

开心散抑制过氧化氢诱导的 PC12 细胞凋亡的机制

钱云飞,姚文兵,王 华,高向东*

中国药科大学生命科学与技术学院,南京 210009

【摘要】目的:研究开心散(Kaixin San, KXS)对过氧化氢(H_2O_2)诱导的 PC12 细胞凋亡的影响,并探讨其抗凋亡的机制。方法:以过氧化氢诱导的 PC12 细胞凋亡为模型,采用 MTT 比色法,琼脂糖凝胶电泳分析,荧光染色观察及流式细胞技术,考察 KXS 对凋亡的保护作用;采用比色法测定 caspase 活性、Western blot 技术检测胞浆中细胞色素 C 水平,RT-PCR 技术分析 Bcl-2 和 Bax mRNA 的表达,考察 KXS 抗凋亡的机制。结果:KXS 可以有效地改善 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞的凋亡,抑制 caspase-3、caspase-9 的活性,降低胞浆中细胞色素 C 的水平,增加 Bcl-2 mRNA 的表达,减少 Bax mRNA 的表达,从而导致 Bcl-2/Bax 比值的增加。结论:KXS 可能通过线粒体途径抑制 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞的凋亡。

【关键词】 开心散; H_2O_2 ; PC12 细胞; 凋亡; 阿尔茨海默病

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1672-3651(2007)05-0379-06

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是老年人中最常见的神经退行性疾病之一,是造成痴呆的最常见原因,占痴呆患者总数的 2/3 以上,在 65 岁以上人群中,西方约有 5% 的人患此病,我国 60 岁以上人群 AD 的患病率为 3%~5%^[1]。AD 病因为多因素参与,发病机制尚不完全清楚。近年研究发现,氧化损伤所造成的神经元凋亡是造成 AD 的重要原因之一^[2]。过氧化氢(H_2O_2)是活性氧族(reactive oxygen species, ROS)的主要成分之一,可以跨膜扩散进入细胞内,是一种比较常用的细胞氧化应激诱导剂,广泛用于诱导细胞凋亡模型。

开心散(Kaixin San, KXS)是古代医籍《备急千金要方》所记载的益智类方剂之一,由人参、远志、茯苓、石菖蒲组成。经临床证实,它有良好的益智作用。近年的研究表明,开心散能改善拟痴呆小鼠的记忆能力,具有明显的益智健脑、抗衰老、增强记忆的功能^[3]。应用开心散后能够显著降低小鼠脑组织 NO 和 NOS 含量,抑制 ChE 活性,说明开心散可能具有保护神经细胞,促进记忆的作用^[4]。PC12 细胞株

源于大鼠嗜铬细胞瘤,已被广泛用于神经细胞死亡方式及神经毒方面的研究。本研究用 H_2O_2 诱导 PC12 细胞的凋亡,观察 KXS 对神经细胞的保护作用,并探讨其抗细胞凋亡的机制,为开发其成为治疗 AD 药物提供实验依据。

1 材料

1.1 开心散水提液的制备

人参、远志、茯苓、石菖蒲均购自南京市药材公司,并经中国药科大学药学教研室秦民坚教授鉴定。按照《备急千金要方》比例,将药材粉碎,8 倍量的蒸馏水浸泡 1 h,煮沸提取 1 h,收集提取液;再加入 6 倍量的蒸馏水煮沸提取 1 h 后,合并提取液,旋转蒸发器浓缩,4℃ 保存。实验中所用 KXS 的浓度均以生药量计算。

1.2 试剂

MTT、Hoechst 33,258、碘化丙啶(PI)(Sigma 公司);DMEM 培养基、新生小牛血清(Gibco 公司);胰蛋白酶(北京夏斯生物公司);细胞色素 C 小鼠单抗(Santa Cruz 公司);细胞凋亡 - DNA Ladder 抽提试剂盒(离心柱式)、caspase-3、caspase-9 活性检测试剂盒(碧云天生物技术研究);Taq 酶(宝生物工程(大连)有限公司);逆转录酶 MMLV (Promega 公司);引物合成(南京基天生物技术有限公司)。

【收稿日期】 2007-03-05

【基金项目】 教育部“高等学校优秀青年教师教学科研奖励计划”(No. 2002-383);国家中医药管理局中医药科学技术研究专项(No. 04-05ZP33)资助

