

论著·实验研究

Caspase-3, -8, -9 在铜诱导大鼠原代皮层 神经元凋亡中的作用研究

焦先婷¹, 刘晓青², 黄丽素¹, 张拥军¹, 韩连书²

(1. 上海交通大学医学院附属新华医院; 2. 上海市儿科医学研究所, 上海 200092)

[摘要] **目的** 通过建立体外铜诱导神经元模型, 观察醋酸铜对大鼠原代皮层神经元凋亡及活化 caspase-3, caspase-8 和 caspase-9 蛋白表达的影响, 探索高浓度铜导致大鼠神经元损伤的作用机制。**方法** 采用不同浓度 (20, 40, 80 μM) 醋酸铜诱导体外培养 72 h 的大鼠原代皮层神经元; MTT 法检测神经元活力, Hoechst33258 染色和流式 Annexin-V/PI 法检测神经元凋亡, Western blot 法检测不同浓度和时间点活化的 caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 蛋白表达。**结果** 体外培养的原代皮层神经元经醋酸铜诱导 48 h 后, 凋亡率上升, 细胞活力呈浓度梯度下降, 活化的 caspase-8 和 caspase-9 在铜诱导 4 h 20 μM 组开始升高, 48 h 各浓度组表达最高, 呈时间与浓度梯度依赖; 活化 caspase-3 在铜诱导 24 h 20 μM 组才开始升高, 激活的时间晚于 caspase-8 和 caspase-9, 48 h 各浓度组表达最高。**结论** 过量铜可导致体外培养大鼠原代皮层神经元发生凋亡, caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 级联反应在铜诱导皮层神经元凋亡过程中发挥重要调控作用。 [中国当代儿科杂志, 2009, 11 (11): 917-922]

[关键词] 铜; 神经元; 半胱氨酸天冬氨酸酶-3; 半胱氨酸天冬氨酸酶-8; 半胱氨酸天冬氨酸酶-9; 大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)11-0917-06

Role of caspase-3, -8, and -9 in apoptosis of copper-induced primary cortical neurons

JIAO Xian-Ting, LIU Xiao-Qing, HUANG Li-Su, ZHANG Yong-Jun, HAN Lian-Shu. Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092, China (Liu X-Q, Email: xqliu@sh163.com)

Abstract: Objective This study aimed to investigate the mechanism of primary cortical neuron injury induced by high concentrations of copper by observing the effect of aceticum culture-medium on apoptosis of rat primary cortical neurons and expression of cleaved caspase-3, caspase-8 and caspase-9. **Methods** Primary cortical neurons were cultured for 72 hrs and then exposed to different concentrations of aceticum culture-medium (20, 40 and 80 μM). The viability of neurons was detected by the MTT method. Apoptosis was observed by Hoechst33258 and flow cytometry Annexin-V/PI. Expression of caspase-3, caspase-8 and caspase-9 was measured by Western blot. **Results** Following incubation with aceticum culture-medium, apoptosis of neurons was induced. The viability of neurons was remarkably reduced and the rate of apoptosis was tremendously increased in a concentration-dependent manner. Caspase-8 and caspase-9 were activated in 20 μM of copper aceticum culture-medium 4 hrs after incubation and peaked at 48 hrs in various concentrations of copper aceticum culture-medium, presenting with a time and concentration-dependent manner. The activated caspase-3 was observed in 20 μM of copper aceticum culture-medium 24 hrs after incubation, which was later than the activated caspase-8 and caspase-9. Caspase-3 expression reached a peak 48 hrs in various concentrations of copper aceticum culture-medium, presenting with a time and concentration-dependent manner. **Conclusions** The apoptosis of primary cortical neurons can be induced by copper. Caspase-3, caspase-8 and caspase-9 cascade reaction may involve in the apoptosis of copper-induced rat primary cortical neurons. [Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11 (11): 917-922]

Key words: Copper; Neuron; Caspase-3; Caspase-8; Caspase-9; Rats

肝豆状核变性(WD)是铜代谢异常的常染色体隐性遗传病, 由于铜沉积的部位不同临床表现也复杂多样, 以肝、脑、肾、角膜等多脏器损害为特征, 首发症状以神经系统表现者约占 50%^[1], 其病理改变主要包括大脑神经元丢失、空洞形成和胶质细胞增

