

氯通道阻断剂对 H_2O_2 诱导的胰岛 $RIN-m$ 细胞凋亡的影响

任省华, 叶春玲, 金永亮, 吕艳青, 冯娟

(暨南大学药学院药理学教研室, 广东 广州 510632)

中国图书分类号: R 322.57; R 329.24; R 329.25; R 916.4

文献标识码: A 文章编号: 1001-1978(2007)09-1202-05

摘要:目的 观察氯通道阻断剂对 H_2O_2 诱导的胰岛 $RIN-m$ 细胞凋亡的影响, 探讨氯通道在 $RIN-m$ 细胞凋亡中的作用。方法 采用 H_2O_2 诱导的胰岛 $RIN-m$ 细胞凋亡模型, 观察氯通道阻断剂 (DDS, NPPB 和 NFA) 对细胞存活率、形态学变化、凋亡的影响。结果 氯通道阻断剂单用时对胰岛 $RIN-m$ 细胞活力无明显影响, 但能明显提高 H_2O_2 处理的胰岛 $RIN-m$ 细胞的存活率。与模型对照组相比, 氯通道阻断剂 DDS, NPPB 和 NFA 对抗组细胞存活率明显增加 ($P < 0.01$), 细胞凋亡率明显降低 ($P < 0.01$)。结论 氯通道阻断剂对 H_2O_2 诱导的 $RIN-m$ 细胞损伤和凋亡具有明显的保护作用。

关键词: 胰岛 $RIN-m$ 细胞; 凋亡; 过氧化氢; 氯通道阻断剂

近年研究表明, 凋亡是胰岛细胞损伤和胰岛分泌功能受损的重要原因^[1]。细胞膜内、外离子环境的稳定是细胞赖以生存的重要条件, 当细胞受到损伤性刺激时, 细胞膜上的各种离子通道蛋白功能调节性开放和关闭可以使细胞维持内环境的相对平衡和正常功能。氯通道特别容积敏感性外向整流氯通道 (VSOR chloride channel) 在这方面的作用引起了人们极大的兴趣, 成为近年来通道研究中的一个热点^[2]。在等渗条件下, VSOR 氯通道由致凋亡因

收稿日期: 2007-04-14, 修回日期: 2007-07-27

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (No 04010463)

作者简介: 任省华 (1972-), 女, 硕士, 研究方向: 临床药理学, Tel: 020-31744872, E-mail: renshenghua@gmail.com;
叶春玲 (1963-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 药理学, 通讯作者, Tel: 020-85223843, E-mail: yechunling2005@163.com

HepG2 cells under the fluorescence microscope and transmission electron microscope. Apoptosis of HepG2 cells was induced after treatment of chlorzoxazone at concentrations from $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ to $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for 48h, which showed obvious concentration-effect relationship. The apoptotic ratios of HepG2 cells were also increased when chlorzoxazone ($100, 200, 300$ and

素诱导激活, 参与凋亡性容积下调 (apoptotic volume decrease, AVD) 的诱导, 但氯通道在胰岛细胞凋亡过程中的作用的研究还未见报道。为此, 本文采用 H_2O_2 诱导的胰岛 $RIN-m$ 细胞凋亡模型, 考察氯通道阻断剂对 H_2O_2 诱导的胰岛细胞凋亡的影响, 探讨氯通道在胰岛细胞凋亡过程中的作用。

1 材料

1.1 药品与试剂 $5.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖 DMEM 培养基购于 Gibco 公司; 胎牛血清, 杭州四季青公司生产; 细胞凋亡 Hoechst 染色试剂盒, 购自碧云天试剂公司; 胰蛋白酶 (trypsin), 溴化-(4,5-二甲基, 2-噻唑基)-2,5-二苯基四氮唑 (MTT), DDS (4,4-diisothiocyanatostilbene-2,2-disulfonate), NPPB [5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoic acid] 和 NFA (Niflumic acid) 均购自 Sigma 公司, Annexin-V PI 双染凋亡试剂盒 (批号: 20051115) 购自北京保赛生物技术有限公司。

1.2 细胞株及培养 胰岛 $RIN-m$ 细胞株购自中山医科大学细胞库。培养基为含 10% 胎牛血清及青霉素 ($100 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$)、链霉素 ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 $5.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖 DMEM 培养基, 于 37°C , 5% CO_2 饱和湿度条件下培养。

