

龟板提取物靶向 BMP4 通路抑制 PC12 细胞凋亡

曹佳会¹, 伍艺灵¹, 张还添², 陈 兰¹, 刘 洋¹, 李伊为¹, 周健洪¹, 陈东风^{1,3*}

1. 广州中医药大学 解剖学教研室, 广东 广州 510405

2. 暨南大学附属第一医院 骨科, 广东 广州 510632

3. 南京大学 生物医药技术国家重点实验室, 江苏 南京 210093

摘要: **目的** 探讨龟板提取物 (*Testudinis Carapax et Plastrum* extracts, TCPE) 对血清饥饿诱导的 PC12 细胞凋亡的保护作用及其机制。**方法** 采用血清饥饿 3 d 的方法建立 PC12 细胞凋亡模型, 并将细胞分为对照组, 模型组, TCPE 低、高剂量 (3、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组。在施加处理因素 3 d 后, 用 MTT 比色分析测定细胞吸光度值, Annexin V/PI 双染流式细胞术测定细胞凋亡率, Western blotting 检测 Caspase-3、BMPs 信号通路的表达水平, 并检测 BMPs 信号通路阻断后 TCPE 的抗凋亡作用。用 Bio-Rad Quantity One 凝胶分析系统对条带进行半定量分析。**结果** MTT 与流式细胞术结果显示, TCPE 能提高 PC12 细胞活性, 降低 PC12 细胞凋亡率, 并呈剂量依赖性, TCPE 组与模型组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.05, 0.01$)。Western blotting 结果显示, TCPE 能降低 Caspase-3 表达, 增加 BMP4、BMPR-IA、p-Smad1/5/8 的表达, TCPE 组与模型组相比, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05, 0.01$)。TCPE 对 BMP2、BMP7、BMPR-II 的表达没有影响, BMPR-IB 没有被检测出。BMP4 中和抗体减弱了 TCPE 的抗凋亡活性。**结论** TCPE 具有抑制血清饥饿诱导 PC12 细胞凋亡的作用, 且这种作用呈剂量依赖性, 其作用机制可能与激活 BMP4 信号通路表达有关。

关键词: 龟板提取物; BMPs 信号通路; PC12 细胞; 细胞凋亡; 血清饥饿

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)01-0108-06

Inhibition of *Testudinis Carapax et Plastrum* extracts targeting BMP4 pathway on PC12 cell apoptosis

CAO Jia-hui¹, WU Yi-ling¹, ZHANG Huan-tian², CHEN Lan¹, LIU Yang¹, LI Yi-wei¹, ZHOU Jian-hong¹, CHEN Dong-feng^{1,3}

1. Department of Anatomy, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

2. Department of Orthopaedics, First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510632, China

3. The State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210093, China

Abstract: Objective To observe the protection of *Testudinis Carapax et Plastrum* extracts (TCPE) on serum starvation-induced PC12 cell apoptosis and explore its mechanism. **Methods** The PC12 apoptosis model was established by serum starvation for 3 d. The cells were randomly divided into four groups: control group, model group, low-dose and high-dose (3 and 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) TCPE groups. In the three days of the treatment, cell absorbance was determined by MTT, ratio of cell apoptosis was examined by Annexin V/PI double stain flow cytometry (FCM), Caspase-3, BMP4, BMPR-IA, and p-Smad1/5/8 signaling molecular expression were detected by Western blotting, and the anti-apoptotic effect of TCPE was observed after blocking BMPs signal pathway. Semi-quantitative analysis of bands was carried out by Bio-Rad Quantity One gel analysis system. **Results** MTT and FCM analyses demonstrated that TCPE could increase PC12 cell viability and decrease their apoptotic ratios in a dose dependent manner. Western blotting results showed that TCPE could decrease Caspase-3 expression, promote the expression of BMP4, BMPR-IA, and p-Smad1/5/8. There was statistically significant difference between TCPE (3 and 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) groups and model group ($P < 0.05, P < 0.01$) in all above results. While TCPE had no effect on the expression of BMP2, BMP7, and BMPR-II. BMPR-IB hadn't been detected. The anti-apoptotic activity was partially mitigated by neutralizing BMP4 antibody. **Conclusion** TCPE has the capacity to inhibit the apoptosis of PC12 induced by serum starvation in a dose dependent manner and its mechanism may be associated with partially activating and up-regulating the expression of BMP4 signaling pathway.