生等, 然而铜是如何导致神经系统病变的确切机制尚不十分清楚。由于铜是机体的必要元素之一, 同时又是一种强氧化剂, 过量铜可诱发机体的氧化应激反应^[2], 启动体内的凋亡信号通路, 如释放的CytC 可通过触发 caspase (半胱氨酸天冬氨酸酶) 级

[收稿日期] 2009-05-06; [修回日期] 2009-06-23

[基金项目] 上海市科委基础重点课题(08jc08144)。

[作者简介] 焦先婷, 女, 硕士研究生, 医师。主攻方向: 小儿神经遗传代谢疾病基础与临床。

[通讯作者] 刘晓青, 女, 主任医师, 上海市控江路 1665 号上海市儿科医学研究所, 邮编: 200092。

联反应引起继发性核酸内切酶活化来启动多条凋亡信号转导途径,caspase 家族引发的级联反应是细胞凋亡过程的中心环节,参与许多类型细胞的凋亡过程,在一些神经变性疾病的发生过程中起到一定作用^[3]。目前关于铜暴露对肝脏的研究较多^[4],而对神经元损伤的研究较少。本研究利用体外培养大鼠原代皮层神经元为模型,加入铜离子模拟大脑的高铜环境,探索铜沉积是否激活 caspase-3, caspase-8 和 caspase-9 蛋白的表达,为探索 WD 的神经系统发病机制提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 孕 15 d Sprague-Dawley (SD) 大鼠,清洁级,购自上海西普尔-必凯实验动物公司。动物生产许可证号: SCXK (沪) 2008-0016; 动物使用许可证: SYXK (沪) 2008-0052。

1.1.2 主要试剂 Neurobasal 培养基和 B27 培养基添加剂 (Gibco 公司); 兔抗大鼠 caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 多克隆抗体 (Calbiochem 公司); 兔抗大鼠 MARP₂ 和 GFAP 单克隆抗体 (上海碧云天公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠原代皮层神经元培养 解剖孕 15 d SD 大鼠,取出胎鼠,分离大脑皮层,剪成匀浆样,加入含 B27 的神经元培养基。用吸管反复轻吹打,得到细胞悬液,以 5×10^4 个细胞/mL (形态学观察) 或 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个细胞/mL (生化实验),接种于 0.05% 左旋多聚赖氨酸包被的培养皿中培养。

1.2.2 神经元纯度鉴定 放有载玻片的神经元培养 72 h,用 PBS 洗涤细胞,4% 多聚甲醛固定,10% FBS 封闭,同时加入单克隆 MAP₂ (1:100) 和 GFAP 一抗 (1:100) 4℃ 过夜,分别标记神经元和胶质细胞,PBS 洗 3 次,二抗 (FITC 标记) (1:200) 室温孵育 30 min,免疫荧光方法鉴定,显微镜下观察。

1.2.3 神经元形态观察 对培养 3 d 的皮层神经元,随机分为 4 组:正常对照组和分别加入终浓度为 20、40 和 80 μM 浓度的醋酸铜诱导组,培养 48 h 后终止,置于倒置相差显微镜下进行观察。

1.2.4 神经元活力鉴定 对培养 3 d 的皮层神经元,随机分为 8 组:正常对照组和分别加入终浓度为 2、20、40、80、160、240 和 320 μM 浓度的醋酸铜诱导组,培养 48 h 后终止,采用 MTT 比色法进行细胞活力检测,每孔加入 MTT (终浓度 0.5 mg/mL),每组设

6 个复孔,正常对照组加入等体积的 PBS,重复 3 次; 37℃ 孵育 4 h 后,加入 150 μL DMSO 振荡 10 min,充分溶解结晶物,用酶标仪测定 490 nm 处吸光度值 (OD_{490}),并按下列公式计算细胞活力:细胞活力 = (实验组平均 OD_{490} / 正常对照组平均 OD_{490}) $\times 100\%$ 。

