

1-甲基-4-苯基吡啶离子调控线粒体自噬对线粒体氧化应激损伤的影响

马耀华¹, 王雪晶¹, 荆婧¹, 马明明², 杨期东³, 唐北沙³, 滕军放¹

1. 郑州大学第一附属医院神经内科, 河南省郑州市 450052

2. 河南省人民医院神经内科, 河南省郑州市 450003

3. 中南大学湘雅医院神经内科, 湖南省长沙市 410008

摘要:目的 探讨 1-甲基-4-苯基吡啶离子(MPP⁺)诱导线粒体自噬在帕金森病(PD)发病机制中的作用。方法 将细胞分为 MPP⁺ (0 mmol/L) 对照组、MPP⁺ (1 mmol/L) 处理组和 MPP⁺ (2 mmol/L) 处理组, 共同转染 EGFP-LC3 和 RFP-MITO 后加入 MPP⁺ 处理 48 h。Western blot 检测细胞自噬水平的变化, 甲丹磺酸尸胺(MDC)检测自噬空泡聚集, 免疫荧光法检测 EGFP-LC3 和 RFP-MITO 亚细胞共定位, 流式技术检测线粒体膜电位及活性氧。结果 MPP⁺ 1 mmol/L 及 MPP⁺ 2 mmol/L 组 LAMP2A、Beclin1 和 LC3-II/LC3-I 的灰度值与对照组相比均上调, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组相比, MPP⁺ 处理组自噬水平增加, 自噬空泡增加, 外源性 LC3 表达上调, EGFP-LC3 和 RFP-MITO 存在亚细胞共定位。MPP⁺ 1 mmol/L 及 MPP⁺ 2 mmol/L 组线粒体膜电位较对照组降低; MPP⁺ 1 mmol/L 及 MPP⁺ 2 mmol/L 组线粒体活性氧较对照组增加, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 MPP⁺ 通过调控线粒体自噬水平致线粒体氧化应激损伤。

关键词: 帕金森病; 1-甲基-4-苯基吡啶离子; 线粒体自噬; 氧化应激; 线粒体功能障碍

Effect of 1-methyl-4-pehnyl-pyridine regulated mitochondrial autophagy on mitochondrial oxidative stress injury

MA Yao-Hua, WANG Xue-Jing, JING Jing, MA Ming-Ming, YANG Qi-Dong, TANG Bai-Sha, TENG Jun-Fang. Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China. Corresponding author: TENG Jun-Fang, Email: tjf.6666@yahoo.com.cn.

Abstract: Objective To investigate the role of 1-methyl-4-pehnyl-pyridine (MPP⁺) regulated mitochondrial autophagy in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Methods** Human neuroblastoma cell lines (SH-SY5Y) were treated with MPP⁺ (0, 1 or 2 mmol/L) for 48 hrs and then were transfected with EGFP-LC3 and RFP-MITO. Expression of LAMP2A, Beclin1 and LC3-II/LC3-I proteins in SH-SY5Y cells was detected by Western blot after MPP⁺ treatment for 48 hrs. Cellular immunofluorescent chemical method was used to observe the change of autophagic vacuolization and the signals of EGFP-LC3 and RFP-MITO, and their subcellular colocalization. The flow cytometry was used to detect the mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species content. **Results** The gray values of LAMP2A, Beclin1 and LC3-II/LC3-I in the 1 mmol/L and 2 mmol/L MPP⁺ treatment groups were significantly increased compared with the control group (0 mmol/L MPP⁺ treatment) ($P < 0.05$). The autophagy levels increased, the number of autophagic vacuolization increased, and expression of exogenous LC3 increased significantly in the two MPP⁺ treatment groups compared with the control group. EGFP-LC3 and RFP-MITO subcellular colocalization was observed in the MPP⁺ treatment groups. Mitochondrial reactive oxygen increased and mitochondrial membrane potential decreased significantly in the two MPP⁺ treatment groups compared with the control group. **Conclusions** MPP⁺ can induce mitochondrial oxidative stress injury through regulating levels of mitochondrial autophagy.