Key words: *Testudinis Carapax et Plastrum* extracts (TCPE); BMPs signal pathway; PC12 cell; cell apoptosis; serum starvation

收稿日期: 2010-05-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30772861, 30472272)

作者简介: 曹佳会 (1986—), 女, 四川泸州人, 在读研究生, 研究方向为中医药调控神经干细胞防治重大神经疾病。E-mail: xiaocaolike123@163.com

*通讯作者 陈东风 Tel: (020)39358001 E-mail: CDF27212@21cn.com

研究表明, 细胞凋亡在帕金森病 (Parkinson disease, PD) 的黑质多巴胺能神经元死亡中起重要作用^[1-2]。目前, PD 神经保护的临床药物和方法主要有单胺氧化酶抑制剂、线粒体保护剂、多巴胺受体激动剂、抗炎药物以及神经营养因子和生长因子移植治疗等, 但药物不良反应大, 机体耐药性强, 不能从根本环节延缓神经退行性病变, 以及生长因子半衰期短, 价格昂贵, 限制了其广泛使用。根据肾生髓、通脑的脏象学说, 龟板为常用益肾中药, 由其为主要组成的许多经典名方, 如大补阴丸、左归丸等益肾中药是中医临床治疗神经疾病最常用的方药。龟板提取物是从龟的背甲和腹甲提取的有机成分^[3], 有资料表明龟背可能是从胚胎神经脊发育而来, 而成骨蛋白 (bone morphological proteins, BMPs) 和成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF) 等信号蛋白介导了龟背的发育过程^[4]。BMPs 是转化生长因子超家族成员, 能通过 Smad、MAPKs 等通路抑制细胞凋亡^[5-6], 在神经发育和凋亡过程中起着重要作用。因此, 推测 BMPs 信号通路可能是龟板发挥神经保护作用的靶点。前期研究表明, 长期 (3 个月) ig 龟板能改善 PD 大鼠的旋转行为, 上调 Bcl-2 以及降低 Bax 蛋白的表达, 对 PD 大鼠多巴胺能神经元具有明显的保护作用^[7], 并发现可能与 BMPs 表达上调有关^[8]。立足于前期实验基础上, 本研究通过建立血清饥饿 PC12 细胞凋亡模型, 从体外角度探讨龟板提取物 (TCPE) 的抗凋亡作用及 BMPs 信号通路的调控机制, 旨在为龟板防治 PD 提供药理学及分子生物学证据。

1 材料

1.1 药物

龟板产地为海南省海口市, 由广东省汕头市药材采购供应站提供, 经广州中医药大学中药学院李希灿鉴定为龟科动物乌龟 *Chinemys reevesii* (Gray) 的背甲及腹甲。将龟板低温粉碎成粗粉, 醋酸乙酯提取, 得到由甾类、脂肪酸及其酯组成的 TCPE。其中, 甾类成分包括 4-甾酮、十四酸甾醇酯和甾醇; 脂肪酸及其酯包括十六酸、十六酸甲酯、十六酸乙酯、十八酸、十八酸甲酯、十八酸乙酯^[9]。TCPE 经二甲基亚砷 (DMSO) 溶解后配成 30 mg/mL 溶液, 备用。

1.2 细胞与试剂

PC12 细胞 (中国科学院广州生物医药与健康研究院), 高糖 DMEM、马血清和胎牛血清 (FBS)、

D-Hank's 液、0.25%胰酶、青链霉素 (美国 Gibco 公司), BMP 中和抗体 (neutralizing BMP4 antibody, N-BMP4) 购于 R&D 公司, Alexa Fluor 488 Annexin V/PI kit 购于 Invitrogen 公司, β -actin 为小鼠抗大鼠的单克隆抗体, 一抗 BMP2、BMP7、BMPR-II、Caspase-3 为兔抗大鼠的多克隆抗体 (武汉博士德公司), BMPR-IA、BMPR-IB、BMP4、p-Smad1/5/8 兔抗大鼠的多克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司), 二抗为羊抗兔 IgG-HRP (武汉博士德公司), 超敏发光液 (北京普利莱公司), 其他试剂购自美国 Sigma 公司。

