

葛根素对 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡过程中 p53 mRNA 及相关基因表达的影响

闫春林¹, 程月发^{2*}, 吴庆文^{1*}, 赵素晨¹, 郝小惠³

(1. 河北联合大学护理与康复学院, 河北 唐山 063000; 2. 河北联合大学冀唐学院, 河北 唐山 063300;
3. 河北联合大学医学中心实验室, 河北 唐山 063000)

[摘要] 目的:探讨1-甲基-4-苯基-吡啶离子(MPP⁺)诱导人神经母细胞瘤(SH-SY5Y)细胞凋亡过程中p53及其上下游相关基因的变化情况,并探讨葛根素干预的保护作用。方法:体外培养SH-SY5Y细胞株,待细胞密度达到70%融合后,用终浓度分别为50,100,150 μmol·L⁻¹的葛根素预先作用3 h后加入1 mmol·L⁻¹的MPP⁺继续培养,第48 h采用噻唑蓝(MTT)法测定细胞存活率,第24 h采用Annexin-V/PI流式细胞分析术检测细胞凋亡率,实时荧光定量PCR(RT-PCR)技术分析p53及其相关基因mRNA表达量变化。结果:MTT结果显示葛根素预处理的细胞比单纯MPP⁺处理的细胞存活率有显著性增加($P < 0.05$),说明葛根素对MPP⁺诱导的SH-SY5Y细胞具有保护作用且呈一定的剂量依赖性;Annexin-V/PI流式细胞分析术检测结果表明葛根素可以降低MPP⁺诱导的SH-SY5Y细胞的凋亡率;RT-PCR结果显示MPP⁺诱导可以增加SH-SY5Y细胞的p53 mRNA表达;葛根素预处理下调了p53及其相关基因p21, Bax, Caspase-3的mRNA的表达,上调了p53负调节因子MDM2和凋亡抑制基因Bcl-2的mRNA的表达。结论:MPP⁺诱导可以导致SH-SY5Y细胞的p53 mRNA增加;葛根素可以通过调节p53及其相关基因的表达对MPP⁺诱导的SH-SY5Y细胞发挥保护作用。

[关键词] 帕金森病; 葛根素; p53; 1-甲基-4-苯基-吡啶离子; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)04-0154-05

[doi] 10.11653/syfy2014040154

Role of p53 in Neuroprotective Effects of Puerarin against MPP⁺-induced Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cell Death

YAN Chun-lin¹, CHENG Yue-fa^{2*}, WU Qing-wen^{1*}, ZHAO Su-chen¹, HAO Xiao-hui³

(1. College of Nursing and Rehabilitation, Hebei United University, Tangshan 063000, China;
2. Jitang College, Hebei United University, Tangshan 063300, China;
3. Medical Experiment Research Center, Hebei United University, Tangshan 063000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the expression changes of p53 mRNA and its related genes in 1-methyl-4-phenylpyridinium iodide (MPP⁺)-induced SH-SY5Y cells and observe the protective effects of puerarin against the cell death. **Method:** SH-SY5Y cells were incubated to 70% confluence, the medium containing 50, 100, 150 μmol·L⁻¹ puerarin was added to SH-SY5Y cells, at 3 h after drug application 1 mmol·L⁻¹ MPP⁺ was added to culture. The viability of MPP⁺-induced SH-SY5Y cells under different doses of puerarin was assayed by 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) at 48 h. The apoptosis rates were detected by flow cytometry with Annexin-V/PI fluorescence staining. The expression of p53 mRNA and its related genes was assayed by real-time quantitative reverse transcription-PCR (RT-PCR) at 24 h. **Result:**

[收稿日期] 20130801(011)

[基金项目] 河北联合大学2012年度自然科学基金培育项目(SZRPY2012001)

