧缺血状态下,自噬被过度激活促进细胞死亡^[6-7]。本研究发现,野生型和基因敲除型假手术组小鼠之间自噬指标无差异,说明PINK1基因敲除后不会激活正常脑组织的细胞自噬。与假手术组小鼠比较,缺氧缺血小鼠脑组织自噬明显被激活,而过度的自噬导致脑组织损伤加重。与野生模型组相比,PINK1基因敲除模型组脑组织LC3荧光点数分布弥散,点状聚集减少,密集程度降低;LC3蛋白表达减弱,同时LC3 I向LC3 II的转化也减少,说明敲除PINK1可明显抑制细胞自噬水平。我们推测敲除PINK1后,由于线粒体外膜缺乏PINK1蛋白,细胞自噬的识别反应受到干扰,抑制了细胞自噬的发生。本研究发现了PINK1在HIBD模型中对细胞自噬及细胞凋亡的影响,但具体的分子机制尚需进一步阐明。本研究初步揭示抑制PINK1对新生10日龄小鼠缺血缺氧脑损伤可能具有神经保护作用,为HIE治疗提供了新思路。

[参 考 文 献]

- [1] Dixon BJ, Reis C, Ho WM, et al. Neuroprotective strategies after neonatal hypoxic ischemic encephalopathy[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(9): 22368-22401.
- [2] Puyal J, Vaslin A, Mottier V, et al. Postischemic treatment of neonatal cerebral ischemia should target autophagy[J]. *Ann Neurol*, 2009, 66(3): 378-389.
- [3] Wang JY, Xia Q, Chu KT, et al. Severe global cerebral ischemia-induced programmed necrosis of hippocampal CA1 neurons in rat is prevented by 3-methyladenine: a widely used inhibitor of autophagy[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2011, 70(4): 314-322.
- [4] Deas E, Plun-Favreau H, Wood NW. PINK1 function in health and disease[J]. *EMBO Mol Med*, 2009, 1(3): 152-165.
- [5] Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12(1): 9-14.
- [6] Springer W, Kahle PJ. Regulation of PINK1-Parkin-mediated mitophagy[J]. *Autophagy*, 2011, 7(3): 266-278.
- [7] Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging[J]. *Science*, 2011, 333(6046): 1109-1112.
- [8] Su Z, Yang Z, Xu Y, et al. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis[J]. *Mol Cancer*, 2015, 14: 48.
- [9] Lalaoui N, Lindqvist LM, Sandow JJ, et al. The molecular relationships between apoptosis, autophagy and necroptosis[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 39: 63-69.
- [10] Wu HJ, Pu JL, Krafft PR, et al. The molecular mechanisms between autophagy and apoptosis: potential role in central nervous system disorders[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2015, 35(1): 85-99.
- [11] Niemi NM, MacKeigan JP. Mitochondrial phosphorylation in apoptosis: flipping the death switch[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 19(6): 572-582.
- [12] Mizumura K, Cloonan SM, Nakahira K, et al. Mitophagy-dependent necroptosis contributes to the pathogenesis of COPD[J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(9): 3987-4003.
- [13] Nakanishi N, Tu S, Shin Y, et al. Neuroprotection by the NR3A subunit of the NMDA receptor[J]. *J Neurosci*, 2009, 29(16): 5260-5265.
- [14] Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, et al. A semiautomated method for measuring brain infarct volume[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1990, 10(2): 290-293.
- [15] Satoh J, Motohashi N, Kino Y, et al. LC3, an autophagosome marker, is expressed on oligodendrocytes in Nasu-Hakola disease brains[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2014, 9: 68.
- [16] Xiong T, Qu Y, Mu D, et al. Erythropoietin for neonatal brain injury: opportunity and challenge[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2011, 29(6): 583-591.
- [17] Scarffe LA, Stevens DA, Dawson VL, et al. Parkin and PINK1: much more than mitophagy[J]. *Trends Neurosci*, 2014, 37(6): 315-324.

(本文编辑: 万静)