1.2.5 Hoechst 33258 检测凋亡 对培养 3 d 的皮层神经元,随机分为 4 组:正常对照组和分别加入终浓度为 20、40 和 80 μM 浓度的醋酸铜诱导组,培养 48 h 后终止,分别加入 Hoechst 33258 染色,终浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$,37℃ 孵育 7 ~ 10 min,PBS 轻柔冲洗 3 次,Hoechst 33258 用光波波长为 352 nm 激发,产生蓝色荧光,重复 3 次。

1.2.6 流式 Annexin-V/PI 检测凋亡 对培养 3 d 的皮层神经元,随机分为 4 组:正常对照组和分别加入终浓度为 20、40 和 80 μM 的醋酸铜诱导组,培养 48 h 后终止;采用流式 Annexin-V/PI 法,胰酶消化神经元成单细胞,以 1:4 稀释 binding buffer 调整细胞密度为 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 。取 195 μL 细胞悬液加入 5 μL Annexin-V-FITC,室温孵育 10 min,洗细胞 3 次后,再重悬细胞于 190 μL binding buffer,加入 10 μL PI,室温孵育 10 min,流式细胞仪检测细胞凋亡,重复 3 次。

1.2.7 活化的 caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 蛋白表达的检测 对培养 3 d 的神经元,随机分为正常对照组和终浓度分别为 20、40 和 80 μM 的醋酸铜诱导组,每组诱导时间再分为 4 h、12 h、24 h 和 48 h 4 个时间点,各相应时间点后收集蛋白;采用 Western blot 方法,取细胞总蛋白抽提液,以 10% 的聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳分离,分别用 caspase-3、caspase-8 和 caspase-9 抗体 (1:1 000 ~ 2 000) 4℃ 孵育过夜,再与 HRP 标记的山羊抗兔 IgG (1:10 000) 反应后,X 线底片曝光显影。结果用图像处理仪进行灰度扫描分析,并以稳定表达的基因 β -Tublin 作为内参照。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.5 软件,所有数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组之间采用单因素方差分析 (ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 神经元培养及纯度鉴定

对培养 3 d 的原代皮层神经元,采用 MAP2 和 GFAP 免疫荧光方法鉴定神经元纯度为 95% 以上 (图 1)。

2.2 神经元形态观察

在倒置相差显微镜下,正常神经元胞体呈圆形,边缘光滑,突起之间相互连接,随着诱导铜浓度的增大,神经元边界逐渐塌陷,突起渐缩短(图2)。

2.3 神经元细胞活力

运用 MTT 比色法对醋酸铜诱导下神经元的活力进行检测:正常对照组和终浓度分别为 2、20、40、80、160、240 和 320 μM 醋酸铜诱导组的 OD_{490} 分别为 0.74 ± 0.03 、 0.65 ± 0.02 、 0.54 ± 0.03 、 0.48 ± 0.04 、 0.39 ± 0.05 、 0.26 ± 0.06 、 0.20 ± 0.07 和 0.14 ± 0.05 ,铜诱导组的 OD 值随诱导铜浓度增加而逐渐下降,两两比较,差异有显著性($P < 0.01$)(图3)。

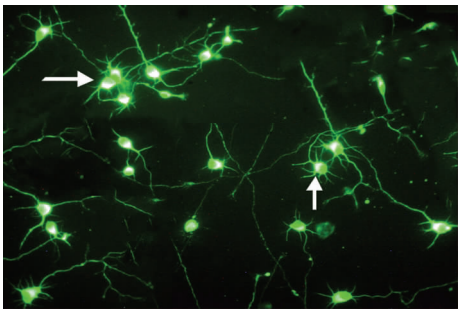


图1 体外培养原代皮层神经元纯度鉴定(FITC × 200, 荧光显微镜) 箭头所示为 MAP2 染色阳性的神经元,胞体呈圆形,折光性强,周围有生长光晕,有双极或三极或者多极突起,突触细而均匀长度超过两倍胞径。

