

94.4%)，不影响测定的准确度。经方法学验证，新建立的测定方法符合药动学要求<sup>[6]</sup>。据文献报道<sup>[4]</sup>，猕猴 iv GLQ223 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  后，药物在体内的消除半衰期  $t_{1/2\beta}$  为  $(3.7 \pm 1.5)$  h。本实验结果显示，猕猴 iv MTCS 220  $\mu\text{g}/\text{kg}$  后，药物在体内的消除半衰期  $t_{1/2\beta}$  为  $(3.8 \pm 1.4)$  h。说明 MTCS 与天然的天花粉蛋白的体内过程基本一致。

#### References:

- [1] Yeung H W, Ng T B. Chemical and biological characterization of the galactose binding lectins from *Trichosanthes kirilowii* root tubers [J]. *Int J Pept Protein Res*, 1986, 27 (2): 208-220.
- [2] Kahn J O, Gorelick K J, Gatti G, et al. Safety, activity, and pharmacokinetics of GLQ223 in patients with AIDS and AIDS-related complex [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994, 38(2): 260-267.
- [3] Zhao J, Ben L H. Anti-HIV Agent trichosanthin enhances the capabilities of chemokines to stimulate chemotaxis and G protein activation, and this is mediated through interaction of trichosanthin and chemokine receptors [J]. *J Exp Med*, 1999, 190(1): 101-111.
- [4] Gatti G, Kahn J O. Pharmacokinetics of GLQ223 in rats, monkeys, and patients with AIDS or AIDS-related complex [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1991, 35 (12): 2531-2537.
- [5] Zhang Y P. *Pharmacology Experiments* (药理学实验) [M]. 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 1996.
- [6] Liu C X, Wei G L, Li Q S. Methodology studies of validation for bioanalysis in studies of pharmacokinetics and bioavailability [J]. *Asian J Drug Metab Pharmacokinet*, 2001, 1(4): 279-286.

## 原花青素对 $\beta$ -淀粉样肽 25-35 诱导 PC12 细胞 par-4 和 bcl-2 基因表达的影响

梅寒芳<sup>1</sup>, 谢朝阳<sup>2</sup>, 杨红<sup>1</sup>, 祝其锋<sup>2\*</sup>

(1. 广东药学院生物化学教研室, 广东广州 510006; 2. 广东医学院生物化学与分子生物学研究所, 广东湛江 524023)

**摘要:**目的 探讨原花青素(PC)对 $\beta$ -淀粉样肽( $A\beta_{25-35}$ )诱导凋亡 PC12 细胞 par-4 和 bcl-2 基因 mRNA 和蛋白表达的影响。方法 采用 MTT 比色法分析细胞存活率, Hoechst 33258-PI 荧光染色法检测细胞凋亡, RT-PCR 方法检测 PC12 细胞 par-4 和 bcl-2 基因 mRNA 的表达, Western blotting 检测 PC12 细胞 Par-4 和 Bcl-2 蛋白表达。结果 不同剂量(5、10、20、30 mg/L) PC 预处理 PC12 细胞 1 h 可剂量依赖性对抗  $A\beta_{25-35}$  引起的细胞凋亡, 提高 PC12 细胞的存活率, 减少  $A\beta_{25-35}$  引起的 PC12 细胞核固缩、凝聚和碎裂, 降低 par-4 基因 mRNA 表达及蛋白表达, 增加 bcl-2 基因 mRNA 表达及蛋白表达。结论 PC 可剂量依赖性对抗  $A\beta_{25-35}$  对 PC12 细胞的毒性作用, 其机制可能与下调凋亡基因 par-4 和上调抗凋亡基因 bcl-2 表达有关。

**关键词:**原花青素(PC);  $A\beta_{25-35}$ ; PC12 细胞; 细胞凋亡; par-4; bcl-2

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)03-0405-04

### Effect of procyanidins on gene expression of par-4 and bcl-2 in PC12 cells induced by $A\beta_{25-35}$

MEI Han-fang<sup>1</sup>, XIE Zhao-yang<sup>2</sup>, YANG Hong<sup>1</sup>, ZHU Qi-feng<sup>2</sup>

(1. Department of Biochemistry, Guangdong Pharmaceutical College, Guangzhou 510006, China; 2. Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

