

## 苯甲酸钠诱导 PC12 细胞凋亡及对 TH 表达的影响

陈倩<sup>1,3</sup>, 黄锦桃<sup>2</sup>, 谢富康<sup>3</sup>, 李朝红<sup>3\*</sup>

(1.海南省血液中心临床输血研究室,海南海口 570311; 2.中山大学医学实验教学中心,广东广州 510080; 3.中山大学中山医学院组织学与胚胎学教研室,广东广州 510080)

**摘要:**【目的】观察苯甲酸钠(SB)对 PC12 肾上腺嗜铬细胞瘤细胞凋亡的诱导作用及对酪氨酸羟化酶(TH)表达的影响。【方法】以大鼠 PC12 细胞为多巴胺能神经元细胞模型,以 10 ~ 50 mmol/L 不同浓度的 SB 加入 PC12 细胞,培养 24 h 后,噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞活性;DAPI 染色观察细胞凋亡形态;流式细胞术检测细胞凋亡状况以及用 Western blot 检测 TH 蛋白表达。【结果】SB 可呈浓度依赖性抑制 PC12 细胞活性,并诱导 PC12 细胞核形态呈凋亡改变;流式细胞术检测显示随着 SB 浓度增加,细胞凋亡率显著增加;低浓度(10 mmol/L)SB 作用下 PC12 细胞中 TH 表达增强,而高浓度(40 ~ 50 mmol/L)SB 作用下 TH 表达减弱,同时,高浓度(40 mmol/L)SB 作用下 TH 的表达减弱可呈时间依赖性。【结论】SB 能够诱导 PC12 细胞凋亡,并伴随 TH 的表达改变。

**关键词:** 苯甲酸钠; PC12 细胞; 凋亡; 酪氨酸羟化酶

**中图分类号:** R114      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1672-3554(2014)03-0340-06

### Effects of Sodium Benzoate on Apoptosis of PC12 Cells and Expression of Tyrosine Hydroxylase

CHEN Qian<sup>1,3</sup>, HUANG Jin-tao<sup>2</sup>, XIE Fu-kang<sup>3</sup>, LI Chao-hong<sup>3\*</sup>

(1.Department of Clinical Transfusion, Hainan Province Blood Center, Haikou 570311, China; 2.Experiment Teaching Center of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 3.Department of Histology and Embryology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the effects of sodium benzoate (SB)-induced apoptosis in adrenal pheochromocytoma (PC12) cell and the expression of tyrosine hydroxylase (TH). 【Methods】 PC12 cells of rats were models for dopaminergic neuron. MTT assay was used to examine the cell viability of PC12 cells treated by different concentration (10-50 mmol/L) SB after 24 h. DAPI stain and flow cytometry were used to observe the morphological changes of apoptosis and apoptotic rates respectively. The expression of TH were determined by Western blot. 【Results】 SB could inhibit PC12 cells viability in dose-dependent manner. Apoptosis was obviously observed using DAPI staining. Flow cytometry showed that apoptosis rates significantly increased with increasing SB concentrations. The expression of TH in PC12 cells was increased when treated with low dosage (10 mmol/L) of SB, whereas this expression was decreased when treated with high dosage (40-50 mmol/L) of SB. And the expression of TH when treated with high dosage (40 mmol/L) of SB was decreased in a time-dependent manner. 【Conclusion】 SB could induce apoptosis of PC12 cells and accompanied with change the expression of TH.

**Key words:** sodium benzoate; PC12 cells; apoptosis; tyrosine hydroxylase

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(3): 340-345]

收稿日期: 2013-11-06

基金项目: 国家教委留学回国人员基金(98677); 高等学校博士学科点专项科研基金(20060558002); 国家自然科学基金(39970237, 81070124); 广东省自然科学基金(S2012010009199); 海南省卫生厅医学科研项目(2013052)

作者简介: 陈倩, 博士, 主管技师, 研究方向: 神经发育损伤, E-mail: cqzy4682@163.com; \* 通信作者: 李朝红, 教授, 博士生导师, E-mail: lichaozhongzq@yahoo.com

