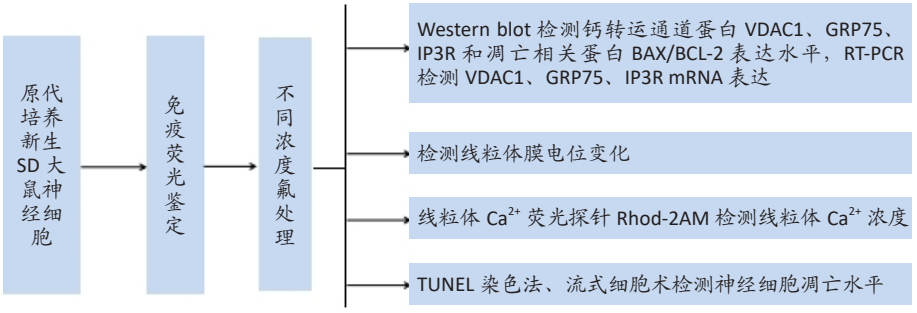
氟暴露对原代神经细胞内质网－线粒体钙转移及细胞凋亡的影响

卢永恒[1]，朱 双[1]，赵飞艳[1]，艾福军[1]，刘艳洁[1, 2]，董阳婷[3]，官志忠[1, 2, 3]，魏 娜[1, 2]

https://doi.org/10.12307/2025.929
采用日期：2024-11-26
修回日期：2024-12-15
在线日期：2025-01-10
中图分类号：
R459.9；R318；R994.6
文章编号：
2095-4344(2026)01-00111-09
文献标识码：B

文章快速阅读： 氟暴露对原代神经细胞凋亡、钙转移、线粒体膜电位和 Ca^{2+} 浓度的影响



文题释义：

内质网−线粒体钙转运： 是指Ca^{2+}由内质网到线粒体之间的转运过程，这一过程在细胞内钙信号转导、能量代谢、细胞生存和死亡等多种生理和病理过程中发挥着重要作用。

线粒体相关内质网膜： 是细胞内一种特殊结构，主要是线粒体和内质网相互靠近但不融合的区域，在细胞中涉及Ca^{2+}稳态、氧化应激、脂质代谢和细胞凋亡等多种生理过程。

摘要

背景： 前期研究发现持续过量氟暴露导致的神经细胞受损与Ca^{2+}超载有关，但Ca^{2+}在细胞内各钙库之间的流动转换和细胞凋亡损伤的作用机制尚不明确。

目的： 探讨氟暴露对原代神经细胞线粒体相关内质网膜内Ca^{2+}转运通道蛋白及细胞凋亡水平的影响。

方法： 体外培养新生SD大鼠原代神经细胞，培养至第7天采用神经元核特异性抗体NeuN行免疫荧光染色鉴定。神经细胞按照加氟浓度分为对照组(含0 mmol/L 氟化钠)、低氟组(含0.5 mmol/L 氟化钠)、高氟组(含1 mmol/L氟化钠)，氟暴露24 h后光镜下观察细胞形态变化；蛋白免疫印迹检测凋亡相关蛋白BAX/BCL-2和钙转移相关通路VDAC1、GRP75、IP3R蛋白表达；RT-PCR检测钙转移相关通路VDAC1、GRP75、IP3R mRNA表达；线粒体Ca^{2+}探针Rhod-2AM检测Ca^{2+}水平；线粒体膜电位试剂盒检测线粒体膜电位变化；流式细胞术、TUNEL染色法检测细胞凋亡水平。

结果与结论： ①培养至第7天的神经细胞经鉴定纯度可达90%以上，杂质少，生长状态良好，细胞网络连接紧密，达到后续实验要求；②与对照组相比，低氟组和高氟组神经细胞聚团生长增多，突起断裂，胞体圆缩，细胞之间连接网络被破坏；与低氟组相比，高氟组细胞损伤变化更为明显；③与对照组比较，低氟组和高氟组VDAC1、GRP75、IP3R蛋白表达上调($P < 0.05$)，凋亡相关蛋白BAX/BCL-2比值升高($P < 0.05$)；与对照组相比，低氟组VDAC1、GRP75 mRNA表达明显上调($P < 0.05$)，高氟组VDAC1、GRP75、IP3R mRNA表达显著上调($P < 0.01$)；④氟暴露处理后细胞凋亡水平明显上升，且高氟组显著高于对照组和低氟组($P < 0.01$)；⑤氟暴露处理后神经细胞线粒体Ca^{2+}浓度明显增加($P < 0.05$)，线粒体膜电位下降($P < 0.01$)，且高氟组损伤程度更为明显($P < 0.05$)。结果表明，氟暴露会损害原代神经细胞的形态结构，导致细胞内质网−线粒体间Ca^{2+}转移通路蛋白表达上调，线粒体Ca^{2+}超载，线粒体损伤，细胞凋亡水平升高。

关键词： 氟暴露；原代神经细胞；Ca^{2+}转移；细胞凋亡；线粒体膜电位；线粒体损伤；线粒体相关内质网膜；钙转运通道

Effect of fluoride exposure on endoplasmic reticulum-mitochondrial calcium transfer and apoptosis in primary nerve cells

Lu Yongheng[1], Zhu Shuang[1], Zhao Feiyan[1], Ai Fujun[1], Liu Yanjie[1, 2], Dong Yangting[3], Guan Zhizhong[1, 2, 3], Wei Na[1, 2]

[1]Pathology Teaching and Research Section, Clinical Medical College, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China; [2]Department of Pathology, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China; [3]Key Laboratory of Endemic and Ethnic Minority Diseases (Guizhou Medical University) of Ministry of Education, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Lu Yongheng, Master candidate, Pathology Teaching and Research Section, Clinical Medical College, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

[1] 贵州医科大学临床医学院病理学教研室，贵州省贵阳市 550004；[2] 贵州医科大学附属医院病理科，贵州省贵阳市 550004；[3] 地方病与少数民族疾病 (贵州医科大学) 教育部重点实验室，贵州省贵阳市 550004

第一作者： 卢永恒，男，1998 年生，贵州省毕节市人，汉族，贵州医科大学病理学与病理生理学在读硕士，主要从事地方病病理与分子病理方面的研究。

通讯作者： 魏娜，博士，副教授，贵州医科大学附属医院病理科，贵州省贵阳市 550004；贵州医科大学病理学教研室，贵州省贵阳市 550004
https://orcid.org/0009-0003-8792-8310(卢永恒)

基金资助： 国家自然科学基金项目 (82360672)，项目负责人：魏娜；贵州医科大学自然科学基金培育项目 (TJ23114)，项目负责人：魏娜；贵州省科技计划项目 (黔科合基础 −ZK[2022] 一般 439)，项目负责人：魏娜；贵州省科技计划项目 (黔科合基础 −ZK[2022] 一般 342)，项目负责人：董阳婷

引用本文： 卢永恒，朱双，赵飞艳，艾福军，刘艳洁，董阳婷，官志忠，魏娜 . 氟暴露对原代神经细胞内质网 − 线粒体钙转移及细胞凋亡的影响 [J]. 中国组织工程研究，2026，30(1):111-119.

Corresponding author: Wei Na, MD, Associate professor, Pathology Teaching and Research Section, Clinical Medical College, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China; Department of Pathology, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Abstract

BACKGROUND: Previous studies have found that neuronal damage caused by continuous excessive fluoride exposure is related to Ca^{2+} overload, but the mechanism of Ca^{2+} flow conversion between intracellular calcium stores and cell apoptosis damage is still unclear.

OBJECTIVE: To investigate the effect of fluoride exposure on Ca^{2+} transport channel proteins and apoptosis levels in the mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane of primary cultured neural cells.