**Abstract: Objective** To study the effect of procyanidins (PC) on mRNA and protein expression of par-4 and bcl-2 genes in PC12 cells induced by  $A\beta_{25-35}$ . **Methods** Cell survival rate was evaluated by MTT assay and apoptosis was analyzed by Hoechst 33258-PI fluorescence staining. The expressions of mRNA and protein for par-4 and bcl-2 were tested by RT-PCR and Western blotting. **Results** Pretreatment with different concentrations of PC (5, 10, 20, and 30 mg/L) for 1 h increased the survival rate of PC12 cell in a dose-dependent manner. PC prevented the PC12 cells nuclei from shrinkage, condensation, and cleavage induced by  $A\beta_{25-35}$ . PC decreased the expression of par-4 mRNA and protein, and increased the expression

收稿日期: 2005-06-14

基金项目: 广东省重点学科重点项目资助(9808)

作者简介: 梅寒芳(1977-), 女, 黑龙江牡丹江人, 硕士, 助教, 主要从事衰老生化研究。

Tel.: (020) 89239472 13602463964 E-mail: meihf37@163.com

\* 通讯作者 祝其锋 Tel.: (0759) 2388850

of bcl-2 mRNA and protein. **Conclusion** PC can protect PC12 cells from apoptosis induced by  $A\beta_{25-35}$  in a dose dependent manner. The mechanism of protection is likely related to decreasing the par-4 gene expression and increasing the bcl-2 gene expression.

**Key words:** procyanidins (PC);  $\beta$ -amyloid peptide<sub>25-35</sub> ( $A\beta_{25-35}$ ); PC12 cells; apoptosis; par-4; bcl-2

$\beta$ -淀粉样肽 ( $\beta$ -amyloid peptide,  $A\beta$ ) 是阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的特征性病理改变——老年斑的重要成分<sup>[1]</sup>,  $A\beta$  在脑实质中沉积与 AD 的发病密切相关, 目前常用  $A\beta_{25-35}$  诱导体外神经毒实验的 AD 模型。原花青素 (procyanidins, PC) 是植物中广泛存在的一种多酚化合物, 是植物体内天然的抗氧化物质, 富含于葡萄、山楂、花生等植物中, 其生物学活性广泛, 如抗氧化、抗炎、抗突变、抗病毒、抗真菌等<sup>[2]</sup>。目前对于 PC 的研究, 多集中于抗癌、抗缺血-再灌注损伤等。前期研究发现 PC 对  $A\beta_{25-35}$  诱导体外培养的 PC12 细胞凋亡有保护作用<sup>[3]</sup>。本实验将进一步对 PC 保护作用的机制进行探讨。

## 1 材料

PC12 细胞由军事医学科学院基础医学研究所马子敏博士惠赠;  $A\beta_{25-35}$  购于 Sigma 公司 (用时以 pH7.4 的 PBS 溶解); 原花青素 (PC) 购自南京学子医化研发中心, 为葡萄籽提取物, 质量分数大于 95%; 各种规格培养皿均为美国 Corning Costar 公司产品; DMEM 及马血清均购自 Gibco 公司; 胎牛血清为杭州四季青公司产品; 琼脂糖为 Amresco 公司产品; 小鼠抗大鼠 Par-4 多克隆抗体、兔抗大鼠 Bcl-2 多克隆抗体均为 Santa Cruz 公司产品; MML-V 逆转录酶、Taq DNA 聚合酶、Oligod (T)、RNasin 为 Promega 公司产品; 100 bp DNA marker 为华美生物工程公司产品; 其余试剂为国产分析纯; 引物为上海生物工程公司合成。

## 2 方法

2.1 细胞培养<sup>[4]</sup>: PC12 细胞在 DMEM 基质中培养, 其中加 10% 灭活马血清、5% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素及 100 mg/mL 链霉素, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

2.2 实验分组: 每次实验均分为对照组 (0  $\mu$ mol/L  $A\beta_{25-35}$ )、诱导组 (10  $\mu$ mol/L  $A\beta_{25-35}$ ) 和药物保护组 (PC +  $A\beta_{25-35}$ ), 每组至少重复 3 次。