基金项目: 国家自然科学基金(81241046; 81100949)

收稿日期: 2012-10-09; 修回日期: 2012-11-27

作者简介: 马耀华(1986-), 男, 在读硕士, 主要从事脑血管病基础与临床及神经退行性疾病的发病机制研究。

通讯作者: 滕军放(1960-), 男, 主任医师, 硕士, 主要从事脑血管病基础与临床及神经退行性疾病的发病机制研究。Email: tjf.6666@yahoo.com.cn。

Key words: Parkinson's disease; 1-methyl-4-pehnyl-pyridine; mitochondrial autophagy; oxidative stress; mitochondrial dysfunction

线粒体功能障碍被认为是帕金森病 (Parkin's disease, PD) 发病的核心环节之一^[1]。目前研究发现自噬途径参与了 PD 的发病过程, 自噬功能的紊乱所致的自噬应激和细胞死亡及神经变性密切相关^[2, 3]。1-甲基-4-苯基吡啶离子 (1-methyl-4-pehnyl-pyridine, MPP⁺) 可诱导线粒体损伤, 是经典的 PD 细胞模型之一, 它能否通过调控线粒体自噬途径诱导细胞氧化应激损伤尚不明确。本研究发现 MPP⁺ 通过调控线粒体自噬水平导致了线粒体氧化应激损伤, 进一步阐明了 MPP⁺ 的致病机制。

1 材料和方法

1.1 材料

所有仪器设备均由河南省临床重点学科开放实验室提供。

SH-SY5Y 细胞由中南大学唐北沙教授馈赠; EGFP-LC3 和 RFP-MITO 质粒由苏州大学药学院王光辉教授馈赠; DMEM 培养基及新生胎牛血清为美国 GIBCO 公司产品; MPP⁺、Hochest 33258 及 MDC 为美国 Sigma 公司产品; Lipofectamine2000 购自美国 Invitrogen 公司; Western-blot 的 I 抗为兔抗人 LC3 (Eptimics); LAMP2A、Beclin-1 为 Abcam USA 的产品; GAPDH 抗体为 Santa Cruz USA 的产品; 流式细胞学检测试剂盒为杭州碧云天公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和处理 SH-SY5Y 细胞用 15% 的新鲜胎牛血清培养基, 于 37℃, 5% 的 CO₂ 孵箱中培养, 传代时取每孔 1 × 10⁵ 个细胞接种于六孔板中, 取对数生长期细胞进行实验。将细胞分为 MPP⁺ (0 mmol/L) 对照组、MPP⁺ (1 mmol/L) 处理组和 MPP⁺ (2 mmol/L) 处理组, 对照组加入等体积 DMEM 培养基, MPP⁺ 处理细胞 48 h 后收样。

1.2.2 Western-blot 检测 LAMP2A、Beclin1 及 LC3-I 和 LC3-II 蛋白的表达 经 MPP⁺ 处理 48 h 后收集细胞, 经细胞裂解液裂解。各组样品中提取总蛋白 25 μg, 经十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳, 分离蛋白样。将分离胶上的蛋白质转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜, 脱脂牛奶封闭 1 h 后加入兔抗人 LAMP2-A (1:800)、兔抗人 LC3 (1:1000)、兔抗人 Beclin 1 (1:800) 和鼠抗人 GAPDH (1:5000), 4℃ 孵育过夜, 孵育二抗 2 h 后加入 ECL 发光底物, 暗室下 X 线胶片曝光。Western

blot 蛋白条带用 AlphaEaseFC (FluorChem8900) 软件分析图像, 采用平均灰度值比较各组蛋白的表达。

1.2.3 甲丹磺酸尸胺 (monodansylcadaverine, MDC) 染色检测自噬水平的变化 经 MPP⁺ 处理 48 h 后, 去上清, 磷酸盐缓冲液 (1 × PBS) 洗 2 次; 4% 多聚甲醛 1 ml/每孔固定 10 min, 加入终浓度为 50 μmol/L 的 MDC 染色液, 37℃ 温育 60 min 后加入 1 × PBS 洗 3 次, 荧光显微镜下观察。

1.2.4 细胞免疫荧光化学检测自噬及线粒体损伤 将 SH-SY5Y 细胞按 1:4 比例接种至六孔板进行培养, 次日转染, 转染具体操作参考脂质体 Lipofectamine (2000) 说明书进行。共同转染 EGFP-LC3 和 RFP-MITO, 转染 18 h 后加入 MPP⁺, 48 h 后行免疫荧光化学法观察。在荧光倒置显微镜下观察荧光, 各组细胞随即抽取 10 个不相重复的视野观察拍照。