METHODS: Primary nerve cells of neonatal SD rats were cultured *in vitro* and identified by immunofluorescence staining with neuronal nucleus-specific antibody up to day 7. The nerve cells were divided into control group (containing 0 mmol/L sodium fluoride), low fluoride group (containing 0.5 mmol/L sodium fluoride), and high fluoride group (containing 1 mmol/L sodium fluoride). The cell morphological changes were observed by light microscope 24 hours after fluorine exposure. The expression levels of apoptosis-related protein BAX/BCL-2 and calcium transfer-related pathways VDAC1, GRP 75, and IP3R were detected using western blot assay. The expression levels of VDAC1, GRP 75, and IP3R mRNA were detected by RT-PCR. Ca^{2+} levels were detected by Rhood-2AM Ca^{2+} probe. Mitochondrial membrane potential detection kit was used to detect the change in mitochondrial membrane potential. The level of apoptosis was determined by flow cytometry and TUNEL staining.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The purity of neurons cultured on day 7 had been determined to be over 90%, with few impurities, good growth status, and tight cell network connections, meeting the requirements of subsequent experiments. (2) Compared with the control group, growth of neural cell clusters in the low-fluoride group and the high-fluoride group increased; the processes were broken; the cell body was rounded, and the connection network between cells was destroyed. Compared with the low-fluoride group, the cell damage changes in the high-fluoride group were more obvious. (3) Compared with the control group, the protein expressions of VDAC1, GRP75, and IP3R were increased in the low-fluoride group and the high-fluoride group ($P < 0.05$), and the ratio of apoptosis-related protein BAX/BCL-2 was increased ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expression of VDAC1 and GRP75 mRNA in the low-fluoride group was significantly increased ($P < 0.05$); the expression levels of VDAC1, GRP75, and IP3R mRNA in the high-fluoride group were significantly increased ($P < 0.01$). (4) The level of cell apoptosis increased significantly after fluoride exposure, and the high-fluoride group was significantly higher than the control and low-fluoride groups ($P < 0.01$). (5) After fluoride exposure, the concentration of mitochondrial Ca^{2+} in nerve cells increased significantly ($P < 0.05$), the mitochondrial membrane potential decreased ($P < 0.01$), and the degree of damage in the high-fluoride group was more obvious ($P < 0.05$). The results show that fluoride exposure impairs the morphological structure of primary neural cells, resulting in upregulation of Ca^{2+} transfer pathway protein expression between the endoplasmic reticulum and mitochondria, mitochondrial Ca^{2+} overload, mitochondrial damage, and increased levels of apoptosis.

Key words: fluoride exposure; primary nerve cell; Ca^{2+} transfer; apoptosis; mitochondrial membrane potential; mitochondrial damage; mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane; calcium transport channel

Funding: *National Natural Science Foundation of China, No. 82360672 (to WN); Natural Science Foundation of Guizhou Medical University, No. TJ23114 (to WN); Guizhou Provincial Science and Technology Plan Project, No. ZK[2022]439 (to WN); Guizhou Provincial Science and Technology Plan Project, No. ZK[2022]342 (to DYT)*

How to cite this article: *LU YH, ZHU S, ZHAO FY, AI FJ, LIU YJ, DONG YT, GUAN ZZ, WEI N. Effect of fluoride exposure on endoplasmic reticulum-mitochondrial calcium transfer and apoptosis in primary nerve cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2026;30(1):111-119.*

0 引言 Introduction

人体长期暴露于高氟环境中会导致氟在体内蓄积，引起骨、肾脏、肝脏、脑等器官系统的损伤，造成慢性氟中毒[1-4]。作者前期研究发现，慢性氟中毒可引起神经细胞膜上兴奋性神经递质 NMDA 受体激活，Ca^{2+} 通道开放，Ca^{2+} 内流增加，造成细胞内 Ca^{2+} 稳态失衡[5-8]，进而激活细胞内质网应激相关通路[9-11]，引起内质网损伤，同时线粒体也出现不同程度损伤[12]，然而内流的 Ca^{2+} 去向及引起内质网线粒体损伤的机制还有待进一步研究。

线粒体相关内质网膜 (mitochondria-associated ER membranes，MAM) 是真核细胞中线粒体膜与内质网膜相互靠近却不融合的部分，介导了内质网和线粒体之间双向的物质和信息交流[13]，两者之间存在许多蛋白质分子复合物，参与维持和调节 MAM 活性、细胞稳态以及许多细胞生命活动，包括细胞凋亡、自噬、脂质代谢和 Ca^{2+} 转运等过程[14]。

在 MAM 中，1，4，5− 三磷酸肌醇受体 (Inositol 1，4，5-trisphosphate receptor，IP3R) 是位于内质网上的 Ca^{2+} 释放受体，激活后能够将 Ca^{2+} 释放到内质网 − 线粒体间隙中[15]，释放后的 Ca^{2+} 被线粒体外膜上的电压依赖性阴离子通道蛋白 1 (voltage-dependentanion channel 1，VDAC1) 摄取进入线粒体内外膜间隙，最后位于线粒体内膜上的 Ca^{2+} 单向转运体 (mitochondrial calcium uniporter，MCU) 将其摄入线粒体基质[16-17]，分子伴侣葡萄糖调节蛋白 75(glucose regulated protein 75，GRP75) 能够将 IP3R 和 VDAC1 连接起来，调节两者之间的相互作用，调控内质网到线粒体的 Ca^{2+} 通量，因此 VDAC1-GRP75-IP3R 成为了 MAM 结构中 Ca^{2+} 由内质网向线粒体转运的重要通道[18-19]。

该研究通过使用不同浓度氟化钠处理体外培养的原代神经细胞，观察氟暴露神经细胞的形态改变，检测 VDAC1-GRP75-IP3R 通道蛋白表达和细胞线粒体 Ca^{2+} 转移通量以及凋亡水平，初步探讨氟暴露对神经细胞内质网 − 线粒体 Ca^{2+} 转运通道和细胞凋亡水平的影响，为氟中毒致神经细胞损伤机制中的细胞 Ca^{2+} 超载学说提供可能依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外实验。

1.2 时间及地点 实验于 2023 年 8 月至 2024 年 8 月在贵州医科大学附属医院病理科实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 试剂 Neurobasal-A 培养基 (神经元基础培养基)、B27 营养因子 (Gibco)；左旋多聚赖氨酸 (Sigma)；木瓜蛋白酶、TritonX-100、DAPI、抗荧光淬灭封片剂、DEPC 水 (北京索莱宝)；

40 g/L 多聚甲醛 (Biosharp)；线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1)、免疫荧光抗体封闭液 (碧云天)；鼠源神经细胞核抗原 (NeuN) 抗体、Cy3 结合山羊抗鼠抗体 (武汉三鹰)；鼠源 GRP75 一抗、兔源 VDAC1、IP3R、BAX/BCL-2 一抗 (杭州华安生物)；鼠源 β-tublin 一抗 (上海艾比玛特)；山羊抗鼠、兔结合二抗 (Absin)；TUNEL 染色凋亡检测试剂盒 (FITC)、即用型 DAPI 染液、电泳液、转膜液 (干粉，武汉赛维尔)；分析纯氟化钠 (天津致远化学试剂有限公司)；1×HBSS 溶液、线粒体 Ca^{2+} 探针 Rhod-2AM(上海懋康生物科技公司)；细胞凋亡检测试剂盒 (AnnexinV-APC，7-AAD，杭州联科生物)；1×PBS(武汉普诺赛)；Trizol(赛默飞)；反转录、PCR 试剂盒 (TAKARA)；大鼠 VDAC1、GRP75、IP3R mRNA 扩增引物 (上海生工生物)。

1.3.2 主要溶剂配制 ①左旋多聚赖氨酸包被液：称取 10 mg 左旋多聚赖氨酸溶解于 10 mL 超纯水中，−20 ℃保存，使用时超纯水稀释 10 倍。② 2 mg/mL 木瓜蛋白酶消化液：称取 30 mg 木瓜蛋白酶溶解于 15 mL DMEM 基础培养基中，使用针式过滤器过滤后放入 37 ℃水浴锅中预热备用 (现配现用)。③神经元完全培养基 (含 0.25% 谷氨酰胺，Neurobasal-A 培养基、B27、双抗比例为 97 ∶ 2 ∶ 1)。④ 1 mg/mL 氟化钠溶液：准确称取 30 mg 氟化钠加入 20 mL 神经元基础培养基中，溶解后加入神经元基础培养基至 30 mL，针式过滤器除菌备用。⑤ 10% 脱脂牛奶封闭液：称取 2 g 脱脂奶粉加入 20 mL 蒸馏水搅拌充分溶解。⑥转膜液：1× 转膜液干粉溶解于 500 mL 超纯水后，加入 200 mL 无水乙醇，超纯水定容至 1 L。⑦电泳液：1× 电泳液干粉溶解于 800 mL 超纯水后定容至 1 L。⑧1×TBST：称取 2.42 g Tris、8.8 g NaCl 溶解于 800 mL 超纯水中，加入 1 mL 吐温 −20 搅拌均匀后，超纯水定容至 1 L。