2.3 MTT 法检测细胞存活率: 取对数生长期的 PC12 细胞以  $1 \times 10^5$ /L 接种于 96 孔板, 培养 24 h, 分别加入不同终质量浓度 (5、10、20、30 mg/L) PC 预处理 1 h, 再加入 10  $\mu$ mol/L  $A\beta_{25-35}$ , 继续培养 20

h, 每孔加入 MTT (5 g/L) 15  $\mu$ L, 继续培养 4 h, 倒出培养液, 每孔加入 DMSO 10  $\mu$ L, 摇床摇播 10~15 min, 待紫色结晶完全溶解后, 用 M450 型 ELISA Reader 酶标仪检测各组细胞的吸光度 (A) 值, 以  $A_{570 \text{ nm}}/A_{450 \text{ nm}}$  代表细胞活力, 并以 0  $\mu$ mol/L  $A\beta_{25-35}$  作为对照组, 其细胞存活率为 100%, 计算其余各组细胞存活率。

$$\text{存活率} = \frac{\text{各实验组细胞活力}}{\text{对照组细胞活力}} \times 100\%$$

2.4 细胞凋亡的细胞核形态学检测: 取对数生长期的 PC12 细胞以  $2 \times 10^5$ /L 接种于 6 孔板, 每孔 2 mL, 培养 24 h, 分别加入不同终质量浓度 (10、20、30 mg/L) PC 预处理 1 h, 再加 10  $\mu$ mol/L  $A\beta_{25-35}$ , 继续培养 24 h, 收集细胞于 1.5 mL EP 管中, 冷 PBS (pH7.4) 洗 2 次, 每管加 Hoechst 33258 至终质量浓度为 5 mg/L 和 PI 至终质量浓度为 50 mg/L, 37 °C 避光孵育 30 min, 于荧光显微镜下观察并拍照。

2.5 RT-PCR 检测 par-4 和 bcl-2 基因 mRNA 表达: 取对数生长期的 PC12 细胞以  $2 \times 10^5$ /L 接种于 6 孔板, 每孔 2 mL, 培养 24 h, 分别加入不同终质量浓度 (10、20、30 mg/L) PC 预处理 1 h, 再加 10  $\mu$ mol/L  $A\beta_{25-35}$ , 继续培养 24 h, 收集细胞, 提取总 RNA, 用紫外分光光度仪测定  $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$  比值在 1.7~2.0, 计算 RNA 质量分数。引物设计: (1) Rat par-4: 正义引物: 5'-ATCCCCGAACAGATAGAAGT-3'<sup>[5]</sup>, 反义链: 5'-AAAAGCAGGTTTCCCACAC-3' (扩增产物 340 bp); (2) Rat bcl-2: 正义引物: 5'-CTGGTGGACAACATCGCTCTG-3'<sup>[6]</sup>, 反义链: 5'-GGTCTGCTGACCTCAC-TTGTG-3' (扩增产物 227 bp)。逆转录体系: 总 RNA 5  $\mu$ L (2  $\mu$ g)、Oligod (T) 2  $\mu$ L、5 $\times$ M-MLV 缓冲液 5  $\mu$ L、dNTP (每一种浓度为 2.5 mmol/L) 混合物 5  $\mu$ L、M-MLV ( $2 \times 10^8$  U/L) 1  $\mu$ L、RNasin ( $4 \times 10^7$  U/L) 1  $\mu$ L、DEPC 处理水 6  $\mu$ L, 总体积 25  $\mu$ L, 稍离心后混匀, 42 °C 水浴 60 min。合成的 cDNA 于 -20 °C 保存备用。从上述反应体系中取 5  $\mu$ L cDNA, 加 10 $\times$ 缓冲液 5  $\mu$ L、dNTP (每一种浓度为 2 mmol/L) 5  $\mu$ L、GAPDH 正义引物 (6.25  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L, par-4 正义引物 (25  $\mu$ mol/L)

各 1  $\mu\text{L}$  或 bcl-2 正反义引物 (25  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 1  $\mu\text{L}$ 、Taq 酶 ( $5 \times 10^6 \text{ U/L}$ ) 0.3  $\mu\text{L}$ 、灭菌三蒸水 29.7  $\mu\text{L}$ 、总体 50  $\mu\text{L}$ ，混匀，瞬间离心，于 PE9600 型 PCR 仪上扩增。反应参数为：95  $^{\circ}\text{C}$ 、5 min，94  $^{\circ}\text{C}$ 、1 min，58  $^{\circ}\text{C}$  或 55  $^{\circ}\text{C}$ 、45 s，72  $^{\circ}\text{C}$ 、1 min，共 30 个循环，最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离检测。