苯甲酸钠(sodium benzoate, SB), 又名安息香酸钠, 是苯甲酸的钠盐, 由于在酸性条件下能够作为抑菌剂抑制几乎所有微生物的生长, 因此成为目前我国乃至全世界普遍采用的食品和饮料防腐剂之一。虽然关于 SB 的安全性实验已进行了不少, 其中包括致癌性、致畸性、遗传毒性等等, 但针对其神经毒性的研究尚不多见。PC12 细胞为小鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞, 在细胞形态、结构和功能上与神经元极其相似, 能与原代培养的神经细胞说明一致的问题, 并且其所含的受体及递质与黑质多巴胺能神经元相似, 是目前用于检测各种神经毒素对多巴胺(dopamine, DA)能神经元损伤的最为广泛的细胞系<sup>[1]</sup>。为进一步了解 SB 对哺乳动物 DA 能神经元的影响, 本实验以大鼠 PC12 细胞作为 DA 能神经元体外模型, 观察 SB 对哺乳动物 DA 能神经元的毒性损伤作用, 为更全面认识 SB 的生物安全性, 阐明 SB 诱导神经毒性的分子机制提供实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

胎牛血清(天津灏洋 TBD 公司); DMEM 培养基(美国 Gibco 公司); 鼠抗 TH(美国 Chemicon 公司); SB、MTT、DAPI 和 DMSO (美国 Sigma 公司); 其余试剂均为国产分析纯。

CO<sub>2</sub> 恒温培养箱(美国 Thermo Scientific Forma 公司); 倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司); 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司); 荧光显微镜(德国 Leica 公司); 低温离心机(德国 Eppendorf 公司); 电泳仪、垂直电泳槽(上海天能科技有限公司)。

### 1.2 方 法

1.2.1 PC12 细胞培养 PC12 细胞由中山大学生理学教研室馈赠。细胞以  $1 \times 10^5$  接种于 96 孔培养板, 体积分数 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 恒温条件下, 培养于含 100 mL/L 灭活胎牛血清和青霉素(100 U/mL)及链霉素(100 ug/mL) DMEM 培养基中。饥饿细胞进行同步化处理: 为使细胞处于同步化, 培养 24 h 后, 吸出旧培养基, 用 PBS 轻轻漂洗细胞 1 次, 更换 DMEM 无血清培养基继续培养 24 h; 药物处理: 饥饿 24 h 后的细胞, 加入不同浓度 SB 作用 24 h, 然后进行下一步的实验观察。

1.2.2 MTT 法检测细胞活性 取对数生长期

PC12 细胞, 以  $1 \times 10^3$  /孔接种于 96 孔板, 细胞饥饿同步化处理, 进行以下分组处理: 空白对照组: 细胞培养基中不加 SB, 正常培养的 PC12 细胞; 实验组则各加入不同浓度的(10、20、30、40、50 mmol/L) SB, 每组设 3 个复孔, 培养 24 h 后, 每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 10  $\mu$ L, 37 °C CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 4 h, 加入 100 g/L DMSO 100  $\mu$ L, 振荡 5 min, 用酶标仪在 490 nm 波长处测定各孔的吸光度值。以公式: 细胞存活率=(对照组平均 OD 值—实验组平均 OD 值)/对照组 OD 值 $\times$ 100% 计算药物对细胞活性的抑制效果。