1.3.3 实验动物 新生 72 h 内的 SD 大鼠 10−14 只，SPF 级，雌雄不限，由贵州医科大学实验动物中心提供，许可证号：SYXK(贵)2023-0002，实验方案经贵州医科大学动物实验伦理委员会批准，审批号为 NO.2305198。

1.4 实验方法

1.4.1 原代神经细胞的提取和培养 ①实验准备：使用 12 孔板培养用于免疫荧光鉴定、TUNEL 染色和线粒体膜电位检测的神经细胞，在底部放置爬片，使用 6 孔板培养用于蛋白免疫印迹、RT-PCR、流式细胞术检测的神经细胞，使用 20 mm 共聚焦小皿培养用于 Ca^{2+} 浓度检测的神经细胞，6 孔板和共聚焦小皿不放置细胞爬片，仅加入多聚赖氨酸包被底部。所有细胞培养器皿放入 37 ℃细胞培养箱包被过夜，第 2 天吸去左旋多聚赖氨酸并用 PBS 浸洗 5 min×3 次后放入细胞培养箱烘干备用。②原代提取：提取过程在冰上进行，新生乳鼠经体积分数 75% 乙醇消毒后断脊法处死，离断头部放入含预冷 DMEM 高糖培养基的 10 cm 细胞培养皿中，使用手术器械打开头骨，暴露整个大脑，用弯头镊托住大脑底部，小心取出完整大脑置于另一含预冷高糖培养基的培养皿中。③使用 2 把显微镊小心剥离皮质血管膜后，夹取大脑皮质 1.0−2.0 mm 厚度的组织块置于新的含预冷高糖培养基的培养皿中，将组织剪成 1 mm×1 mm×1 mm 左右的碎块，静置 2 min 后小心吸掉上清，加入预热的木瓜蛋白酶，37 ℃细胞培养箱消化 25 min，每 5 min 摇晃一次充分消化组织。④加入适量含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基轻柔吹打，终止消化。⑤使用 70 μm 滤网过滤单细胞悬液，1 000 r/min 离心 5 min，去掉上清，换用神经元完全培养基重悬细胞，计数后按 2×10^9 L^{-1} 浓度进行接种铺板，6 孔板每孔加入 2 mL 细胞悬液，12 孔板每孔加入 1 mL 细胞悬液，20 mm 共聚焦小皿加入 1.5 mL 细胞悬液，第 2 天去除培养基，使用预热的神经元基础培养基小心润洗 1 遍细胞后，加入神经元完全培养基继续培养，之后每 2 d 半量换液，持续培养至第 7 天。

1.4.2 原代神经细胞鉴定 原代神经细胞培养至第 7 天后弃去培养基，PBS 浸洗细胞爬片 2 次 ×3 min，40 g/L 多聚甲醛固定 20 min，PBS 浸洗细胞爬片 3 次 ×3 min，0.25% TritonX-100 室温通透 20 min，PBS 浸洗细胞爬片 3 次 ×3 min，免疫荧光抗体封闭液室温封闭 1 h，吸掉封闭液，在爬片上滴加鼠源 NeuN 抗体 (1 ∶ 100)，4 ℃摇床孵育过夜，第 2 天爬片经 PBS 浸洗 3 次 ×5 min 后，滴加抗小鼠 Cy3 结合荧光素二抗 (1 ∶ 200) 避光孵育 2 h，PBS 浸洗 3 次 ×3 min，滴加 DAPI 避光孵育 5 min，PBS 浸洗 3 次 ×3 min，滴加抗荧光淬灭封片剂在载玻片上，将爬片上有细胞的一侧盖向载玻片进行封固，荧光显微镜下观察并拍照。随机选取 3 个 200 倍视野拍照取图，用 Image J 进行阳性细胞比例分析。

1.4.3 原代神经细胞的氟暴露处理 根据前期预实验确定染氟浓度，对照组含 0 mmol/L 氟化钠，低氟组含 0.5 mmol/L 氟化钠，高氟组含 1 mmol/L 氟化钠。培养至第 7 天的原代神经细胞，使用含不同浓度氟化钠的神经元完全培养基进行全量换液，37 ℃培养箱培养 24 h 作氟暴露处理。在神经元完全培养基中加入 1 mg/mL 氟化钠溶液配置对应染氟浓度的培养基，对照组 (加入正常神经元完全培养基)，低氟组 (979 μL 神经元完全培养基加 21 μL 1 mg/mL 的氟化钠溶液)，高氟组 (958 μL 神经元完全培养基加 42 μL 1 mg/mL 的氟化钠溶液)。

1.4.4 神经细胞钙转移通路及凋亡相关蛋白检测 取氟暴露处理 24 h 的原代神经细胞，弃去培养基，使用 PBS 小心浸洗 2 次 ×3 min，加入 RIPA 冰上裂解细胞 20 min，收集裂解液至 1.5 mL EP 管，4 ℃、12 500 r/min 离心 15 min，收集上清得到总蛋白，加入 5×Loading Buffer 沸水浴 10 min 变性后 −20 ℃

保存，蛋白上样后经 8% SDS-PAGE 电泳后转膜至 PVDF 膜 (电泳 40 min，转印 25 min)，10% 脱脂牛奶室温封闭 2 h，TBST 浸洗 3 次 ×10 min，4 ℃摇床过夜孵育 VDAC1(1 ： 1 000)、GRP75(1 ： 2 000)、IP3R(1 ： 500)、BAX(1 ： 2 000)、BCL-2 (1 ： 1 000)、β-tublin(1 ： 10 000) 蛋白一抗，第 2 天 TBST 浸洗条带 3 次 ×10 min，室温孵育二抗 (山羊抗兔 IgG、山羊抗鼠 IgG，1 ： 25 000)1 h，TBST 浸洗条带 3 次 ×10 min，添加曝光液进行显影，使用 Image J 进行灰度值统计，所得目的条带灰度值 /β-tublin 灰度值得到目的蛋白相对表达量。

1.4.5 RT-PCR 检测 VDAC1、GRP75、IP3R mRNA 表达 取氟暴露处理 24 h 的原代神经细胞，吸除培养基，使用 PBS 润洗 2 次 ×3 min，每孔加入 500 μL Trizol 将细胞吹下，室温裂解 2 min，加入 1/5 体积氯仿混匀，室温静置 3 min，转移裂解液至 1.5 mL 离心管，4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min，转移上层水相至新离心管后，加入等体积异丙醇，室温静置 3 min，4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min，小心吸除上清，加入 1 mL DEPC 水配置的体积分数 75% 乙醇 (需预冷)，4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min，吸除上清，离心管倒扣，风干 5 min 后加入 50 μL DEPC 水溶解，测定浓度后按照试剂盒说明进行反转录和 PCR 反应，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法统计 mRNA 表达量，引物序列见**表 1**，反应体系见**表 2**。

表 1 | PCR 引物序列
Table 1 | **PCR primer sequences**

基因	引物序列
VDAC1	Forward：5′-AAG AAC GTC AAT GCG GGT GG-3′
	Reverse：5′-TCC GCT GTA CCT CTG AAA CG-3′
GRP75	Forward：5′-TGC CAT TCA AGG AGG TGT-3′
	Reverse：5′-GTT TGT CCA TCA GCA GCA-3′
IP3R	Forward：5′-ATG CCA GGA GGA AAT GCG AA-3′
	Reverse：5′-CTC AGG GGT GGA CTT GGT TC-3′
GAPDH	Forward：5′-GAC ATG CCG CCT GGA GAA AC-3′
	Reverse：5′-AGC CCA GGA TGC CCT TTA GT-3′

