

闻双全, 王亮, 方兰, 等. BNIP3L 介导的线粒体自噬在镉致大鼠大脑皮质神经元凋亡中的作用 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (1): 50-56.
WEN S Q, WANG L, FANG L, et al. The role of BNIP3L-mediated mitophagy in cadmium-induced apoptosis in rat cerebral cortical neurons [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (1): 50-56.

BNIP3L 介导的线粒体自噬在镉致大鼠大脑皮质神经元凋亡中的作用

闻双全¹, 王亮¹, 方兰¹, 袁燕^{2,3*}

(1. 苏州健雄职业技术学院, 江苏 太仓 215411;

2. 扬州大学兽医学院, 江苏 扬州 225009;

3. 江苏高校动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009)

摘要: 为探究线粒体自噬受体 Bcl-2/腺病毒 E1B 19 kDa 相互作用蛋白 3 样 (BNIP3L) 介导的线粒体自噬对镉致大鼠大脑皮质神经元凋亡的调控作用, 利用 RNA 干扰技术建立大鼠大脑皮质神经元 BNIP3L 基因沉默模型, 并经 10 $\mu\text{mol/L}$ 镉处理 12 h, Western blot 检测 BNIP3L、帕金森氏蛋白 2 (Parkin) 和线粒体凋亡通路相关蛋白 cleaved caspase-9、cleaved caspase-3 的表达水平, 免疫荧光染色检测 BNIP3L 与线粒体标志蛋白 TOMM20 共定位, 透射电镜检测细胞内线粒体自噬体数目, FITC Annexin V 染色检测细胞凋亡水平。结果: 大鼠大脑皮质神经元经镉处理 12 h 后, BNIP3L 蛋白表达水平极显著升高 ($P<0.01$), BNIP3L 与 TOMM20 共定位增加, 沉默 BNIP3L 极显著抑制镉致 Parkin 线粒体转位 ($P<0.01$), 抑制镉致细胞内线粒体自噬体形成, 极显著促进镉致 caspase-9、caspase-3 激活和神经元凋亡 ($P<0.01$)。结果表明, BNIP3L 介导的线粒体自噬可抑制镉致大鼠大脑皮质神经元凋亡。

关键词: 镉; 大鼠大脑皮质神经元; BNIP3L; 线粒体自噬; 凋亡

中图分类号: S856.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2025)01-0050-07

The role of BNIP3L-mediated mitophagy in cadmium-induced apoptosis in rat cerebral cortical neurons

WEN Shuangquan¹, WANG Liang¹, FANG Lan¹, YUAN Yan^{2,3*}

(1. Suzhou Chien-Shiung Institute of Technology, Taicang 215411, China;

2. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

3. Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou 225009, China)

Abstract: In order to determine the regulatory effect of BNIP3L-mediated mitophagy on apoptosis induced by cadmium (Cd), the rat cerebral cortical neuron BNIP3L gene silencing model was established, in this study, by RNA interference technique, and then the model was treated with 10 $\mu\text{mol/L}$ Cd for 12 h. Next, the expression levels of BNIP3L, Parkinson disease protein 2 (Parkin) and mitochondrial apoptosis pathway-related proteins cleaved caspase-9 and cleaved caspase-3 were detected by Western blot. The co-localization of BNIP3L and the mitochondrial marker protein TOMM20 was detected by immunofluorescence staining. And, transmission electron microscopy was used to determine the number of mitophagosomes in neurons. Finally, apoptosis was detected by FITC Annexin V staining. The results showed that the expression of BNIP3L was significantly increased ($P<0.01$), and the co-localization of BNIP3L and TOMM20 was increased after Cd treatment for 12 h. Silencing BNIP3L significantly inhibited Cd-induced Parkin translocation to mitochondria ($P<0.01$), inhibited Cd-induced mitophagosome formation, and significantly promoted Cd-induced caspase-9 and caspase-3 activation and neuronal apoptosis

收稿日期: 2024-02-05; 修回日期: 2024-10-31

基金项目: 江苏省自然科学基金项目 (BK20221372); 江苏省高等学校基础科学研究面上项目 (24KJB330009, 22KJB360016); 博士启动资金项目 (2023); 太仓基础研究项目 (TC2022JC30); 高等学校学科创新引智计划资助项目 (D18007); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD)

第一作者: 闻双全, 男, 博士

* 通信作者: 袁燕, 博士, 教授, 主要从事动物营养代谢病与中毒病方面的研究, E-mail: yuanyan@yzu.edu.cn.

($P < 0.01$). The present results indicated that BNIP3L-mediated mitophagy was able to inhibit Cd-induced apoptosis in rat cerebral cortical neurons.

