

人参皂甙 Rb1 对香烟烟雾诱导的大鼠神经细胞凋亡和细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响

庄 严¹ 时 京² 吕燕华¹ 曹亦宾¹ 王海英¹ 柳忠兰³

(1 河北医科大学附属唐山市工人医院神经内科 河北 唐山 063000 ;2 河北医科大学附属唐山市工人医院泌尿外科 河北 唐山 063000 ;3 中国医科大学附属第一医院神经内科 辽宁 沈阳 110001)

摘要 目的 探讨人参皂甙 Rb1(GRb1)对香烟烟雾诱导的大鼠神经细胞凋亡和细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响。方法 雄性 Wistar 大鼠 48 只,随机分为对照组、吸烟组和 GRb1 组,每组 16 只。吸烟组和 GRb1 组连续吸烟 12 周制作吸烟大鼠模型,期间每周给予 GRb1 组和吸烟组大鼠分别腹腔注射 40mg/kg 的 GRb1 和等量生理盐水,对照组不做任何处理。提取大鼠大脑皮层组织,用 TUNEL 法检测各组细胞凋亡情况,荧光分光光度法检测细胞内 Ca^{2+} 浓度变化情况。结果 TUNEL 法检测表明,未经香烟烟雾处理的对照组大鼠大脑皮层细胞自然凋亡率为 2.54 ± 0.92 个/视窗。连续吸烟 12 周,吸烟组大鼠大脑皮层细胞凋亡率较对照组显著升高,达 20.62 ± 2.13 个/视窗($q=35.72, P<0.01$)。GRb1 组细胞凋亡率虽也有增加,为 11.48 ± 2.37 个/视窗,明显低于吸烟组($q=15.39, P<0.01$)。对照组、吸烟组和 GRb1 组大鼠大脑皮层细胞内 Ca^{2+} 浓度分别为 $236.62 \pm 12.52 \text{ ng/L}$ 、 $636.37 \pm 18.63 \text{ ng/L}$ 和 $353.61 \pm 13.72 \text{ ng/L}$, GRb1 组 Ca^{2+} 浓度显著低于吸烟组($q=54.73, P<0.01$)。结论 GRb1 对吸烟大鼠脑损伤的保护作用可能与抑制细胞内的 Ca^{2+} 超载、降低香烟烟雾诱导的神经细胞凋亡有关。

关键词 人参皂甙;香烟烟雾;凋亡;钙离子

中图分类号 Q95-3 R285.5 R595 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2013)31-6019-04

Effect of Ginsenoside Rb1 to Neuron Apoptosis and Intra-neuronal Ca^{2+} Concentration of Rats Given Cigaretting Smoke

ZHUANG Yan¹, SHI Jing², LV Yan-hua¹, CAO Yi-bin¹, WANG Hai-ying¹, LIU Zhong-lan³

(1 Department of Neurology, Tangshan Gongren Hospital affiliated to Hebei Medical University, Tangshan, Hebei, 063000, China;

2 Department of Urology, Tangshan Gongren Hospital affiliated to Hebei Medical University, Tangshan, Hebei, 063000, China;

3 Department of Neurology, First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning, 110001, China)

ABSTRACT Objective: To explore the Effect of Ginsenoside Rb1 to neuron apoptosis and Intra-neuronal Ca^{2+} concentration of rats given smoke. **Methods:** 48 Wistar rats were randomly divided into 3 groups: control group, smoking group and GRb1 group. The rats of smoking group and GRb1 group were smoked 20rams a day for 12 weeks. During this period, 40mg/kg of GRb1 and the same amount of physiological saline were injected into abdominal cavity to the rats of GRb1 group and smoking group once a week, individually. The rats of control group were not given any treatments. After 12 weeks, the tissue of cerebral cortex was extracted. TUNEL was used to detect cell apoptosis and fluorescence spectrophotometry was used to detect the intra-neuronal Ca^{2+} concentration. **Results:** The result of TUNEL revealed that the natural apoptosis rate of control group was 2.54 ± 0.92 /field of vision. The apoptosis rates of smoking group and GRb1 group were 20.62 ± 2.13 and 11.48 ± 2.37 /field of vision. The apoptosis rates of GRb1 group was inferior to smoking group obviously ($q=15.39, P<0.01$). The intra-neuronal Ca^{2+} concentration of control group, smoking group and GRb1 group were $236.62 \pm 12.52 \text{ ng/L}$, $636.37 \pm 18.63 \text{ ng/L}$ and $353.61 \pm 13.72 \text{ ng/L}$. The intra-neuronal Ca^{2+} concentration of GRb1 group was inferior to smoking group obviously ($q=54.73, P<0.01$). **Conclusions:** GRb1 may protect neuron of rats given cigarette smoke by means of prohibiting the overloading of Intra-neuronal Ca^{2+} concentration and apoptosis of neuron.