2 方法

2.1 PC12 细胞培养^[10]

将 PC12 细胞按 $1 \times 10^6/\text{cm}^2$ 接种于培养瓶, 5% CO_2 、37 °C 孵箱培养。培养液为含 10% 马血清、5% FBS、1% 青链霉素的高糖 DMEM, 2~3 d 换液 1 次, 当 PC12 细胞汇合 80% 时, 用含 0.25% 胰酶室温消化 2~3 min, 按 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 传代。取对数生长期细胞进行各种处理。

2.2 血清饥饿诱导建立 PC12 细胞凋亡模型

将细胞按 $1 \times 10^3/\text{mL}$ 种入 96 孔板 (MTT 检测) 或按 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 种入 6 孔板 (Annexin V 流式细胞术、Western blotting 检测), 并分为对照组, 模型组, TCPE 低、高剂量 (终质量浓度分别为 3、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组。细胞种入培养板 24 h 贴壁后, 吸出培养上清, 换用各种工作液。对照组加入完全培养液, 模型组加入无血清培养液, 并加入与药物组同等剂量 DMSO 2 μL , TCPE 组在加入无血清培养液的同时加入 TCPE, 3 d 后行各种检测。

2.3 MTT 测定 PC12 细胞存活率

药物作用 3 d 后, 每孔加入终浓度为 5 mg/mL 的 MTT 20 μL , 继续培养 4 h 后, 吸弃半量培养基, 每孔加入 DMSO 100 μL , 振荡 10 min, 溶解细胞中的蓝紫色结晶物, 用酶标仪测定 570 nm 波长处吸光度 (A) 值, 判定 PC12 细胞的活性。每组 5 孔, 2 次重复独立实验。

2.4 Annexin V/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡率

离心收集细胞, 重悬于结合缓冲液中, 加入 5 μL Annexin V-Fluor 和 1 μL PI, 室温避光染色 10 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡率。正常的活细胞不被 Annexin V-FITC 和 PI 染色, 凋亡早期的细胞仅被 Annexin V-FITC 染色, 坏死细胞和凋亡晚期细胞可以同时被 Annexin V-FITC 和 PI 染色。每组 3 个复

孔, 2 次重复独立实验。

2.5 Western blotting 法检测

细胞称质量, 加入适量蛋白裂解液及酶抑制剂, 低温高速离心, 提取蛋白。取蛋白样品, 加 6×(5:1) 上样缓冲液, 100 °C 煮, 离心, 取 20 μL 上样, SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 浓缩胶 5%, 分离胶 10%, 于 80~100 V 电泳 80 min。将分离胶完整取下, 于转移缓冲液静置 30 min 后, 转移夹靠 PVDF 膜, 排除气泡, 以 31 mA 转移 60 min。取出 PVDF 膜, TTBS 洗 5 min, 3 次, 5% 脱脂牛奶封闭 30 min, 加一抗 β-actin, BMP2、BMPR-II、Smad8 (1:500 稀释), 4 °C 过夜, 次日用 TTBS 洗 PVDF 膜 3 次后, 加 1:5000 二抗 (兔抗小鼠、羊抗兔 IgG-HRP), 室温反应 1 h。TTBS 洗 10 min, 3 次, 超敏发光液反应 5 min, X 光片感光, 显影, 定影, Quantity one 扫描条带吸光度值。每组 2 张片, 2 次重复独立实验。

2.6 统计学分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 17.0 医用统计软件包进行单因素方差分析, 组间比较采用 Dunnett-*t* 检验。

3 结果

3.1 TCPE 对 PC12 细胞活性的影响

结果见图 1, 模型组与对照组比较, 细胞活性明显下降, TCPE 呈剂量依赖性提高 PC12 细胞活性。

3.2 TCPE 对 PC12 细胞凋亡的影响

Annexin V/PI 流式细胞术结果进一步证实了 TCPE 具有抗血清饥饿诱导 PC12 细胞凋亡的能力。

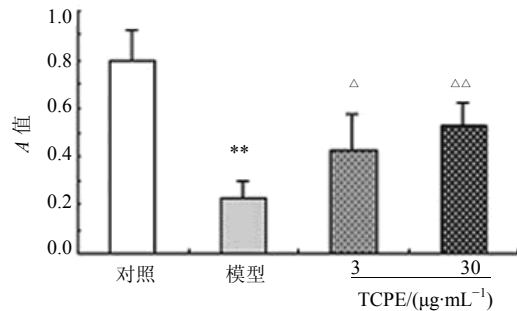
结果显示 (图 2), 模型组凋亡率明显比对照组高, 而 TCPE 能以剂量依赖方式减少细胞凋亡的发生。