[第一作者] 闫春林, 学士, 硕士研究生在读, 从事神经康复学研究, Tel:0315-3725252, E-mail:623249786@qq.com

[通讯作者] * 吴庆文, 博士, 教授, 从事神经康复学研究, Tel:0315-3725252, E-mail:wxyqw@163.com

* 程月发, 医学博士, 副教授, 从事天然产物药理学研究, Tel:0315-8114108, E-mail:arthureyf@163.com

The puerarinpretreatment could apparently increase the viability and inhibit the early apoptosis of the MPP⁺-induced SH-SY5Y cells in the experiment ($P < 0.05$). Annexin-V/PI fluorescence staining results showed that puerarin could reduce the apoptosis rate of MPP⁺-induced SH-SY5Y cells. Real-time PCR results showed that the MPP⁺ could increase the expression of p53 mRNA, but the expression of p53, p21, Bax, Caspase-3 mRNA was down-regulated in puerarin pretreatment groups compared with the MPP⁺ group, and the expression of MDM2 and Bcl-2 mRNA was up-regulated simultaneously. **Conclusion:** The expression of p53 mRNA in SH-SY5Y cells can increase by MPP⁺ and puerarin can regulate the p53 and its related genes and play a protective role against the death of MPP⁺-induced SH-SY5Y cells.

[**Key words**] Parkinson's disease; puerarin; p53; 1-methyl-4-phenylpyridinium iodide; apoptosis

在帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 的发生发展进程中,细胞凋亡是重要的病理性过程,与其有关的细胞信号转导因子,主要同死亡受体、Bcl-2 家族、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (Caspases)、钙激活酶 (Calpains)、周期素依赖性激酶 5 (Cdk5)、p53、聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶-1 (PARP-1) 等有关^[1-2]。近年来,p53 与神经退行性疾病的关系受到重视,p53 作为一种肿瘤抑制基因,编码的 p53 蛋白作为一种转录因子控制着细胞周期的启动,在神经细胞凋亡过程中有特殊的表达方式和分布特点,并在神经元的 DNA 损伤与修复、细胞周期调控、相关基因表达和某些关联基因的活性调控等方面发挥重要作用^[3-5]。基于此,研究者也在积极寻找一些能够干预 p53 表达的调控因子,从而为抗 PD 的药物研究提供新的靶点。葛根素作为一种传统中药中分离出来的单体,具有植物雌激素样作用,对体内外 PD 模型研究已经初步显示出抗氧化、抗凋亡的神经保护作用,并且对 p53 蛋白表达具有一定的调节^[6-10],但目前有关葛根素是通过何种途径来干预 p53 的活化、表达,进而影响细胞凋亡进程并发挥神

经保护作用的机制尚不清晰。本研究在前期的相关实验基础上,采用 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 体外细胞凋亡模型,主要以实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 技术分析 p53 及其相关基因 mRNA 的表达,考察神经细胞凋亡过程中 p53 及其相关凋亡因子的变化情况,来探讨葛根素是否通过调节 p53 的表达来影响细胞凋亡,从而发挥保护多巴胺能神经元的作用。

1 材料

1.1 药物与试剂 SH-SY5Y 细胞株购自中国科学院基础医学研究所基础医学细胞中心。葛根素购自中国食品药品检定研究院 (纯度为 96%,批号 110752-200912),实验使用时用 DMEM 培养基溶解配置。MTT (货号 M2128)、MPP⁺ (货号 D048) 购自 Sigma 公司; DMEM 高糖培养基 (货号 C11330500BT)、胎牛血清 (货号 10099141) 均购自 Gibico 公司; Annexin-V/PI (货号 P4170) 试剂盒购自 Sigma 公司; SYBR Green qPCR 试剂盒 (货号 C11733038) 和反转录试剂盒 (货号 C28025032) 购自 Invitrogen 公司; 引物由 Invitrogen 公司设计合成,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物名称	序列
MDM2	Forward primer 5'-TGGGCCCTTCGTGAGAATTG-3'; Reverse primer 5'-TCTACATACTGGCAGGGCT-3'
p53	Forward primer 5'-TTTTCCCTCCCATGTGCTC-3'; Reverse primer 5'-CAGTCTGGCTGCCAATCCA-3'
p21	Forward primer 5'-AGTCAGTTCCTTGTGGAGCC-3'; Reverse primer 5'-CATTAGCGCATCACAGTCCG-3'
Bcl-2	Forward primer 5'-CTTTGAGTTCGGTGGGGTCA-3'; Reverse primer 5'-GGGCCGTACAGTTCACAAAA-3'
Bax	Forward primer 5'-TGACGGCAACTTCAACTGGG-3'; Reverse primer 5'-ATCTGAAGATGGGGAGAGGGC-3'
Caspase-3	Forward prime TCCTAGCGGATGGGTGCTAT-3'; Reverse primer 5'-CTCACGGCCTGGGATTTCAA-3'
β -actin	Forward primer 5'-CTTTGAGTTCGGTGGGGTCA-3'; Reverse primer 5'-GGGCCGTACAGTTCACAAAA-3'