1.3 实验仪器 二氧化碳培养箱 (FORMA, USA); 5084R 型高速冷冻离心机 (EPPENDORF, Germany); FACS Aria 流式细胞仪 (美国 BD 公司); 450 酶标仪 (BD-RAD, USA); 22D FE-D282 荧光倒置显微镜 (LEICA, Germany)。

2 方法

2.1 H_2O_2 致胰岛 $RIN-m$ 细胞凋亡模型的制备和药物处理 细胞以每孔 10^8 个 $\cdot \text{L}^{-1}$ 的密度接种

$500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) was treated for 24, 48 and 72 h, which showed obvious time-effect relationship. **Conclusion** Chlorzoxazone inhibited HepG2 cells survival and induced cell apoptosis

Key words: chlorzoxazone; apoptosis; HepG2; Ca^{2+} -activated K^+ channel

于 96 孔培养板中, 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度条件下培养过夜使细胞完全贴壁。分别设溶媒对照组 (不加任何药物)、H₂O₂ 模型组 (500 μmol · L⁻¹ H₂O₂ 处理 6 h)、氯通道阻断剂单用组 (不同浓度的 DDS、NPPB、NFA)、氯通道阻断剂对抗组 (H₂O₂ + 不同的氯通道阻断剂), 每组至少 6 孔。药物于 37 °C 预孵 10 h 后, 再加入终浓度为 500 μmol · L⁻¹ 的 H₂O₂ 继续培养 6 h, 然后进行 MTT 法检测细胞活力等实验。至少重复 3 次实验。

2.2 MTT 法检测细胞活力^[3, 4] 将接种过细胞的 96 孔培养板每孔 200 μl 培养液吸去, 先用 PBS 洗涤 1 次, 再每孔加入 200 μl PBS 和 20 μl 的 MTT (5 g · L⁻¹), 使其终浓度不低于 0.5 g · L⁻¹。37 °C 温育 4 h 后, 取出培养板, 小心吸去上清, 每孔加入 150 μl DMSO 溶解液, 振荡 10 min 以使沉淀溶解。用酶联免疫检测仪测定 570 nm / 630 nm 处的光密度值 (optical density, OD)。与试验平行孔设只含有溶解液的孔作为溶媒对照, 最后比色时, 以正常空白孔调零, 可间接定量反映活细胞数量。以溶媒对照组为 100%, 计算细胞存活率。

细胞存活率 / % = 试验组光密度值 / 对照组光密度值 × 100%。

2.3 荧光染色法观察 按 Hoechst 33258 染色试剂盒说明操作, 细胞以 50% ~ 80% 密度接种于事先放入爬片的 6 孔培养板中, 制作细胞爬片, 经过药物或相应处理后, 600 r · min⁻¹ 离心 5 min 去上清; 用 4% 多聚甲醛 0.5 ml 重悬细胞, 室温下固定 10 min; 去固定液, PBS 洗 2 次, 每次 3 min; 600 r · min⁻¹ 离心 5 min 去 PBS; 加入 0.5 ml 终浓度为 2 ~ 5 g · L⁻¹ 的 Hoechst 33258 染色 5 min; 用 PBS 洗 2 遍, 每次 3 min; 加一滴抗荧光淬灭封片液于载玻片上, 盖上贴有细胞的爬片, 使细胞接触封片液。荧光显微镜下检测到呈蓝色的细胞核, 激发波长在 350 nm 左右, 发射波长在 460 nm 左右, 观察并摄片。

2.4 流式细胞术 (FCM) 检测细胞凋亡 按 Annexin-V / PI 双染凋亡试剂盒操作说明书进行测定。样品用 0.25% 胰酶在室温下消化, 收集细胞, 调整细胞的浓度为 5 × 10⁸ ~ 1 × 10⁹ 个 · L⁻¹; 用 200 目滤网过滤成单细胞悬液; 取 1 ml 细胞悬液 1 000 r · min⁻¹, 4 °C 离心 10 min, 弃上清; 加入 1 ml 冷的 PBS, 轻轻震荡使细胞悬浮; 1 000 r · min⁻¹, 4 °C 离心 10 min, 弃上清; 将细胞重悬于 200 μl Binding Buffer; 加入 10 μl AnnexinV-FITC 和 5 μl PI, 轻轻混匀, 避光室温反应 15 min 或 4 °C 反应 30 min; 加入 300 μl Binding Buffer, 1 h 内在流式细胞仪上检测 PI 和 An-

nexinV-FITC, 经荧光激发后分别在 (610 ± 20) nm 和 (530 ± 30) nm 产生红色荧光和绿色荧光。待用 CELLQuest 软件采集样本后, 用 ModFitLT 软件进行分析。