3.3 TCPE 对促凋亡分子 Caspase-3 表达的影响

为在蛋白水平上证实 TCPE 的抗凋亡活性, 本实验检测了 Caspase-3 的表达水平。Caspase-3 作为凋亡程序的执行者, 在生长因子剥离而诱导的凋亡中扮演着关键性的角色。Western blotting 结果显示, 对照组 Caspase-3 表达较低, 模型组表达明显增强, TCPE (3、30 μg/mL) 组 Caspase-3 表达降低 (图 3)。

3.4 TCPE 对 BMP2、BMP4、BMP7、BMPR-IA、BMPR-IB、BMPR-II、p-Smad1/5/8 蛋白表达的影响

Western blotting 结果显示, 对照组 BMP4 表达明显, 模型组表达下降, TCPE 组表达上调; BMP2

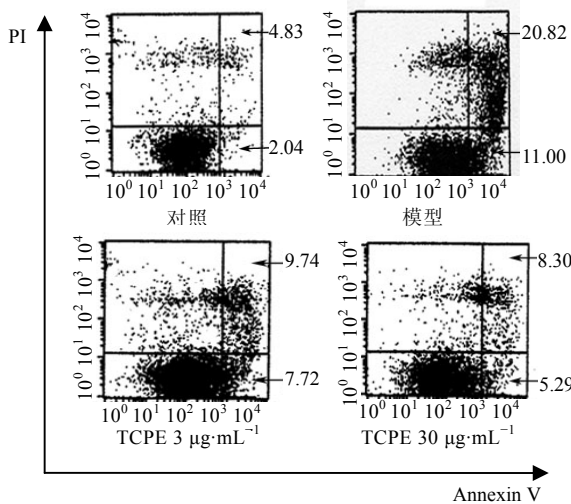


与对照组比较: ***P*<0.01; 与模型组比较: △*P*<0.05 △△*P*<0.01
***P*<0.01 vs control group; △*P*<0.05 △△*P*<0.01 vs model group

图 1 TCPE 对 PC12 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 1 Effect of TCPE on activity of PC12 cells

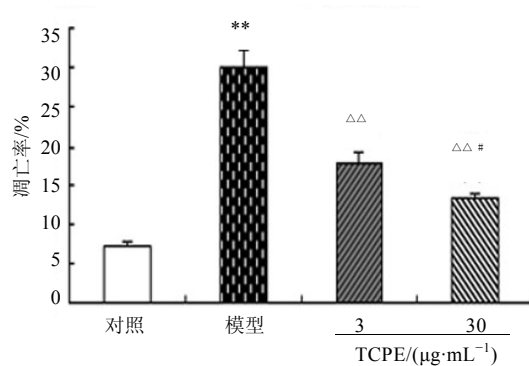
($\bar{x} \pm s, n = 5$)



与对照组比较: ***P*<0.01; 与模型组比较: △△*P*<0.01; 与 TCPE (3 μg/mL) 比较: #*P*<0.05
***P*<0.01 vs control group; △△*P*<0.01 vs model group; #*P*<0.05 vs TCPE (3 μg/mL) group

