

بررسی غلظت‌های مختلف گلوکز بر روند آپتوز در سلول‌های PC12:

نقش پروتئین Bax و Bcl₂

مونا فرهادی^۱، دکتر کاظم پریور^۲، دکتر علی محمد شریفی^۳، دکتر سیروس زینلی^۴،
دکتر سیده‌های موسوی^۵، معصومه بخشایش^۶

^۱ کارشناس ارشد زیست‌شناسی سلولی تکوینی

^۲ استاد، گروه جنین‌شناسی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی

^۳ دانشیار، گروه فارماکولوژی، مرکز تحقیقات سلولی ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

^۴ استادیار، گروه ژنتیک انسانی، انستیتو پاستور ایران

^۵ دانشجوی دکتری فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

^۶ کارشناس ارشد، آزمایشگاه سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

چکیده

سابقه و هدف: هیپرگلیسمی که تحت شرایط دیابتیک اتفاق می‌افتد موجب نقائص متعددی از جمله نوروپاتی، نفروپاتی و رتینوپاتی می‌گردد. هنوز اطلاعات اندکی درباره اثر مستقیم سمیت گلوکز روی سلول‌های نورونی در دست است.

روش بررسی: در این تحقیق ابتدا توان حیاتی سلول‌ها توسط روش *MTT* ارزیابی شد و غلظت‌های مختلف گلوکز و سپس نقش پروتئین *Bax* در القاء آپتوز سلول‌های *PC12* به عنوان یک مدل آزمایشگاهی از سلول‌های نورونی مورد آزمایش قرار گرفت. اثرات غلظت‌های مختلف گلوکز توسط رنگ *Hoechst* و میزان دو پروتئین *Bax* و *Bcl2* مداخله‌کننده در آپتوز به وسیله روش وسترن بلاتینگ مورد سنجش قرار گرفتند.

یافته‌ها: در روش *MTT* سلول‌ها در ساعات ۴۸، ۷۲ و ۹۶ مرگ سلولی معنی‌داری را نسبت به گروه‌های کنترل نشان دادند ($p < 0/01$). غلظت ۱۳/۵ mg/ml گلوکز غلظت موثر و ۷۲ ساعت زمان مناسب برای القاء آپتوز در این سلول‌ها است. نتایج وسترن بلات نشان داد که بیان پروتئین *Bax* در سلول‌های تحت افزایش گلوکز به مدت ۷۲ ساعت، به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش دارد. همچنین نسبت بین این دو پروتئین *Bax/Bcl2* نیز افزایش معنی‌داری را نشان داد ($p < 0/01$).

نتیجه‌گیری: افزایش گلوکز موجب القاء آپتوز در سلول‌های *PC12* در مسیر داخلی می‌گردد. در این میان پروتئین *Bax* نقش مهمی ایفا می‌کند.

واژگان کلیدی: سمیت گلوکز، آپتوز، سلول *PC12*، پروتئین *Bax/Bcl2*.

مقدمه

متابولیسم گلوکز است، ترشح انسولین از سلول‌های β و باز جذب گلوکز توسط انسولین دچار اختلال می‌گردد (۱). هیپرگلیسمی که تحت شرایط دیابتیک اتفاق می‌افتد موجب القاء بیماری‌های میکروواسکولار نظیر نورپاتی، نفروپاتی و رتینوپاتی می‌گردد (۲). نوروپاتی یک عارضه شایع و خطرناک دیابت است و در مطالعات انجام شده اکثر بیماران دیابتی در بدو تشخیص دچار نوروپاتی بوده‌اند. این بیماران دچار تخریب

دیابت از بیماری‌های مزمن و شایع در جهان است که تمامی نژادهای انسانی را گرفتار می‌سازد. در این بیماری که نقص

آدرس نویسنده مسئول: تهران، میدان پونک، انتهای بزرگراه اشرفی اصفهانی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، دکتر کاظم پریور (email: kazem-parivar@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۴/۱۰/۲۷

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۴/۱۲/۱۲

تحقیق غلظت ۱۳/۵mg/ml جهت تیمار گروه تجربی در نظر گرفته شد و سلولها در یک روش وابسته به زمان تحت تیمار قرار گرفتند. بعد از دو پاساژ سلولی، سلولها جهت سنجش توان حیاتی روی ظروف ۹۶ خانه منتقل شده و کشت داده شدند.