2.5 统计方法 所有实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用两样本均数比较的 *t* 检验。

3 结果

3.1 氯通道阻断剂对细胞存活率的影响

3.1.1 氯通道阻断剂单用组对细胞存活率的影响

不同浓度的 DDS、NPPB、NFA 单用组的细胞存活率与溶媒对照组相比差异都没有显著性 ($P > 0.05$), 说明 50、100、200 μmol · L⁻¹ 的 DDS, 50、100、200 μmol · L⁻¹ 的 NPPB 以及 10、50、100 μmol · L⁻¹ 的 NFA 对正常细胞存活率没有影响。结果见图 1 ~ 3。

3.1.2 氯通道阻断剂对 H₂O₂ 处理细胞的存活率影响

给予 500 μmol · L⁻¹ H₂O₂ 处理胰岛 RN_{1m} 细胞 6 h, H₂O₂ 模型组的细胞存活率明显下降, 与溶媒对照组比较, 差异有显著性 ($P < 0.01$); 500 μmol · L⁻¹ H₂O₂ + 不同浓度的氯通道阻断剂对抗组的 RN_{1m} 细胞的存活率呈剂量依赖性升高, 其中 100 μmol · L⁻¹ 和 200 μmol · L⁻¹ DDS, 100 μmol · L⁻¹ 和 200 μmol · L⁻¹ NPPB 以及 50、100 μmol · L⁻¹ NFA 对抗组与 H₂O₂ 模型组比较差异有显著性 ($P < 0.01$)。结果见图 1 ~ 3。

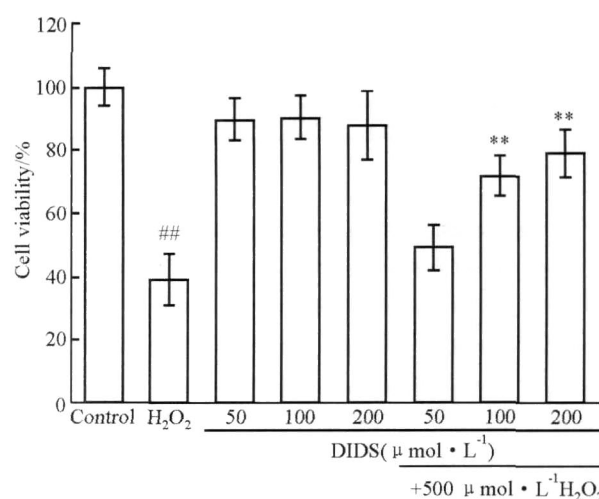


Fig 1 Effect of DDS on cell viability ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Compared with control, H₂O₂ has significant difference ($P < 0.01$); and various concentrations of DDS alone do not have significant difference ($P > 0.05$). Compared with H₂O₂, 100 μmol · L⁻¹ DDS + H₂O₂ and 200 μmol · L⁻¹ DDS + H₂O₂ have significant difference, 50 μmol · L⁻¹ DDS + H₂O₂ do not have significant difference ## $P < 0.01$ vs control; * * $P < 0.01$ vs H₂O₂ model