【通讯作者】 高向东:博导,教授, Tel: 025-83271298 E-mail: xiangdong_gao@hotmail.com

1.3 仪器

Water Jacketed CO₂ 细胞培养箱 (Thermo 电子公司); XSB-1A 倒置显微镜 (梧州光学仪器厂); DM-ILT 荧光显微镜 (德国 Leica 公司); BS110s 型分析天平 (北京赛多利斯天平有限公司); Z323K 冷冻高速离心机 (德国 Hermle labor technik 公司); MycyclerTM PCR 仪 (BIO-RAD 公司); multiskan 全波长酶标仪 (Thermo 公司); 流式细胞仪 (FACSCalibur, 美国 BD 公司)

2 方法

2.1 PC12 细胞培养和处理

PC12 细胞株由中国科学院细胞生理研究所提供, 保存于液氮中。实验时 37 °C 快速复苏, 1 500 r·min⁻¹ 离心 5 min, 用含 10% 小牛血清、100 U·mL⁻¹ 青霉素、100 μg·mL⁻¹ 链霉素的 DMEM 培养基重悬, 接种于 100 mL 培养瓶中, 待 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度下长成单层后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化 3~5 min, 含血清的 DMEM 培养基终止消化, 反复吹打成细胞悬液, 调整密度为 1 × 10⁴ 个细胞/mL, 接种于涂有多聚赖氨酸的 24 孔培养板或培养瓶中, 培养 48 h 后用于试验。

2.2 H₂O₂ 处理

接种在 24 孔板上的 PC12 细胞长满单层后, 用 D-Hank's 液轻轻洗 2 次, 加入含 H₂O₂ 的 DMEM 培养液 500 μL, 使 H₂O₂ 的终浓度为 0.5 mmol L⁻¹, 共同孵育 0、3、6、9、12、24 h。考察 KXS 对细胞的保护作用时, 加入 KXS 水提液与 H₂O₂ 一起孵育。同时设一颜色对照组, 只加入培养基和 KXS 水提液。

2.3 MTT 比色分析

实验结束前 4 h, 每孔加入 MTT 后使其终浓度为 0.5 mg·mL⁻¹, 37 °C 孵育 4 h 后, 每孔加入 500 μL DMSO, 待结晶完全溶解后, 以 630 nm 为参比, 测定 A_{570nm}。

2.4 Hoechst 33,258 染色

收集 H₂O₂ 及药物共同作用 12 h 的细胞, 用 PBS 洗涤两遍, 加入 4% 的多聚甲醛, 室温下固定 15 min。PBS 洗涤后, 加入 Hoechst 染色液, 使其终浓度为 5 μg·mL⁻¹, 室温染色 20 min。吸去染色液, 再用 PBS 洗 2 次, 立即在荧光显微镜下观察细胞形态并拍照。

2.5 DNA 电泳分析

收集细胞, 按照试剂盒 (碧云天, C0008) 要求

提取 DNA。取 15 μL DNA 提取液加 3 μL 上样缓冲液, 进行 1.8% 琼脂糖凝胶电泳 (含 Goldview 0.5 μg mL⁻¹), 80 V, 1 h。紫外下观察并拍摄结果。

2.6 流式细胞仪分析

收集细胞轻轻吹打成单细胞悬液, 用 PBS 清洗两遍, 细胞悬浮于 70% 冰乙醇中, 4 °C 固定过夜, 1 500 r·min⁻¹ 离心 5 min, 用 PBS 洗 2 次。将细胞用 1 mL DNA 染色液 (其中包含 50 μg mL⁻¹ RNA 酶, 0.1% Triton X-100, 0.1 mmol L⁻¹ pH 7.4 的 EDTA 和 50 μg mL⁻¹ PI) 重悬, 4 °C 避光染色 30 min, 300 目的筛网过滤一次, 上机收集分析。

2.7 Caspase-3、-9 活性分析

按照试剂盒 (碧云天, C1115, C1157, C11151kitC1157) 方法分析 caspase 活性。收集细胞, 600 g 4 °C 离心 5 min。PBS 洗涤后, 吸尽上清, 按照每 2 × 10⁷ 个万细胞加入 100 μL 裂解液的比例加入裂解液, 重悬沉淀, 冰浴裂解 15 min 后, 4 °C 16 000 g 离心 15 min。取上清分别与 caspase-3、-9 的底物 Ac-DEVD-pNA 和 Ac-LEHD-pNA 37 °C 共同孵育 2 h, 405 nm 测定吸光值。