سنجش *MTT*: پس از دو پاساژ سلولی جهت سنجش *MTT*، سلولهای PC12 به میزان ۵۰۰۰ سلول در هر خانه در ظرف ۹۶ خانه در زمانهای ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ کشت داده شد. توان حیاتی سلولها با استفاده از:

3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium ارزیابی شد. به این ترتیب که ۱۰ میکرولیتر محلول *MTT* حل شده در محیط DMEM به غلظت ۵mg/ml به هر کدام از خانههای ۹۶ تایی اضافه شد و سلولها برای یک ساعت در انکوباتور در حرارت ۳۷ درجه انکوبه شدند. پس از اینکه محیط سلولها دور ریخته شد به رسوب (سلولها و بلورهای حاصله از محلول) ۱۰۰ میکرو لیتر DMSO اضافه شد و جذب نوری آنها در ۵۷۰ نانومتر در دستگاه ELIZA reader بررسی شد.

رنگ آمیزی *Hoechst 3334* به این منظور سلولها در PBS (phosphate buffered saline) محتوی ۳/۷٪ پارافرم آلدئید به مدت ۳۰ دقیقه فیکس شدند و پس از فیکس شدن در حرارت اتاق سلولها چند بار با محلول PBS شستشو شدند و سپس با ۱۰ μl/ml رنگ *Hoechst* در حرارت اتاق به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. پس از سه بار شستشو سلولها به وسیله میکروسکوپ فلورسنت در طول موج ۳۶۰ نانومتر قابل رویت شدند.

استخراج پروتئین: پروتئین سلولها طبق روش Bradford با استفاده از سرم آلبومین گاوی استخراج شدند.

سنجش پروتئین به روش وسترن بلاتینگ: جهت آنالیز ایمونوبلات یا وسترن بلاتینگ دو پروتئین Bax و Bcl2 تمام سلولهای کشت شده توسط SDS buffer لیز شدند. مقدار مساوی از پروتئین (۴۰ μg/well) قرار داده شد و روی ژل پلی اکریل آمید ۱۰٪ با ولتاژ ۱۰۰ الکتروفورز شد. سپس به کاغذ PVDF انتقال داده شد. از آنتی بادی آنتی بادی Rabbit anti rat Bax and Bcl-2 (BD, 1:1000) به عنوان آنتی بادی اولیه واز Alkaline phosphates goat anti-rabbit IgG (Roche, 1:1000) به عنوان آنتی بادی ثانویه استفاده شد. باندها با استفاده از انکوبه کردن در سوبسترای BCIP (5bromo-4-choloro-3 indolyl phpsphate) و NBT (Nitroblue tetrazolium) به مدت ۵ تا ۲۰ دقیقه دیده شدند.