图 2 TCPE 抑制血清饥饿诱导的 PC12 细胞凋亡

Fig. 2 Inhibition of TCPE on serum starvation-induced PC12 cell apoptosis



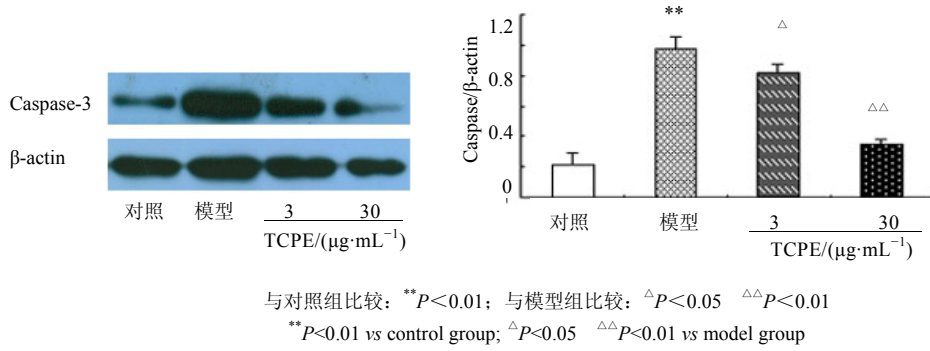


图 3 TCPE 下调血清饥饿诱导的 PC12 细胞中 Caspase-3 表达

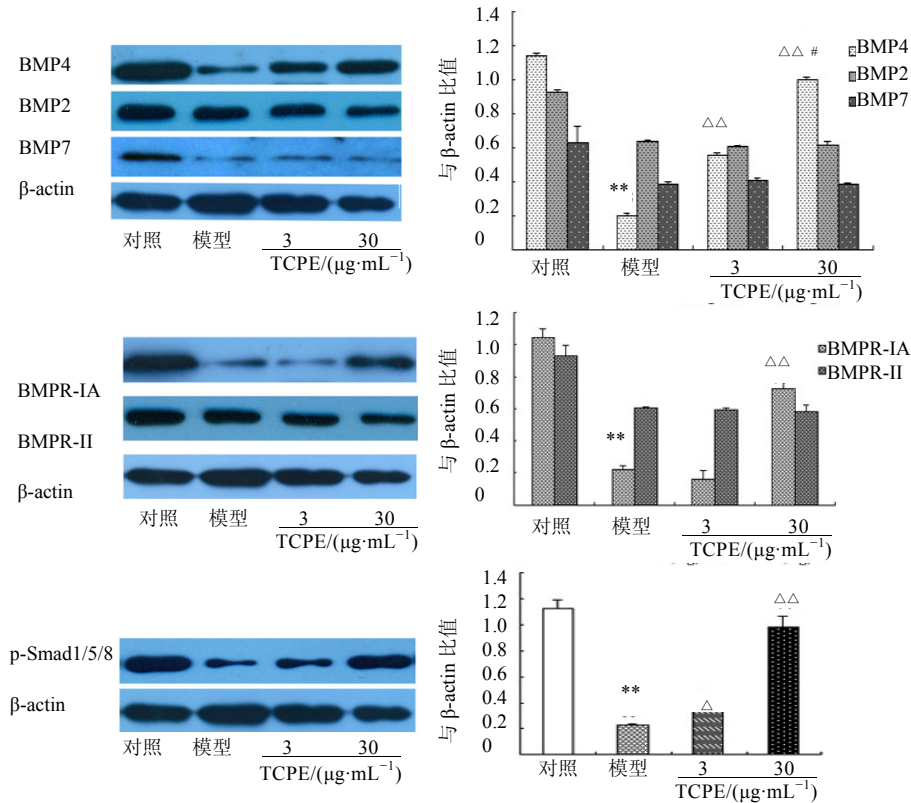
Fig. 3 TCPE down-regulated Caspase-3 expression in PC12 cells induced by serum starvation

和 BMP7 表达, 模型组和 TCPE 组无明显变化 (图 4), 提示 TCPE 特异性诱导 BMP4 的表达, 并呈剂量依赖性。

对照组 BMPs 受体 BMPR-IA 表达明显, 模型组表达下降, TCPE (30 μg/mL) 组表达上调; BMPR-II 表达模型组和 TCPE 组没有明显差异; BMPR-IB 未被检测出 (图 4)。模型组 p-Smad1/5/8 表达下降, TCPE 低剂量组和高剂量组表达上调 (图 4)。

3.5 N-BMP4 阻断 TCPE 抑制 PC12 细胞凋亡的作用

为证实 BMP4 信号通路参与 TCPE 抗血清饥饿诱导 PC12 细胞的凋亡过程, 将实验分为对照组、模型组、N-BMP4 (0、100、500 ng/mL) 共 5 组, 并向 N-BMP4 组中加入 30 μg/mL TCPE, AnnexinV/PI 流式细胞术检测 N-BMP4 阻断 BMP4 信号通路后, TCPE 对 PC12 细胞凋亡的影响 (图 5)。