Key words: Ginseng saponins; Cigaretted Smoke; Apoptosis; Ca^{2+}

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3 R285.5 R595 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2013)31-6019-04

引言

吸烟是威胁人类健康的重要公共卫生问题^[1-2]。香烟烟雾成分复杂,包含超过 4000 种化合物,如酚类、醌类、醛类等,可通过炎症反应、氧化应激、细胞凋亡、细胞脂质代谢等多种途径导

致全身多种器官疾病的发生^[3-5]。中药人参经多年实验研究和临床应用证实,具有改善组织缺血、防治再灌注损伤等多种功能。有研究表明,人参所含有的重要生物活性物质人参皂甙 Rb1 (GRb1)所具有的钙通道阻滞功能可能在此过程中发挥重要作用^[6]。本研究中,我们建立了烟灌注大鼠模型,并对吸烟大鼠脑细胞凋亡和细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化进行检测,探讨 GRb1 对香烟烟雾致脑损伤的保护作用。

1 材料与方法

作者简介 庄严(1976-),女,硕士,副主任医师,从事脑血管病方向的研究, E-mail: Zysj1211@sina.com

(收稿日期:2013-08-30 接受日期:2013-09-24)

1.1 材料

8 周龄雄性 Wistar 大鼠由中国医科大学实验动物部提供。TUNEL 试剂盒 (武汉博士德公司) Fura-1/AM, DMSO, Ethyl-ene glycol-bis (2-aminoethyl ether)-N, N, N, N-tetraacetic acid (EGTA), TritonX-100 (Sigma 公司), 胰蛋白酶, 牛血清清蛋白, DMBM 高糖培养基, 小牛血清 (Gibco 公司), 试验用香烟为市售某品牌香烟, 尼古丁含量 1.2 mg/支, 焦油含量 16 mg/支; 人参皂甙 Rb1 由中国药品生物检定所提供。

1.2 动物分组

Wistar 大鼠共 48 只, 随机分为 3 组, 每组 16 只: 对照组、吸烟组、GRb1 组。吸烟组和 GRb1 组大鼠连续吸烟 12 周, 吸烟量为 20 支/d。每周给予 GRb1 组大鼠一次性腹腔注射 40 mg/kg 的 GRb1, 吸烟组给予腹腔注射等量生理盐水, 对照组不做任何处理。

1.3 吸烟动物模型的制备

参照 Chow 等^[7]烟灌注模型的建立方法。以角钢、有机玻璃及钢丝制成 600 mm×400 mm×300 mm 吸烟鼠箱, 于鼠箱侧面斜对两侧各打双孔 (直径=10 mm, 间距=10 mm), 一侧双孔接双腔空气泵, 分别输入烟雾及空气, 一侧双孔通外界, 确保箱内空气中氧浓度与外界相同。

1.4 细胞凋亡率检测

每组随机选取 8 只大鼠, 在麻醉下开胸, 经升主动脉快速灌注肝素化生理盐水 250 mL, 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液灌注固定 30 min, 快速断头取脑, 用同浓度多聚甲醛磷酸盐缓冲液固定脑组织 48 h, 常规石蜡包埋。距离嗅球尖端 7~11 mm 处取材, 制成 4 μm 层厚的脑组织石蜡切片。然后按试剂盒说明书进行 TUNEL 染色。应用 Quantiment 570C 图像分析系统, 每张切片在 400 倍镜下随机测定 10 处视窗 (视窗由计算机系统随机提供) 内阳性细胞总数, 除以 10 所得平均数记为该标本的凋亡细胞率。