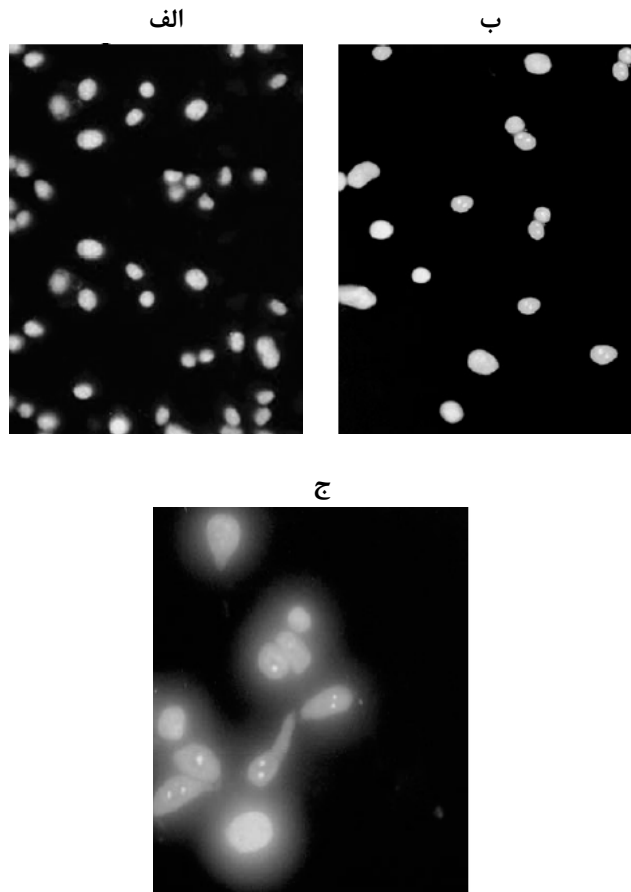
اعصاب محیطی و خودمختار می گردند که گاهی منجر به قطع اندام می گردد (۳). افزایش گلوکز عامل اصلی تخریب سیستم عصبی است (۴). شیوع آپتوز نورونی برای تمام بیماریهای دژنراتیو نورونی با بررسیهای مدل‌های حیوانی و همچنین کشت بافت نشان داده شده است (۵،۳). بررسیهای ۲۵ سال اخیر برخی از مسیرهای اصلی متابولیسم گلوکز را در نروپاتی دیابتی نشان داده و روشن شده است که افزایش گلوکز می تواند باعث واکنش اختصاصی اکسیژن (ROS) و همچنین افزایش فعالیت فاکتور هسته‌ای کاپای بتا (NF-kB) گردد که در بسیاری از تیپ‌های سلولی از جمله آندوتلیالی، مزانشیمال و سلولهای بتا پانکراسی دیده شده است (۶). این فرآیند وابسته به فعالیت پروتئین کیناز C و ROS می باشد، به علاوه مهار تجمع سوپراکسید و یا کاهش گلوکز موجب مهار و عدم پیشرفت آپتوز می گردد (۳). آپتوز میتوکندریایی به وسیله تعداد زیادی از پروتئین‌هایی تنظیم می شود که بطور مستقیم و غیرمستقیم سیستمین پروتئازها Caspase را مهار و یا فعال می کنند.

Bcl2 و Bax دو پروتئین مداخله کننده در مسیر داخلی آپتوز و تشکیل کمپلکس آپتوزوم و همچنین فعال کننده و مهار کننده Caspase ها می باشند. نسبت Bax/Bcl2 به عنوان فاکتور تعیین کننده بقاء و مرگ سلول شناخته شده است. تاکنون نقش این دو پروتئین در مسیر آپتوز سلولهای PC12 بررسی نشده است. سلولهای PC12 که از غده آدرنال رت بدست آمده اند مدل مناسبی جهت نشان دادن مرگ سلولی در سلولهای عصبی به شمار می روند (۷،۵). در این تحقیق سعی بر آن بود که نقش پروتئین آنتی آپتوتیک Bcl2 و پروآپتوتیک Bax در سمیت گلوکز و القاء آپتوز بررسی گردد.

مواد و روشها

کشت سلول: سلولهای PC12 از انستیتو پاستور تهیه شد. سلولها در دمای ۳۷ درجه، رطوبت ۹۰٪ و CO₂ ۵٪ نگهداری شدند. سلولها در محیط DMEM (Dulbeccos Modified Eagles Medium) به علاوه ۵٪ سرم جنین گاوی FBS (Fetal Bovine Serum)، ۱۰٪ سرم اسب HS (Horse Serum)، ۵۰ IU/ml پنی سیلین و ۵۰ μg/ml استرپتومایسین رشد کردند. غلظت گلوکز در این محیط ۴/۵mg/ml بود که طبق دستورالعمل ساخت جهت رشد سلولهای PC12 مناسب بود در حالی که این میزان نسبت به غلظت گلوکز سرم انسان به میزان قابل توجهی بالا بود. در این

نتایج رنگ‌آمیزی *Hoechst*: مطابق شکل ۲ سلول‌های کشت داده شده در دو غلظت گلوکز هسته‌های آپتوزی را نشان دادند که تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها پس از تبدیل زاویه‌ای بر $\arcsin\sqrt{x}$ با روش فاکتوریل صورت پذیرفت (جدول ۱). مقایسه میانگین غلظت و زمان به روش دانکن به عمل آمد. بر اساس جدول ۱ غلظت ۱۳/۵mg/ml بهترین غلظت و زمان ۷۲ ساعت زمان مناسب در القاء آپتوز در سلول‌های PC12 می‌باشد.