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 TCPE (3 μg·mL⁻¹) 比较: # $P < 0.05$
 ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs model group; # $P < 0.05$ vs TCPE (3 μg·mL⁻¹) group

图 4 TCPE 上调 BMP4 信号通路分子的表达

Fig. 4 TCPE up-regulated expression of BMP4 signaling pathway molecular

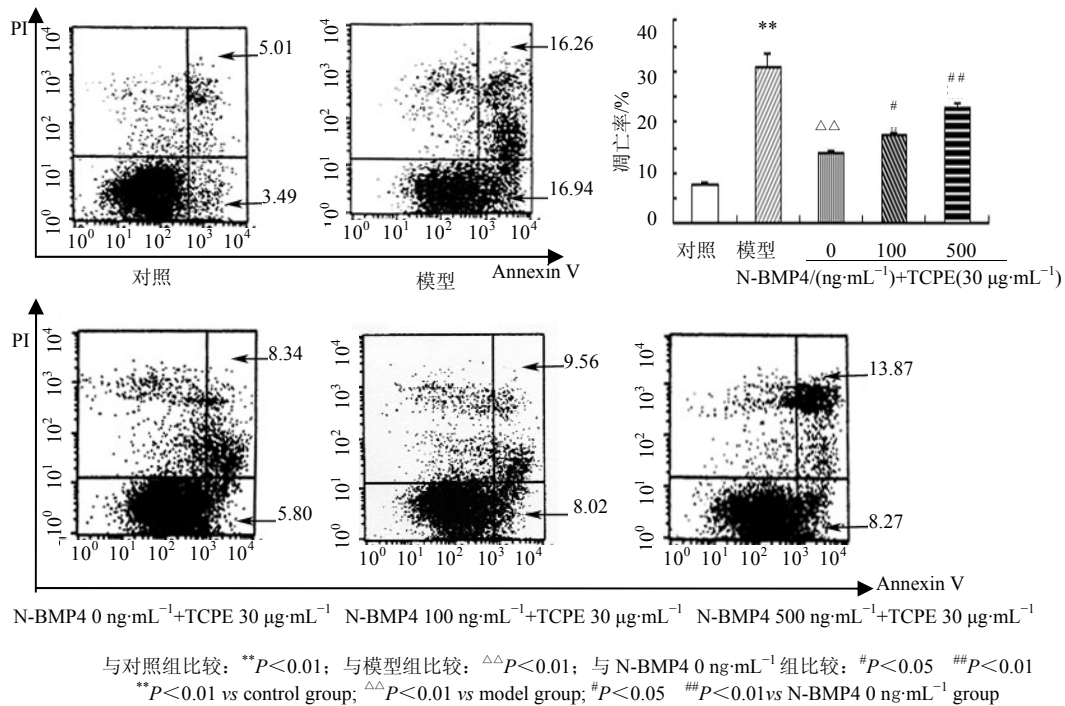


图 5 N-BMP4 阻断了 TCPE 抑制血清饥饿诱导的 PC12 细胞凋亡作用
 Fig. 5 Blocking of N-BMP4 to inhibition of TCPE on serum starvation-induced PC12 cell apoptosis

结果表明，N-BMP4（100、500 ng/mL）与 N-BMP4（0 ng/mL）相比，凋亡发生率增加，但比模型组凋亡发生率少；N-BMP4（500 ng/mL）凋亡发生率比 N-BMP4（100 ng/mL）多，表明 N-BMP4 部分阻断了 TCPE 抗血清饥饿诱导 PC12 细胞的凋亡，并呈剂量依赖性，提示 BMP4 信号通路部分参与 TCPE 抑制 PC12 细胞凋亡的过程。