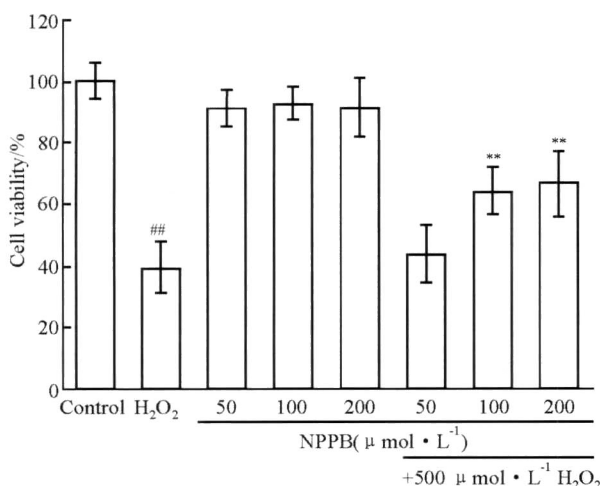


Fig 2 Effect of NPPB on cell viability ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Compared with control, H₂O₂ has significant difference ($P < 0.01$); and various concentrations of NPPB alone do not have significant difference ($P > 0.05$). Compared with H₂O₂, 100 μmol·L⁻¹ NPPB + H₂O₂ and 200 μmol·L⁻¹ NPPB + H₂O₂ have significant difference, 50 μmol·L⁻¹ NPPB + H₂O₂ do not have significant difference. ### $P < 0.01$ vs Control, ** $P < 0.01$ vs H₂O₂ model

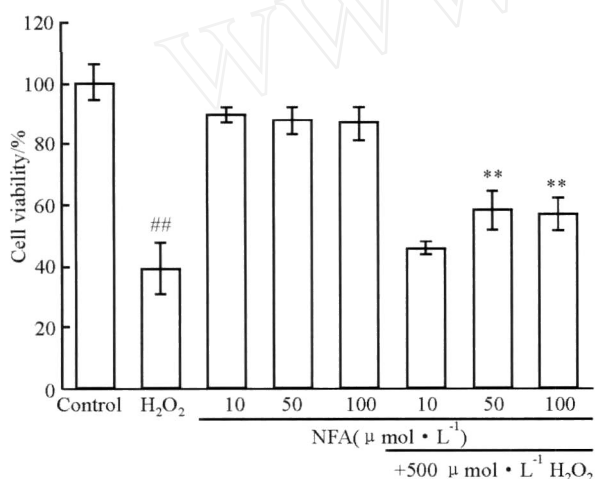


Fig 3 Effect of NFA on cell viability ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Compared with control, H₂O₂ has significant difference ($P < 0.01$); and various concentrations of NFA alone do not have significant difference ($P > 0.05$). Compared with H₂O₂, 50 μmol·L⁻¹ NFA + H₂O₂ and 100 μmol·L⁻¹ NFA + H₂O₂ have significant difference, 10 μmol·L⁻¹ NFA + H₂O₂ do not have significant difference. ### $P < 0.01$ vs control; ** $P < 0.01$ vs H₂O₂ model

3.2 氯通道阻断剂对细胞形态学的影响 用 Hoechst 33258染色,在荧光显微镜下观察细胞核形态,可见溶媒对照组的细胞核边界规则整齐,呈弥散均匀荧光,模型对照组细胞核致密浓染,或呈碎块状致密浓染的DNA碎片,荧光强度比正常细胞高,核膜皱缩,呈现典型的凋亡形态学改变,而不同氯通道阻断剂药物处理组的细胞核与H₂O₂模型组的细胞核

相比,凋亡细胞明显减少,正常细胞明显增加。从形态学结果显示氯通道阻断剂能明显抑制H₂O₂诱导的胰岛RNm细胞的凋亡。结果见Fig 4。

3.3 氯通道阻断剂对细胞凋亡的影响 将Annexin V与PI匹配使用,利用流式细胞仪检测细胞凋亡的发生,可以将凋亡早晚期的细胞以及死细胞区分开来。结果出现4个细胞亚群,即机械性损伤细胞(AnnexinV⁻/PI⁺)、正常活细胞(AnnexinV⁻/PI⁻)、晚期凋亡或继发性坏死细胞(AnnexinV⁺/PI⁺)以及早期凋亡细胞(AnnexinV⁺/PI⁻)。

结果如图5所示,(a)溶媒对照组细胞主要集中在左下象限,而右边的象限几乎没有凋亡细胞。

(b) 500 μmol·L⁻¹ H₂O₂诱导胰岛RNm细胞凋亡模型组细胞。可见在右下象限出现早期凋亡细胞,约为31.37% ± 3.13%,和右上象限的晚期凋亡细胞及坏死细胞,说明H₂O₂诱导凋亡模型成功。

(c)、(d)、(e)分别为终浓度为100 μmol·L⁻¹ DDS、100 μmol·L⁻¹ NPPB、50 μmol·L⁻¹ NFA处理组,凋亡率分别为9.97% ± 1.96%、11.57% ± 3.26%、15.57% ± 2.41%,与模型组相比,凋亡率明显下降($P < 0.01$)。提示氯通道阻断剂对H₂O₂诱导的RNm细胞凋亡具有明显保护作用。