Keywords: cadmium; rat cerebral cortical neuron; BNIP3L; mitophagy; apoptosis

工农业生产等人类活动导致重金属镉被不断排放到环境中,造成环境严重污染,威胁公共健康。环境中的镉进入人和动物体内可损伤多种器官,其中,脑已被证实为镉毒性损伤的重要靶器官^[1-3]。体内外研究表明,镉的神经毒性机制主要包括细胞的氧化损伤、自噬和凋亡等几个方面^[4-7]。

Bcl-2/腺病毒 E1B 19 kDa 相互作用蛋白 3 样 (Bcl-2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3-like, BNIP3L) 是 Bcl-2 家族的重要一员,只含有 BH3 结构域。有研究表明, BNIP3L 参与了谷氨酸诱导的原代大鼠大脑皮质神经元凋亡^[8]。除调控细胞凋亡外, BNIP3L 还参与细胞线粒体自噬发生。一方面, BNIP3L 可招募帕金森氏蛋白 2 (Parkinson disease protein 2, Parkin) 到线粒体,通过 Parkin-泛素-p62-LC3 途径介导线粒体自噬^[9];另一方面, BNIP3L 可作为线粒体自噬受体,通过其氨基末端 LC3 相互作用域直接招募 LC3 到受损的线粒体,介导线粒体自噬^[10]。

尽管 BNIP3L 对细胞凋亡与线粒体自噬的调控已有诸多报道,但 BNIP3L 是否参与镉致大鼠大脑皮质神经元凋亡和线粒体自噬以及其确切的分子机制尚不清楚。因此,本试验通过建立大鼠大脑皮质神经元 BNIP3L 基因沉默模型并经镉处理,通过免疫荧光染色、Western blot 等方法探究 BNIP3L 介导的线粒体自噬对镉致大鼠大脑皮质神经元凋亡的调控作用,以期揭示镉的神经毒性机制提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号: SCXK (沪) 2022-0004。

1.2 主要试剂

醋酸镉 (Sigma, USA); DMEM/F-12 培养基、Neurobasal 培养基、B-27 无血清添加剂、Lipofectamine RNAiMAX 转染试剂、Opti-MEM 血清培养基 (Thermo, USA); BNIP3L siRNA (靶序列为 TCAGTCAGAAGAAGATT)、对照 siRNA (广州锐博生物科技有限公司); FITC Annexin V 凋亡检测试剂盒 (BD, USA); TOMM20 小鼠单克隆抗体 (Abcam, USA); BNIP3L 兔单克隆抗体、cleaved caspase-9 兔多克隆抗体、cleaved caspase-3 兔单克隆抗体、COX IV 兔单克隆抗体、 β -actin 兔单克隆抗

体 (CST, USA); Parkin 小鼠单克隆抗体 (Santa, USA); 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗、辣根过氧化物酶标记驴抗小鼠二抗 (Jackson, USA); Alexa Fluor 488 标记山羊抗小鼠 IgG、Cy3 标记山羊抗兔 IgG (上海碧云天生物科技有限公司); 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 大鼠大脑皮质神经元的分离与培养

孕 18 d SD 大鼠处死后取出胎鼠,剥离胎鼠大脑组织;分离大脑皮质,并将其剪成 1 mm³大小,加入 0.125% 胰蛋白酶,37 °C 水浴消化 15 min;加入 DMEM/F-12 培养基 (含 10% 胎牛血清) 终止消化;重悬细胞,静置后收集上层悬液,1 800 r/min 离心 7 min;弃上清液,用培养基重悬细胞,400 目滤网过滤,并进行细胞计数;将细胞接种到预先用 L-多聚赖氨酸包被的细胞培养板,培养 4 h 后弃去 DMEM/F-12 培养基,加入 Neurobasal 培养基 (含 2% B-27, 1% L-谷氨酰胺)。神经元纯度达 90% 以上,用于后续试验。

1.4 BNIP3L 基因沉默及细胞处理

神经元于 6 孔细胞培养板中培养 6 d 后,弃去培养基,用新鲜培养基洗涤细胞;配置 BNIP3L 干扰 (BNIP3L siRNA) 转染体系 (表 1),将离心管 A 和 B、C 和 D 混合,于室温孵育 15 min;将 BNIP3L siRNA 转染体系加入到细胞培养板中,10 h 后更换为新鲜培养基;继续培养 24 h 后,用 10 μ mol/L 镉处理细胞 12 h。

表 1 BNIP3L siRNA 转染体系

离心管	试剂成分
A	9 μ L Lipofectamine RNAiMAX 和 150 μ L Opti-MEM
B	100 nmol/L BNIP3L siRNA 和 150 μ L Opti-MEM
C	9 μ L Lipofectamine RNAiMAX 和 150 μ L Opti-MEM
D	100 nmol/L NC siRNA (对照干扰) 和 150 μ L Opti-MEM

