

尼古丁对 6-羟多巴胺诱导 PC12 细胞凋亡的拮抗作用

朱小南, 汪雪兰, 何进, 余剑平, 王琴, 陈汝筑*
(中山大学中山医学院药理学教研室, 广东 广州 510089)

摘要: 目的 探讨尼古丁对 6-羟多巴胺(6-OHDA)诱导 PC12 细胞凋亡的拮抗作用及其与烟碱受体的关系。方法 用 6-OHDA 诱导大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞株 PC12 细胞凋亡的细胞模型;用 MTT、二乙酸荧光素活细胞染色、流式细胞仪和 DNA 琼脂糖凝胶电泳等方法检测 PC12 细胞的凋亡;用尼古丁及 N 型和 M 型受体拮抗剂预处理,观察尼古丁的拮抗作用及其与受体的关系。结果 尼古丁可明显拮抗 6-OHDA($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)诱导 PC12 细胞凋亡,呈钟型浓度效应关系, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尼古丁的拮抗作用最强。用 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尼古丁预处理 PC12 细胞 2 h 可明显降低 6-OHDA 诱导的细胞凋亡。用 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 六甲溴铵阻断烟碱受体,可取消尼古丁对 6-OHDA 诱导细胞凋亡的拮抗作用;但用阿托品阻断 M 型胆碱受体,对尼古丁的拮抗作用则无明显影响。结论 尼古丁对 6-OHDA 诱导的 PC12 细胞凋亡有明显的拮抗作用,这种作用由烟碱受体所介导。

关键词: 尼古丁;受体,烟碱;羟基多巴胺类;凋亡;细胞,PC12

中图分类号: R971.91

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2004)01-0006-05

目前,尼古丁及其受体的研究、烟碱受体激动剂的开发已成为人们关注的热门课题,这主要是由于许多研究证实,神经系统退行性疾病如帕金森病(Parkinson's disease, PD)和阿尔茨海默病(Alzheimer's

disease, AD)的脑中烟碱受体明显丢失,用尼古丁(nicotine)治疗可以缓解 PD 病人的认知、学习、短期记忆、运动和行为障碍等症[1];也有流行病学研究报道,吸烟与神经系统退行性疾病如 PD 和 AD 的患病率呈明显的负相关[2],改善病人的症状,认为这可能与烟草中所含的尼古丁成分有关;研究还显示,尼古丁对中枢神经系统有一定的保护作用[3~5]。但其保护机制仍未清楚。由于 6-羟多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)通过使儿茶酚胺神经元变性可复制 PD 的大鼠模型。大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞株 PC12 细胞与多巴胺神经元有许多特性相似,因此,本实验用 PC12 细胞作为 PD 的体外细胞模型[6~8],探讨尼古丁对 6-OHDA 所致 PC12 细胞损伤的保护作用以及其与烟碱受体的关系。

1 材料与方法

1.1 材料与药品

大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞株 PC12 细胞由中国科学院上海细胞研究所细胞库提供。96 孔培养板、培养皿均为 Corning 公司产品;RPMI 1640 培养基和胎牛血清购自 Gibco BRL;6-OHDA、噻唑蓝(MTT)、二乙酸荧光素(fluorescein diacetate, FDA)、尼古丁、聚赖氨酸(poly-lysine)、六甲溴铵(hexamethonium bromide, C_6)、二甲亚砜、碘化丙啶(PI)均为 Sigma 产品;琼脂糖凝胶和神经生长因子(nerve growth factor, NGF)购自 Boehringer Mannheim 公司。GAS7001B UVI 凝胶图像分析系统购自 UVI 公司,Olympus 相差显微镜和荧光显微镜购自 Olympus 公司。