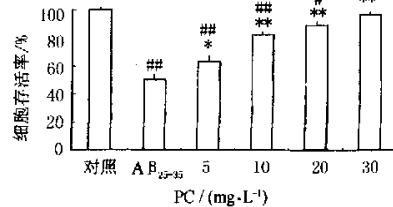
2.6 Western blotting 检测 Par-4 和 Bcl-2 蛋白的表达：PC12 细胞以  $2 \times 10^6/\text{L}$  接种于 6 孔板，每孔 2 mL，培养 24 h，分别加入不同终质量浓度 (10、20、30 mg/L) PC 预处理 1 h，再加 10  $\mu\text{mol/L}$   $\text{A}\beta_{25-35}$ ，继续培养 24 h，低温收集细胞，每管加 100  $\mu\text{L}$  细胞裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl、5 mmol/L EDTA pH 8.0、1% NP40、0.05% PMSF、2 mg/L Aprotinin、0.5 mg/L Leupeptin)，提取蛋白，考马斯亮蓝 G250 染色法测定蛋白浓度，与等体积  $2 \times$  上样缓冲液混匀，煮沸 5 min。每孔上样 50  $\mu\text{g}$ ，SDS-PAGE 分离样品。4  $^{\circ}\text{C}$ 、90 mA、15 h 将蛋白转至 NC 膜上，将膜封闭后，与一抗 (小鼠抗大鼠 Par-4 多克隆抗体 1:400，兔抗大鼠 Bcl-2 多克隆抗体 1:500) 室温孵育 2 h，洗涤，再与以 1:4000 体积比稀释的二抗稀释液室温孵育 1.5 h，洗涤，加入 ECL 试剂，暗室曝光，显影，定影，拍照，扫描并分析。

2.7 统计学处理：F 与 Bonferroni 或 Tamhane's  $T_2$  检验，采用 SPSS10.0 统计软件包完成，数值用  $\bar{x} \pm s$  表示。

### 3 结果

3.1 MTT 结果：培养的 PC12 细胞用不同终质量浓度 (5~30 mg/L) PC 预处理 1 h，再加入 10  $\mu\text{mol/L}$   $\text{A}\beta_{25-35}$ ，继续培养 24 h，细胞的存活率随 PC 剂量的增大而升高，具有明显的量效依赖性。5 mg/L PC 即具有保护作用 ( $P < 0.05$ ，图 1)。

3.2 荧光染色结果：Hoechst 33258 荧光染色结果显示，用 10  $\mu\text{mol/L}$   $\text{A}\beta_{25-35}$  处理 PC12 细胞 24 h，可见染为高亮蓝色的典型凋亡小体，其细胞核明显固缩、凝聚和断裂 (图 2-A)，而药物保护组 (20~30 mg/L PC+10  $\mu\text{mol/L}$   $\text{A}\beta_{25-35}$ ) 的细胞核 (图 2-B、图 2-C) 与对照组细胞的细胞核 (图 2-D) 形态逐渐接近，说明 PC 对  $\text{A}\beta_{25-35}$  诱导的细胞凋亡有明显的保护作用。



与对照组比较：\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$   
与  $\text{A}\beta_{25-35}$  诱导组比较：\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$   
# $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs control group  
\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs  $\text{A}\beta_{25-35}$  group

图 1 PC 对  $\text{A}\beta_{25-35}$  诱导凋亡 PC12 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Fig. 1 Effect of PC on survival rate of apoptotic PC12 cells induced by  $\text{A}\beta_{25-35}$  ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

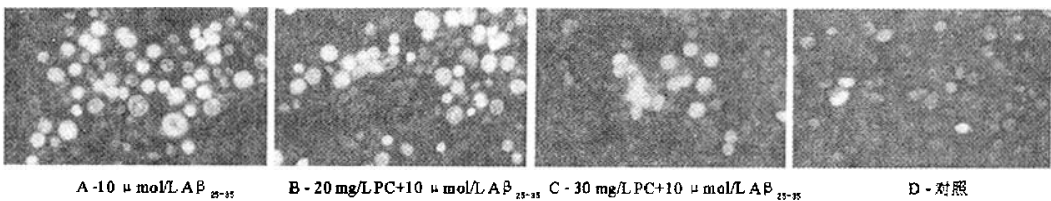


图 2 荧光染色分析凋亡 PC12 细胞核形态改变 ( $\times 400$ )

Fig. 2 Analysis of nucleus changes in PC12 cells by fluorescence staining ( $\times 400$ )