1.5 免疫荧光染色检测 BNIP3L 与 TOMM20 共定位

细胞处理好后弃去培养基,加入 4% 多聚甲醛,固定 30 min, PBS 洗涤 15 min; 0.5% Triton X-100 透膜 5 min, PBS 洗涤 15 min; 50 g/L 牛血清白蛋白室温孵育 1 h; 4 °C 孵育 BNIP3L 和 TOMM20 抗体 (1:400) 过夜, PBS 洗涤 15 min; 室温避光孵育 Alexa Fluor 488 标记山羊抗小鼠 IgG 和 Cy3 标记山羊

抗兔 IgG (1 : 400) 1 h, PBS 洗涤 15 min; DAPI 复染, PBS 洗涤 10 min; 封片, 于激光共聚焦显微镜下采集图像。使用 Image J 软件分析荧光共定位系数, 数值在-1~0.5 范围内表示无共定位, 数值在>0.5~1 范围内表示有共定位。

1.6 透射电镜观察线粒体自噬体

细胞处理好后弃去培养基, 加入 2.5% 戊二醛, 离心收集细胞; 弃上清液, 再次加入 2.5% 戊二醛固定过夜; 弃上清液, 1% 琼脂糖溶液包埋细胞; 1% 锇酸避光固定 2 h, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液洗涤 3 次, 每次 15 min; 脱水, 包埋, 60 °C 聚合 48 h; 切片, 醋酸铀和柠檬酸铅染色, 于透射电镜下采集图像。

1.7 Western blot 检测相关蛋白的表达

细胞加入裂解液, 置于冰上裂解 30 min; 4 °C, 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 为细胞总蛋白。线粒体蛋白的制备按照上海碧云天生物科技有限公司提供的试剂盒说明书进行制备。BCA 法测定蛋白浓度, 加入蛋白上样缓冲液, 混匀, 沸水煮 10 min 后-80 °C 冻存。

取等量蛋白样品进行电泳, 转印至 PVDF 膜上, 50 g/L 脱脂乳室温封闭 2 h, 4 °C 孵育一抗 (Parkin 抗体按 1 : 200 稀释, BNIP3L、cleaved caspase-9、

cleaved caspase-3、COX IV 和 β -actin 抗体按 1 : 1 000 稀释) 过夜, 室温孵育辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗或辣根过氧化物酶标记驴抗小鼠二抗 (1 : 5 000) 2 h, 化学发光成像系统检测蛋白表达水平。

1.8 FITC Annexin V 荧光染色检测细胞凋亡

细胞处理好后弃去培养基, 结合缓冲液漂洗 1 次; 加入 FITC Annexin V 染色液, 避光孵育 20 min; 弃染色液, 于荧光显微镜下采集图像。

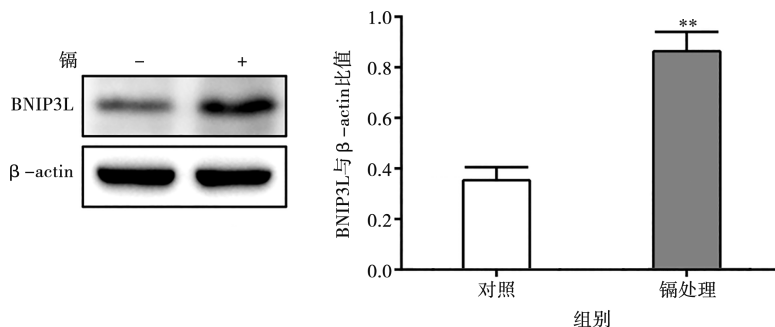
1.9 数据统计与分析

数据采用 SPSS 软件进行单因素方差分析, 再经 LSD 法进行多重比较, 结果以“平均值 \pm 标准差”表示。

2 结果

2.1 镉对大鼠大脑皮质神经元 BNIP3L 蛋白表达的影响

神经元经 10 μ mol/L 镉处理 12 h, Western blot 检测 BNIP3L 蛋白表达水平。结果见图 1, 与对照组比较, 镉处理组 BNIP3L 蛋白表达水平极显著升高 ($P<0.01$)。



注: 与对照组比较, **表示 $P<0.01$ 。下同。

图 1 大鼠大脑皮质神经元 BNIP3L 蛋白表达变化

2.2 镉对大鼠大脑皮质神经元 BNIP3L 与 TOMM20 共定位的影响

神经元经 10 μ mol/L 镉处理 12 h, 免疫荧光染色检测 BNIP3L 与线粒体标志蛋白 TOMM20 共定位。结果见图 2, 与对照组 (共定位系数为 0.31) 比较, 镉处理组 BNIP3L 与 TOMM20 共定位 (系数为 0.69) 增加。