1.5 大鼠皮层神经细胞内 Ca^{2+} 浓度的测定

每组随机选取 8 只大鼠断头取脑, 去除软脑膜及表面血管, 取出大脑皮层并剪碎, 2.5 g/L 胰蛋白酶消化, 30 min 后用含体积分数为 15% 小牛血清的冷 DMEM 高糖培养基中止消化, 200 目尼龙筛网过滤, 滤液以 1000 r/min 离心 5 min, 沉淀用含体积分数为 15% 小牛血清的 DMEM 高糖培养基悬浮计数后制成浓度为每毫升 2×10^6 个细胞的细胞悬液, 台盼蓝排斥实验检查, 保证细胞活力在 95% 以上。取 2 mL 脑细胞悬液, 置于 37℃ 水浴中预温 5 min 后加入终浓度为 5 μmol/L 的 Fura-2/AM, 37℃ 水浴中恒温振荡 45 min 负载, 然后细胞用含 0.2% 牛血清清蛋白的 Hanks 液冲洗 2 次, 将细胞浓度调整到 2×10^6 个/mL。采用日立 MPE-4 型荧光分光光度计, 激发光波长为 340 nm 和 280 nm, 发射光波长为 500 nm, 测静息荧光值 F, 加 TritonX-100 破膜, 测最大荧光值 (Fmax), 再加 EGTA 络合, 测最小荧光值 (Fmin)。利用公式计算: 细胞内游离 Ca^{2+} 浓度 = $kd \times (F-F_{min}) / (F_{max}-F)$, 其中 $kd=224$ nmol/L。

1.6 统计学方法

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS11.0 统计学分析软件对数据进行单因素方差分析 q 检验, 组间比较用 SNK-q 检验。

2 结果

2.1 神经细胞细胞凋亡情况

TUNEL 染色阳性细胞胞核呈棕黄色或棕褐色 (图 1)。在对照组中, 仅见少量 TUNEL 阳性细胞, 其自然凋亡率为 2.54 ± 0.92 个/视窗。吸烟组、GRb1 组细胞凋亡率分别为 20.62 ± 2.13 和 11.48 ± 2.37 个/视窗。吸烟组和 GRb1 组细胞凋亡率均高于对照组 (q 值分别是 35.72 和 19.60, P 均 < 0.01), 但 GRb1 组细胞凋亡率明显低于吸烟组 ($q=15.39$, $P<0.01$) (表 1)。

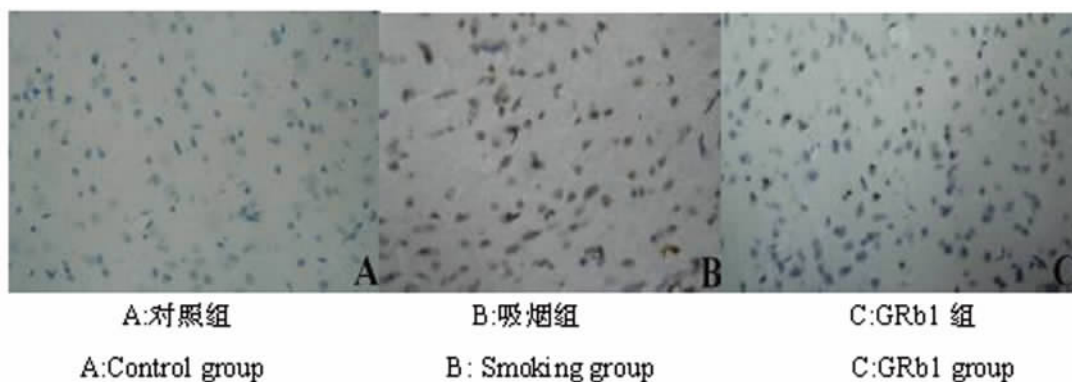


图 1 各组大鼠神经细胞凋亡的情况

Fig.1 Neuronal apoptosis in each group

2.2 神经细胞内 Ca^{2+} 浓度变化

对照组、吸烟组和 GRb1 组细胞内 Ca^{2+} 浓度分别为 236.62 ± 12.52 ng/L, 636.37 ± 18.63 ng/L 和 353.61 ± 13.72 ng/L。吸烟组和 GRb1 组细胞内 Ca^{2+} 浓度显著高于对照组 (q 值分别是 74.51 和 39.22, $P<0.01$), 而 GRb1 组细胞内 Ca^{2+} 浓度显著低于吸烟组 ($q=54.73$, $P<0.01$) (表 1)。

3 讨论

香烟中含有包括尼古丁、镉、苯并芘、氧化剂和自由基等大量有害的化学成分, 这些有害成分进入人体后会严重干扰人的正常生理功能, 引起、促进或扩大细胞损害^[8-10]。香烟烟雾产生的副作用是脑卒中发生发展的内在机制, 但学界对香烟烟雾引