4 讨论

PC12 细胞源于大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤，合成并释放多巴胺和去甲肾上腺素等神经递质，分化后的 PC12 细胞能显示出与神经元高度相似的生理、生化特性等性状^[11]。PC12 细胞在去血清后，诱发的凋亡与许多神经系统退变性疾病的凋亡有共同之处，如都有共同参与凋亡的基因表达，细胞凋亡的形态特征极为相似。因此，PC12 细胞的去血清损伤模型常用来研究神经营养因子剥夺性损伤，其效果明显且稳定，这也是在神经科学研究中广泛接受的研究神经系统细胞凋亡的体外模型^[12-13]。本实验 MTT 与流式细胞术发现，TCPE 能够以剂量依赖的方式提高 PC12 细胞活性，降低 PC12 细胞凋亡发生率，在细胞学水平证明了 TCPE 的抗凋亡作用。

Caspase-3 是线粒体凋亡通路中的效应分子，是细胞凋亡的“执行者”^[14]。Western blotting 结果发现，TCPE 能显著降低 Caspase-3 的表达水平，在分子水

平上证明了 TCPE 的抗凋亡作用。国内外学者研究发现，血清饥饿由于生长因子的剥离启动了线粒体凋亡通路^[15]。据此可推测，TCPE 可能是首先促进了生长因子的表达，继而下调 Caspase-3 的表达，从而发挥其神经保护潜能。BMPs 是一种超级生长因子，能够促进成年神经组织多巴胺能神经元存活^[15-17]，在调节神经系统凋亡过程中起着关键作用。然而，BMPs 在血清饥饿诱导 PC12 凋亡中的机制目前仍不清楚，为了阐明 TCPE 的抗凋亡机制，本研究探讨了 BMPs 信号通路在此过程中的角色。

与 Kano 等^[18]报道的结果一致，本研究发现 PC12 细胞表达 BMP2、BMP4、BMP7 等 BMPs 配体，然而，TCPE 只是特异性地提高了 BMP4 信号分子的表达，对 BMP2、BMP7 的表达水平没有影响。研究表明，BMP4 是重要的神经营养因子，在神经组织发育、分化、凋亡中可能具有更加重要的作用^[19-20]。因此，BMP4 信号可能是 TCPE 发挥神经保护的有效靶点。为了检测是否是受体介导的 BMP4 的抗凋亡活性，本研究检测了 BMP 受体的表达。BMP 受体分为 I 型和 II 型，BMPs 蛋白作用时首先和 II 型受体结合并使其活化，然后 I 型受体（BMPRI 分为 IA 和 IB）和 BMPs 蛋白结合，在活化的 II 型受体作用下通过转磷酸基被激活，激活的 I 型受体再作用于胞内信号分子。Western blotting

结果显示, TCPE 选择性地提高了 BMPR-IA 的表达, 对 BMPR-II 表达没有影响, BMPR-IB 没有检测到, 表明了 BMPR-IA 介导了 BMP4 的效应。BMP 配体与受体结合后, Smad1/5/8 能被特异性的磷酸化并与 Smad4 结合形成二聚体进入细胞核内, 是 BMP 受体直接作用底物, 影响基因转录和翻译^[21]。在本研究中, 使用 Western blotting 技术发现 TCPE 以剂量依赖的方式刺激磷酸化的 Smad1/5/8 的表达, 表明 BMP4 介导的凋亡活性传递至细胞内。用 BMP4 中和抗体抑制 BMP4 信号通路后, 流式细胞术检测发现, 细胞凋亡发生率增加, 部分阻断了 TCPE 的抗凋亡活性, 证实了 BMP4 信号通路在 TCPE 抑制血清饥饿诱导 PC12 细胞凋亡中的角色。

细胞对凋亡的易感性是受调节的, 阻断或延缓细胞的凋亡将有利于 PD 疾病的治疗, 本实验发现, TCPE 浓度依赖性对抗了血清饥饿诱导 PC12 凋亡的发生, 并与部分上调 BMP4 通路表达有关。由于 BMP4 通路在神经系统中的重要作用, TCPE 调节 BMP4 信号通路的表达来抑制细胞凋亡, 为治疗 PD 提供了一个新视角。然而, TCPE 中有多个有效成分, 究竟何种成分在发挥作用, 仍需进一步研究。此外, 凋亡发生的过程是多种因素调控的, 研究 BMPs 通路与其他通路的网络关系, 阐明龟板的多靶点保护机制, 对 PD 创新药物的开发具有重要作用, 也是下一步的研究方向。