2.3 沉默 BNIP3L 对镉致大鼠大脑皮质神经元 Parkin 蛋白表达的影响

神经元转染 BNIP3L siRNA 或 NC siRNA 后,

Western blot 检测 BNIP3L 蛋白表达水平, 结果见图 3。BNIP3L siRNA 极显著抑制神经元 BNIP3L 蛋白表达 ($P<0.01$), 可用于后续试验。

神经元转染 BNIP3L siRNA 或 NC siRNA 后经 10 μ mol/L 镉处理 12 h, Western blot 检测 Parkin 蛋白表达水平, 结果见图 4。与对照组比较, 镉处理组线粒体上 Parkin 蛋白表达水平极显著升高 ($P<0.01$); 与镉处理组比较, 镉与 BNIP3L 干扰组线粒体上 Parkin 蛋白表达水平极显著降低 ($P<0.01$)。

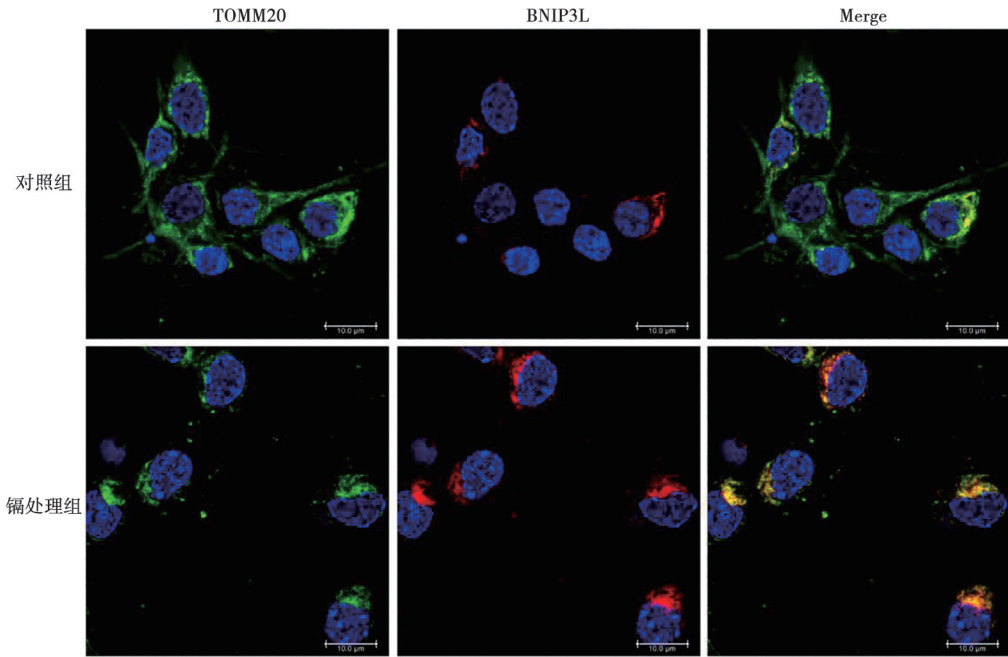


图2 大鼠大脑皮质神经元 BNIP3L 与 TOMM20 共定位情况 (比例尺 = 10 μm)

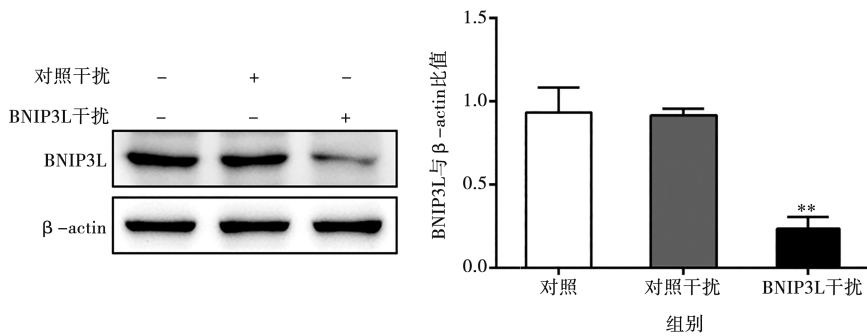
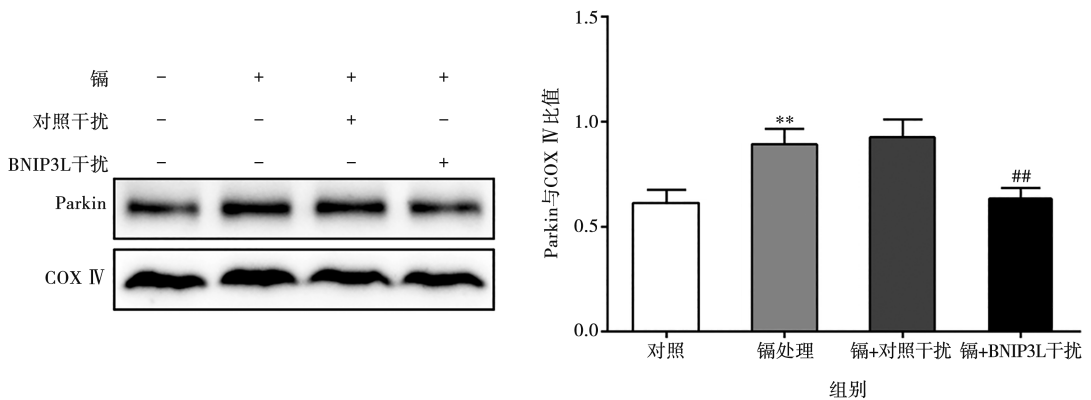