شکل ۲- عکس رنگ‌آمیزی با میکروسکوپ فلورسنت. الف: گروه کنترل با غلظت ۴/۵mg/ml گلوکز، ب: گروه تیمار با ۱۳/۵mg/ml گلوکز، ج: گروه تیمار با غلظت ۹/۵mg/ml گلوکز

جدول ۱- تجزیه واریانس میزان درصد سلولهای آپتوز در غلظت و زمان

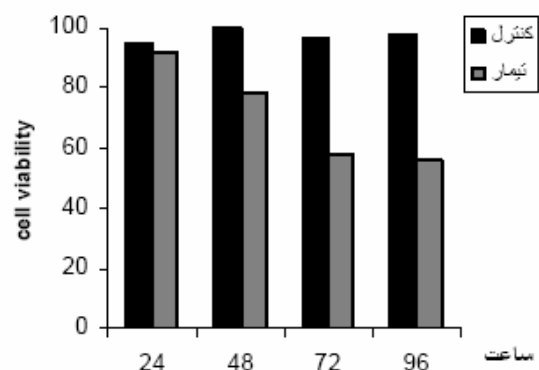
F	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	منابع تغییرات
*۱۶/۷۸	۷۶۵/۴۶	۳/۹۳	۲	غلظت
*۶/۶۹	۱۸/۶۷	۳۷/۳۴	۲	زمان
†۱/۷۶	۴/۹۰	۱۹/۶۱	۴	غلظت/زمان
	۲/۷۹	۱۰۰/۳۵	۳۶	اشتباه

NS †, p < ۰/۰۵ °

استخراج و آنالیز *DNA*: سلول‌ها در ۱۰ml اتانول ۷۰٪ به مدت یک تا ۴ روز در 20°C - فیکس شدند. سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی دور ریخته شد. رسوب سلول در ۴۰ میکرولیتر بافر فسفات سیتریک اسید حل شد، سپس به تیوب‌های اپندورف ۰/۵ml انتقال داده شد و در حرارت اتاق برای ۳۰ دقیقه نگهداری شد. مجدداً در ۱۵۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی به یک اپندورف جدید منتقل شد و در دستگاه Concentrator به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. سپس ۳ میکرولیتر NP40 ۰/۲٪ و ۳ میکرولیتر RNase به آن اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت ۳۷ درجه انکوبه شد. به هرکدام از تیوب‌ها ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K اضافه شده و در ۳۷ درجه به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. ژل آگاروز ۲٪ تهیه شد و نمونه‌ها یعنی گروه کنترل و گروه‌های تیمار شده با ۱۳/۵mg/ml گلوکز به همراه ۲ میکرولیتر Loading buffer در چاهکها قرار داده شد و به مدت ۴۰ دقیقه به ولتاژ ۱۰۰ ولت متصل شد.

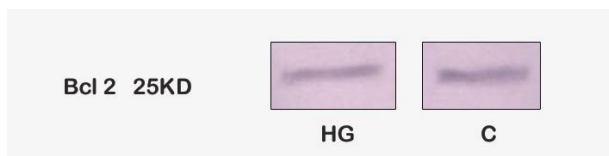
یافته‌ها

نتایج بدست آمده از سنجش *MTT* در این مطالعه جهت سنجش مرگ سلولی، سلول‌ها در معرض افزایش گلوکز به میزان سه برابر حد طبیعی محیط کشت در زمانهای ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت قرار داده شدند و برای هرکدام از سلول‌ها یک گروه کنترل در نظر گرفته شد. طبق نمودار ۱ میزان جذب نوری در سنجش *MTT* در گروه ۲۴ ساعت تفاوت چندانی ندارد ولی در گروه ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت توان حیاتی سلولهای تحت تیمار نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد ($p < ۰/۰۱$).