4 讨论

在凋亡的分子机制研究方面,离子的自稳态在凋亡过程的作用受到了日益广泛的重视^[7]。氯离子作为细胞内的优势阴离子,在细胞容积调节过程中发挥了重要的作用。当细胞发生凋亡时,钾和氯离子的外流与水的外流是凋亡性细胞皱缩的原因^[5]。Szabo等^[6]发现凋亡信号能够激活Jurkat T淋巴细胞上的外向整流氯通道,增加细胞外Cl⁻浓度或加用氯通道阻断剂能抑制凋亡DNA片段的形成^[7]。但是,凋亡的调节过程中,有关氯通道作为独立因素诱导凋亡的机制还不清楚。Jiao等^[8]的研究指出,VSOR氯通道可以被凋亡诱导剂H₂O₂所激活,VSOR氯通道阻断剂可以通过阻止AVD过程和激活caspase-3而抑制细胞凋亡。H₂O₂诱导的Cl⁻电流表现出明显的VSOR氯通道的特征,包括外向整流、电压依赖性失活、能够被传统的氯通道阻断剂所阻断,以及对高渗敏感等。对VSOR氯通道阻断剂可以挽救处于凋亡性容积减小阶段的细胞,由于目前对VSOR氯通道的还远不完整,VSOR氯通道和凋亡的信号通路联系还需要进一步深入的研究。因为缺乏特异性的VSOR氯通道阻断剂,所以还不能排除其他亚型的氯通道在细胞凋亡和拯救过程中的作用。

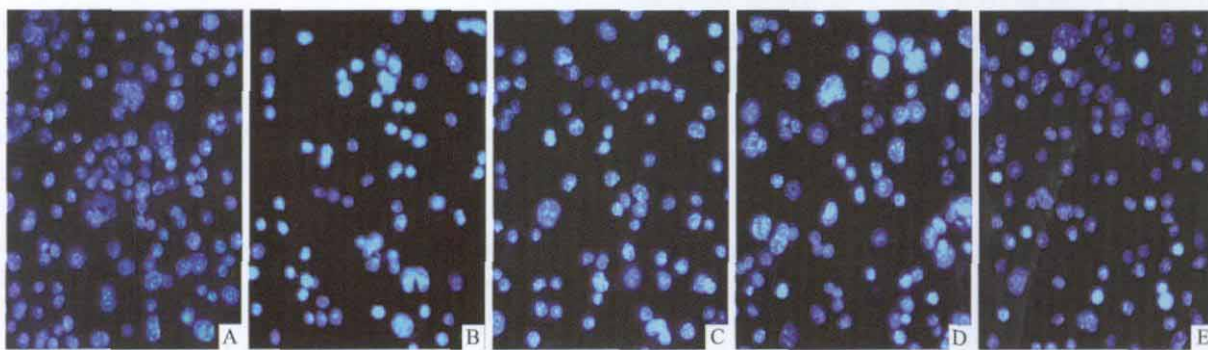


Fig 4 RIN-m cells under fluorescence microscopy after staining with Hoechst33258 (×2000)

a Control; b H_2O_2 of $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; c $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2 + 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{DDS}$; d $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2 + 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NPPB}$; e $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2 + 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NFA}$