图3 BNIP3L siRNA 干扰效率鉴定



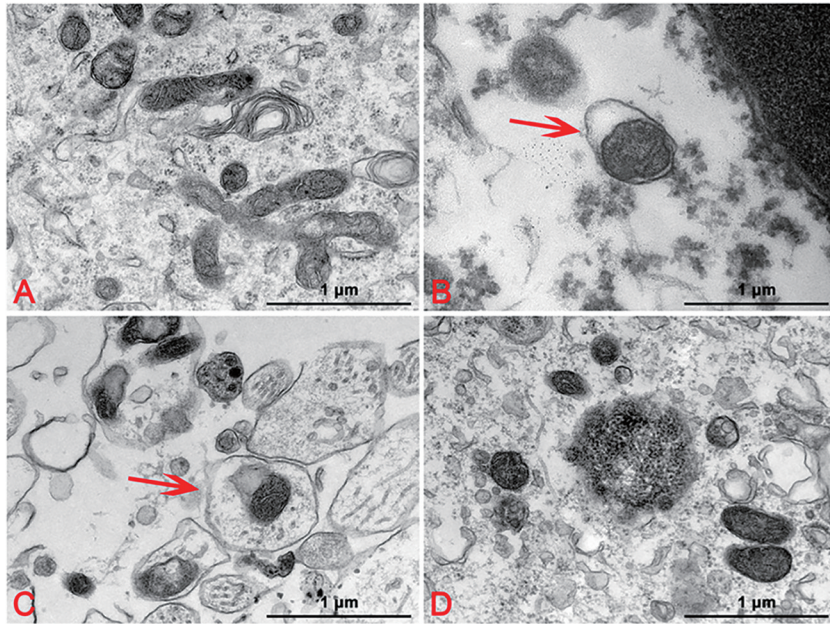
注：与镉处理组比较，##表示 $P < 0.01$ 。下同。

图4 大鼠大脑皮质神经元 Parkin 蛋白表达变化

2.4 沉默 BNIP3L 对镉致大鼠大脑皮质神经元线粒体自噬体形成的影响

神经元转染 BNIP3L siRNA 或 NC siRNA 后经 10 μmol/L 镉处理 12 h，透射电镜检测细胞内线粒体自噬体数目，结果见图 5。对照组细胞内未出现线粒体自噬体，镉处理组细胞内出现线粒体自噬体（红色箭头），镉与 BNIP3L 干扰组细胞内未出现线粒体自噬体。

噬体数目，结果见图 5。对照组细胞内未出现线粒体自噬体，镉处理组细胞内出现线粒体自噬体（红色箭头），镉与 BNIP3L 干扰组细胞内未出现线粒体自噬体。



A. 对照组; B. 镉处理组; C. 镉+对照干扰组; D. 镉+BNIP3L干扰组。红色箭头指示线粒体自噬体。

图5 大鼠大脑皮质神经元中线粒体自噬体数目变化 (比例尺=1 μm)

2.5 沉默 BNIP3L 对镉致大鼠大脑皮质神经元 caspase-9 和 caspase-3 蛋白活化的影响

神经元转染 BNIP3L siRNA 或 NC siRNA 后经 10 μmol/L 镉处理 12 h, Western blot 检测 cleaved caspase-9 和 cleaved caspase-3 蛋白表达水平, 结果见图 6。与对照组比较, 镉处理组 cleaved caspase-9

蛋白表达水平极显著升高 ($P < 0.01$), cleaved caspase-3 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 与镉处理组比较, 镉与 BNIP3L 干扰组 cleaved caspase-9 和 cleaved caspase-3 蛋白表达水平均极显著升高 ($P < 0.01$)。