表注：IP3R 为 1，4，5– 三磷酸肌醇受体；VDAC1 为电压依赖性阴离子通道蛋白 1；GRP75 为葡萄糖调节蛋白 75。

表 2 | PCR 反应体系
Table 2 | **PCR reaction system**

试剂	使用量 (μL)	终浓度
SYBR Primix Ex Taq Ⅱ	12.5	1×
PCR Forward Primer	1	0.4 μmol/L
PCR Forward Primer	1	0.4 μmol/L
反转录反应液 (cDNA)	2	
无菌无酶水	8.5	
总计	25	

1.4.6 线粒体 Ca^{2+} 浓度检测 氟暴露处理 24 h 后，吸除共聚焦小皿中的培养基，使用 HBSS 浸洗细胞 2 次，按照探针推荐加载浓度将 Rhod-2AM 配置为 4 μmol/L 工作液，每皿细胞加入 500 μL 探针工作液，37 ℃孵育 30 min，HBSS 清洗细胞 2 次，加入 500 μL HBSS 室温孵育 10 min 后共聚焦显微镜下观察拍照。使用 Image J 对图像进行量化分析。

1.4.7 线粒体膜电位检测 氟暴露处理 24 h 后进行检测。① JC-1 染色工作液配制：根据实验用量用超纯水将 5×JC-1 染色缓冲液稀释 5 倍后，再用 1×JC-1 染色缓冲液将 JC-1 染色液稀释 200 倍，得到 JC-1 染色工作液。②染色：吸除培养液，使用 PBS 小心洗涤细胞 1 次，加入 1 mL 神经元完全培养基，加入 500 μL JC-1 染色工作液，充分混匀，37 ℃细胞培养箱中孵育 20 min。③浸洗：孵育结束后，吸除染色液，用 1×JC-1 染色缓冲液小心洗涤 2 次，加入 1 mL 神经元完全培养基，荧光显微镜观察拍照。

1.4.8 TUNEL 染色法检测神经细胞凋亡 ①固定：氟暴露处理 24 h 后，去除培养基，PBS 小心浸洗 2 次 ×3 min，40 g/L 多聚甲醛溶液室温固定 20 min，去掉固定液，PBS 清洗 2 次 × 3 min。②通透：使用 10 μg/mL 的 ProteinaseK 溶液室温孵育 5 min 进行通透，PBS 清洗 2 次 ×3 min。③平衡：在爬片上滴加 50 μL Equilibration Buffer 覆盖细胞，室温孵育 10 min，PBS 浸洗 3 次 ×5 min，浸洗后吸掉 PBS(注意不要干片)。④配制标记工作液：此步骤在平衡孵育后 PBS 浸洗期间完成，在冰上解冻 FITC-12-dUTP Labeling Mix 和 Equilibration Buffer 后，按照实验所需标记工作液体积将 Recombinant TdT enzyme ： FITC-12-dUTP Labeling Mix ： Equilibration Buffer= 2 μL ： 5 μL ： 50 μL(2 ： 5 ： 50) 比例混合。⑤标记：在每个爬片样本上滴加 57 μL TdT 标记工作液，放入湿盒，37 ℃水浴避光孵育 1 h，注意不能干片 (标记开始之后的所有步骤都要避光进行)，PBS 浸洗 4 次 ×5 min。⑥染核：去除 PBS，在每张爬片上滴加 100 μL DAPI 染液，室温染核 5 min，PBS 浸洗 3 次 ×5 min。取出爬片，用滤纸吸干爬片周围的液体，滴加抗荧光淬灭封片剂在载玻片上后，将爬片上有细胞的一侧盖向载玻片进行封固，荧光显微镜下观察并拍照。

1.4.9 流式细胞术检测神经细胞凋亡 氟暴露处理 24 h 后，弃去细胞培养基，PBS 小心浸洗细胞 1 次，加入细胞消化酶 Acutase 酶 (该酶是检测试剂盒自带产品，消化效果较温和，且不需要终止消化) 将原代神经细胞消化 3 min，1 000 r/min 离心 5 min，弃上清，PBS 重悬洗涤后再次离心，弃上清，加入 500 μL 1×Bindding Buffer 重悬，将悬液转移到流式分析管中，每管加入 5 μL AnnexinV-APC 和 7-AAD，单染管分别仅加入 5 μL AnnexinV-APC 和仅加入 10 μL 7-AAD，轻微振荡混匀后室温避光孵育 5 min，流式上机分析。

1.5 主要观察指标 氟暴露处理后原代神经细胞的镜下形态改变，氟暴露引起的原代神经细胞线粒体 Ca^{2+} 浓度、膜电

位变化，细胞凋亡水平，原代神经细胞钙转运通路 VDAC1、GRP75、IP3R 蛋白和凋亡相关蛋白 BAX/BCL-2 表达水平。

1.6 统计学分析 每个实验经过 3 次独立重复，数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，应用 GraphPad Prism 10 进行数据统计分析，计量资料采用配对 *t* 检验或单因素方差分析，$P < 0.05$ 为差异有显著性意义。文章统计学方法已经通过贵州医科大学生物统计学专家审核。

2 结果 Results

2.1 原代神经细胞的形态 如**图 1** 所示，培养至第 7 天的神经细胞状态良好，体积较大、胞体圆润，细胞质丰富，光晕明显，细胞呈轻度聚集生长，细胞突起丰富，细胞之间相互连接形成紧密网络。

2.2 原代神经细胞的鉴定结果 使用 NeuN 进行免疫荧光染色鉴定，NeuN 是一种神经元特异性核蛋白，主要表达于成熟的神经细胞核中，表达量与神经细胞数量呈正相关，可用于定量分析神经细胞数目变化（**图 2** 所示，蓝色：DAPI，红色：NeuN）。随机拍取 6 个 200 倍视野，使用 Image J 计算神经细胞的纯度为 (95.00±2.31)%。

2.3 氟处理后神经细胞形态变化 如**图 3** 所示，氟暴露处理 24 h 后，于光学显微镜下观察神经细胞形态变化，可见对照组神经细胞呈轻度聚集生长，状态良好，胞体饱满，圆润，突起丰富，突起之间的连接较为紧密；与对照组比较，氟暴露组神经细胞胞体出现肿胀、圆缩，细胞之间聚集生长程度增加，细胞突起变短或缺失，细胞间突起连接减少；与低氟组比较，高氟组细胞形态变化更明显，甚至部分细胞出现死亡，细胞碎片增加。

2.4 染氟处理后线粒体 Ca^{2+} 浓度变化 如**图 4** 所示，经线粒体 Ca^{2+} 指示剂 Rhod-2-AM 处理后，荧光显微镜下可见 Ca^{2+} 广泛分布于神经细胞胞质及突起内，且随氟暴露浓度增加，细胞内 Ca^{2+} 荧光染色逐渐增强，高氟组线粒体 Ca^{2+} 浓度明显高于对照组和低氟组 ($P < 0.05$)。

2.5 染氟处理后线粒体膜电位变化 线粒体膜电位检测是一种以 JC-1 为荧光探针，检测细胞、组织等膜电位变化的实验方法，可用于早期的细胞凋亡检测，当线粒体膜电位较高时，JC-1 可以在线粒体的基质中形成聚合物 (J-aggregates)，产生红色荧光，当线粒体膜电位较低时，JC-1 不能聚集在线粒体的基质中，以单体 (monomer) 形式存在，产生绿色荧光。通过 JC-1 从红色荧光到绿色荧光的转变可以很容易地检测到细胞膜电位的下降。如**图 5** 所示，氟暴露导致原代神经细胞线粒体膜电位降低，且高氟组神经细胞膜电位下降最为明显。

2.6 染氟处理后神经细胞 VDAC1-GRP75-IP3R 通路和凋亡相关蛋白 BAX/BCL-2 表达变化 如**图 6** 所示，与对照组相比，低氟组和高氟组细胞 Ca^{2+} 转运通道相关蛋白 VDAC1、GRP75、IP3R 表达均明显升高 ($P < 0.05$)；与对照组相比，低氟组和高氟组神经细胞 BAX/BCL-2 蛋白表达比值明显升高 ($P < 0.05$)，且 BAX/BCL-2 随着氟处理浓度增加而增加 ($P < 0.01$)。