نمودار ۱- نتایج حاصل از سنجش *MTT* در سلولهای PC12 در زمانهای ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت درمقایسه با گروه کنترل

شکل ۵ وسترن بلاتینگ بیان پروتئین استخراج شده Bcl2 از سلولهای گروه کنترل و گروه تحت تیمار با افزایش گلوکز ۱۳/۵mg/ml در ۷۲ ساعت را نشان می‌دهد.



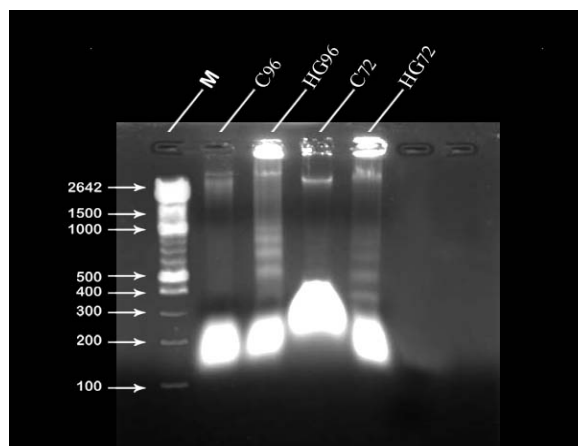
شکل ۵- نمایش وسترن بلاتینگ بیان پروتئین Bcl2 استخراج شده از سلولهای گروه کنترل C و تیمار با افزایش گلوکز ۱۳/۵mg/ml در ۷۲ ساعت (HG)

در مقایسه میانگین پروتئین Bax در دو گروه کنترل و گروه تیمار با افزایش گلوکز در زمان ۴۸ ساعت میزان پروتئین Bax نسبت به گروه کنترل به میزان معنی‌داری ($p < 0.01$) افزایش نشان می‌دهد. همچنین در مقایسه نسبت Bax/Bcl2 در گروه افزایش گلوکز نسبت به گروه کنترل به میزان معنی‌داری ($p < 0.01$) افزایش نشان داده شد.

بحث

هیپرگلیسمی که تحت دیابت اتفاق می‌افتد نقایصی مانند نورپاتی و رتینوپاتی ایجاد می‌کند. اگرچه مشخص شده است که هیپرگلیسمی آسیب نورونی را از طریق مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یا آپتوز القا می‌کند، اما مکانیسمی که به وسیله آن این القاء صورت می‌گیرد، هنوز بدرستی روشن نیست. اثر افزایش گلوکز روی بسیاری از تیپ‌های سلولی مطالعه شده و نتایج نشان داده است که سمیت سطح بالای گلوکز باعث القاء آپتوز از طریق واکنش اختصاصی اکسیژن ROS و افزایش سطح NO می‌گردد (۹،۸،۵). گلوکز تشکیل ROS را افزایش می‌دهد و مکانیسم مشترکی را ایجاد می‌کند که ممکن است فعالیت MAP Kinase ها را القاء کرده و آپتوز را افزایش دهد (۶،۴). همچنین مطالعات دیگر پیشنهاد می‌کنند که جریان کلسیم می‌تواند روی سلول‌های نورونی اثر بگذارد (۱۱،۱۰). اما نقش پروتئین‌های Bax و Bcl2 به عنوان دو پروتئین مداخله‌کننده در مسیر داخلی آپتوز در سلول‌های PC12 هنوز بررسی نشده است. بنابراین در این مطالعه اثر هیپرگلیسمی بر سلول‌های تمایز نیافته PC12 بعنوان یک مدل سلولی برای مطالعه نورپاتی دیابتی و همچنین نقش دو پروتئین مذکور در القاء آپتوز مورد بررسی قرار گرفت.

نمایش الکتروفورز DNA در گروههای افزایش گلوکز و کنترل: جهت اطمینان از غلظت و زمان مناسب و القاء آپتوز در این تحقیق از الکتروفورز ژل آگارز استفاده شد. شکل ۳ الکتروفورز ژل آگارز ۲٪ از DNA استخراج شده از گروههای تحت تیمار با غلظت ۱۳/۵mg/ml گلوکز در زمانهای ۷۲ و ۹۶ ساعت را نشان می‌دهد که باندها فرم نردبانی یا قطعه‌قطعه نشان را نسبت به Marker نشان می‌دهند و گروه کنترل فرم قطعه‌قطعه ندارد و بصورت یک باند نمایان است.