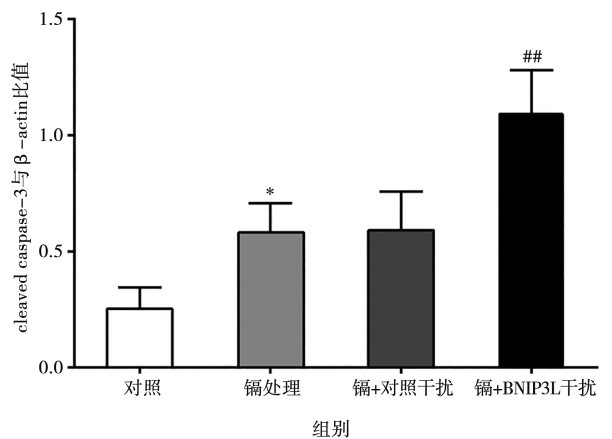
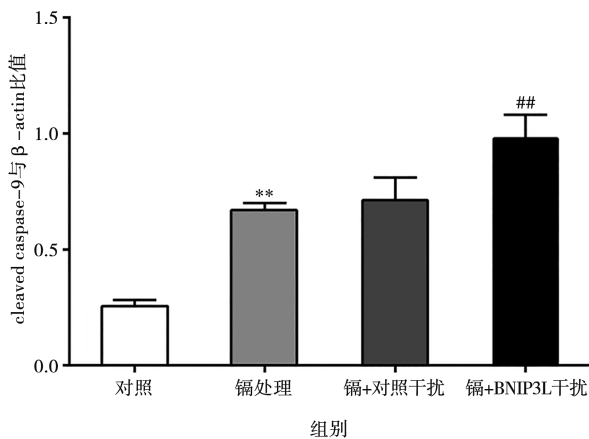
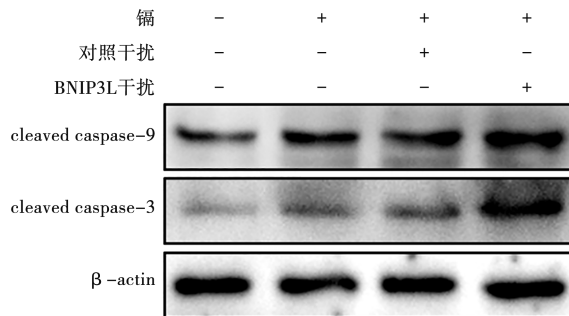


图6 大鼠大脑皮质神经元 cleaved caspase-9 和 cleaved caspase-3 蛋白表达变化

2.6 沉默 BNIP3L 对镉致大鼠大脑皮质神经元凋亡的影响

神经元转染 BNIP3L siRNA 或 NC siRNA 后经 10 $\mu\text{mol/L}$ 镉处理 12 h, FITC Annexin V 荧光染色检测

神经元凋亡水平, 结果见图 7。与对照组比较, 镉处理组细胞凋亡水平极显著升高 ($P<0.01$); 与镉处理组比较, 镉与 BNIP3L 干扰组细胞凋亡水平极显著升高 ($P<0.01$)。