2.8 Western-blot 测定胞浆中细胞色素 C 水平

参照文献^[5]的方法进行 Western-blot 检测。为确保蛋白电泳上样量的一致, 用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。其中一抗为小鼠抗细胞色素 C 抗体, 二抗为用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG, 用 DAB 试剂盒显色。

2.9 RT-PCR 检测 Bcl-2、Bax 基因的 mRNA 表达

按照《分子克隆实验指南》第 3 版^[6]的方法提取总 mRNA。逆转录过程按试剂盒操作。引物设计如下:

GAPDH (213 bp): 5'-ATTCAACGGCAG-AGT-CAAGG3 (forward)

3'-AGTAGAGGCGGGGAAGACG5 (reverse)

Bcl-2 (303 bp): 5'-GATGACTTCTCTCGTCGCTA-3 (forward)

3'-TACGGAAACACCTTGATATA-5 (reverse)

Bax (331 bp): 5'-GAACTGGACAATAATATGGA-3 (forward)

3'-TCACTGGTGAACACCGAC-5 (reverse)

PCR 条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 51 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 28 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 的产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳 100 V, 1.5 h, EB 染色后紫外光下观察

拍照。

2.10 统计学处理

采用 SPSS 统计软件进行统计学处理。数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 KXS 对 PC12 细胞活力的影响

为了确定最佳损伤条件, 考察了 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 不同损伤时间下细胞活力的变化。如图 1 所示, 随着作用时间的延长, 细胞活力逐渐下降, $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 作用 12 h 时, 细胞活力下降到空白组的 55.3%。加入 KXS (终浓度分别为 2.8×10^{-5} 、 2.8×10^{-6} 、 $2.8 \times 10^{-7} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 共同孵育时, 细胞活力增加, 分别上升为 81.1%、69.2%、60.8%, 表明 KXS 对 H_2O_2 引起的 PC12 细胞损伤具有明显的保护作用, 可以显著地改善细胞的活力。

3.2 KXS 对 PC12 细胞总体凋亡的影响

Hoechst 33,258 染色结果显示, 在荧光显微镜下观察, 活细胞核呈弥散均匀的蓝色荧光, 凋亡细胞的细胞核或细胞质内可见浓染致密的颗粒块状荧光, 蓝色荧光比正常细胞要强, 并可见到凋亡细胞中分散着较多的 DNA 荧光碎片。KXS (终浓度为 $2.8 \times 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 给药组中正常细胞的比例高于损伤组细胞, 对凋亡细胞的形态变化有所改善, 结果见图 2(A)。这个结果在 DNA 电泳分析中得到了证实。图 2(B) 结果显示, PC12 细胞经 H_2O_2 诱导后出现特异性的细胞凋亡的生化特征, 其 DNA 发生片段化, 经 1.8% 琼脂糖凝胶电泳的电泳谱呈

典型的梯状条带 (DNA ladder); 而 KXS 各给药组特征梯状带减少, 尤其是 KXS (终浓度为 $2.8 \times 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 组减少最为显著。流式细胞分析结果显示, KXS (终浓度分别为 2.8×10^{-5} 、 2.8×10^{-6} 、 $2.8 \times 10^{-7} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 与 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 作用 12 h 后, PC12 细胞的凋亡率由 32.23% 分别减小到 13.17%、17.36%、21.93% (如图 3)。这些结果都说明 H_2O_2 能诱导细胞凋亡而 KXS 能抑制这一细胞凋亡过程。

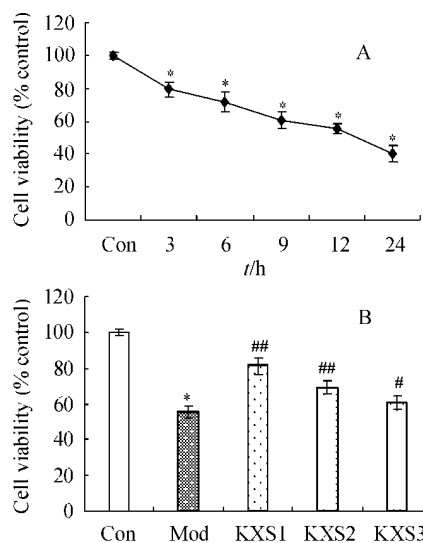


Fig 1 KXS inhibited H_2O_2 -induced injury in PC12 cells. (A) Cells were treated with $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ for indicated times. (B) Cells were treated with $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ for 12 h in the absence of KXS (2.8×10^{-5} , 2.8×10^{-6} , $2.8 \times 10^{-7} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$). * $P < 0.01$ vs control; # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$ vs H_2O_2 alone