1.2.5 细胞流氏技术检测线粒体膜电位及活性氧 MPP⁺ 处理 48 h 后收集细胞 (在冰上操作), 用 1 × PBS 将六孔板的细胞吹打下来计数, 调细胞浓度为 1 × 10⁶ mmol/L, 取出 100 μl, 加入用无水乙醇溶解的 DeFH-DA (2', 7'-二氯荧光黄双乙酸盐), 终浓度为 20 μmol/L, 37℃ 避光负载 30 min, 1 × PBS 洗 2 次, 流式细胞仪 (BD, 美国, 激发光波长 488 nm) 检测细胞活性氧, 每个样品收集 1 × 10⁴ 个细胞。另取 100 μL 单细胞悬液, 加入 Rhodamine123, 终浓度为 5 mg/L, 37℃ 避光负载 30 min, 用 1 × PBS 洗 2 次, 流式细胞仪检测线粒体膜电位, 每个样品收集 1 × 10⁴ 个细胞。二者均用 cell Quest 软件分析结果。

1.3 统计学处理

实验数据采用均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 所得实验数据用 SPSS 13.0 统计软件行方差分析及 Spearman 相关分析, 多组间比较先进行方差齐性检验, 方差齐者进行方差分析, 方差不齐者进行秩和检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MPP⁺ 对 SH-SY5Y 细胞自噬水平的调控

2.1.1 MPP⁺ 处理后 LAMP2A、Beclin 1 和 LC3-II/LC3-I 的表达 与对照组相比, MPP⁺ 处理组的自噬相关蛋白 LAMP2A、Beclin1 及 LC3-II/LC3-I

的表达明显增高,且随着 MPP⁺ 处理浓度的增加, LAMP2A、Beclin-1 及 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ 的表达进一步增强。见表 1、图 1。

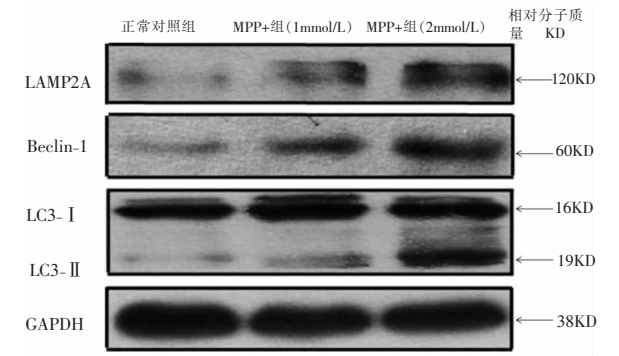


图 1 MPP⁺ 处理 48 h 后 SH-SY5Y 细胞内 LAMP2A、Beclin-1 及 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ 比值的变化。

表 1 不同浓度 MPP⁺ 对 SH-SY5Y 细胞 LAMP2A、Becli-1 和 LC3-Ⅱ 蛋白表达的影响 (灰度比, $\bar{x} \pm s$)

组别	LAMP2A	Beclin1	LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ
对照组	0.184 ± 0.023	0.213 ± 0.025	0.206 ± 0.021
MPP ⁺ (1 mmol/L) 组	0.386 ± 0.035 *	0.351 ± 0.014 *	0.405 ± 0.053 *
MPP ⁺ (2 mmol/L) 组	0.653 ± 0.042 *△	0.757 ± 0.052 *△	0.852 ± 0.062 *△

注: * 为与对照组相比, $P < 0.05$; △ 为与 MPP⁺ (1 mmol/L) 处理组相比, $P < 0.05$ 。

2.2.2 MDC 荧光染色观察自噬空泡聚集 与对照组相比, 1 mmol/L 及 2 mmol/L 浓度 MPP⁺ 处理 SH-SY5Y 细胞 48 h 后, MDC 荧光信号增强, 提示细胞出现大量自噬空泡聚集。且随着 MPP⁺ 浓度的增加, 自噬空泡聚集更加明显, 自噬进一步激活。见图 2。