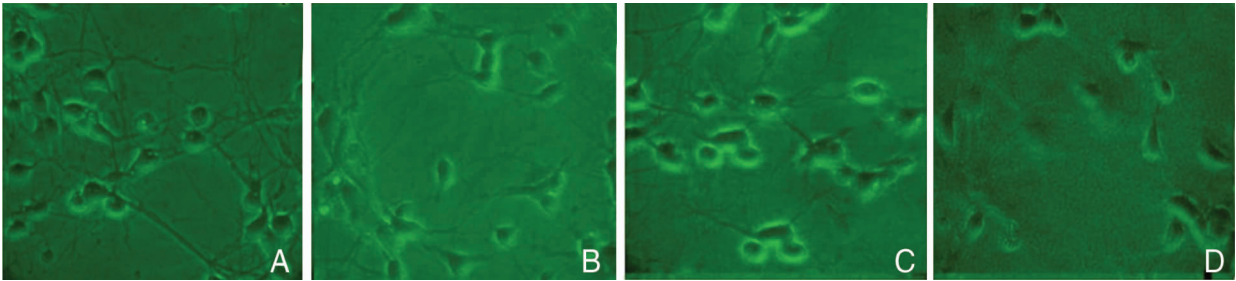


图2 铜诱导皮层神经元形态观察(×200,倒置相差显微镜) A:正常对照组,神经元胞体呈圆形,边缘光滑,突起之间相互连接;B:20 μM 醋酸铜诱导组,可见神经元边界逐渐塌陷,突起渐缩短;C:40 μM 醋酸铜诱导组,可见神经元胞体呈椭圆形,突起缩短;D:80 μM 醋酸铜诱导组,可见神经元突起明显缩短。

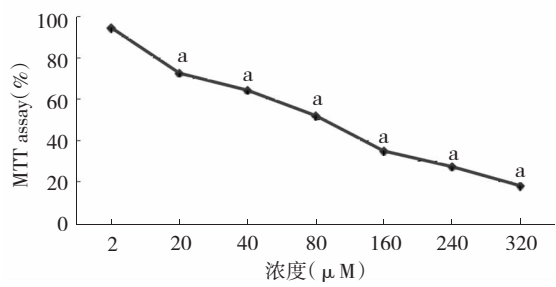


图3 MTT 法检测铜对神经元活力的影响 (a:与前一浓度组比较, $P < 0.01$)

2.4 神经元凋亡

Hoechst 33258 染色进行凋亡检测(图4),在荧光显微镜下,正常的细胞核成蓝色,而凋亡细胞的核会呈致密浓染,或呈碎块状致密浓染,颜色有些发白。随着诱导铜浓度的增加,呈致密浓染碎块状核的神经元逐渐增加,80 μM 组中致密碎块状核占到了接近一半;流式 Annexin-V/PI 法检测发现(图5):正常对照组、20 μM 、40 μM 和 80 μM 浓度组神经元的凋亡率分别是 $(4.6 \pm 1.3)\%$ 、 $(7.7 \pm 0.7)\%$ 、 $(13.2 \pm 1.1)\%$ 和 $(22.0 \pm 3.7)\%$,凋亡率与铜浓度呈正相关($P < 0.01$)。

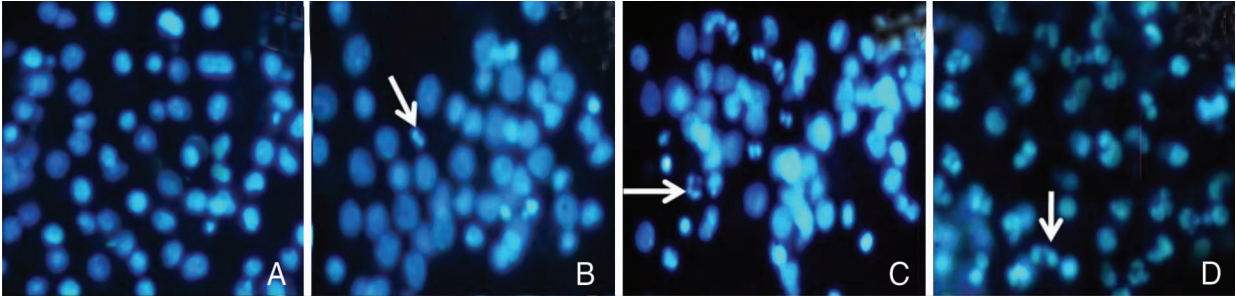


图4 铜诱导神经元凋亡的 Hoechst 33258 检测(×200, 荧光显微镜) A:正常对照组,神经元的核染成蓝色,形态均匀;B:20 μM 醋酸铜诱导组,可见致密浓染的细胞核(箭头所示);C:40 μM 醋酸铜诱导组,致密浓染和破碎的细胞核增多(箭头所示);D:80 μM 醋酸铜诱导组,可见明显增多的致密浓染和破碎的细胞核(箭头所示)。