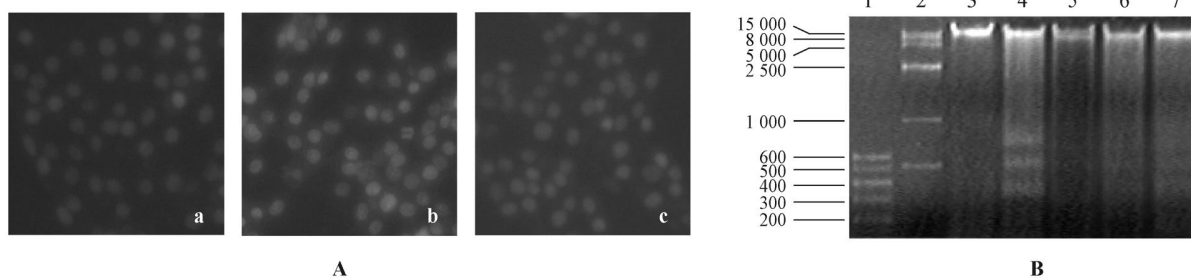


Fig 2 Morphological analysis of KXS treated PC 12 cells. (A) Morphological analysis of nuclear chromatin in by Hoechst 33, 258. (a) Control conditions. (b) Exposure to $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ for 12 h (c) Exposure to $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ and $2.8 \times 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ KXS for 12 h. (B) Agarose gel electrophoresis of DNA fragmentation. Lane 1~2, DNA ladder marker; Lane 3, control; Lane 4, $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ treated for 12 h; Lanes 5~7, KXS (2.8×10^{-5} , 2.8×10^{-6} , $2.8 \times 10^{-7} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$) and $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ treatment for 12 h

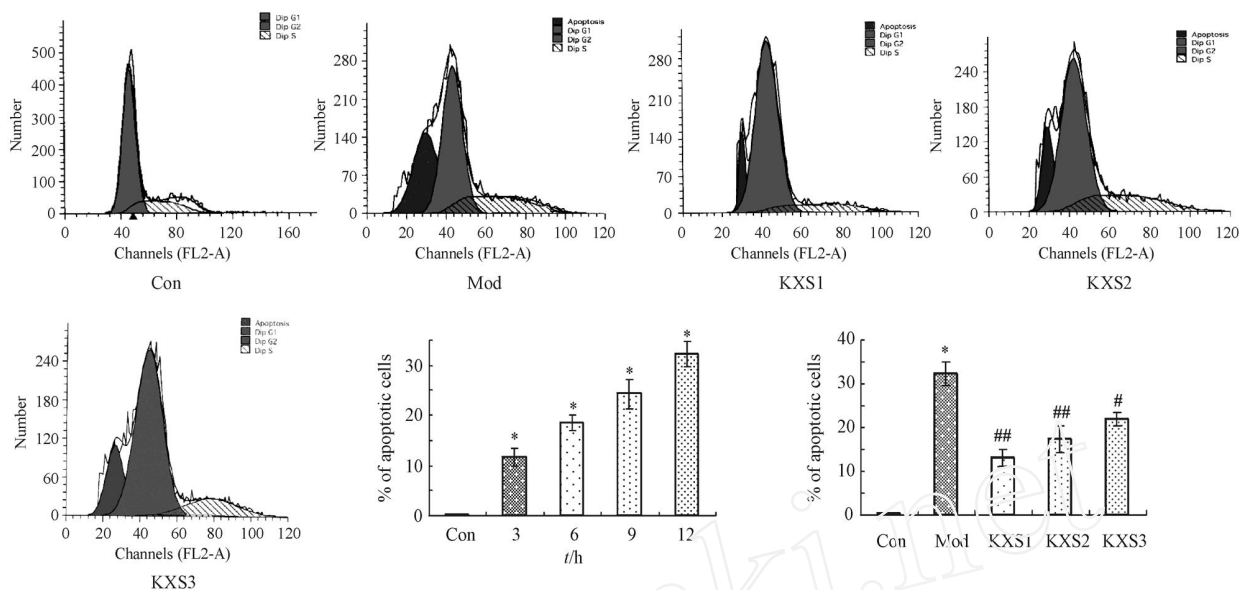


Fig 3 Effects of KXS on PC12 cells apoptosis by flow cytometric DNA analysis. (A) Cells were treated with $0.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ for indicated times. (B) Exposure to $0.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ and different dose of KXS ($2.8 \times 10^{-5}, 2.8 \times 10^{-6}, 2.8 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$) for 12 h. * $P < 0.01$ vs control; # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$ vs H_2O_2 alone