3.3 PC 对  $\text{A}\beta_{25-35}$  诱导的 PC12 细胞 par-4 和 bcl-2 基因 mRNA 表达的影响：结果见表 1。RT-PCR 结果显示，用终质量浓度为 10、20、30 mg/L PC 预处理细胞 1 h，par-4 mRNA 的表达随药物质量浓度的增加而减少，bcl-2 mRNA 表达随药物质量浓度的增加而增加。

3.4 PC 对  $\text{A}\beta_{25-35}$  诱导的 PC12 细胞 Par-4 和 Bcl-2 基因蛋白表达的影响：结果见表 1。Western blotting 结果显示，用终质量浓度为 10、20、30 mg/L PC

预处理细胞 1 h，Par-4 蛋白的表达随药物质量浓度的增加而减少，Bcl-2 蛋白表达随药物质量浓度的增加而增加。

### 4 讨论

$\text{A}\beta_{25-35}$  可诱导体外培养的成神经细胞瘤细胞和原代培养的海马与新皮质神经元发生脂质过氧化反应，导致细胞中过氧化物生成增多，膜脂质过氧化程度增高；维生素 E 等抗氧化剂可抑制此过程，保护细胞免受  $\text{A}\beta_{25-35}$  的损伤<sup>[7]</sup>，说明  $\text{A}\beta$  毒性和氧化应

表 1 PC 对 Aβ<sub>25-35</sub> 诱导凋亡 PC12 细胞 par-4 和 bcl-2 基因 mRNA 和蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 1 Effect of PC on mRNA and protein expression of par-4 and bcl-2 genes in apoptotic PC12 cells induced by Aβ<sub>25-35</sub> ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量	基因 mRNA 表达		基因蛋白表达	
		par-4	bcl-2	Par-4	Bcl-2
对照	—	0.418±0.01	0.754±0.03	0.458±0.03	0.930±0.03
Aβ <sub>25-35</sub>	10 μmol·L <sup>-1</sup>	0.649±0.02**	0.286±0.02**	0.898±0.03**	0.670±0.03**
PC	10 mg·L <sup>-1</sup>	0.425±0.03 <sup>△△</sup>	0.630±0.02** <sup>△△</sup>	0.791±0.02** <sup>△△</sup>	0.742±0.03** <sup>△△</sup>
	20 mg·L <sup>-1</sup>	0.352±0.03 <sup>△△</sup>	0.710±0.01 <sup>△△</sup>	0.692±0.03** <sup>△△</sup>	0.866±0.05 <sup>△△</sup>
	30 mg·L <sup>-1</sup>	0.239±0.03** <sup>△△</sup>	0.940±0.01** <sup>△△</sup>	0.472±0.02 <sup>△△</sup>	0.886±0.02 <sup>△△</sup>

与对照组比较: \*P<0.05 \*\*P<0.01; 与 Aβ<sub>25-35</sub> 组比较: <sup>△</sup>P<0.05 <sup>△△</sup>P<0.01

\*P<0.05 \*\*P<0.01 vs control group; <sup>△</sup>P<0.05 <sup>△△</sup>P<0.01 vs Aβ<sub>25-35</sub> group

激反应之间关系密切。PC 是目前已知的作用最强的抗氧化物质,它对无烟草提取物(STE)诱导的人类口腔角化细胞的脂质过氧化、DNA 断裂和凋亡有明显的保护作用<sup>[8]</sup>;对巴豆油刺激所引起的大鼠多形核白细胞(PMNs) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水平的增加,肝线粒体脂质过氧化有显著的抑制作用,并能提高肝线粒体 SOD 活性<sup>[9]</sup>;本实验观察到,10~30 mg/L PC 可拮抗 Aβ<sub>25-35</sub> 对 PC12 细胞的毒性,剂量依赖性增加 PC12 细胞的存活率,可减少 Aβ<sub>25-35</sub> 引起 PC12 细胞凋亡时的核固缩、凝聚和破裂,对 Aβ<sub>25-35</sub> 诱导的细胞凋亡有明显的保护作用。