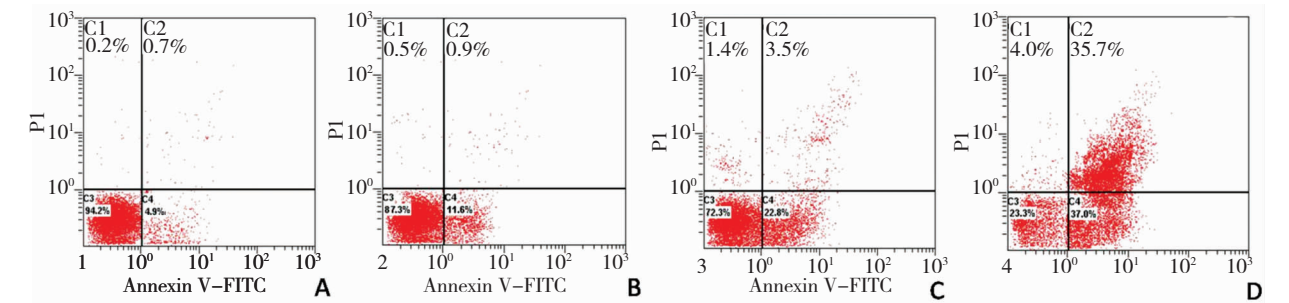


图 5 醋酸铜诱导神经元凋亡的 Annexin/PI 法检测 A: 正常对照组神经元的凋亡率, 可见少量的神经元自发性凋亡; B: 20 μM 醋酸铜诱导组, 可见凋亡率较对照组升高; C: 40 μM 醋酸铜诱导组, 神经元的凋亡率逐渐升高; D: 80 μM 醋酸铜诱导组, 凋亡率明显增多。

2.5 铜诱导神经元相关蛋白的表达

Western blot 检测显示, 在本研究建立的铜诱导神经元模型中, 活化的 caspase-9 (表 1) 在铜诱导 4 h 20 μM 组开始升高, 48 h 各浓度组表达最高, 呈时间与浓度梯度依赖 ($P < 0.05$); 活化的 caspase-8 (表 2) 在铜诱导 4 h 20 μM 组开始升高, 呈时间与浓度

梯度依赖 ($P < 0.05$), 48 h 80 μM 组开始出现下降, 可能与神经元继发性坏死有关; 活化 caspase-3 在铜诱导 24 h 20 μM 组才开始升高, 激活的时间晚于 caspase-8 和 caspase-9, 呈浓度和时间梯度依赖 ($P < 0.05$), 48 h 80 μM 组开始出现下降, 可能与神经元继发性坏死有关 (表 3)。

表 1 Western blot 检测神经元活化 caspase-9 蛋白表达的灰度值 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	铜诱导时间				<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
	4 h	12 h	24 h	48 h		
正常对照(0 μM)组	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.20 ± 0.02	0.42 ± 0.09	205.539	0.000
20 μM 诱导组	0.22 ± 0.01 ^b	0.34 ± 0.01 ^{a,b}	0.54 ± 0.01 ^{a,b}	0.58 ± 0.04 ^{a,b}		
40 μM 诱导组	0.39 ± 0.04 ^b	0.58 ± 0.20 ^{a,b}	0.76 ± 0.12 ^a	0.78 ± 0.07 ^b		
80 μM 诱导组	0.53 ± 0.20 ^b	0.77 ± 0.30	0.99 ± 0.32 ^b	1.12 ± 0.03 ^b		
<i>F</i> 值	180.858	25.513	21.451	73.397		
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000		