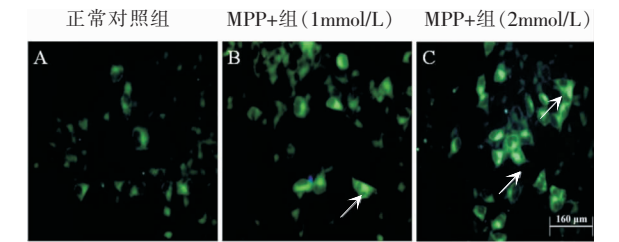


图 2 MPP⁺ 处理后细胞内 AVs (自噬空泡) 的变化, 示 MPP⁺ 处理后自噬空泡聚集明显增加 (白色箭头所示为自噬空泡)。

2.3.3 MPP⁺ 处理后 EGFP-LC3 和 RFP-MITO 的免疫荧光信号及共定位 与对照组相比, MPP⁺ 处理

组 EGFP-LC3 的免疫荧光信号明显增强, 外源性 LC-3 的表达明显上调, 自噬水平上调; 与对照组相比, MPP⁺ 处理组 RFP-MITO 表达减少, 随着 MPP⁺ 浓度的增加, 其表达进一步减少; 且 EGFP-LC3 和 RFP-MITO 存在亚细胞共定位。见图 3。

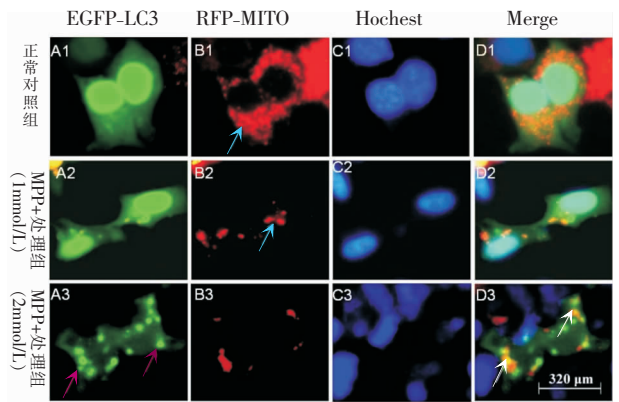


图 3 共同转染 EGFP-LC3 和 RFP-MITO 18 h 后加入 MPP⁺ 处理, 观察 EGFP-LC3 标记的自噬体的结构和分布的改变及 EGFP-LC3 和 RFP-MITO 亚细胞共定位情况 (红色箭头示 GFP-LC3 标记的自噬体; 蓝色箭头示 RFP-MITO 标记的线粒体; 白色箭头示 GFP-LC3 和 RFP-MITO 的亚细胞共定位)。

2.2 MPP⁺ 对 SH-SY5Y 细胞的线粒体损伤

2.2.1 MPP⁺ 对 SH-SY5Y 细胞线粒体膜电位的影响 与对照组相比, 加入 MPP⁺ 后 SH-SY5Y 细胞的线粒体膜电位差明显降低 ($P < 0.05$, 且随 MPP⁺ 浓度的增加, 线粒体膜电位进一步降低 ($P < 0.05$)). 见表 2。

表 2 不同浓度 MPP⁺ 处理 SH-SY5Y 细胞后线粒体膜电位的比较 ($\Delta \Psi_m, \bar{x} \pm s$)

组别	线粒体膜电位
对照组	613 ± 38.8
MPP ⁺ (1 mmol/L) 组	519 ± 51.2 *
MPP ⁺ (2 mmol/L) 组	426 ± 75.7 *△

注: * 为与对照组相比, $P < 0.05$; △ 为与 MPP⁺ (1 mmol/L) 处理组相比, $P < 0.05$ 。

2.2.2 MPP⁺ 对 SH-SY5Y 细胞活性氧的影响 与对照组相比, 加入 MPP⁺ 后 SH-SY5Y 细胞的活性氧明显升高 ($P < 0.05$), 且随着 MPP⁺ 浓度的增加, 细胞内活性氧含量进一步增高 ($P < 0.05$)). 见表 3。

表3 不同浓度 MPP⁺ 处理 SH-SY5Y 细胞后活性氧含量的比较
(DCF 荧光强度, $\bar{x} \pm s$)

组别	活性氧
对照组	63.43 ± 8.12
MPP ⁺ (1 mmol/L) 组	89.33 ± 10.32 *
MPP ⁺ (2 mmol/L) 组	112.47 ± 21.12 * [△]