1.2 仪器 本实验在河北联合大学实验中心完成,所用的仪器包括 RotorGene 3000 PCR 仪; ELX800uv 酶标仪; Diaphot 倒置显微镜; 高速离心机; Q3000 型微量分光光度计。流式细胞仪 (FACS Calibuar, BD

公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 将 SH-SY5Y 细胞复苏于培养瓶中,加入 DMEM 培养基 (含 13% 胎牛血清、青霉素

$1 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 和链霉素 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ 的培养箱中培养, 选取对数生长期细胞进行实验。实验分为对照组, MPP⁺ 模型组, 葛根素 + MPP⁺ 处理组, 共 5 组。其中葛根素分为低 ($50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、中 ($100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、高 ($150 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 3 种剂量。

2.2 MTT 比色法检测葛根素对 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞生长率的影响 细胞以每孔 5×10^3 个的密度接种于 96 孔板中, 每组 4 个副孔, 待 70% 融合后, 用高、中、低剂量葛根素预先作用 3 h 后加入 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MPP⁺ 继续培养 48 h 后弃去培养基, 每孔加入 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTT $20 \text{ } \mu\text{L}$, 继续孵育 3 h, 弃去培养基, 加入 $150 \text{ } \mu\text{L}$ 的 DMSO, 摇床 10 min 后用酶标仪测 490 nm 波长检测吸光度值 (A)。实验重复 3 次。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$$

2.3 Annexin-V/PI 染色检测细胞凋亡 细胞以每孔 2×10^5 个的密度接种于 6 孔板中, 待细胞 70% 融合后, 用高、中、低剂量葛根素预先作用 3 h 后加入 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MPP⁺ 继续培养 24 h 后, 0.25% 胰酶消化, $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清, 用 PBS 重悬细胞, $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清, 加入 $400 \text{ } \mu\text{L}$ Annexin V-FITC 结合液重悬细胞后, 加入 $5 \text{ } \mu\text{L}$ Annexin V-FITC, 室温避光孵育 15 min 后加 $10 \text{ } \mu\text{L}$ 的 PI 染色液混匀, 室温避光孵育 5 min, 随即进行流式细胞仪检测分析, 以 Annexin V (+)/PI (-) 细胞的含量代表早期凋亡细胞。以上实验重复 3 次。

2.4 RT-PCR 检测 p53, p21, MDM2, Bax, Bcl-2,

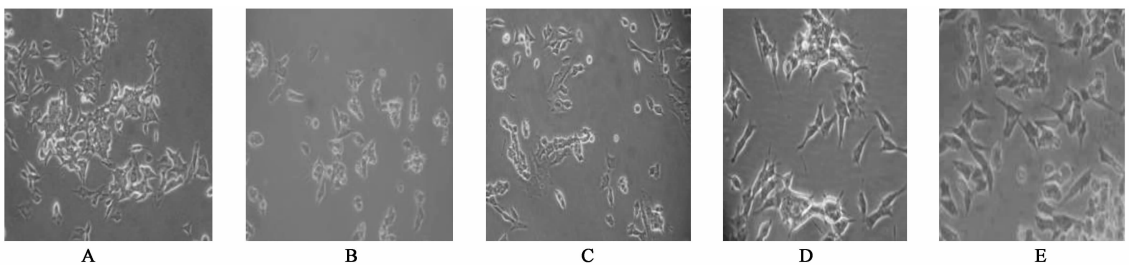
Caspase-3 基因的表达变化 将 SH-SY5Y 细胞以每孔 2×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔板中, 待细胞 70% 融合后, 用高、中、低剂量葛根素预先作用 3 h 后加入 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MPP⁺ 继续培养 24 h 后弃去培养基, 每孔加入 1 mL 的 trizol 冰上裂解细胞后提取总 RNA, 按反转录试剂盒进行 cDNA 合成, 反应条件为 $42 \text{ }^\circ\text{C}$, 50 min ; 用 RotorGene 3000 PCR 仪进行 RT-PCR 扩增, 反应条件: $95 \text{ }^\circ\text{C}$, 15 s ; $59 \text{ }^\circ\text{C}$, 25 s ; 共 45 个循环。实验结果应用分析软件 Rotor-Gene 计算出 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值即 mRNA 的相对含量, 每组实验重复 3 次, 取平均值。