a: 与同组前一时间点比较, $P < 0.05$; b: 与前一浓度组比较, $P < 0.05$

表 2 Western blot 检测神经元活化 caspase-8 蛋白表达的灰度值 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	铜诱导时间				F 值	P 值
	4 h	12 h	24 h	48 h		
正常对照(0 μM)组	0.01 $\pm$ 0.00	0.08 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.01	0.23 $\pm$ 0.05		
20 μM 诱导组	0.03 $\pm$ 0.01 ^b	0.11 $\pm$ 0.02	0.34 $\pm$ 0.21	0.48 $\pm$ 0.09 ^b	7.590	0.001
40 μM 诱导组	0.05 $\pm$ 0.02 ^b	0.23 $\pm$ 0.09 ^b	0.37 $\pm$ 0.20 ^b	0.49 $\pm$ 0.08 ^{a, b}	6.507	0.001
80 μM 诱导组	0.19 $\pm$ 0.03 ^b	0.35 $\pm$ 0.03 ^{a, b}	0.58 $\pm$ 0.03 ^{a, b}	0.39 $\pm$ 0.02 ^a	69.381	0.000
F 值	65.219	18.031	5.98	3.757		
P 值	0.000	0.001	0.019	0.060		

a: 与同组前一时间点比较, $P < 0.05$; b: 与前一浓度组比较, $P < 0.05$

表 3 Western blot 检测神经元活化的 caspase-3 蛋白表达的灰度值 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	铜诱导时间		<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
	24 h	48 h		
正常对照(0 μM)组	0.31 ± 0.01	0.65 ± 0.04		
20 μM 诱导组	0.43 ± 0.02 ^b	0.84 ± 0.03 ^{a,b}	18.513	0.000
40 μM 诱导组	0.73 ± 0.03 ^b	1.49 ± 0.07 ^{a,b}	17.993	0.000
80 μM 诱导组	0.96 ± 0.04 ^b	1.22 ± 0.02 ^b	9.122	0.000
<i>F</i> 值	299.684	233.249		
<i>P</i> 值	0.000	0.000		

a: 与同组前一时间点比较, $P < 0.05$; 与前一浓度组比较, $P < 0.05$

3 讨论

WD 是铜代谢异常的遗传性疾病, 临床特点以肝病变、神经系统 (尤其是基底节变性)、角膜色素环 (K-F 环) 和肾脏损害为主。过量铜在中枢神经系统的沉积是引起神经、精神症状的主要原因, 但铜沉积导致神经系统损伤的机制目前还不清楚。铜是机体内一系列具有生物活性酶的必要元素之一, 如: Cu/Zn 超氧化物歧化酶 (SOD), 细胞色素 C 氧化酶

(Cyt C),铜蓝蛋白(Cp)等。而游离铜是一种强氧化剂,能够激活自由基的活性,促进细胞内活性氧的产生,因而诱发一系列的氧化应激反应,相继通过胞膜和胞内等多种途径介导细胞凋亡或坏死。Saito等^[5]通过免疫组化和共聚焦显微镜技术在大鼠脑组织中发现Cu/Zn超氧化物歧化酶(SOD)、多巴胺-β羟化酶等选择性沉积在海马组织、小脑和大脑皮层等部位,其产生的毒性作用可导致大脑神经元丢失、空洞形成和胶质细胞增生等。Reddy等^[6]研究发现铜可通过氧化应激和硝基反应导致神经元和胶质细胞的死亡。

正常脑实质中铜的生理浓度约70 μM,WD患者脑受累区中铜的浓度高达约1 300 μM。而Sheline等^[7]在体外研究铜的神经毒性作用时发现20 μM铜就通过调节氧自由基而导致神经元死亡,而此浓度时胶质细胞还未受到影响,这是可能由于在体外单一培养的神经元缺少胶质细胞如星形细胞、少突胶质细胞和室管膜细胞的支持,Tiffany-Castiglioni等^[8]报道在大脑中星形细胞可以充当重要的金属储存作用,对铜内环境稳态发挥重要的作用。因此本研究通过体外培养大鼠原代皮层神经元,加入不同浓度铜建立体外铜诱导神经元模型,模拟WD患者大脑的高铜环境,研究发现皮层神经元经醋酸铜诱导后,神经元的形态发生改变,活力降低,凋亡率明显升高,且呈现浓度梯度依赖,结果表明过量铜可诱导原代皮层神经元发生凋亡,这与Reddy等^[6]的研究结果一致。提示皮层神经元的凋亡可能是WD患者大脑神经元损伤的机制之一,而铜诱导神经元凋亡的机制需要进一步探讨。