前列腺凋亡应答基因(prostate apoptosis response, par)是 Sells 等于 1994 年从凋亡的前列腺肿瘤细胞中分离出来的,包括 par-1、par-2、par-3、par-4、par-5,其中 par-4 编码的 Par-4 蛋白与细胞凋亡的关系最为密切<sup>[10]</sup>。对神经退行性疾病(包括 AD)的病人和动物模型死亡后脑组织的病理研究表明,在损伤的神经元中,Par-4 水平也明显升高,Aβ 作用于 PC12 细胞,在细胞活性明显下降的同时,Par-4 的表达明显增强<sup>[11]</sup>,提示 Par-4 参与 Aβ 对 PC12 细胞的毒性。Par-4 蛋白分子的羧基末端含有一个亮氨酸拉链区(leucine zipper, LZ)<sup>[12]</sup>,推测 Par-4 可能通过 LZ 区与一些凋亡调节蛋白(如 PKCζ, Bcl-2 等)相互作用,通过影响这些凋亡调节蛋白而间接影响凋亡。本研究结果显示,10 μmol/L Aβ<sub>25-35</sub> 诱导组,par-4 基因的 mRNA 和蛋白表达增加,bcl-2 基因的 mRNA 和蛋白表达减少,与对照组比较差异非常显著(P<0.01);而 10~30 mg/L PC 保护组,随 PC 质量浓度的增加,par-4 基因的 mRNA 和蛋白表达减少,bcl-2 基因的 mRNA 和蛋白表达增加,与对照组比较差异显著(P<0.05)。Culmsee 等报道,Par-4 通过 LZ 区与 PKCζ 结合后,通过抑制 NF-κB 的活性,下调抗凋亡因子 bcl-2

的基因表达<sup>[5]</sup>。Par-4 也可以结合到 bcl-2 基因启动子上的 WT1 结合位点,而减少 bcl-2 基因启动子的转录,调节 Bcl-2 蛋白的表达<sup>[13]</sup>。

本研究结果提示,PC 可能是通过其抗氧化活性,抑制与 Aβ<sub>25-35</sub> 毒性相关的氧化应激反应,继而减少凋亡基因 par-4 的表达,增强抗凋亡基因 bcl-2 的表达,保护细胞免受损伤。

References:

- [1] Barbara K, Martin U, Henning W, et al. Inhibition of NF-κB potentiates amyloid β-mediated neuronal apoptosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 9409-9414.
- [2] Guo Z, Xu L. Procyanidins: A kind of floral drugs of broad use [J]. *World Phytomed* (国外医药:植物药分册), 1996, 11(5): 196-204.
- [3] Xie Z Y, Mei H F, Zhu Q F. The protective effect of procyanidins on apoptosis of PC12 cells induced by β-amyloid peptide 25-35 [J]. *Chin J Gerontol* (中国老年学杂志), 2005, 25(2): 159-161.
- [4] Zhang G X, Zhu Q F. Study of NGF to induce PC12 cells differentiation [J]. *J Biol* (生物学杂志), 2002, 19(4): 14-15.
- [5] Culmsee C, Zhu Y, Kriegelstein J, et al. Evidence for the involvement of Par-4 in ischemic neuron cell death [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, 21(4): 334-343.
- [6] Michio T, Yong H C, Hideo M, et al. Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NFB activation in primary hippocampal neurons [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 8531-8538.
- [7] Behl C, Davis J B, Lesley R, et al. Hydrogen peroxide mediates amyloid β protein toxicity [J]. *Cell*, 1994, 77: 817-827.
- [8] Bagchi M, Balmoon J, Bagchi D, et al. Smokeless tobacco, oxidative stress, apoptosis, and antioxidants in human oral keratinocytes [J]. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26(7-8): 995-1000.
- [9] Lu Y, Sun Z G, Zhao W Z, et al. Procyanidins' anti relaxation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and lipids oxybation induced by cancer inducers [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 2001, 17(5): 562-565.
- [10] Sells S F, Wood D P, Jr, et al. Commonality of the gene programs induced by effectors of apoptosis in androgen-dependent and -independent prostate cells [J]. *Cell Growth Differ*, 1994, 5: 457-466.
- [11] Tang M K, Zhang J. Prostate apoptosis response-4 involved in the protective effect of salvianolic acid B against amyloid beta peptide-induced damage in PC12 cells [J]. *Jpn J Pharmacol*, 2002, 88(4): 422-427.
- [12] Lan R Z, Ye Z Q. Expression of Par-4 in castrated rat's ventral prostate [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol: Med Sci* (华中科技大学学报:医学版), 2002, 31(1): 50-52.
- [13] Sangeeta K C, Sandip K M, Vivek M R, et al. Par-4 transcriptionally regulates Bcl-2 through a WT1-binding site on the bcl-2 promoter [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(22): 19995-20005.