2.5 统计学方法 用 SPSS 17.0 软件进行统计分析; 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 MTT 检测细胞存活率 MTT 结果显示模型组与对照组比, 细胞存活率明显降低, 仅为 36% ($P < 0.01$), 而给予葛根素低、中、高剂量干预后的细胞存活率与模型组比明显增高, 分别为 52% , 76.67% , 86% ($P < 0.05$), 说明随葛根素浓度的增高存活率也随之增高, 葛根素的保护作用呈一定的剂量依赖性。

3.2 细胞形态学的改变 显微镜下观察, 模型组细胞大部分突起结构减少, 细胞变圆, 贴壁细胞数目减少, 而葛根素预处理组, 随着葛根素浓度的增高, 与模型组比贴壁细胞逐渐增多, 细胞间的突起联系增多且细胞形态逐渐接近对照组, 见图 1。



A. 对照组; B. 模型 ($\text{MPP}^+ 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组; C ~ E. $\text{MPP}^+ (1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}) +$ 葛根素 $50, 100, 150 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组

图 1 各组细胞形态学的改变 ($\times 400$)

3.3 Annexin-V/PI 染色检测细胞凋亡 各组细胞凋亡率的统计分析显示葛根素可以抑制 MPP⁺ 诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡的发生且随葛根素浓度的增高凋亡率也随之降低, 这与 MTT 结果一致, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

3.4 RT-PCR 检测 p53, p21, MDM2, Bax, Bcl-2, Caspase-3 基因的表达变化 RT-PCR 结果显示各个基因的溶解曲线均为单峰, 说明为单一片段扩增特

异性较好。模型组 p53, p21, Bax, Caspase-3 基因 mRNA 的表达量与对照组比明显升高 ($P < 0.05$), 葛根素低、中、高剂量组 p53, p21, Bax, Caspase-3 基因 mRNA 的表达量与模型组比明显降低 ($P < 0.05$); 与对照组比, 葛根素中剂量组、高剂量组 p21, Caspase-3 基因表达量无统计学差异, 而葛根素低剂量组与对照组比有差异 ($P < 0.05$), 说明有剂量依赖性。模型组 MDM2, Bcl-2 基因 mRNA 的

表 2 葛根素预处理对 MPP⁺ 处理的 SH-SY5Y 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	药物浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	凋亡率/%
对照	-	12.01 ± 1.91 ²⁾
MPP ⁺ ³⁾	-	31.78 ± 0.86
MPP ⁺ ³⁾ + 葛根素	50	25.34 ± 0.61 ²⁾
	100	21.03 ± 1.89 ²⁾
	150	19.97 ± 2.31 ²⁾

注:与 MPP⁺ 组比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;³⁾ MPP⁺ 浓度为 1 mmol·L⁻¹ (表 3 同)。

表 3 葛根素预处理对 MPP⁺ 处理的 SH-SY5Y 细胞基因相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分组	药物浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	p53	p21	Bax	Caspase-3	MDM2	Bcl-2
对照	-	1.00 ± 0.00 ²⁾	1.00 ± 0.00 ²⁾	1.00 ± 0.00 ²⁾	1.00 ± 0.00 ²⁾	1.00 ± 0.00 ²⁾	1.00 ± 0.00 ²⁾
MPP ⁺ ³⁾	-	2.63 ± 0.19	2.37 ± 0.34	2.53 ± 0.14	1.54 ± 0.09	0.18 ± 0.06	0.55 ± 0.22
MPP ⁺ ³⁾ + 葛根素	50	1.65 ± 0.03 ²⁾	1.67 ± 0.31 ¹⁾	1.90 ± 0.39 ¹⁾	1.29 ± 0.11 ¹⁾	0.74 ± 0.07 ²⁾	1.08 ± 0.13 ¹⁾
	100	1.31 ± 0.12 ²⁾	1.22 ± 0.34 ²⁾	1.61 ± 0.32 ¹⁾	1.09 ± 0.06 ²⁾	2.25 ± 0.25 ¹⁾	1.36 ± 0.13 ²⁾
	150	1.21 ± 0.06 ²⁾	1.21 ± 0.27 ²⁾	1.16 ± 0.43 ²⁾	1.04 ± 0.18 ²⁾	2.40 ± 0.16 ²⁾	1.50 ± 0.18 ²⁾