表 1 大鼠脑组织中细胞凋亡和细胞内游离 Ca^{2+} 的变化($\bar{x} \pm s$)Table 1 Changes of apoptosis and intracellular free Ca^{2+} in rat brain tissue

组别 Groups	凋亡细胞(个/视窗) Apoptotic cells(Pcs/Windows)	Ca^{2+} 浓度(ng/L) Ca^{2+} concentration(ng/L)
对照组 Control group	2.54± 0.92	236.62± 12.52
吸烟组 Smoking group	20.62± 2.13 [△]	636.37± 18.63 [△]
GRb1 组 GRb1 group	11.48± 2.37	353.61± 13.72

注: [△]与对照组相比 $q=35.72$ $P<0.01$, 与 GRb1 组相比 $q=19.60$ $P<0.01$ 。与对照组相比 $q=74.51$ $P<0.01$, 与 GRb1 组相比 $q=54.73$ $P<0.01$ 。

Note: [△]Compared with the control group, $q=35.72$, $P<0.01$, compared with GRb1 group, $q=19.60$ $P<0.01$. [△]Compared with the control group, $q=74.51$, $P<0.01$, compared with GRb1 group, $q=54.73$ $P<0.01$.

起的细胞死亡的具体方式还存在很大争议。Bagloli 等^[11]研究发现香烟烟雾可导致肺纤维原细胞氧化损伤、线粒体形态及膜电位改变。香烟烟雾亦可通过损伤线粒体结构和功能引发人脐静脉内皮细胞及人胃上皮细胞凋亡^[12]。Liu X 等^[13]研究发现香烟烟雾可引起神经细胞的快速死亡。本实验结果显示:在应用香烟烟雾连续作用 12 周后,吸烟组和 GRb1 组细胞内 Ca^{2+} 浓度显著高于对照组。随着烟雾浓度的增加,大鼠脑神经细胞凋亡数量显著增加,这表明香烟烟雾可通过诱导细胞凋亡,导致大鼠脑组织受损。这一结果佐证了 Sdralia 等^[14]人的研究结论:导致细胞死亡的主要方式是香烟烟雾的浓度、作用时间以及作用的细胞类型。

GRb1 是从人参中提取的一种生物活性物质^[15,16]。Radad 等^[17]发现 GRb1 可以通过对抗某些药物引起的细胞毒性作用,增加体外培养的神经元轴突数量,促进细胞存活。Jiang QS 等^[18]人的研究结果表明人参皂甙 Rb1 可降低肥厚型心肌病大鼠细胞内游离钙浓度。本研究中我们发现 GRb1 组细胞凋亡率明显低于吸烟组,这表明给予大鼠腹腔注射 GRb1,可以减少因吸烟导致的脑神经细胞凋亡,GRb1 可以减轻香烟烟雾导致的脑细胞损伤,对神经细胞具有保护作用。

GRb1 对细胞的保护作用,可能通过多种机制来完成。目前认为,对 Ca^{2+} 通道的阻滞作用可能是其发挥作用的关键。 Ca^{2+} 是重要的第二信使,参与真核细胞跨膜信号转导途径。细胞质内的 Ca^{2+} 与细胞凋亡信号传导通路密切相关,它的升高参与了凋亡早期信号传导和凋亡的执行阶段,最终促进细胞凋亡的发生^[19,20]。我们的研究发现,在香烟烟雾作用下,伴随大量细胞凋亡,大鼠脑神经细胞内 Ca^{2+} 浓度显著升高。而在应用 GRb1 处理后,这一过程被明显的抑制。这提示,GRb1 对脑神经细胞的保护作用可能与其抑制细胞内游离 Ca^{2+} 浓度升高有关。有研究表明,在凋亡刺激因素作用下,由于大量 Ca^{2+} 进入线粒体,消除质子梯度,使氧化磷酸化中断,细胞缺氧肿胀,并产生一系列凋亡刺激因子导致细胞凋亡。GRb1 对细胞凋亡的抑制作用,可能与其对抗细胞内 Ca^{2+} 浓度升高,有效保护了线粒体有关,对此还需要深入研究。

总之,我们的研究表明,香烟烟雾可导致大鼠神经细胞凋亡,而 GRb1 可以通过降低细胞内 Ca^{2+} 超载、减少神经细胞凋亡而对香烟烟雾导致的脑损伤起保护作用。这一结果初步达到了本次研究的目的,为临床应用 GRb1 防治香烟烟雾所致神经毒性提供了有益的思路。但是香烟烟雾的成分非常复杂,GRb1 是否还会通过其他途径影响神经细胞的凋亡和细胞内 Ca^{2+} 的