1.2.3 DAPI 染色检测细胞核形态 将 PC12 细胞以  $1 \times 10^5$  /孔密度接种于 6 孔板中, 饥饿同步化处理, 分别加入不同浓度的 SB(10~50 mmol/L) 作用 24 h, 同时设不加 SB 正常培养的 PC12 细胞为空白对照组, 将处理后的细胞 PBS 洗 3 次, 用含 0.1% Triton-X-100 的 4% PFA 固定细胞并破膜 15 min, PBS 洗 3 次, 加入 0.001% DAPI, 避光孵育 10 min, PBS 洗涤后缓冲甘油封闭, 荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡率 将 PC12 细胞以  $1 \times 10^5$  /mL 的密度接种于 60 mm 培养皿中, 饥饿同步化处理, 分别加入不同浓度的 SB(10~50 mmol/L) 作用 24 h, 同时设不加 SB 正常培养的 PC12 细胞为空白对照组和加入 5  $\mu$ mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 为阳性对照组, 分别收集各组细胞, PBS 洗 2 次, 加入-20 °C 预冷的 700 mL/L 乙醇 4 °C 固定过夜, 次日 4 °C 离心后, PBS 洗涤 2 次去除乙醇, 并调节细胞密度为  $1 \times 10^6$  /mL, 加入含 RNase 的 PI 溶液(RNase 终浓度为 20 mg/mL, PI 终浓度为 50 mg/mL), 4 °C 避光染色 30 min, 流式细胞仪上机检测细胞凋亡率。PI 用氩离子激发荧光, 激发光波波长为 488 nm, 发射光波波长大于 630 nm, 流式细胞仪自带细胞凋亡检测程序分析结果。

1.2.5 Western blot 检测 TH 蛋白表达 细胞以  $(3\sim 5) \times 10^5$  /mL 密度接种于直径为 60 mm 玻璃培养皿 24 h 后, 换用无血清培养基饥饿 24 h, 将饥饿同步化处理后的 PC12 细胞分别按以下分组处理: ①不同浓度(10~50 mmol/L) SB 处理 24 h, 同时设不加 SB 的空白对照组; ②40 mmol/L SB 作用不同时间(1~24 h), 同时设不加 SB 的空白对照组。分别将各组细胞弃去培养基, 冰 PBS 洗 2 次, 细胞刮刮取细胞, 收集到 1.5 mL 预冷 EP 管中, 4 °C,

5 000 r/min ( $r = 8$  cm) 离心 1 min, 弃上清, 加入溶有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液 100  $\mu$ L, 超声波细胞粉碎机粉碎细胞, 4  $^{\circ}$ C, 12 000 r/min ( $r = 8$  cm) 离心 20 min, 收集上清, 采用 BCA 法进行蛋白定量。取 70  $\mu$ g 蛋白提取液, 95  $^{\circ}$ C 煮沸 5 min, 样品于 SDS-PAGE (聚丙烯酰胺凝胶) 分离后, 转移到 PVDF 膜上, 用 5 % BSA 封闭 1 h, 随后加入抗-TH 抗体, 摇床上 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 洗 10 min  $\times$  3 次, 用辣根过氧化物酶标记的二抗室温下孵育 2 h, TBST 洗 10 min  $\times$  3 次, ECL 化学发光法显影。胶片经凝胶成像系统拍摄后, 使用 Gene Genius Bio-imaging System 软件对所存图像行定量分析。

### 1.3 统计学处理

数据经 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 实验数据均用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间差异采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 和 LSD- $t$  进行检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 SB 对分化的 PC12 细胞形态的影响

倒置显微镜下观察发现, 不同浓度 (10 ~ 50 mmol/L) 的 SB 作用 24 h 后引起了 PC12 细胞不同程度的形态学改变, 随着浓度的增高, 细胞生长速度放缓, 突起减少, 细胞间距变大。如图 1 所示, 低浓度的 SB 对 PC12 细胞形态变化影响不大, 细胞生长状态良好, 10 mmol/L SB 处理后的细胞甚至较对照组突起更粗更长, 数目更多; 当 SB 浓度增加至 30 mmol/L 时, 漂浮细胞开始增多, 约占细胞总数的 20 ~ 30 %, 细胞缩小变圆, 单个细胞间间距增加; 40 mmol/L SB 的处理使漂浮细胞的量占到了近 50 %, 贴壁细胞状态欠佳, 突起减少且变短, 甚至消失; 当 SB 浓度提高到 50 mmol/L 时, 漂浮细胞的量达到 70 ~ 80 %, 多为成团漂起, 剩下的少量贴壁细胞亦呈现烙花, 贴壁不紧, 突起变短甚至消失, 形态不规则等表现。表明 SB 对 PC12 细胞的形态可造成损伤, 且随 SB 浓度增加细胞损伤呈增强趋势。