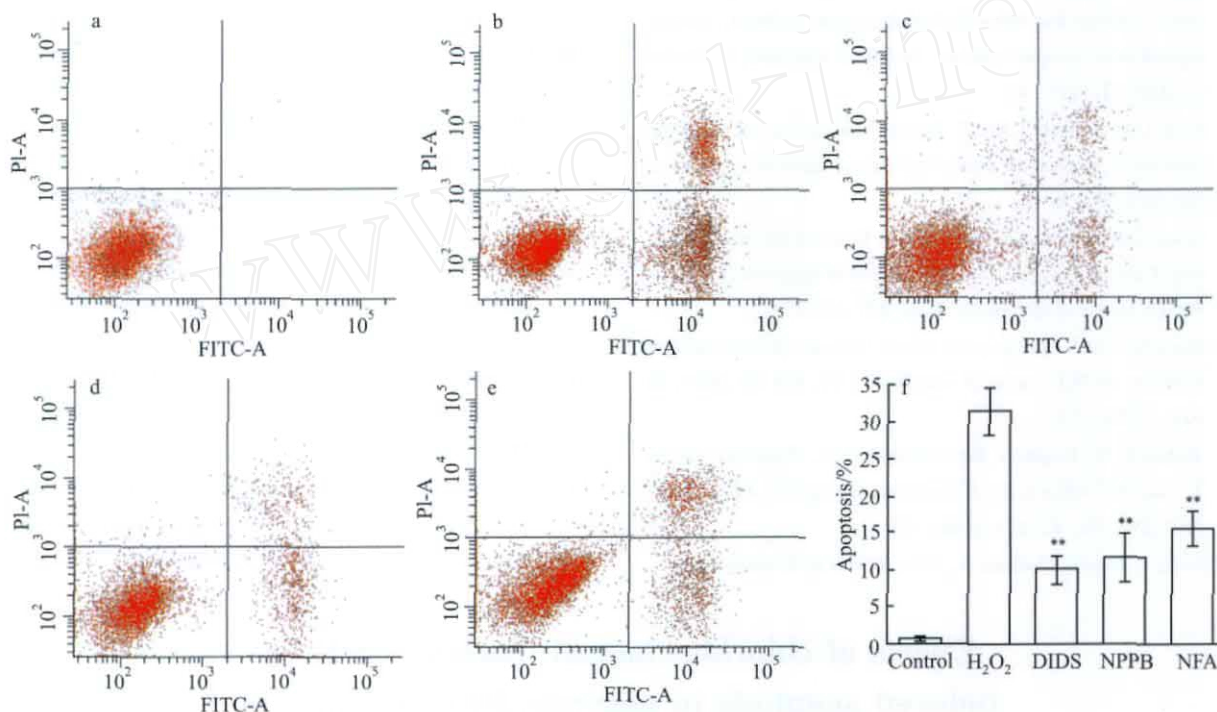


Fig 5 Apoptosis in RIN-m cells assessed by FCM ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Cells had been exposed to $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ for 6 h; a Control group; b $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$; c $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2 + 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{DDS}$; d $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2 + 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NPPB}$; e $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2 + 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NFA}$; f Bar graph of the apoptosis, ** $P < 0.01$ vs H_2O_2 model

像所有的阴离子通道仍没有特异性的阻断剂一样,目前尚未见有特异性的肿胀激活的氯通道阻断剂的报道。在一些细胞类型中,作用于胞外的核苷酸或核苷的同功异质体可特异性地阻断肿胀激活的氯通道;9-AC (anthracene-9-carboxylic acid), NFA (niflumic acid), NPPB [5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid], 抗疟药奎宁,抗雌激素药 nafoxidine 和 tamoxifen, 脂加氧酶与环加氧酶抑制剂 NDGA (nordihydroguaiaretic acid), T型钙通道阻断剂 mibefradil 等可阻断 VSOR 氯通道; DDS (4, 4 -

diisothiocyanatato-stibene-2, 2'-disulphonate), SITS, calixarenes 在正电位时呈电压依赖性地阻断 VSOR 氯通道。

氯通道在激活导致 Cl^- 的过度外流和正常的细胞容积调控机制失活是细胞在凋亡早期发生皱缩、容积减小的关键因素^[9,10]。大量的 Cl^- 外流同时伴随的 K^+ 外流是多种类型细胞受损的共同变化^[11]。氯通道开放可能是凋亡启动的信号,导致随后的细胞色素 C 的释放、Caspase 和细胞核内切酶的激活等凋亡信号的启动^[12,13]。本实验结果证明氯通道阻