参考文献

- [1] 张芳, 谢俊霞. 螺旋藻多糖对 MPTP 致多巴胺能神经元损伤的保护 [J]. 中国药理学通报, 2007, 23(9): 1241-1245.
- [2] Tang X Q, Zhi J L, Cui Y, et al. Hydrogen peroxide preconditioning protects PC12 cells against apoptosis induced by dopamine [J]. *J Sci*, 2005, 78(1): 61-66.
- [3] 侯秋科, 吴静, 易香华, 等. 龟板提取物上调维生素 D 受体表达促骨髓间充质干细胞向成骨分化 [J]. 中草药, 2010, 41(4): 607-612.
- [4] Elizabeth P. Neural beginnings for the turtle's shell [J]. *Science*, 2004, 303: 951.
- [5] Wong Y C, Wang X. Id-1 expression and cell survival [J]. *Apoptosis*, 2004, 9: 279-289.
- [6] Yang S X, Lim M Y, Linda K. Pham bone morphogenetic protein 7 protects prostate cancer cells from stress-induced apoptosis via both Smad and c-Jun NH₂-terminal kinase pathways [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(8): 4285-4290.
- [7] 邓汝东, 李伊为, 陈东风, 等. 龟板抗帕金森病大鼠多巴胺神经元凋亡 [J]. 神经解剖学杂志, 2008, 24(3): 301-306.
- [8] 易香华, 吴静, 侯秋科, 等. 龟板促进 Parkinson 病大鼠黑质骨形态发生蛋白信号分子的表达 [J]. 神经解剖学杂志, 2009, 25(5): 567-571.
- [9] Chen D F, Zeng H P, Du S H, et al. Extracts from *Plastrum Testudinis* promotes proliferation of rat bone-marrow derived mesenchymal stem cells [J]. *Cell Prolif*, 2007, 40: 196-212.
- [10] Weinreb O, Bar-Am O, Amit T, et al. Neuroprotection via pro-survival protein kinase C isoforms associated with Bcl-2 family members [J]. *FASEB J*, 2004, 18(12): 1471-1473.
- [11] Liu W, Feldman J D, Machado H B, et al. Expression of depolarization-induced immediate early gene proteins in PC12 Cells [J]. *J Neurosci Res*, 2003, 72: 670-678.
- [12] Perkins D, Yu Y, Bambrlck L, et al. Expression of herpes simplex virus type 2 protein ICP10 PK rescues neurons from apoptosis due to serum deprivation or genetic defects [J]. *Exp Neurol*, 2002, 174: 118-122.
- [13] Charytoniuk D A, Traiffort E. Distribution of bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein receptor transcripts in the rodent nervous system and up-regulation of bone morphogenetic protein receptor type II in hippocampal dentate gyrus in a rat model of global cerebral ischemia [J]. *Neuroscience*, 2000, 100: 33-43.
- [14] Cohen G M. Caspases: the executioners of apoptosis [J]. *Biochem J*, 1997, 326: 1-16.
- [15] Goyeneche A A, Harmon J M, Telleria C M. Cell death induced by serum deprivation in luteal cells involves the intrinsic pathway of apoptosis [J]. *Reproduction*, 2006, 131: 103-111.
- [16] Jordan J, Bottner M, Schluesener H J, et al. BMPs: neurotrophic roles for midbrain dopaminergic neurons and implication of astroglial cells [J]. *Eur J Neurosci*, 1997, 9: 1699-1709.
- [17] Althini S, Usoskin D, Kylberg A, et al. Ebendal T Bone morphogenetic protein signalling in NGF-stimulated PC12 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 307: 632-639.
- [18] Kano Y, Otsuka F, Takeda M, et al. Regulatory roles of bone morphogenetic proteins and glucocorticoids in catecholamine production by rat pheochromocytoma cells [J]. *Endocrinology*, 2005, 146(12): 5332-5340.
- [19] Trousse F, Esteve P, Bovolenta P. BMP4 mediates apoptotic cell death in the developing chick eye [J]. *J Neurosci*, 2001, 21: 1292.
- [20] Gomes W A, Mehler M F, Kessler J A. Transgenic overexpression of BMP4 increases astroglial and decreases oligodendroglial lineage commitment [J]. *Dev Biol*, 2003, 255(1): 164-177.
- [21] Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus [J]. *Cell*, 2003, 113: 685-700.