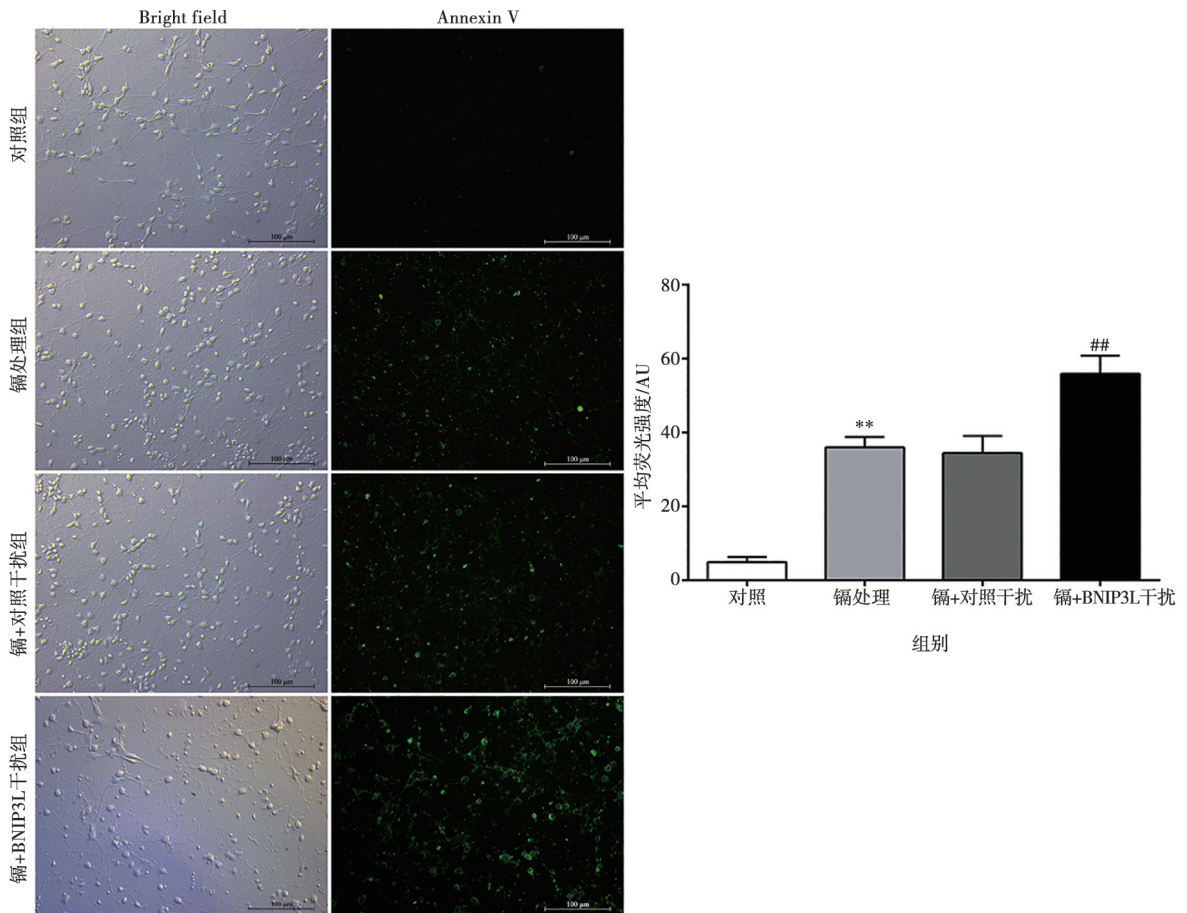


图 7 大鼠大脑皮质神经元凋亡水平 (标尺=100 μm)

3 讨论

线粒体自噬是细胞通过自噬机制选择性地清除受损线粒体的过程, 哺乳动物细胞中介导线粒体自噬的关键受体蛋白主要包括 BNIP3L、PTEN 诱导激酶 1 (PINK1)、FUN14 结构域包含蛋白 1 (FUNDC1) 等^[11]。其中, BNIP3L 介导的线粒体自噬已被证实参与了各种生理和病理过程, 包括网织红细胞成熟过程中线粒体的程序性清除^[12]、大鼠脊髓损伤^[13]、大鼠蛛网膜下腔出血后早期脑损伤^[14]等。本研究发现, 镉处理后大鼠大脑皮质神经元中 BNIP3L 蛋白表达水平极显著升高, 且表达的 BNIP3L 主要定位于线粒体上, 说明线粒体上的 BNIP3L 蛋白可能参与了镉致大鼠大脑皮质神经元损伤。

前期研究发现, 镉可激活 PINK1, 促进 Parkin 转位到线粒体, 进而促进 LC3 II 定位到线粒体, 最终促使大鼠大脑皮质神经元发生线粒体自噬^[15]。本研

究结果显示, 沉默 BNIP3L 极显著抑制镉诱导的线粒体上 Parkin 表达水平升高, 并抑制线粒体自噬体形成, 说明镉通过激活 BNIP3L 调控 Parkin 转位到线粒体, 进而介导大鼠大脑皮质神经元线粒体自噬。Ding 等^[9]研究也发现, BNIP3L 可促使 Parkin 转位到线粒体, 介导羰基氰化物间氯苯胺诱导的小鼠胚胎成纤维细胞线粒体自噬, 这与本研究结果相一致。

越来越多的研究表明, BNIP3L 介导的线粒体自噬参与了细胞凋亡进程。当线粒体受到损伤时, 外膜通透性增加, 各种促凋亡蛋白从线粒体释放到胞浆中, 激活线粒体凋亡通路, 最终诱导细胞凋亡^[16]。例如, 从线粒体释放到胞浆中的细胞色素 C 与凋亡蛋白酶活化因子-1 (Apaf-1) 结合, 促使其激活并形成凋亡复合体, 继而依次激活 caspase-9 和 caspase-3, 以 caspase 依赖方式促进细胞凋亡^[17-18]。而线粒体自噬可通过清除受损的线粒体, 抑制线粒体中促凋亡蛋白的释放, 从而维持细胞内环境稳态。Xu 等^[19]

研究发现, BNIP3L 介导的线粒体自噬可抑制白蛋白诱导的线粒体凋亡通路激活, 缓解肾小管上皮细胞凋亡。杨璧璘^[20]研究发现, 清热化痰方可促进 BNIP3L 介导的线粒体自噬, 抑制大鼠脑缺血再灌注引起的线粒体凋亡通路激活, 减轻脑缺血再灌注损伤。本研究结果显示, 沉默 BNIP3L 极显著促进镉诱导的大鼠大脑皮质神经元 caspase-9、caspase-3 激活和神经元凋亡, 说明 BNIP3L 介导的线粒体自噬可抑制镉激活大鼠大脑皮质神经元线粒体凋亡通路, 减轻神经元凋亡。