### 2.2 SB 对 PC12 细胞活性的影响

如表 1 所示, 随着 SB 浓度的增加, PC12 细胞的活性逐渐降低, 增殖受到抑制。与对照组相比, 50 mmol/L SB 作用 PC12 细胞 24 h 后, 细胞活性降低至  $(35.84 \pm 2.65)\%$  ( $P < 0.05$ ), 抑制率呈现浓

度依赖性。

表 1 不同浓度 SB 作用 24h 对 PC12 细胞活性的影响

Table 1 Viability of PC12 cells treated with SB for 24 h

( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Group	Cell viability (%)
Control	100.00 $\pm$ 2.15
Sb 10 mmol/L	75.19 $\pm$ 5.31
20 mmol/L	70.63 $\pm$ 4.49
30 mmol/L	65.02 $\pm$ 6.13 <sup>1)</sup>
40 mmol/L	47.81 $\pm$ 5.23 <sup>1)</sup>
50 mmol/L	35.84 $\pm$ 2.65 <sup>1)</sup>

1)  $P < 0.05$  vs control group.

### 2.3 SB 对 PC12 细胞核形态的影响

荧光显微镜观察发现 (图 2), 对照组细胞核浅染, 着色较均一; 40 mmol/L SB 作用 PC12 细胞 24 h 后, 在浅染胞核背景下, 约有 20 % 的细胞出现深染、比胞核小的圆形颗粒, 表现出凋亡小体的形态学特征, 提示 SB 作用下可使 PC12 细胞核形态呈凋亡改变。

### 2.4 SB 对 PC12 细胞凋亡率的影响

如图 3 所示, 随着 SB 浓度增高, PC12 细胞的凋亡率也逐渐增加。但 10 mmol/L 和 20 mmol/L 的 SB 作用组其细胞凋亡率与对照组无明显差异, 当 SB 浓度增加到 30 mmol/L 时, 其细胞凋亡率与对照组相比具有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。

### 2.5 SB 对 PC12 细胞 TH 蛋白表达的影响

由图 4、5 可见, 不同浓度的 (10 ~ 50 mmol/L) SB 分别作用 PC12 细胞 24 h 后, 与对照组相比, 低浓度的 (10 mmol/L) SB 作用下 TH 表达增强 ( $P < 0.05$ ), 而高浓度的 (40 ~ 50 mmol/L) SB 作用下 TH 表达减弱 ( $P < 0.05$ ); 以 40 mmol/L 的 SB 分别作用于 PC12 细胞 1、3、6、12、24 h 时, 各组细胞 TH 的表达水平与对照组相比逐渐下降 ( $P < 0.05$ ), 表现出一定的时间依赖性。

## 3 讨 论

SB 作为一种常用的食品防腐剂, 在世界各国被广泛应用于果酱、色拉、泡菜等酸性食品和碳酸饮料的防腐; 同时, SB 还可用于化妆品的制备; 在医学领域, SB 也发挥了独特的治疗效用, 被用于