2.7 染氟处理后细胞凋亡水平变化 如**图 7** 所示，流式细胞术结果显示氟暴露处理后，细胞凋亡水平明显上升，且高氟组显著高于对照组和低氟组 ($P < 0.01$)；TUNEL 染色结果显示，与对照组相比，氟暴露处理导致低氟组与高氟组凋亡神经细胞数量增加 ($P < 0.01$)，且高氟组细胞凋亡数量明显高于低氟组 ($P < 0.01$)。

3 讨论 Discussion

持续过量的氟暴露会造成神经细胞膜 NMDA 受体组成亚单位的表达改变，导致细胞对 Ca^{2+} 通透性增加，引起细胞 Ca^{2+} 内流超载，过量的 Ca^{2+} 还可与钙调蛋白 (Calmodulin，CaM) 结合并激活 CaM 依赖性蛋白激酶 (Calmodulin-dependent kinase Ⅱ，CaMK Ⅱ)，进一步造成神经细胞兴奋性毒性损害 [20]。储存于内质网钙库中的 Ca^{2+} 可作为第二信使，通过内质网上的 IP3R 释放后被线粒体摄取，进入线粒体的 Ca^{2+} 参与三羧酸循环和细胞凋亡等代谢过程 [21]，因此，线粒体扮演了缓冲内质网和胞质 Ca^{2+} 的重要角色，同时线粒体的钙超载也会引发一系列的级联反应 [22]，但有关氟暴露后神经细胞内 Ca^{2+} 在内质网－线粒体间的转运途径及影响还有待深入研究。

在 MAM 中，VDAC1-GRP75-IP3R 是负责将 Ca^{2+} 从内质网高效转运到线粒体的蛋白复合体 [19]，研究发现，过表达 VDAC1 可以增强内质网与线粒体之间的连接，进而增加内质网到线粒体的 Ca^{2+} 通量；沉默或敲低 VDAC1 则会导致 GRP75 和 IP3R1 之间的连接减少，显示内质网与线粒体相互作用减少；在过表达 GRP75 的细胞中，发现了 IP3R1-VDAC1 相互作用位点的增加；沉默 IP3R1 或 GRP75 则会导致 VDAC1 和 GRP75 或 IP3R1 之间的连接作用减少，表明 3 种蛋白的连接不仅可以进行内质网和线粒体之间的钙转运，还参与维持 MAMs 的结构 [23-25]。该研究发现原代神经细胞在氟暴露 24 h 后，低氟组与高氟组细胞内钙转移通道组成蛋白 VDAC1、GRP75、IP3R 表达都有升高，同时荧光探针检测到线粒体 Ca^{2+} 浓度增加，推测神经细胞氟暴露后，细胞线粒体 Ca^{2+} 内流的增加与 VDAC1-GRP75-IP3R 钙转移通路有关。

线粒体的 Ca^{2+} 内流增加可能进一步引起线粒体 Ca^{2+} 超载，激活下游一系列相关通路，导致细胞发生进一步损伤。线粒体外膜通透化是一种不可逆转地导致细胞死亡的决定性

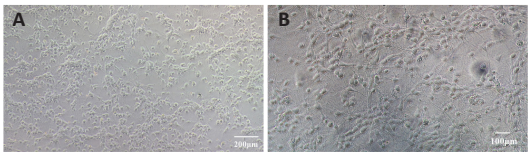


图 1 | 培养至第 7 天的原代神经细胞形态 (A：×100，B：×200)
Figure 1 | Primary neuronal morphology from culture to day 7 (A: ×100, B: ×200)

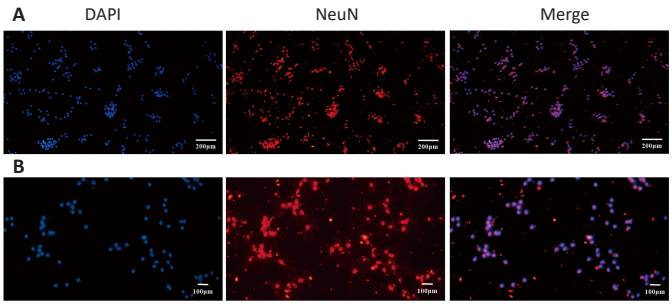


图 2 | 原代神经细胞核特异抗体 NeuN 的免疫荧光鉴定 (A：×100，B：×200)
Figure 2 | Immunofluorescence identification of nuclear-specific antibody Neun in primary neuronal cells (A: ×100, B: ×200)

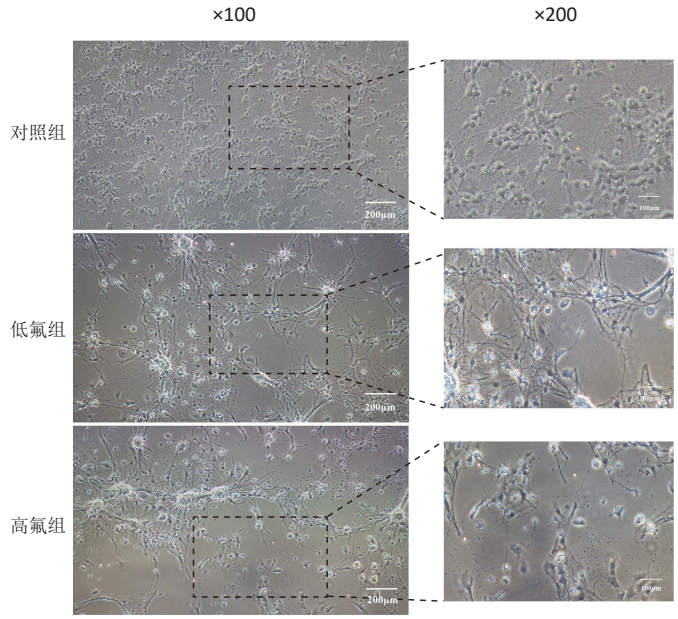


图 3 | 氟化钠处理 24 h 后各组神经细胞的形态变化
Figure 3 | Morphological changes of neuronal cells in each group after 24 hours of sodium fluoride treatment

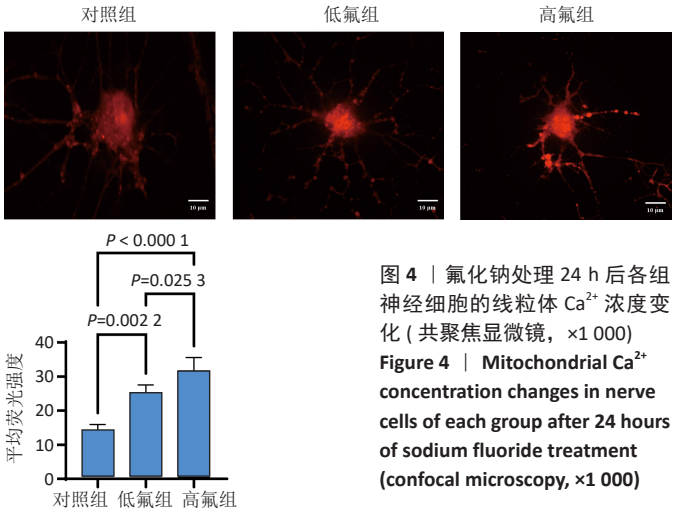


图 4 | 氟化钠处理 24 h 后各组神经细胞的线粒体 Ca^{2+} 浓度变化 (共聚焦显微镜，×1 000)
Figure 4 | Mitochondrial Ca^{2+} concentration changes in nerve cells of each group after 24 hours of sodium fluoride treatment (confocal microscopy, ×1 000)