Kawakami等^[9]通过Western blot和RT-PCR技术研究发现铜可通过Bax、Bad、caspase-9及caspase-3导致PC12细胞的凋亡。caspase家族引发的级联反应是细胞凋亡过程的中心环节,在中枢神经系统疾病的发病机制中起着重要作用,其激活途径主要包括:(1)线粒体依赖途径:当凋亡起始信号作用于线粒体后,引起线粒体释放CytC,CytC通过触发caspase级联引起继发性核酸内切酶活化来启动多条凋亡信号转导途径,CytC从线粒体释放引起线粒体依赖的caspase引起的神经元凋亡过程激活,结合并活化胞浆蛋白凋亡活化因子,导致caspase-9自身剪切活化^[10]。在本研究中,caspase-9在不同浓度醋酸铜诱导4 h 20 μM组就开始被激活,48 h达到最高峰,且表现出浓度梯度依赖,此结果提示过量铜可通过线粒体途径介导体外培养皮层神经元的凋亡。同时活化的caspase-9进一步激活其下游caspase-3、

caspase-6和caspase-7。caspase-3是细胞凋亡的主要效应子^[11],激活后作用于特异性的凋亡底物,导致细胞凋亡。在本研究建立的铜诱导模型中发现活化的caspase-3在醋酸铜诱导24 h 20 μM组才开始升高,48 h达到最高点,而80 μM组开始出现下降,这可能与细胞的继发性坏死有关,同时证明了caspase-3的活化有赖于caspase-9的激活,充当凋亡的执行因子,caspase-3在被激活后,经过多种细胞因子的相互作用,降解作用底物,激活脱氧核糖核酸酶,裂解DNA,或者水解细胞骨架调节蛋白,使催化结构和调节结构分离,从而丧失调节功能,细胞骨架塌陷,导致细胞凋亡的发生。研究表明,当铜结合于凋亡抑制基因XIAP(一种caspase抑制剂)时,使得XIAP发生可逆性构象改变,从而降低了铜结合到caspase-3的水平,此结果在降低凋亡阈值,使细胞对凋亡更加敏感等方面有重要作用^[12]。(2)死亡受体介导的信号传导途径:最具代表性的死亡受体是CD95,是一种跨膜受体蛋白,通过与细胞内的接头蛋白FADD(Fas-associated death domain)和procaspase-8结合,最后共同形成死亡诱导信号复合物(death inducing signaling complex,DISC),DISC形成后,可诱导procaspase-8自身激活,活化的caspase-8则进一步激活下游的caspase-3^[13]。本研究中caspase-8在醋酸铜诱导4 h 20 μM组开始被激活,呈时间和浓度梯度依赖,48 h到达最高点,其结果提示在铜诱导神经元凋亡过程中活化的caspase-8和caspase-9被同时检测到,通过一系列的细胞因子反应导致caspase-3的激活,最后导致神经元的凋亡。因此,说明在铜诱导的皮层神经元凋亡中,通过线粒体和死亡受体的caspase级联反应都扮有重要的作用。但线粒体通路和死亡受体通路两者的优先次序或者相互机制仍需要进一步研究。

WD的中枢神经系统损伤机制错综复杂,本研究结果显示,过量铜可导致诱导体外培养的皮层神经元发生凋亡;caspase-3、caspase-8和caspase-9蛋白表达的改变则证实了caspase级联反应在铜诱导原代皮层神经元凋亡过程中起到了重要作用,但仍尚不足以完全解释复杂的神经元凋亡过程,而如何早期干预铜沉积,提高该病患者中枢神经系统抵御氧化应激损伤能力,将可能成为预防和治疗肝豆状核变性神经系统症状的一种有效途径,为疾病的防治提供新思路。

[参 考 文 献]

[1] Benhamla T, Tirouche YD, Abaoub-Germain A, Theodore F. The

onset of psychiatric disorders and Wilson's disease[J]. *Encephale*, 2007, 33(6):924-932.