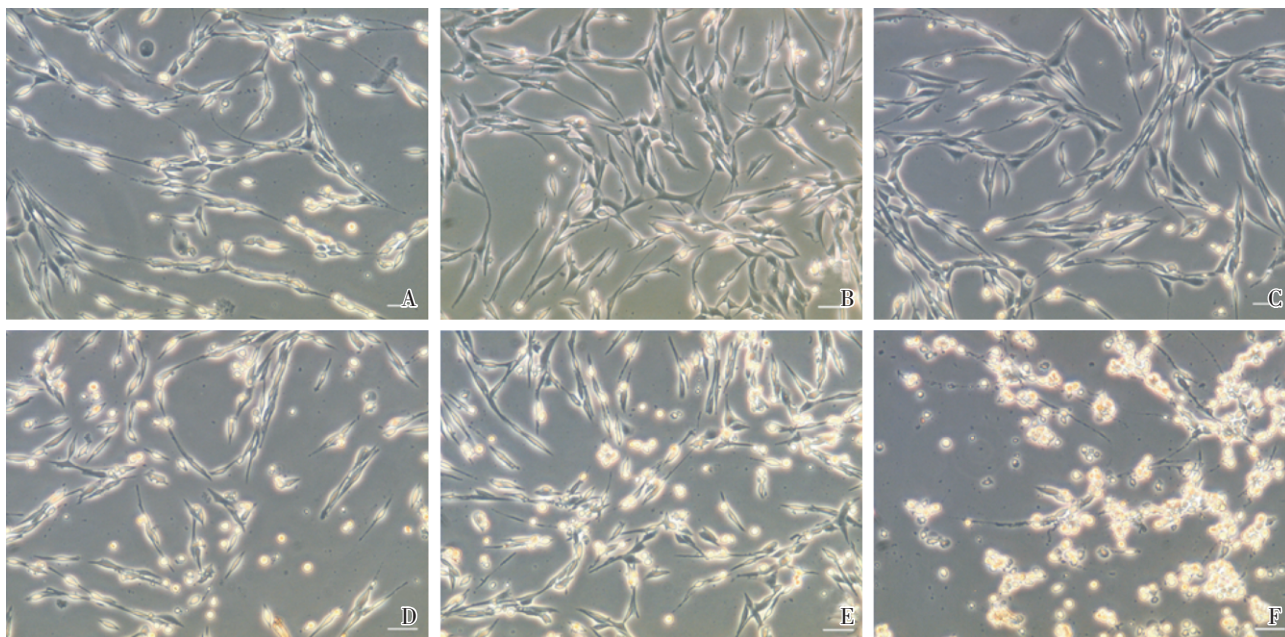


图1 SB作用24 h后PC12细胞形态学改变

Fig.1 Morphological changes of PC12 cells treated with SB for 24 h

A: Control group; B-F: PC12 cells exposed to 10, 20, 30, 40, and 50 mmol/L SB, respectively; Bar=50  $\mu\text{m}$

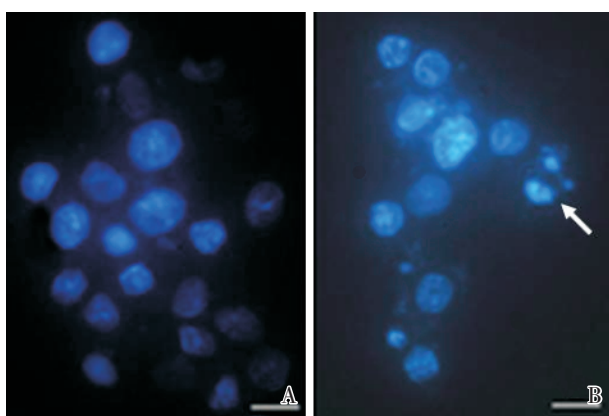


图2 DAPI染色法观察40 mmol/L SB作用24 h后PC12细胞核形态的改变

Fig.2 Morphological changes of nucleus of PC12 cells treated with SB by DAPI staining assay

Arrow indicated cells with apoptotic nuclear condensation and fragmentation. A: Control group; B: PC12 Cells exposed to 40 mmol/L SB for 24 h; Bar = 10  $\mu\text{m}$ .

治疗高氨血症、龋齿等。近年来,随着研究的不断深入,人们对于SB作为食品防腐剂的安全性不禁产生越来越多的疑问,即包括SB等在内的食品防腐剂使用是否真的安全?其安全性结论是否已充分考虑了检测范围的广泛性,检测时期的选择,给

药的持续时间,给药频率等诸多的影响因素?因在其使用和安全剂量上存有争议,各国虽仍允许使用,但应用范围已越来越窄。有些国家如日本已经停止生产苯甲酸钠,并对它的使用做出了严格限制。但因价格低廉,在我国却仍被广泛使用,且目前我国规定的最大使用量为每天0.2~1.5 g/kg,远高于世界卫生组织规定的每日摄入量标准每天0~5 mg/kg,而美国规定的最大使用量也仅为每天7.5 mg/kg<sup>[2]</sup>。频繁而大量的食用接触,更促使我们有必要进一步研究和重新审视SB的安全性问题。