浓度,以达到对神经细胞的保护作用,还有待于进一步深入的研究。

参考文献(References)

- [1] Bruckman D, Allan T, Stefanak M, et al. Enforcement of Ohio's Smoke Free Workplace Law through the lens of public health practice [J]. Public Health Rep, 2013, 128(1): 54-63
- [2] Hehir AM, Indig D, Prosser S, et al. Evaluation of a smoke-free forensic hospital: patients' perspectives on issues and benefits[J]. Drug Alcohol Rev, 2012, 31(5): 672-677
- [3] 张蕊,王广增,刘斌,等.香烟烟雾吸入对大鼠局灶性脑缺血细胞凋亡及脑梗死体积的影响 [J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2008, 11(6): 908-910
- [4] Zhang Rui, Wang Guang-zeng, Liu Bin, et al. Effect of Cigarette Smoking on Expression of Apoptosis of Neurocyte and Infarction Volume in Rats[J]. Chinese Journal of Coal Industry Medicine, 2008, 11(6): 908-910
- [5] 刘慧琳,刘涛,徐孝娜,等.人参皂甙 Rb1 对大鼠慢性缺氧性认知功能障碍的治疗作用 [J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(22): 4242-4245
- [6] Liu Hui-lin, Liu Tao, Xu Xiao-na, et al. Ginsenoside Rb1 Attenuates Chronic Hypobaric Hypoxia-Induced Cognitive Deficits [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 13(22): 4242-4245
- [7] Lee IN, Lin MH, Chung CY, et al. Chronic cigarette smoke exposure enhances brain-derived neurotrophic factor expression in rats with traumatic brain injury[J]. Metab Brain Dis, 2012, 27(2): 197-204
- [8] Lin ZY, Chen LM, Zhang J, et al. Ginsenoside Rb1 selectively inhibits the activity of L-type voltage-gated calcium channels in cultured rat hippocampal neurons[J]. Acta Pharmacol Sin, 2012, 33(4): 438-444
- [9] Chow JY, Ma L, Cho CH. An experimental model for studying passive cigarette smoking effects on gastric ulceration [J]. Life Sci, 1996, 58(26): 2415-2422
- [10] Yagi S, Tsukatani T, Yata T, et al. Lipopolysaccharide-induced apoptosis of olfactory receptor neurons in rats [J]. Acta Otolaryngol, 2007, 127(7): 748-753
- [11] 廖纪萍,迟春花,李海潮,等.连花清瘟胶囊对吸烟大鼠 Clara 细胞和氧化应激的影响[J]. 国际呼吸杂志, 2010, 30(4): 204-207
- [12] Liao Ji-ping, Chi Chun-hua, Li Hai-chao, et al. Effects of Lianhuaqingwen capsule on Clara cell and oxidative stress in smoking rats[J]. International Journal of Respiration, 2010, 30(4): 204-207
- [13] Tizabi Y, Manaye KF, Taylor RE. Nicotine blocks ethanol-induced apoptosis in primary cultures of rat cerebral cortical and cerebellar