شکل ۳- نمایش قطعه‌قطعه شدن DNA سلول‌های PC12 پس از الکتروفورز ژل آگارز ۲٪ در گروههای افزایش گلوکز (HG) در زمانهای ۷۲ و ۹۶ ساعت، M مارکر و C گروههای کنترل

نتایج حاصل از وسترن بلاتینگ: در این تحقیق میزان پروتئین Bax گروه تجربی ۱۳/۵mg/ml در زمان ۷۲ ساعت به عنوان یک زمان مناسب جهت آپتوز سلولها در نظر گرفته شد و نسبت به گروه کنترل توسط وسترن بلات سنجیده شد. بیان پروتئین ۲۳ کیلودالتونی Bax نسبت به گروه کنترل با Bonfroni's test به میزان معنی‌داری ($p < 0.01$) افزایش نشان داد (شکل ۴).



شکل ۴- نمایش وسترن بلاتینگ بیان پروتئین Bax استخراج شده از سلولهای گروه کنترل C و تیمار با افزایش گلوکز ۱۳/۵mg/ml در ۷۲ ساعت (HG)

متولد شده (۱۴،۱۳،۱۰) و نورون‌های دو قطبی و قرمز در محیط کشت (۱۵) نشان داده شده است.

یافته‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهد افزایش این نسبت بوسیله هیپرگلیسمی، مرگ سلولی را از طریق افزایش بیان پروتئین Bax در مسیر آپتوزی سلول‌های PC12 القا می‌کند. همانطور که در شکل ۲ و ۳ نشان داده شده است Bax نسبت به گروه کنترل افزایش یافته در حالی که پروتئین Bcl2 تغییری نشان نداده است.

تحقیقات نشان داده است Bax به هنگام اتصال به غشاء، دو لایه لیپیدی کانالهای یونی وابسته به ولتاژ و pH را اشغال می‌نماید بنابراین منافذ داخلی را تشکیل می‌دهد. فعالیت این کانالها توسط پروتئین Bcl2 مهار می‌شود. پروتئینی است که موجب بقاء سلول شده و نشان داده شده است که مهار مرگ سلولی را بوسیله بلوک کردن آزادسازی سیتوکروم C و مهار Caspase فعال کننده Apaf 1 القاء می‌نماید (۱۶). افزایش بیان Bax نسبت به Bcl2 باعث القاء آزادسازی سیتوکروم C از میتوکندری و افزایش تشکیل کمپلکس آپتوزوم و هدایت سلول‌ها به سمت آپتوز از طریق تشکیل کانالهای هدایتی می‌گردد.

تشکر و قدردانی

از پشتیبانی‌های علمی و اجرایی مسئولین و کارشناسان محترم مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی ایران در اجرای این طرح صمصیمانه قدردانی می‌شود.

نتایج نشان داد که گلوکز می‌تواند توان حیاتی سلول‌های PC12 تحت تیمار غلظت سه برابر گلوکز (۱۳/۵mg/ml) را کاهش دهد که این نتایج مطابق با نتایج گذشته است (۱۲). سنجش MTT نشان داد که غلظت ۱۳/۵mg/ml گلوکز می‌تواند توان حیاتی سلول‌های PC12 تمایز نیافته را پس از ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت کاهش دهد درحالی‌که طبق گزارش Kushimura افزایش غلظت گلوکز باعث کاهش توان حیاتی سلول‌های تمایز یافته پس از ۷ روز گشته است (۹). این نتایج نشان می‌دهد سلول‌های تمایز یافته مقاومت بیشتری را در برابر مرگ سلولی دارا می‌باشند.

افزایش گلوکز باعث قطعه‌قطعه شدن DNA (DNA ladder) می‌گردد که سنجش آن بعنوان یک مشخصه مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در مطالعات اخیر مورد استفاده قرار گرفته است. در این سنجش DNA بصورت قطعات ۲۰۰-۱۸۰ bp مشخص می‌گردد که این قطعات توسط الکتروفورز ژل آگارز قابل رویت می‌باشند (۵).