注: * 为与对照组相比, $P < 0.05$; [△] 为与 MPP⁺ (1 mmol/L) 处理组相比, $P < 0.05$ 。

3 讨论

近年研究证实自噬途径异常调控在 PD 的发生、发展过程起着重要的作用^[4, 5]。PD 的发病与线粒体功能障碍、氧化应激和异常蛋白质的聚集等相关,而细胞自噬可能参与了以上病理过程^[6]。经典的自噬根据细胞底物运动到溶酶体腔方式的不同,可以分为大自噬、小自噬和分子伴侣介导的自噬,最近的研究发现还存在线粒体自噬、内质网自噬等特殊类型^[7, 8]。LC3 蛋白是由哺乳动物中酵母 Atg8 基因的同源物编码的蛋白,参与自噬体的形成,分为 LC3-I 和 LC3-II。当细胞内自噬被激活时,LC3-I 经泛素样加工修饰过程,与自噬膜表面的磷脂酰乙醇胺结合,形成 LC3-II 与 LC3-II 结合体并定位于自噬体膜上,其含量的多少与自噬空泡的数目成正比,所以 LC3-II/LC3-I 的比值常用来衡量细胞自噬水平^[9-10]。Beclin1 蛋白是最早发现的酵母菌 Atg6 在哺乳类的同源基因 Beclin1 编码的蛋白,可调控自噬体的形成,引导相关蛋白定位于自噬体膜上,促进自噬水平的上调^[11]。LAMP2A 是参与分子伴侣介导的自噬过程中的关键转膜蛋白, LAMP2A 的表达升高,分子伴侣介导的自噬水平随之增加^[12, 13]。这三种蛋白都常用来检测细胞内自噬水平高低。

线粒体自噬是一种选择性的自噬过程,最早由 Lemasters 于 2005 年提出^[14],主要是指在 ROS、营养缺乏、细胞衰老等刺激下,细胞内的线粒体发生去极化损伤,损伤的线粒体被特异性的包裹进自噬体中,并与溶酶体 (lysosome) 融合,从而完成线粒体损伤的降解,维持细胞内环境的稳定。

以往研究已经证实线粒体功能障碍在 PD 发病机制起着重要的作用,在遗传性 PD 患者的研究中发现有两个基因发生突变,分别是编码线粒体外膜激酶 PINK1 和 E3 泛素连接酶,在果蝇的研究中发现这两个蛋白的突变可通过相同的途径导致线粒体的损伤^[15-17]。Geisler 等^[18] 在 2010 年的一个研究中完整的揭示了 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬

途径在 PD 发生中的作用及其分子机制。PINK1/Parkin 介导的自噬分为两个阶段,即 Parkin 向受损的线粒体转移,形成线粒体聚集体和受损的线粒体最终被自噬途径降解^[19]。PINK1 或 Parkin 的基因突变抑制了线粒体自噬的活性,导致损伤线粒体的清除障碍,被认为是 PD 的发病机制之一。

MPP⁺ 是一种在 PD 研究中广泛应用的神经毒素,可致线粒体功能障碍、氧化应激等最终导致细胞死亡,常用来制备 PD 细胞模型^[20, 21]。但是 MPP⁺ 导致线粒体氧化应激损伤的具体机制尚未完全阐明,我们猜想 MPP⁺ 是否通过线粒体自噬途径导致细胞线粒体损伤及清除障碍。实验结果发现 MPP⁺ 可以诱导 SH-SY5Y 细胞自噬的发生, Western-blot 发现自噬相关蛋白 LAMP2A、Beclin1 及 LC3-II 的表达均明显上调,且随着 MPP⁺ 浓度的升高,上调更加明显,呈现浓度相关性, MDC 结果示细胞内自噬空泡数目明显增加,上述免疫印迹及 MDC 实验结果都验证了 MPP⁺ 可以诱导细胞自噬的发生^[22, 23]。进一步研究证实加入 MPP⁺ 处理后 SH-SY5Y 细胞内的线粒体膜电位降低,活性氧含量增加,线粒体结构形态紊乱,且与加入 MPP⁺ 的浓度成剂量依赖性;从而证实了 MPP⁺ 导致了细胞的线粒体氧化应激损伤。

MPP⁺ 可以上调细胞自噬水平,导致线粒体的靶向损害,两者有何关联? 为此我们进行了进一步的研究:共转染 EGFP-LC3 和 RFP-MITO 后加入 MPP⁺ 处理,发现两者存在亚细胞共定位;加入 MPP⁺ 处理后发现 EGFP-LC3 融合蛋白转位至自噬体膜,自噬被激活,同时发现 RFP-MITO 标记的线粒体结构形态紊乱变小,线粒体发生损伤,而 GFP-LC3 和 RFP-MITO 又存在亚细胞共定位。MPP⁺ 通过激活了细胞内线粒体自噬的水平导致了线粒体氧化应激损伤。细胞内上调线粒体自噬的水平,可以帮助清除损伤的线粒体,维持细胞内环境的稳定;但过度、持续的自噬激活可能导致自噬应激,从而引起细胞的线粒体损伤甚至细胞凋亡^[24]。