3.3 KXS 抑制 caspase-3、caspase-9 的激活

在细胞凋亡的过程中, caspase 既是起始者, 又是效应者。如图 4 所示, $0.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ 作用细胞会引起 caspase 酶活的上升。Caspase-3 活力在 6 h 开始增加, 12 h 时达到最大值; caspase-9 活力从 3 h 开始上升, 9 h 和 12 h 时达到最大值。KXS 与 $0.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ 共同作用 PC12 细胞 12 h, 能显著抑制 caspase-3、caspase-9 的活力上升。

3.4 KXS 抑制线粒体中细胞色素 C 的释放

如图 5 所示, 用 $0.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ 分别处理 PC12 细胞 0、3、6、9、12、24 h, 细胞色素 C 蛋白条带逐渐变粗, 说明随着 H_2O_2 作用时间的延长, 从线粒体释放到胞浆中的细胞色素 C 量增加, 9 h 达到最大值。当加入 KXS (终浓度为 $2.8 \times 10^{-5} \text{ g mL}^{-1}$) 共同作用时, 蛋白条带明显变淡, 说明 KXS 能显著降低线粒体膜的通透性, 减少细胞色素 C 的释放。

3.5 KXS 抑制 Bcl-2 和 Bax 基因 mRNA 的表达

RT-PCR 图象分析结果显示, $0.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ 作用细胞会引起 Bcl-2 表达减少, Bax 表达增加, 9 h 时变化明显, Bcl-2/Bax 比值明显下降。加入 KXS 共同作用 9 h 后, 这些变化均能被显著改善, Bcl-2/Bax 比值与损伤相比有明显升高 (如图 6)。

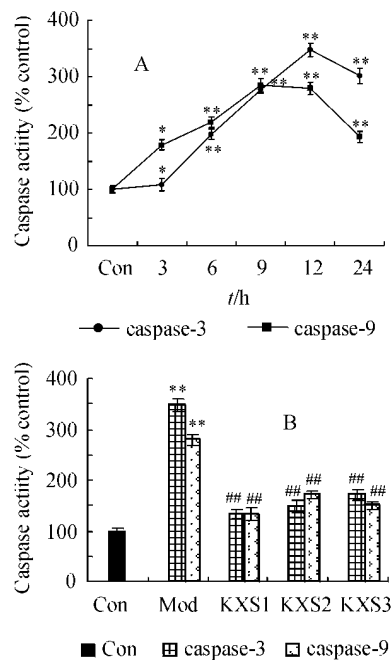


Fig 4 Activation of caspases 3, caspase-9. (A) Alteration of caspase-3, caspase-9 activity in $0.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ -induced PC12 cells for indicated times. (B) Effect of KXS ($2.8 \times 10^{-5}, 2.8 \times 10^{-6}, 2.8 \times 10^{-7} \text{ g mL}^{-1}$) on caspase-3, caspase-9 activity in $0.5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$ -induced PC12 cells for 12 h. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs control; # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$ vs H_2O_2 alone at the same time

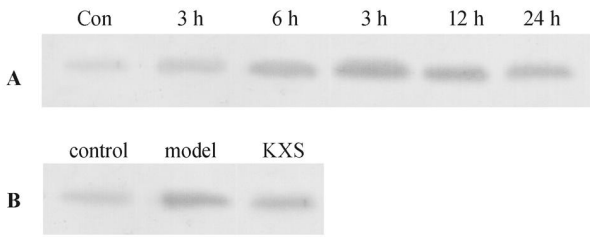


Fig 5 Western blot analysis of cytosolic cytochrome C in H_2O_2 and KXS treated or untreated cells. (A) Cytochrome C in cytosol of $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ -induced PC12 cells for indicated times. (B) Effect of $2.8 \times 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ KXS on cytochrome C release in $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ -induced PC12 cells for 9 h.