در این تحقیق DNA استخراج شده از گروه کنترل و تیمار روی الکتروفورز ژل آگارز برده شد. نتایج نشان داد که گلوکز الگوی قطعه‌قطعه شدن DNA را در غلظت ۱۳/۵mg/ml پس از ۴۸ ساعت القاء می‌کند.

آپتوز توسط تعدادی از ژن‌های پرو و آنتی‌آپتوتیک مانند Bcl2 و Bax تنظیم می‌شود. تغییر در بیان ژن Bcl2 و Bax باعث القاء آپتوز می‌شود. نشان داده شده است که سرب باعث القاء آپتوز در هیپوکامپ رت از طریق افزایش این نسبت می‌شود همچنین این افزایش در نورون‌های مغزی رت‌های تازه

REFERENCES

1. Sheperd PR, Kan BB. Glucose transporters and insulin action-implication for insulin resistance and diabetes mellitus. *New Eng J Med* 1999;341:248-57.
2. Titus T, Badet L, Gray DW. Islet cell transplantation for insulin-dependant diabetes mellitus: perspectives from the present and prospects for the future. *Expert Rev Mol Med* 2000;6(2):1-28.
3. Feldman EL, Stevens MJ, Russell JW, Greene DA. Somatosensory neuropathy. In: Porte D, Sherwin RS, Baron A, editors. *Ellenberg and Rifkin's diabetes mellitus*. McGraw Hill. New York, USA. 2002;p:771-88, 789-804, 747-770.
4. Lelkes E, Unsworth BR, Lelkes PI. Reactive oxygen species apoptosis and altered NGF-signaling in PC12 pheochromatocytoma cells cultured in elevated glucose. *Neurotox Res* 2001;3(2):189-203.
5. Greene DA, Stevens MG, Obrosova I, Feldman EL. Glucose-induced oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Eur J Pharmacol* 1999;375:217-23.
6. Alen DA, Yaghoob MM, Harwood SM. Mechanism of high glucose induced apoptosis and its relationship to diabetic complication. *J Nutr Bioche (In Press)*.
7. Martin TF, Grishanin RN. PC12 cells as a model for studies of regulated secretion in neuronal and endocrine cells. *Methods Cell Biol* 2003;71:267-86.

8. Sombers LA, Colliver TL, Ewing AG. Differentiated PC12 cells: a better model system for the study of the VMAT's effects on neuronal communication. *Ann NY Acad Sci* 2002;971:86-88.
9. Koshimura K, Gunko T, Murakami Y, Kato Y. Involvement of nitric oxide in glucose toxicity on differentiated PC 12 cells. *Neurosci Res* 2002;43:31-38.
10. Nobuhisa M, Hideyuki Y, Hitoshi I, Hiroshi K, Jun K, Yataka S, et al. Altered Bcl2 and Bax expression and intracellular Ca signaling in apoptosis of pancreatic cells and the impairment of glucose induced insulin secretion. *Endocrinology* 1998;139(3):1429-38.
11. Kasier N, Eldman IS. Calcium dependence of glucocorticoid-induced lymphocytolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:638-42.
12. Webb SJ, Harrison DJ, Wyllie AH. Apoptosis: an overview of the process and its relevance in disease. *Adv Pharmacol* 1997;41:31-34.
13. Sharifi AM, Baniyadi S, Jorjani M, Rahimi F, Bakhshayesh M. Investigation of acute lead poisoning on apoptosis in rat hippocampus in vivo. *Neurosci Lett* 2002;329:45-48.
14. Oberto A, Marks N, Evans HL, Guidotti A. Lead promotes apoptosis in newborn rat cerebellar neurons: pathological implications. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;9:435-42.
15. He L, Poblentz AT, Medrano CJ, Fox DA. Lead and calcium produce rod photoreceptor cell apoptosis by opening the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* 2000;275:12175-84.
16. Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N, Nunenz G. Bcl xl interacts with Apaf 1 dependent Caspase 9 activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:4386-91.