由于线粒体功能及结构的复杂性和自噬调控机制的多样性, MPP⁺ 通过怎样的具体分子机制调控线粒体自噬水平仍待我们进行进一步的研究,从而为寻找治疗 PD 干预靶点提供新的理论依据。

参 考 文 献

- [1] Schapira AH. Targeting Mitochondria for Neuroprotection in

- Parkinson's Disease, Antioxid Redox Signal, 2012, 16 (9): 965-973.
- [2] Chu CT. Autophagic stress in neuronal injury and disease. J Neuropathol Exp Neurol, 2006, 65(5): 423-432.
- [3] Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, et al. Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. J Biol Chem, 2003, 278(27): 25009-25013.
- [4] Geisler S, Holmstrom KM, Treis A, et al. The PINK1/Parkin-mediated mitophagy is compromised by PD-associated mutations. Autophagy, 2010, 6(7): 871-878.
- [5] 周生奎,程言博,耿得勤,等. 神经细胞自噬与帕金森病的研究进展. 中华行为医学与脑科学杂志, 2010, 19(7): 60-62.
- [6] Lynch-Day MA, Mao K, Wang K, et al. The role of autophagy in Parkinson's disease. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012, 2(4): 258-262.
- [7] 周生奎,程言博,耿润潼,等. 6-羟基多巴胺致 PC12 细胞损伤机制中自噬的影响. 中华行为医学与脑科学杂志, 2011, 20: 312-314.
- [8] 潘婕,汪敬业,罗本燕. 自噬与神经系统疾病研究进展. 国际神经病学神经外科学杂志, 2009, 36(6): 538-541.
- [9] Kondo Y, Kondo S. Autophagy and cancer therapy. Autophagy, 2006, 2(2): 85-90.
- [10] Liang XH, Jackson S, Seaman M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin1. Nature, 1999, 402(6762): 672-676.
- [11] Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. Science, 2004, 306(5698): 990-995.
- [12] Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. Science, 2000, 290(5497): 1717-1721.
- [13] Cuervo AM, Dice JF. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. Science, 1996, 273(5274): 501-503.
- [14] Lemasters JJ. Selective mitochondrial autophagy or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction and aging. Rejuvenation Res, 2005, 8(1): 3-5.
- [15] Kitada T, Asakawa S, Hattori N, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. Nature, 1998, 392(6676): 605-608.
- [16] Greene JC, Whitworth AJ, Kuo I, et al. Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in Drosophila parkin mutants. Proc Natl Acad Sci, 2003, 100(7): 4078-4083.
- [17] Park J, Lee SB, Kim Y, et al. Mitochondrial dysfunction in Drosophila PINK1 mutants is complemented by parkin. Nature, 2006, 441(7097): 1157-1161.
- [18] Geisler S, Holmström KM, Skujat D, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. Nat Cell Biol, 2009, 12(2): 119-131.
- [19] Jones N. PINK1 targets dysfunctional mitochondria for autophagy in Parkinson disease. Nat Rev Neurol, 2010, 6(4): 181.
- [20] Dagda RK, Zhu J, Chu CT, et al. Mitochondrial kinases in Parkinson's disease: converging insights from neurotoxin and genetic models. Mitochondrion, 2010, 9(5): 289-298.
- [21] 解洪荣,张玉花,李雪松,等. MPTP/MPP⁺ 诱导的帕金森病实验模型的研究进展. 医学综述, 2011, 17(5): 669-672.
- [22] Zhu J, Horbinski HC, Guo F. Regulation of autophagy by extracellular signal-regulated protein kinases during 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death. Am J Pathol, 2007, 170(1): 75-86.
- [23] Chu CT, Zhu J, Dagda R. Beclin 1-independent pathway of damage-induced mitophagy and autophagic stress: implications for neurodegeneration and cell death. Autophagy, 2007, 3(6): 663-666.
- [24] 石际俊,蔡增林,张萍,等. 1-甲基-4-苯基吡啶离子诱导嗜铬细胞瘤细胞自噬应激并导致 α -突触核蛋白的自噬性清除障碍. 中华神经科杂, 2009, 42(9): 625-630.