周期阻滞在 G₁ 期,同时产生对 MDM2 的负反馈性诱导;另一方面诱导上调靶基因 Bax 的表达从而激活线粒体凋亡通路。因此,p53 被认为是细胞应激和细胞凋亡之间的链接^[11-13]。用百草枯诱导 SH-SY5Y 细胞,p53 和 Bax 的表达显著增加,细胞线粒体复合体 I 的活性和细胞膜电位降低,并导致细胞色素 C 的外释放,且百草枯还能够提高 Caspases-9 和 Caspases-3 的活性;而添加了 p53 抑制剂 pifithrin- α 后,则细胞凋亡现象明显受到抑制,说明 p53 在线粒体细胞凋亡途径中扮演了重要角色^[14]。在多巴胺诱导的 SH-SY5Y 细胞模型中,同样也观察到了在蛋白合成水平抑制 Bcl-2,促进 p53 表达的现象^[15]。尚有细胞学研究认为,p53 (Ser15) 的磷酸化发生在细胞膜通透性改变之前,提示 p53 (Ser15) 的激活是启动细胞凋亡程序的开始^[16]。Zhu 等^[10] 研究发现,MPP⁺ 可以诱导 SH-SY5Y 细胞的 p53 表达,提高细胞的 Puma 和 Bax 表达水平并启动 Caspase-3 依赖的细胞凋亡,但中药单体葛根素可以拮抗这一进程。在 MPTP 诱导的 PD 小鼠模型的脑组织中发现 p53 的聚集,认为 PARP-1 对 p53 的转录后多聚化修饰 [poly (ADP-ribosyl) ated] 是稳定 p53 的主要机制^[17]。

本研究通过 MPP⁺ 诱导 SH-SY5Y 细胞发生凋亡,RT-PCR 结果显示 p53 和 p53 重要的下游基因 p21,促凋亡基因 Bax, Caspase-3 基因 mRNA 的表

表达量与对照组比明显降低 ($P < 0.05$),葛根素低、中、高剂量组 MDM2, Bcl-2 基因 mRNA 的表达与模型组比明显升高 ($P < 0.05$),见表 3。

4 讨论

4.1 p53 在神经退行性变中的作用 正常情况下,细胞内 p53 的生成和消除处于动态平衡状态,在环境因素及病理等刺激下,使 p53 生成过多,或抑制与负调控因子 MDM2 的结合,使这种动态平衡遭到破坏从而导致 p53 的活化。p53 活化后,一方面激活下游的细胞周期素依赖性激酶抑制因子 p21 使细胞

达量与对照组相比有显著增高,而 p53 的负调控因子 MDM2 和凋亡抑制因子 Bcl-2 基因 mRNA 的表达量明显下调,MTT 结果也显示模型组的细胞存活率仅为 36%。这些结果说明 p53 的激活和表达是细胞凋亡进程中的重要事件。本实验发现 Bax mRNA 的表达增高,Zhu 等^[10] 的结果也发现 Bax 的表达变化明显,与本研究结果一致;而 Cui 等^[18] 分别用阿霉素和依托泊苷来诱导 SH-SY5Y 细胞,结果发现作为 p53 下游的重要凋亡蛋白 Bax 的表达并没有出现显著变化。关于这种差异,期待未来能够通过更多的实验和技术方法进一步予以验证。

4.2 葛根素干预 p53 表达的研究 前期有关研究发现用 MPP⁺ 诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡,MPP⁺ 明显降低蛋白酶体的活性,出现了泛素共轭蛋白表达增高 (尤其是高分子量蛋白变化较为明显) 和 α -synuclein 蛋白表达增加、p53 蛋白表达升高的现象,而葛根素的干预虽然显示了一定的神经保护作用,但非常奇怪的是,葛根素预处理反而使 p53 表达增加,造成这种结果的原因尚不清楚,推测可能与 p53 从核内向细胞质转移所分析的时间段有关^[8]。另有研究发现,葛根素可以减低 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞的 p53 聚集,抑制相关凋亡蛋白 Puma, Bax 的表达,减轻 Caspase-3 级联反应的细胞凋亡;同样的,p53 抑制剂 pifithrin- α 处理可以阻断这种凋亡反应^[10]。本研究的 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞