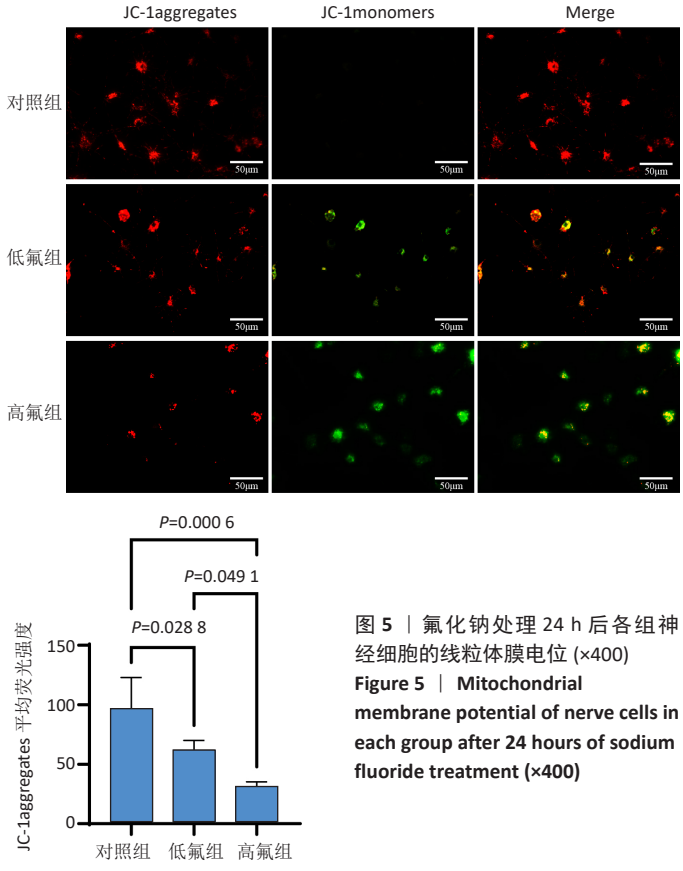
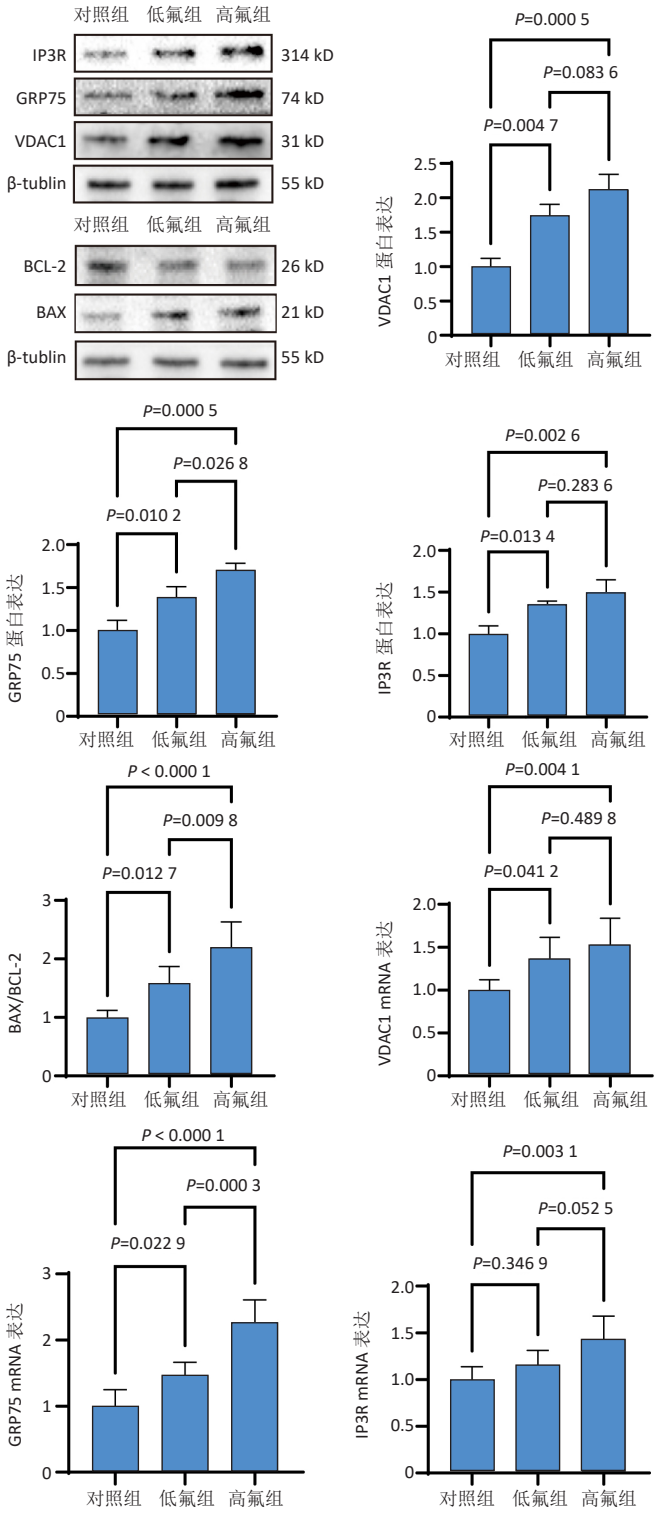


图 5 | 氟化钠处理 24 h 后各组神经细胞的线粒体膜电位 (×400)
Figure 5 | Mitochondrial membrane potential of nerve cells in each group after 24 hours of sodium fluoride treatment (×400)

事件 [26]，当线粒体受到外部刺激或内部损伤如氧化应激、DNA 损伤、Ca^{2+} 失衡、线粒体膜电位降低时都有可能会导致线粒体外膜通透性发生改变，细胞色素 C 从线粒体膜间隙释放到胞质，激活凋亡相关的蛋白酶 (胱天蛋白酶) 级联反应，引起细胞凋亡 [27-30]。

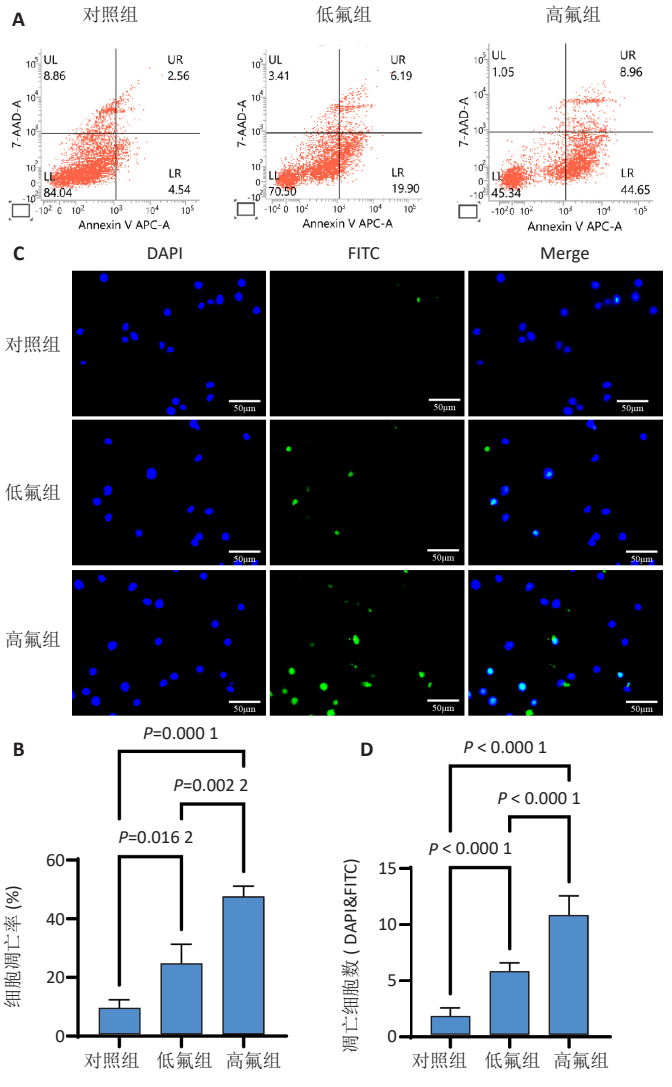
线粒体外膜通透化的不可逆转性使其本身受到严格的调控，主要由 BCL-2 蛋白家族成员调控 [31]，该家族可细分为促凋亡效应蛋白 (BAX 和 BAK)、促凋亡 BH3 特异性蛋白 (Bid、BIK、BAD 等) 和抗凋亡 BCL-2 蛋白 (BCL-2、BCL-xL、BCL-B 等)，其中，活化的 BAX 或 BAK 蛋白是线粒体外膜通透化所必需的。多数情况下，BAX 或 BAK 的激活是与 BH3 特异性蛋白家族成员直接相互作用后发生构象改变，并在线粒体外膜寡聚化完成的 [32]，BAX 或 BAK 形成寡聚体后使线粒体外膜通透，细胞色素 C 释放，进一步引起细胞凋亡，其可能机制是通过诱导脂膜成孔间接实现，也可能是本身直接形成孔道，目前尚不清楚 [33-35]。抗凋亡的 BCL-2 蛋白可以通过竞争性结合 BH3 特异性蛋白或直接结合活化的 BAX 或 BAK 来抵消两者的活性，