[2] Desai V, Kaler SG. Role of copper in human neurological disorders[J]. *Am J Clin Nutr*, 2008, 88(3):855S-8S.

[3] Grutter MG. Caspases: key players in programmed cell death[J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2000, 10(6):649-655.

[4] 万小华,罗小平. 铜对大鼠肝细胞凋亡的影响以及姜黄素的保护作用[J]. *中国当代儿科杂志*, 2007, 9(6):567-570.

[5] Saito T, Okabe M, Hosokawa T, Kurasaki M, Hata A, Endo F, et al. Immunohistochemical determination of the Wilson Copper-transporting P-type ATPase in the brain tissues of the rat[J]. *Neurosci Lett*, 1999, 266(1):13-16.

[6] Reddy PV, Rao KV, Norenberg MD. The mitochondrial permeability transition, and oxidative and nitrosative stress in the mechanism of copper toxicity in cultured neurons and astrocytes [J]. *Lab Invest*, 2008, 88(8): 816-830.

[7] Sheline CT, Choi EH, Kim-Han JS. Cofactors of mitochondrial enzymes attenuate copper-induced death in vitro and in vivo[J]. *Ann Neurol*, 2002, 52(2):195-204.

[8] Tiffany-Castiglioni E, Guerri C, Aschner M, Matsushima GK, O'callaghan JP, Streit WJ. Roles of glia in developmental neurotoxicity: session VI summary and research needs[J]. *Neurotoxicology*, 2001, 22(5): 567-573.

[9] Kawakami M, Inagawa R, Hosokawa T, Saito T, Kurasaki M. Mechanism of apoptosis induced by copper in PC12 cells[J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46(6):2157-2164.

[10] Jiang X, Wang X. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(40):31199-31203.

[11] Stennicke HR, Jurqensmeier JM, Shin H, Deveraux Q, Wolf BB, Yang X, et al. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(42):27084-27090.

[12] Mufti AR, Burstein E, Csomos RA, Graf PC, Wilkinson JC, Dick RD, et al. XIAP is a copper binding protein deregulated in Wilson's disease and other copper toxicosis disorders[J]. *Mol Cell*, 2006, 21(6):775-785.

[13] Micheau O, Thome M, Schneider P, Holler N, Tschopp J, Nicholson DW, et al. The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death inducing signaling complex[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(47):45162-45171.

(本文编辑:王庆红)

· 消息 ·

2010 年湘雅儿科国际论坛征文通知

中南大学湘雅医院、湘雅二医院、湘雅三医院及中国当代儿科杂志社将于 2010 年 4 月 16 ~ 18 日在湖南长沙联合举办“2010 年湘雅儿科国际论坛”。本次论坛将邀请国际知名大学专家及国内各专业知名教授 10 余名,围绕目前儿科专业研究进展及热点问题进行专题讨论。本次论坛为与会者提供一个相互学习切磋的平台,是一次极好的同行专家交流的机会,特向全国征文。热忱欢迎全国同仁积极投稿。适宜刊登的稿件优先在中国当代儿科杂志上发表。现将征文的有关注意事项通知如下:

征文内容:包括儿科各个专业临床与基础方面的最新研究成果、研究动向;新技术、新进展以及临床治疗方面的经验与改进。

征文要求:文章要求为未公开发表过的学术论文;内容具有科学性、先进性,数据准确无误;来稿须有 800 字以内的摘要(包括目的、方法、结果、结论),以 Word 格式保存;稿件上务必注明作者姓名、单位、地址、邮编、电话和传真。

投稿方式:请将稿件以 Email 形式发送到 xueshaicha@163.com,邮件主题写“2010 湘雅儿科国际论坛征文”。

截稿日期:2010 年 3 月 31 日。

联系人:中南大学湘雅医院儿科教研室及研究室 李清香老师

手机:13975883165; 电话:0731-84327208; 传真:0731-84327922。