越来越多的研究显示SB对神经系统存在着损伤作用。大量饮用含SB防腐剂的饮料可导致大脑严重萎缩;SB在体内可反应生成苯甲酸,后者长期作用可能引起人慢性苯中毒,产生神经衰弱如头晕、记忆力减退、乏力等症状;同时引起白细胞减少,甚至可能造成再生障碍性贫血<sup>[3]</sup>。也有研究表明,长期饮用含SB的碳酸饮料会影响儿童行为,可能是造成儿童多动症的原因之一<sup>[4-5]</sup>。Tsay等<sup>[6]</sup>研究发现SB处理的斑马鱼(danio rerio)幼鱼在运动轴突和神经肌连接处表现出明显的缺陷,提示SB可能具有神经毒性。我们的前期研究结果也显示,SB能够导致斑马鱼胚胎生存率明显降低

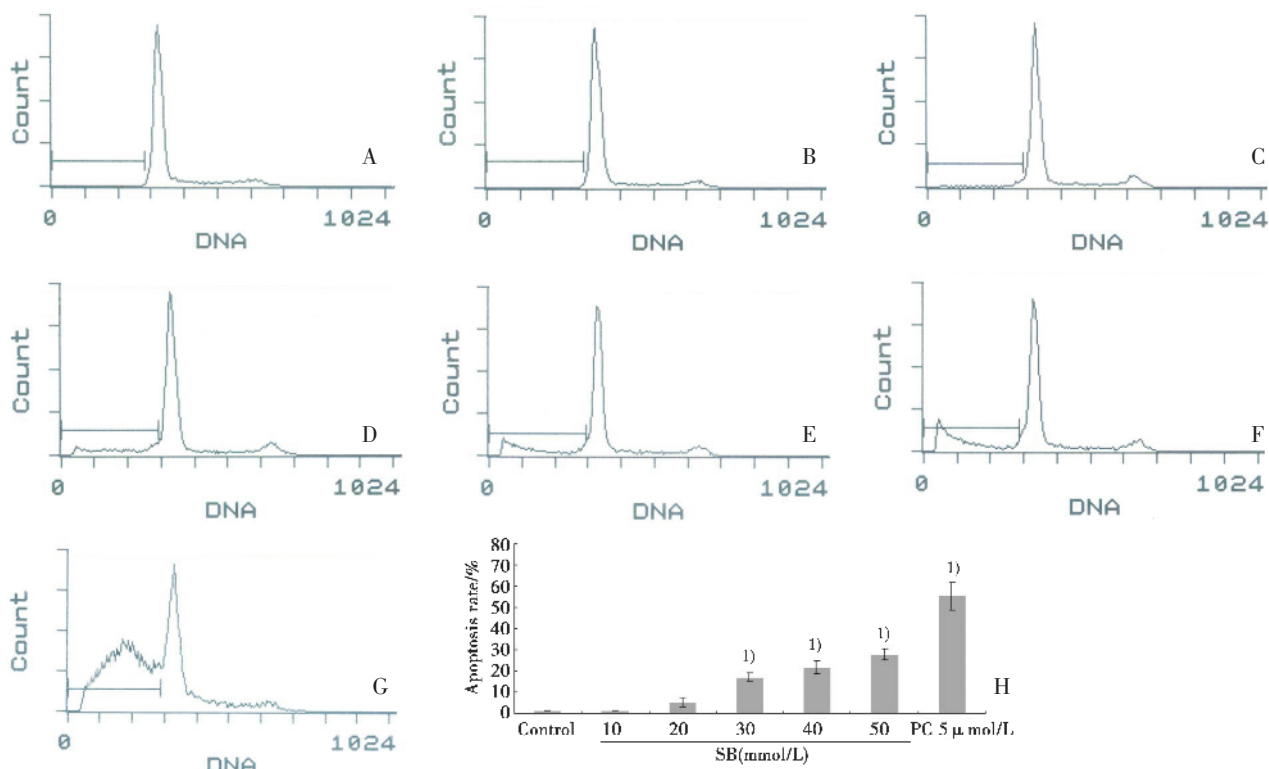


图 3 流式细胞术检测 SB 对 PC12 细胞凋亡的影响

Fig.3 Effect of SB on apoptosis of PC12 cells detected by flow cytometry ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

A: Control group; B-F: PC12 cells exposed to 10, 20, 30, 40, and 50 mmol/L SB, respectively; G: PC, positive control group 5  $\mu$ mol/L H2O2; 1)  $P < 0.05$  vs control group.