图注：IP3R 为 1，4，5− 三磷酸肌醇受体；VDAC1 为电压依赖性阴离子通道蛋白 1；GRP75 为葡萄糖调节蛋白 75。

图 6 | 氟化钠处理 24 h 后各组神经细胞钙转通道蛋白、mRNA 表达和凋亡相关蛋白表达变化

Figure 6 | Changes in calcium transduction channel protein, mRNA expression and apoptosis-related protein expression in nerve cells of each group after 24 hours of sodium fluoride treatment



图注：图 A，B 为流式细胞术检测细胞凋亡水平；C，D 为 TUNEL 染色检测细胞凋亡水平 (×400)。

图 7 | 氟化钠处理 24 h 后各组神经细胞凋亡水平变化

Figure 7 | Changes in apoptosis level of nerve cells in each group after 24 hours of sodium fluoride treatment

阻止线粒体外膜通透化和凋亡的发生，因此，BAX/BCL-2 表达比值一定程度上代表了凋亡发生的水平 [36-37]。

SHAO 等 [38] 研究发现，实验性氟中毒小鼠肾细胞 L 型钙通道 (L-type calcium channel，LTCC) 的持续开放导致细胞钙超载，CaM 蛋白表达显著增加和 CAMK Ⅱ蛋白表达下调，以及凋亡相关蛋白 BAX/BCL-2 比值显著升高诱导了肾细胞的凋亡，当细胞 Ca^{2+} 内流增加时，Ca^{2+} 会结合到 CaM 上，形成 Ca^{2+}-CaM 复合物并激活 CAMK Ⅱ，从而向下游传递信号，Ca^{2+}-CaM-CAMK Ⅱ路径相关蛋白的表达异常，可能导致 Ca^{2+} 信号的转导异常，发生细胞 Ca^{2+} 超载和细胞毒性，从而诱导细胞的凋亡。ZHANG 等 [39] 研究发现氟暴露原代星形胶质细胞表面的 NMDA 受体调节亚基表达上调，NMDA 受体过度激活、细胞对 Ca^{2+} 通透性增强和细胞 Ca^{2+} 内流增加可能是引起细胞 Ca^{2+} 超载的始动因素，钙超载同样导致了细胞凋亡水平的升高，线粒体 Ca^{2+} 浓度也有升高。SHAO 等 [38] 和 ZHANG 等 [39] 研究所侧重的钙信号转导通路有所不同，在研究中使用相关钙信号转导通路抑制剂后，都能够降低细胞钙超载水平，缓

解细胞凋亡损伤，表明实验性氟中毒引起的 Ca^{2+} 超载或许与细胞凋亡损伤有一定联系，但都没有具体阐明 Ca^{2+} 内流入细胞以后，在胞内各钙库以及钙信号转导通路之间如何流动，以及钙超载引起细胞凋亡水平上升的可能机制。

目前，研究线粒体外膜通透化中 BAX 和 BAK 诱导线粒体外膜成孔的相关机制，能够为药物开发、细胞应激、神经退行性疾病和癌症研究提供新的策略和思路[40-43]，SHIMIZU 等[44-45]研究发现，BAX 与 VDAC1 可以形成一个大的多聚体通道，允许蛋白质通过人工膜释放，介导细胞色素 C 等相关凋亡蛋白的释放，引起细胞凋亡。TAJEDDINE 等[46]发现在使用 VADC1 化学抑制剂后，能够拮抗顺铂引起的细胞凋亡和 BAX 及其下游 Caspase-3 的激活，而使用 BH3 蛋白模拟物激活 BAX 后可恢复 VDAC1 缺失细胞对 CDDP 诱导凋亡的敏感性，表明 VDAC1 可作为 BAX(不含 BAK) 的激活剂，参与下游凋亡信号的传递，诱导细胞凋亡。该实验观察到，氟暴露原代神经细胞的正常结构受损，神经细胞钙转运通道 VDAC1-GRP75-IP3R 组成蛋白表达上调，线粒体 Ca^{2+} 内流增加；线粒体膜电位检测实验显示氟暴露降低了神经细胞线粒体膜电位，这是早期凋亡发生的标志，BAX/BCL-2 蛋白比值显著升高，同时 TUNEL 染色和流式细胞术检测验证了氟暴露导致神经细胞凋亡水平上升，提示 VDAC1-GRP75-IP3R 钙通道可能介导了氟暴露引起的神经细胞线粒体 Ca^{2+} 内流超载，导致线粒体损伤，并诱发细胞凋亡的过程。作者推测，VADC1 蛋白在细胞 Ca^{2+} 超载进程中除了参与介导 Ca^{2+} 向线粒体内外膜间隙的流动之外，或许还存在与 BAX 的相互作用，一系列的相关信号传递与蛋白互作，最终导致了氟暴露引起的原代神经细胞损伤，在后续研究中更多关注于 BAX 和 VDAC1 的相互作用及其详细机制，或许能为进一步探索氟暴露神经细胞 Ca^{2+} 超载和凋亡损伤的具体机制提供新的思路和方法。

综上所述，氟暴露可引起原代神经细胞结构受损，钙转运通路 VDAC1-GRP75-IP3R 组成蛋白表达增加，线粒体 Ca^{2+} 内流超载和损伤，细胞凋亡水平上升。

致谢：感谢贵州医科大学病理学教研室、贵州医科大学附属医院病理科实验室和贵州医科大学实验动物中心对实验的大力支持。

作者贡献：魏娜、卢永恒负责实验设计，卢永恒负责实验实施、论文撰写，朱双、艾福军负责细胞培养，赵飞艳、董阳婷负责实验数据分析处理、指标检测，官志忠、刘艳洁负责数据和文章的校对。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名－非商业性使用－相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范：该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

[1] SOLANKI YS, AGARWAL M, GUPTA AB, et al. Fluoride occurrences, health problems, detection, and remediation methods for drinking water: A comprehensive review. Sci Total Environ. 2022;807(Pt 1): 150601.

[2] ZHANG J, SARDANA D, LI KY, et al. Topical Fluoride to Prevent Root Caries: Systematic Review with Network Meta-analysis. J Dent Res. 2020;99(5):506-513.

[3] HE X, LI P, JI Y, et al. Groundwater arsenic and fluoride and associated arsenicosis and fluorosis in China: occurrence, distribution and management. Expo Health. 2020;12:355-368.

[4] PODGORSKI J, BERG M. Global analysis and prediction of fluoride in groundwater. Nat Commun. 2022;13(1):4232.

[5] 唐余敬 , 蓝奉军 , 李光第 , 等 . 钙离子在慢性氟中毒发病机制中的作用 [J]. 中国组织工程研究 ,2023,27(17):2745-2753.

[6] 赵保华 , 张东军 , 赵宗权 . 慢性氟中毒对神经系统的影响及诊治分析 [J]. 中国地方病防治杂志 ,2018,33(3):327+329.

[7] CHEN L, JIA P, LIU Y, et al. Fluoride exposure disrupts the cytoskeletal arrangement and ATP synthesis of HT-22 cell by activating the RhoA/ROCK signaling pathway. Ecotoxicol Environ Saf. 2023;254:114718.