综上, 镉通过激活 BNIP3L 诱导大鼠大脑皮质神经元线粒体自噬, 且 BNIP3L 介导的线粒体自噬可抑制镉致大鼠大脑皮质神经元凋亡。

参考文献:

- [1] WEN S Q, WANG L, ZOU H, et al. Puerarin attenuates cadmium-induced neuronal injury via stimulating cadmium excretion, inhibiting oxidative stress and apoptosis [J]. *Biomolecules*, 2021, 11 (7): 978.
- [2] GONG Z G, ZHAO Y, WANG Z Y, et al. Epigenetic regulator BRD4 is involved in cadmium-induced acute kidney injury via contributing to lysosomal dysfunction, autophagy blockade and oxidative stress [J]. *J Hazard Mater*, 2022, 423: 127110.
- [3] MA Y G, RAN D, CAO Y, et al. The effect of P2X7 on cadmium-induced osteoporosis in mice [J]. *J Hazard Mater*, 2021, 405: 124251.
- [4] YUAN Y, BIAN J C, LIU X Z, et al. Oxidative stress and apoptotic changes of rat cerebral cortical neurons exposed to cadmium *in vitro* [J]. *Biomed Environ Sci*, 2012, 25 (2): 172-181.
- [5] WANG L, WANG T, WEN S Q, et al. Puerarin prevents cadmium-induced neuronal injury by alleviating autophagic dysfunction in rat cerebral cortical neurons [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (9): 8328.
- [6] WEN S Q, XU M C, ZHANG W H, et al. Cadmium induces mitochondrial dysfunction via SIRT1 suppression-mediated oxidative stress in neuronal cells [J]. *Environ Toxicol*, 2023, 38 (4): 743-753.
- [7] WEN S Q, WANG L, ZHANG W H, et al. Induction of mitochondrial apoptosis pathway mediated through caspase-8 and c-Jun N-terminal kinase by cadmium-activated Fas in rat cortical neurons [J]. *Metallomics*, 2021, 13 (7): mfab042.
- [8] SHEN J B, CHEN X M, LI H M, et al. p75 neurotrophin receptor and its novel interaction partner, NIX, are involved in neuronal apoptosis after intracerebral hemorrhage [J]. *Cell Tissue Res*, 2017, 368 (1): 13-27.
- [9] DING W X, NI H M, LI M, et al. Nix is critical to two distinct phases of mitophagy, reactive oxygen species-mediated autophagy induction and Parkin-ubiquitin-p62-mediated mitochondrial priming [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285 (36): 27879-27890.
- [10] NOVAK I, KIRKIN V, MCEWAN D G, et al. Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance [J]. *EMBO Rep*, 2010, 11 (1): 45-51.
- [11] 马穰桂, 夏志, 尚画雨. 线粒体自噬相关受体蛋白研究进展 [J]. *生理学报*, 2021, 73 (6): 1025-1034.
- [12] SCHWEERS R L, ZHANG J, RANDALL M S, et al. NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104 (49): 19500-19505.
- [13] NIE P M, WANG H G, YU D T, et al. NIX mediates mitophagy in spinal cord injury in rats by interacting with LC3 [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2022, 42 (6): 1983-1994.
- [14] ZHANG J Y, YUAN G Q, LIANG T Y, et al. Nix plays a neuroprotective role in early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage in rats [J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 245.
- [15] WEN S Q, WANG L, WANG T, et al. Puerarin alleviates cadmium-induced mitochondrial mass decrease by inhibiting PINK1-Parkin and Nix-mediated mitophagy in rat cortical neurons [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 230: 113127.
- [16] HARRIS M H, THOMPSON C B. The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability [J]. *Cell Death Differ*, 2000, 7 (12): 1182-1191.
- [17] NAKABAYASHI J, SASAKI A. A mathematical model for apoptosome assembly: the optimal cytochrome c/Apaf-1 ratio [J]. *J Theor Biol*, 2006, 242 (2): 280-287.
- [18] RIEDL S J, SALVESEN G S. The apoptosome: signalling platform of cell death [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8 (5): 405-413.
- [19] XU D, CHEN P P, WANG B, et al. NIX-mediated mitophagy protects against proteinuria-induced tubular cell apoptosis and renal injury [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2019, 316 (2): 382-395.
- [20] 杨璧璘. 基于 Nix 介导的线粒体自噬通路探讨清热化痰方对脑缺血再灌注损伤大鼠的神经保护机制 [D]. 南宁: 广西中医药大学, 2020.