- granule cells[J]. Neurotox Res, 2005, 7(4): 319-322
- [11] Bagloli G, Bushinsky SM, Garia TM, et al. Differential induction of apoptosis by cigarette smoke extract in primary human lung fibroblast strains: implications for emphysema [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006, 291(1): 19-29
- [12] 黄旭, 代远斌, 吴田方, 等. 香烟提取物损伤人脐静脉血管内皮细胞及阿托伐他汀的干预 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(50): 9339-9343
Huang Xu, Dai Yuan-bin, Wu Tian-fang, et al. Human umbilical vein endothelial cells damaged by cigarette smoke extract and intervention of atorvastatin[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2011, 15(50): 9339-9343
- [13] Liu X, Conner H, Kobayashi T, et al. Cigarette smoke extract induces DNA damage but not apoptosis in human bronchial epithelial cells[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005, 33(2): 121-129
- [14] Sdralia ND, Patmanidi AL, Velentzas AD, et al. The mode of lymphoblastoid cell death in response to gas phase cigarette smoke is dose-dependent[J]. Respir Res, 2009, 10: 82
- [15] Zhu J, Jiang Y, Wu L, et al. Suppression of local inflammation contributes to the neuroprotective effect of ginsenoside Rb1 in rats with cerebral ischemia[J]. Neuroscience, 2012, 202: 342-351
- [16] 王琼, 孙湛, 买买提祖农·买苏尔, 等. 三七总皂苷对大鼠脑缺血再灌注损伤后脑组织的凋亡抑制作用 [J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(15): 2804-2808+2861
Wang Qiong, Maimaitizunong·Maisuer, Chen Yong-xiang, et al. The Influence on the Inhibition of Apoptosis of Total Saponins of Panax Notoginseng on Cerebral Ischemia Reperfusion Injury in Rats [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 13(15): 2804-2808+2861
- [17] Radad K, Gille G, Moldzio R, et al. Ginsenosides Rb1 and Rg1 effects on mesencephalic dopaminergic cells stressed with glutamate[J]. Brain Res, 2004, 1021(4): 41-53
- [18] Jiang QS, Huang XN, Yang GZ, et al. Inhibitory effect of ginsenoside Rb1 on calcineurin signal pathway in cardiomyocyte hypertrophy induced by prostaglandin F2alpha [J]. Acta Pharmacol Sin, 2007, 28(8): 1149-1154
- [19] Ciarcia R, Damiano S, Montagnaro S, et al. Combined effects of PI3K and SRC kinase inhibitors with imatinib on intracellular calcium levels, autophagy, and apoptosis in CML-PBL cells [J]. Cell Cycle, 2013, 12(17): 2839-2848
- [20] 袁琼兰, 孙珠蕾, 杨朝鲜, 等. 人参皂甙 Rb1 阻止大鼠局灶性脑缺血细胞凋亡和诱导 NAIP 表达 [J]. 神经解剖学杂志, 2007, 23(4): 355-361
Yuan Qiong-lan, Sun Zhu-lei, Yang Chao-xian, et al. Ginsenoside Rb1 Prevents Apoptosis and Induces Naip Expression in Rats Subjected to Focal Cerebral Ischemia[J]. Chinese Journal of Neuroanatomy, 2007, 23(4): 355-361

(上接第 6007 页)

- [13] Haggqvist B, Naslund J, Sletten K, et al. Medin: an integral fragment of aortic smooth muscle cell-produced lactadherin forms the most common human amyloid [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 8669-8674
- [14] Stubbs J, Lekutis C, Singer K. cDNA cloning of a mouse mammary epithelial cell surface protein reveals the existence of epidermal growth factor-like domains linked to factor-like sequences[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 8417-8421
- [15] Andersen MH, Graversen H, Fedosov SN, et al. Functional analyses of two cellular binding domains of bovine lactadherin [J]. Biochemistry, 2000, 39: 6200-6206
- [16] Alnemri ES. Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases [J]. J Cell Biochem, 1997, 64: 33-42
- [17] Porter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis[J]. Cell Death Differ, 1999, 6: 99-104
- [18] Bratton SB, Macfarlane M, Cain K, et al. Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis[J]. Exp Cell Res, 2000, 256(1): 27
- [19] 冯永东, 陶德定, 谢大兴, 等. 流式细胞技术检测胱氨酰酶 3 原位激活与两种检测细胞凋亡方法的比较性研究[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27(9): 582-585
Fen Yong-dong, Tao De-ding, Xie Da-xing, et al. Comparison of Caspase3 activity, subG1 and Annexin V/PI in detecting apoptosis by flow cytometry[J]. Chin J Lab Med, 2004, 27 (9): 582-585
- [20] T. T Hu, J Shi, X Jiao, et al. Measurement of annexin V uptake and lactadherin labeling for the quantification of apoptosis in adherent Tca8113 and ACC-2 cells [J]. Brazilian Journal of Medical and Biological, 2008, 41: 750-757
- [21] Aubry J-P, Blaecke A, Lecoanet-Henchoz S, et al. Annexin-V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity[J]. Cytometry, 1999, 37: 197-204
- [22] Shu Bin, Duan Wei-gang, Yao Jin-chen, et al. Caspase3 is involved in the apoptosis induced by triptolide in HK-2 cells [J]. Toxicology in vitro, 2009, 23: 598-602
- [23] Brian S, Cummings, Rick G, et al. Cisplatin-Induced Renal Cell Apoptosis: Caspase3-Dependent and-Independent Pathways[J]. JPET, 2002, 302: 8-17