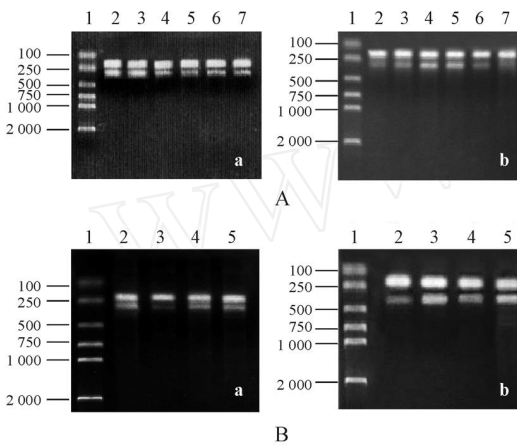


Fig 6 RT-PCR analysis of Bcl-2 and Bax mRNA in KXS and H_2O_2 treated or untreated cells. (A) Alteration of Bcl-2 (a) and Bax (b) in $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ -induced PC12 cells for indicated times. Lane 1, DNA marker; Lane 2, control; Lanes 3-7, $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ treated for 3, 6, 9, 12, 24 h. (B) The expression of Bcl-2 (a) and Bax (b) in KXS treated PC 12 cells. Cells were co-incubated with $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ and KXS for 9 h. Lane 1, DNA marker; Lane 2, control; Lane 3, $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ treated for 9 h; Lanes 4-5, KXS (2.8×10^{-5} , $2.8 \times 10^{-7} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$) and $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ treatment for 9 h.

3 讨论

AD 病因复杂,发病环节较多,西药治疗 AD 作用靶点单一,效果较差,且易出现耐药及副作用^[7]。益智抗衰老开心散作为一个复方,在开发应用于 AD 的治疗方面具有明显的优越性。细胞凋亡是多种生理病理因素参与的由凋亡相关基因

启动的过程,许多炎症介质和细胞因子均影响这个过程。其中,氧化应激造成大量活性氧的产生及其造成的继发性细胞损伤在细胞凋亡过程中起着重要作用^[8]。近年来研究表明凋亡在 AD 的神经元丢失过程中起着重要的作用,引起了广泛的关注^[9]。研究发现, $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 作用细胞能引起细胞损伤和典型的细胞凋亡,而 KXS 能显著地改善凋亡引起的 PC12 细胞形态学变化,增强细胞活力,降低凋亡细胞比率。这些结果说明 KXS 能有效抑制 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞的凋亡,提示 KXS 可以作为一种抗氧化应激诱导凋亡的神经保护剂。

在细胞凋亡研究中,caspase 已成为该领域的研究热点之一。Caspase 以无活性的酶原形式存在细胞内,需被水解加工后才能成为有活性的片段。它主要分为两类,起始 caspases 包括-2,-8,-9,-10 等,对细胞凋亡的刺激信号作出反应,启动细胞的凋亡过程;效应 caspases 包括-3,-6,-7 等,是在细胞凋亡过程中的具体执行者,完成对特定蛋白底物的水解,引起一系列的生化反应,如 DNA 片段降解等。实验中发现,在 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ 处理的 PC12 细胞中,caspase-3 酶活 6 h 开始上升,12 h 达到最大值。为了探讨此过程中凋亡的途径和信号传导,又对细胞胞浆中的细胞色素 C 蛋白水平进行了检测,结果发现,随着 H_2O_2 作用时间的延长,细胞色素 C 蛋白水平逐渐增加,9 h 达到最大值。同时,caspase-9 酶活 3 h 时开始上升,9 h 和 12 h 达到峰值。综合这些结果发现, H_2O_2 诱导的 PC12 细胞的凋亡与线粒体中细胞色素 C 释放到胞浆以及 caspase 的激活有关,提示可能是通过线粒体途径来诱导细胞的凋亡。同时,在 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞的凋亡中还发现了 Bcl-2 表达的下调和 Bax 表达的上调。一些研究表明,Bcl-2 可以作为线粒体线粒体膜的通道蛋白^[10]。Bcl-2 的上调可以抑制细胞色素 C 从线粒体中释放到胞浆,从而抑制 caspase 的激活和细胞凋亡^[11,12]。结果显示,不同浓度的 KXS 对这些环节均有显著的改善作用,提示它可能通过调节 Bcl-2 和 Bax 的表达,减小线粒体膜的通透性,阻止细胞色素 C 释放进入胞浆,抑制 caspase 酶的激活,即通过线粒体途径来减少凋亡的发生。这些研究结果为将 KXS 开发用于治疗 AD 提供了一定的药理基础。