[8] 童爱群 .Morris 水迷宫训练对慢性氟中毒脑损害大鼠模型学习记忆能力及海马组织的影响分析 [J]. 中国地方病防治 ,2022,37(4): 289-290.

[9] WEI N, DONG YT, DENG J, et al. Changed expressions of N-methyl-d-aspartate receptors in the brains of rats and primary neurons exposed to high level of fluoride. J Trace Elem Med Biol. 2018;45:31-40.

[10] 毕翻 . 慢性氟中毒对仔代大鼠海马 NMDA 受体表达的影响 [D]. 贵阳 : 贵州医科大学 ,2020.

[11] 杨淳 , 温建霞 , 冯江龙 , 等 . 氟中毒大鼠脑组织中 NMDA 受体及内质网应激相关通路蛋白的表达 [J]. 中国组织工程研究 ,2024,28(7): 1070-1075.

[12] 戴姗姗 , 李锦沂 , 杨克宇 , 等 . 氟化钠通过氧化应激和内质网应激途径诱导 PC12 细胞凋亡 [J]. 山西医科大学学报 ,2023,54(8): 1107-1112.

[13] HU Y, CHEN H, ZHANG L, et al. The AMPK-MFN2 axis regulates MAM dynamics and autophagy induced by energy stresses. Autophagy. 2021;17(5):1142-1156.

[14] WANG N, WANG C, ZHAO H, et al. The MAMs Structure and Its Role in Cell Death. Cells. 2021;10(3):657.

[15] ZHANG N, YU H, LIU T, et al. Bmal1 downregulation leads to diabetic cardiomyopathy by promoting Bcl2/IP3R-mediated mitochondrial Ca^{2+} overload. Redox Biol. 2023;64:102788.

[16] GARBINCIUS JF, ELROD JW. Mitochondrial calcium exchange in physiology and disease. Physiol Rev. 2022;102(2):893-992.

[17] MEANS RE, KATZ SG. Yes, MAM! Mol Cell Oncol. 2021;8(4):1919473.

[18] MISSIROLI S, PATERGNANI S, CAROCCIA N, et al. Mitochondria-associated membranes (MAMs) and inflammation. Cell Death Dis. 2018;9(3):329.

[19] HAYASHI T, RIZZUTO R, HAJNOCZKY G, et al. MAM: more than just a housekeeper. Trends Cell Biol. 2009;19(2):81-88.
[20] 温建霞 , 魏娜 , 毕翻 . 慢性氟中毒大鼠脑组织 P-NMDAR 及 CaMK Ⅱ的表达 [J]. 中华地方病学杂志 ,2020,39(9):636-640.
[21] CABRAL-COSTA JV, KOWALTOWSKI AJ. Mitochondrial Ca^{2+} handling as a cell signaling hub: lessons from astrocyte function. Essays Biochem. 2023;67(1):63-75.
[22] VEERESH P, KAUR H, SARMAH D, et al. Endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk: from junction to function across neurological disorders. Ann N Y Acad Sci. 2019;1457(1):41-60.
[23] LEE S, WANG W, HWANG J, et al. Increased ER-mitochondria tethering promotes axon regeneration. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019;116(32): 16074-16079.
[24] YE L, ZENG Q, LING M, et al. Inhibition of IP3R/Ca^{2+} Dysregulation Protects Mice From Ventilator-Induced Lung Injury via Endoplasmic Reticulum and Mitochondrial Pathways. Front Immunol. 2021;12: 729094.
[25] LI J, QI F, SU H, et al. GRP75-faciliated Mitochondria-associated ER Membrane (MAM) Integrity controls Cisplatin-resistance in Ovarian Cancer Patients. Int J Biol Sci. 2022;18(7):2914-2931.
[26] GREEN DR. The Mitochondrial Pathway of Apoptosis: Part I: MOMP and Beyond. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2022;14(5):a041038.
[27] YAPRYNTSEVA MA, ZHIVOTOVSKY B, GOGVADZE V. Permeabilization of the outer mitochondrial membrane: Mechanisms and consequences. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2024;1870(7):167317.
[28] VICTORELLI S, SALMONOWICZ H, CHAPMAN J, et al. Apoptotic stress causes mtDNA release during senescence and drives the SASP. Nature. 2023;622(7983):627-636.
[29] ZHOU Z, ARROUM T, LUO X, et al. Diverse functions of cytochrome c in cell death and disease. Cell Death Differ. 2024;31(4):387-404.
[30] MORSE PT, ARROUM T, WAN J, et al. Phosphorylations and Acetylations of Cytochrome c Control Mitochondrial Respiration, Mitochondrial Membrane Potential, Energy, ROS, and Apoptosis. Cells. 2024;13(6):493.
[31] KALKAVAN H, GREEN DR. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. Cell Death Differ. 2018;25(1):46-55.
[32] WOLF P, SCHOENIGER A, EDLICH F. Pro-apoptotic complexes of BAX and BAK on the outer mitochondrial membrane. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2022;1869(10):119317.
[33] DADSENA S, CUEVAS ARENAS R, VIEIRA G, et al. Lipid unsaturation promotes BAX and BAK pore activity during apoptosis. Nat Commun. 2024;15(1):4700.
[34] COSENTINO K, HERTLEIN V, JENNER A, et al. The interplay between BAX and BAK tunes apoptotic pore growth to control mitochondrial-DNA-mediated inflammation. Mol Cell. 2022;82(5):933-949.e9.
[35] SCHWEIGHOFER SV, JANS DC, KELLER-FINDEISEN J, et al. Endogenous BAX and BAK form mosaic rings of variable size and composition on apoptotic mitochondria. Cell Death Differ. 2024;31(4):469-478.
[36] O'NEILL KL, HUANG K, ZHANG J, et al. Inactivation of prosurvival Bcl-2 proteins activates Bax/Bak through the outer mitochondrial membrane. Genes Dev. 2016;30(8):973-988.
[37] BOCK FJ, TAIT SWG. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. Nat Rev Mol Cell Biol. 2020;21(2):85-100.
[38] SHAO D, ZHANG J, TANG L, et al. Effects and Molecular Mechanism of L-Type Calcium Channel on Fluoride-Induced Kidney Injury. Biol Trace Elem Res. 2020;197(1):213-223.
[39] ZHANG Y, LU YH, ZHU S, et al. Decreased Autophagy, Enhanced Apoptosis and Raised Intracellular Calcium in Astrocytes Exposed to Excessive Fluoride as well as the Attenuated Effect of Ifenprodil on the Neurotoxicity. Fluoride. 2024;57(5):1-12.
[40] LINDENBOIM L, GROZKI D, AMSALEM-ZAFRAN AR, et al. Apoptotic stress induces Bax-dependent, caspase-independent redistribution of LINC complex nesprins. Cell Death Discov. 2020;6(1):90.
[41] RÜHL S, LI Z, SRIVASTAVA S, et al. Inhibition of BAK-mediated apoptosis by the BH3-only protein BNIP5. Cell Death Differ. 2024. doi: 10.1038/s41418-024-01386-3.
[42] MYSTEK P, SINGH V, HORVÁTH M, et al. The minimal membrane requirements for BAX-induced pore opening upon exposure to oxidative stress. Biophys J. 2024;123(20):3519-3532.
[43] ZHANG T, CAO RJ, NIU JL, et al. G6PD maintains the VSMC synthetic phenotype and accelerates vascular neointimal hyperplasia by inhibiting the VDAC1-Bax-mediated mitochondrial apoptosis pathway. Cell Mol Biol Lett. 2024;29(1):47.
[44] SHIMIZU S, NARITA M, TSUJIMOTO Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. Nature. 1999;399(6735):483-487.
[45] SHIMIZU S, SHINOHARA Y, TSUJIMOTO Y. Bax and Bcl-xL independently regulate apoptotic changes of yeast mitochondria that require VDAC but not adenine nucleotide translocator. Oncogene. 2000;19(38): 4309-4318.
[46] TAJEDDINE N, GALLUZZI L, KEPP O, et al. Hierarchical involvement of Bak, VDAC1 and Bax in cisplatin-induced cell death. Oncogene. 2008;27(30):4221-4232.

(责任编辑：马征华，邱杨，张楠)