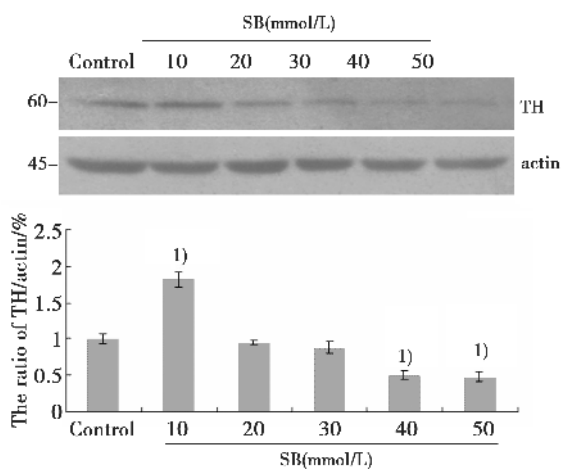


图 4 不同浓度的 SB 作用 24 h 对 PC12 细胞 TH 蛋白表达的影响

Fig.4 Effect of different concentrations of SB on TH activity in PC12 cells after treatment for 24 h ( $n = 3$ )

1)  $P < 0.05$  vs control group.

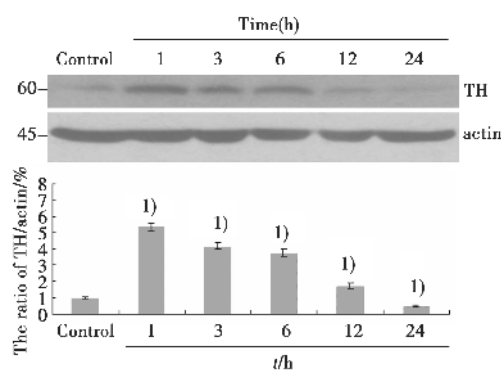


图 5 40 mmol/L SB 作用不同时间对 PC12 细胞 TH 蛋白表达的影响。

Fig.5 Effect of 40 mmol/L SB on TH activity in PC12 cells after treatment for different times ( $n = 3$ )

1)  $P < 0.05$  vs control group.

以及畸形率增加,同时诱导斑马鱼胚胎间脑 DA 能神经元 TH 和 DAT 的表达明显下调,对发育中的斑马鱼胚胎产生神经毒性损伤<sup>[7]</sup>。在本研究中,

我们利用大鼠 PC12 肾上腺嗜铬细胞瘤细胞作为体外 DA 能细胞模型,通过 MTT、DAPI 染色、流式细胞术以及 Western blot 等一系列实验探讨了 SB 对 PC12 细胞的生长抑制及毒性损伤作用。

细胞死亡包括坏死和凋亡两种形式<sup>[8]</sup>,研究认为在氧化应激、毒物药物损伤等情况下,多可诱导神经元发生以凋亡为主的细胞死亡<sup>[9-11]</sup>。本研究在发现 SB 对 DA 能神经元有毒性作用,能抑制细胞增殖的基础上,为确定 SB 是否也可诱导 DA 能神经元的凋亡,利用 DAPI 染细胞核观察核形态的改变。并发现 SB 可引起 PC12 细胞中核皱缩和凋亡小体等的出现,且随着浓度的增高凋亡小体数量也增多。在进一步利用流式细胞术进行细胞凋亡率的定量检测中发现,30 mmol/L SB 作用 PC12 细胞后诱导的细胞凋亡率与对照组相比具有统计学差异,且 SB 诱导凋亡的作用具有浓度依赖性。以上结果表明本实验成功构建了 SB 诱导的体外神经细胞凋亡模型,同时提示 SB 抑制 PC12 细胞增殖的作用可能是通过诱导细胞凋亡来实现的。