参考文献

- [1] 陈彪(Chen B),马秋兰(Ma QL). 阿尔茨海默病病因学研究进展及治疗展望[J]. 中华神经科杂志(*Chin J Neurol*),2003,36(2):158.
- [2] Behl C. Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches [J]. *Prog Neurobiol*,1999,57:301-323.
- [3] 黄玉芳(Huang YF),卞慧敏(Bian HM),刘学风(Liu XF). 开心散对拟痴呆小鼠记忆功能的影响[J]. 中国老年学杂志(*Chin J Gerontol*),1999,19(9):290-292.
- [4] 黄玉芳(Huang YF),卞慧敏(Bian HM),刘涛(Liu T),等. 开心散对记忆障碍小鼠脑组织一氧化氮、胆碱酯酶含量的影响[J]. 北京中医药大学学报(*J Beijing Univ Tradit Chin Med*),2001,24(4):40-41.
- [5] Jia RR, Gu YL, Ho LS, et al. Anti-apoptotic activity of Bak Foong Pills and its ingredients on 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in PC12 cells [J]. *Cell Biol Int*,2005,29:835-842.
- [6] J 萨姆布鲁克,拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南(第3版)[M]. 北京:科学出版社,2002:516-522.
- [7] 任振华(Ren ZH),李光武(Li GW). 中药有效成分治疗老年性痴呆的研究进展[J]. 中成药(*Chin Tradit Pat Med*),2004,26(12):1054-1056.
- [8] 姜泊(Jiang B). 细胞凋亡基础与临床[M]. 北京:人民军医出版社,1999.
- [9] Cotman CW. Apoptosis decision cascade and neuronal degeneration in Alzheimer's disease [J]. *Neurobiol Aging*,1998,S29-S32.
- [10] Goss A,McDonnell JM,Korsmeyer SJ. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis [J]. *Genes Dev*,1999,13:1899-1911.
- [11] Solange D,Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis [J]. *Trends Cell Biol*,2000,10:369-377.
- [12] Budihardjo I, Oliver H,Lutter M, et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*,1999,15:269-290.

The Mechanism of Kaixin San Inhibiting Apoptosis in Hydrogen Peroxide-induced PC12 Cells

QIAN Yur-Fei, YAO Wen-Bing, WANG Hua, GAO Xiang-Dong

School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

[ABSTRACT] AIM: To investigate the effect of *Kaixin San* (KXS) in H₂O₂-induced PC12 cells apoptosis and its mechanism of anti-apoptosis. **METHODS:** H₂O₂-induced PC12 cells apoptosis model was established, and the protective effect of KXS was assayed by MTT, Hoechst 33,258 staining, agarose gel electrophoresis and flow cytometric. Furthermore, the antiapoptosis mechanism of KXS was investigated using Caspase assay, western blot and RT-PCR. **RESULTS:** KXS could protect the PC12 cells from the damage of H₂O₂, inhibit apoptosis by suppression of cytochrome C release and caspase cascade activation, as well as regulation of Bcl2 family members. **CONCLUSION:** KXS may inhibit apoptosis in H₂O₂-induced PC12 cells from the mitochondria mediated pathway.

[KEY WORDS] *Kaixin San*; H₂O₂; PC12 cells; Apoptosis; Alzheimer's disease

[Foundation Item] This project was supported by the Teaching and Research Award Program for Outstanding Young Teachers in Higher Education Institutions of MOE, P. R. C. (No. 2002-383) and the Special Project for the Traditional Chinese Medicine Scientific Research of State Administration of Traditional Chinese Medicine of China(No. 04-05ZQP33)

征订启事

欢迎订阅 2008 年《中国海洋药物》

《中国海洋药物》杂志是由中国科协主管、中国药学会主办、国内外公开发行的全国性科技核心期刊。本刊为双月刊,56页,每期定价7.50元,全年45.00元,国内邮发代号24-57;国外订阅者请与中国国际图书贸易公司北京399信箱联系(P. O. BOX399, Beijing 10004, China),欢迎广大读者通过当地邮局订阅。

编辑部地址:青岛市莱芜二路2号 邮编:266003

电话:0523-88083130;E-mail:qdhaiyao@public.qd.sd.cn