断剂 DDS、NPPB 和 NFA 能够有效地抑制 H_2O_2 诱导的胰岛 细胞凋亡,提示氯通道在过氧化损伤引起的胰岛 细胞凋亡中起着重要作用。氯通道阻断剂对抗 H_2O_2 诱导的胰岛 细胞凋亡可能的机制是:氯通道被抑制后,钾离子和水的流出也被抑制,阻止或者中断了 AVD 的发生,从而抑制了由于 AVD 持续进行引起的后续凋亡事件,挽救细胞免于死亡。VSOR 氯通道参与了 H_2O_2 诱导的 细胞凋亡,但是具体的分子机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Lupi R, Dotta F, Marselli L, et al Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated [J]. *Diabetes*, 2002, **51**: 1437 - 42.
- [2] Small D L, Tauskela J, Xia Z. Role for chloride but not potassium channels in apoptosis in primary rat cortical cultures[J]. *Neurosci Lett*, 2002, **334**: 95 - 8.
- [3] Geiser T, Ishigaki M, van Leer C, et al H_2O_2 inhibits alveolar epithelial wound repair *in vitro* by induction of apoptosis[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, **287**: 448 - 53.
- [4] Hong H, Liu G Q. Protection against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in PC12 cells by scutellarin [J]. *Life Sci*, 2004, **74** (24): 2959 - 73.
- [5] Bortner C D, Hughes F M Jr, Cidlowski J A. A primary role for K^+ and Na^+ efflux in the activation of apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 1997, **272**, No. 51 (19): 32436 - 42.
- [6] Szabo I, Lepple-Wienhues A, Kaba KN, et al Tyrosine kinase - dependent activation of a chloride channel in CD95-induced apoptosis in T lymphocytes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (11): 6169 - 74.
- [7] Rasola A, Farahi Far D, Hofman P, et al Lack of internucleosomal DNA fragmentation is related to Cl^- efflux impairment in hematopoietic cell apoptosis[J]. *FASEB J*, 1999, **13** (13): 1711 - 23.
- [8] Jiao J D, Xu C Q, Yue P, et al Volume-sensitive outwardly rectifying chloride channels are involved in oxidative stress-induced apoptosis of mesangial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **340** (1): 277 - 85.
- [9] Souktani R, Berdeaux A, Ghaleh B, et al Induction of apoptosis using sphingolipids activates a chloride current in *Xenopus laevis* oocytes[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000, **279**: 158 - 65.
- [10] 付国香,涂玉林,堤一彦,等. NO-1886对培养的胰岛细胞凋亡和 细胞功能的影响 [J]. 中国药理学通报, 2003, **19** (1): 66 - 9.
- [11] Fu G X, Tu Y L, Di Y Y, et al Effect of NO-1866 on cultured islet cell apoptosis and -cell function[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2003, **19** (1): 66 - 9.
- [11] Nilius B, Seherer J, De Smet P, et al Volume regulation in a toad epithelial cell line: role of coactivation of K^+ and Cl^- channels [J]. *J Physiol*, 1995, **487** (Pt 2): 367 - 78.
- [12] Best L, Speake T, Brown P. Functional characterisation of the volume-sensitive anion channel in rat pancreatic beta-cells[J]. *Exp Physiol*, 2001, **86** (2): 145 - 50.
- [13] 周 园,周家国,丘钦英,等. CIC-3 氯通道对 H_2O_2 诱导的大鼠主动脉平滑肌细胞凋亡的影响 [J]. 中国药理学通报, 2006, **22** (10): 1175 - 9.
- [13] Zhou Y, Zhou J G, Qiu Q Y, et al Effects of CIC-3 chloride channel on H_2O_2 -induced apoptosis in rat aortic vascular smooth muscle cells[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2006, **22** (10): 1175 - 9.

Effects of chloride channel blockers on H_2O_2 induced apoptosis in pancreas RIN-m beta cells

REN Sheng-hua, YE Chun-ling, JIN Yong-liang, LU Yan-qing, FENG Juan
(Dept of Pharmacology, Pharmacy College of Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: **Aim** To investigate the effects of chloride channel blockers on the apoptosis of RIN-m cells of pancreatic islet induced by H_2O_2 . **Methods** The apoptotic model was made by H_2O_2 exposed for six hours with a concentration of $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The chloride channel blockers: DDS, NPPB and NFA were administered to pretreat the samples respectively. The cell viability, morphological changes, and apoptosis rate were observed. **Results** Chloride channel blockers alone have no marked effects on the cell viability of

RIN-m cell. However, they elevated the cell viability of RIN-m cell disposed of by H_2O_2 . Compared to H_2O_2 group, the groups of DDS + H_2O_2 , NPPB + H_2O_2 and NFA + H_2O_2 have significant difference in cell viability and apoptosis rate ($P < 0.01$). **Conclusions** Chloride channel blockers (DDS, NPPB and NFA) remarkably inhibit apoptosis of RIN-m cells induced by H_2O_2 .

Key words: pancreas RIN-m cell, apoptosis, H_2O_2 , chloride channel blocker