酪氨酸羟化酶(Tyrosine hydroxylase, TH)可催化儿茶酚胺类神经递质体内生物合成的起始步骤即 L-酪氨酸羟化形成 L-DOPA 的反应,是包括 DA 在内的儿茶酚胺类神经递质合成的限速酶,在多巴胺生物合成的调节中发挥重要作用。本实验 Western blot 结果显示,SB 处理细胞后,随着时间的延长,药物浓度的增加,TH 的蛋白表达水平明显下降。由于 TH 是 DA 合成的关键酶,细胞 TH 蛋白表达的改变可显著影响 DA 合成的量,提示 SB 可能通过改变 TH 蛋白的表达,从而影响 DA 的合成代谢。结合实验中所观察到的 SB 诱导细胞凋亡的实验结果,对于 TH 表达逐渐降低的原因,是 SB 的直接抑制或进而诱导细胞凋亡,还是由于 SB 诱导了细胞凋亡从而导致 TH 蛋白的合成减少,其间的相互关系及作用机制仍有待于进一步的实验研究。

综上所述,本研究以分化的 PC12 细胞为 DA 能神经元体外模型,初步探讨了 SB 对 PC12 细胞增殖和神经递质合成的抑制作用,发现 SB 对于 PC12 细胞具有抑制增殖和凋亡诱导的作用,证明 SB 对体外 DA 能神经元细胞模型存在着神经毒性影响。为更全面了解 SB 的生物安全性,进一步阐明 SB 诱导神经毒性的分子机制提供了重要信息。

#### 参考文献

[1] 徐冰,田国萍,王宏,等. 骨髓基质干细胞对 MPP<sup>+</sup>制备的 PC12 细胞凋亡的影响[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2007, 16(5): 513-520.

Xu B, Tian GP, Wang H, et al. Effect of bonemarrow

stromal cells on PC12 apoptosis induced by 1-methyl-4-phenylpyridine[J]. Chin J Hist Cyto, 2007, 16(5): 513-520.

[2] 邹志飞,吴赤蓬,郑立新,等. 苯甲酸钠的毒物兴奋效应及其所致损害[J]. 毒理学杂志, 2010, 24(4): 300-303.

Zou ZF, Wu CP, Zheng LX, et al. Hormesis of sodium benzoate and its damage effect[J]. J Toxicol, 2010, 24(4): 300-303.

[3] 王思文,巩江,高昂等. 防腐剂苯甲酸钠的药理及毒理学研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(30): 16724-1684. Wang SW, Gong J, Gao A, et al. Pharmacotoxicological study of preservative: sodium benzoate[J]. J Anhui Agri Sci, 2010, 38(30): 16724-1684.

[4] Bateman B, Warner JO, Hutchinson E, et al. The effects of a double blind, placebo controlled, artificial food colourings and benzoate preservative challenge on hyperactivity in a general population sample of preschool children[J]. Arch Dis Child, 2004, 89(6): 506-511.

[5] McCann D, Barrett A, Cooper A, et al. Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial[J]. Lancet, 2007, 370(9598): 1560-1567.

[6] Tsay HJ, Wang YH, Chen WL, et al. Treatment with sodium benzoate leads to malformation of zebrafish larvae[J]. Neurotoxicol Teratol, 2007, 29(5): 562-569.

[7] Chen Q, Huang NN, Huang JT, et al. Sodium benzoate exposure downregulates the expression of tyrosine hydroxylase and dopamine transporter in dopaminergic neurons in developing zebrafish[J]. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol, 2009, 86(2): 85-91.

[8] Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy [J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1776(1): 86-107.

[9] Liu E, Du X, Ge R, et al. Comparative toxicity and apoptosis induced by diorganotin in rat pheochromocytoma (PC12) cells [J]. Food Chem Toxicol, 2013, 60: 302-308.

[10] Ma M, Wang X, Ding X, et al. Protective effect of BAG5 on MPP<sup>+</sup>-induced apoptosis in PC12 cells [J]. Neurol Res, 2012, 34(10): 977-983.

[11] Cheng B, Lu H, Bai B, et al. D-β-Hydroxybutyrate inhibited the apoptosis of PC12 cells induced by H2O2 via inhibiting oxidative stress[J]. Neurochem Int, 2013, 62(5): 620-625.

(编辑 孙慧兰)