给予葛根素干预后, MTT 结果与流式细胞分析术的结果显示随着葛根素剂量的增大, 细胞存活率显著增高而凋亡率明显降低, p53, p21, Bax, Caspase-3 基因 mRNA 的表达量与模型组比有了明显下调且逐渐接近正常对照组, MDM2 和 Bcl-2 基因 mRNA 的表达量也明显上调。由此可以推测 p53 凋亡网络中的 Bax/Bcl-2, Caspase-3 信号通路在 MPP⁺ 诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡中发挥了重要作用, 葛根素可能是通过抑制 p53 转录从而减少下游 p21, Bax, Caspase-3 的基因表达, 同时可以上调 MDM2 和 Bcl-2 基因的表达, 来达到保护细胞的结果。

[参考文献]

[1] Venderova K, Park D S. Programmed cell death in Parkinson's disease [J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2012, 2(8) : a009365.

[2] Perier C, Bové J, Vila M. Mitochondria and programmed cell death in Parkinson's disease: Apoptosis and beyond [J]. Antioxid Redox Signal, 2012, 16(9) : 883.

[3] Morrison R S, Kinoshita Y, Johnson M D, et al. p53-dependent cell death signaling in neurons [J]. Neurochem Res, 2003, 28(1) : 15.

[4] Lanni C, Racchi M, Memo M, et al. p53 at the crossroads between cancer and neurodegeneration [J]. Free Radic Biol Med, 2012, 52(9) : 1727.

[5] Chang J R, Ghafouri M, Mukerjee R, et al. Role of p53 in neurodegenerative diseases [J]. Neurodegenerative Diseases, 2011, 9(2) : 68.

[6] Li X, Zhang S, Liu S, et al. Recent advances in herbal medicines treating Parkinson's disease [J]. Fitoterapia, 2013, 84 : 273.

[7] 程月发, 朱国旗, 关亚丽, 等. 葛根素对 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞线粒体途径凋亡的保护作用 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(9) : 1222.

[8] Cheng Y F, Zhu G Q, Wang M, et al. Involvement of ubiquitin proteasome system in protective mechanisms of puerarin to MPP⁺-elicited apoptosis [J]. Neurosci Res,

2009, 63(1) : 52.

[9] Zhu G, Wang X, Chen Y, et al. Puerarin protects dopaminergic neurons against 6-hydroxydopamine neurotoxicity via inhibiting apoptosis and upregulating glial cell line-derived neurotrophic factor in a rat model of Parkinson's disease [J]. Planta Medica, 2010, 76(16) : 1820.

[10] Zhu G, Wang X, Wu S, et al. Involvement of activation of PI3K/Akt pathway in the protective effects of puerarin against MPP⁺-induced human neuroblastoma SH-SY5Y cell death [J]. Neurochem Int, 2012, 60(4) : 400.

[11] Haupt S, Berger M, Goldberg Z, et al. Apoptosis-the p53 network [J]. J Cell Sci, 2003, 116(20) : 4077.

[12] Vousden K H, Lane D P. p53 in health and disease [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(4) : 275.

[13] Alves da Costa C, Checler F. Apoptosis in Parkinson's disease: is p53 the missing link between genetic and sporadic Parkinsonism? [J]. Cell Signal, 2011, 23(6) : 963.

[14] Yang W, Tiffany-Castiglioni E. Paraquat-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: involvement of p53 and mitochondria [J]. J Toxicol Environ Health, Part A, 2008, 71(4) : 289.

[15] Jiang Y, Pei L, Li S, et al. Extracellular dopamine induces the oxidative toxicity of SH-SY5Y cells [J]. Synapse, 2008, 62(11) : 797.

[16] Nair V D. Activation of p53 signaling initiates apoptotic death in a cellular model of Parkinson's disease [J]. Apoptosis, 2006, 11(6) : 955.

[17] Mandir A S, Simbulan-Rosenthal C M, Poitras MF, et al. A novel *in vivo* post-translational modification of p53 by PARP-1 in MPTP-induced parkinsonism [J]. J Neurochem, 2002, 83(1) : 186.

[18] Cui H, Schroering A, Ding H F. p53 mediates DNA damaging drug-induced apoptosis through a Caspase-9-dependent path in SH-SY5Y neuroblastoma cells [J]. Mol Cancer Ther, 2002, 1(9) : 679.

[责任编辑 聂淑琴]