1.2 PC12 细胞培养及凋亡模型的建立[8]

大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞株 PC12 细胞在 RPM 1640 培养基(内含 5% 马血清、5% 小牛血清和 5% 胎牛血清)中分裂增殖,并保持嗜铬细胞瘤的特性。当培养基中加入 NGF,PC12 细胞即停止分裂增殖,胞体增大并形成突起,表现交感神经元的特征。取加入 NGF($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)后培养 4 d 的 PC12 细胞,经

来稿日期: 2003-01-14 接受日期: 2003-09-15

基金项目: 国家卫生部科学研究基金资助项目(98-010-086)

作者简介: 朱小南(1963-),女,云南石屏人,副主任技师,主要研究方向为神经药理学;陈汝筑(1945-),男,广东梅县人,教授,主要研究方向为神经药理学。

*联系作者 E-mail: yujian@gzsums.edu.cn Tel: (020) 87330561

0.25%胰蛋白酶消化后制成细胞悬液待用。加入 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 6-OHDA 处理 24 h 诱发 PC12 细胞凋亡, 加入 6-OHDA 前 2 h 分别加入不同浓度的尼古丁, 观察其对 6-OHDA 诱导 PC12 细胞凋亡拮抗作用的量-效关系。用 C_6 和阿托品观察介导尼古丁拮抗作用的受体。

1.3 MTT 检测细胞凋亡

取 96 孔板, 每孔加入 $200 \mu\text{L}$ PC12 细胞悬液, 加入 $20 \mu\text{L}$ MTT, 终浓度为 $0.5 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 并置于 37°C 的 CO_2 培养箱放置 4 h, 轻轻吸出培养液, 每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 二甲亚砜使细胞溶解, 用 ELx 酶联免疫检测仪测定 A 值, 以 A 值计算细胞的存活率。

1.4 二乙酸荧光素活细胞染色法^[9]

PC12 细胞悬液去除培养液, 用冷磷酸缓冲液 (PBS) 轻轻冲洗后加入 FDA ($10 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), 37°C 避光孵育 5 min 后弃上清液, 室温干燥后用图像分析仪计数活细胞。

1.5 流式细胞仪法

PC12 细胞悬液经离心 ($240 \times g$, 5 min) 弃上清液, 取其沉淀物加入 70% 乙醇 4°C 固定过夜, 再次离心后, 其沉淀物加入 PBS (内含 $5 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ RNase), 37°C 孵育 30 min 后加入 $50 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PI, 4°C 避光放置 1 h, 用 FACS-420 型流式细胞仪检测细胞亚二倍体峰, 实验数据经凋亡分析软件 Mod Fit LT 处理, 计算凋亡细胞 DNA 断裂的百分比。

1.6 DNA 提取及琼脂糖凝胶电泳法

按文献^[10]提取 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳。

1.7 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间数据比较用 F 检验, 两组间比较再用 t 检验。

2 结果

2.1 尼古丁对 6-OHDA 所致 PC12 细胞损伤的保护作用

正常对照组 PC12 细胞生长旺盛, 加入 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA, 用 MTT 法检测细胞的存活率为 (45 ± 8)%, 加入不同浓度的尼古丁预处理 2 h 后, 加入 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 作用 24 h。结果显示, 尼古丁对 6-OHDA 所致 PC12 细胞损伤有明显的保护作用, 作用随尼古丁的浓度而变化, 呈钟型量-效关系, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尼古丁保护作用最强, 此后随剂量进一步增大, 其保护作用反而减弱 (表 1)。

Tab 1. Protective effect of nicotine on PC12 cell injury induced by 6-hydroxydopamine(6-OHDA)

Nicotine/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	6-OHDA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Survival rate of PC12 cell/%
0	0	100 ± 0
0	50	$45 \pm 8^{**}$
0.1	50	$56 \pm 4^{**\#}$
1	50	$69 \pm 6^{**\#\#}$
10	50	$76 \pm 10^{**\#\#}$
100	50	$72 \pm 9^{**\#\#}$
1000	50	$62 \pm 12^{**\#\#}$

The cells were pretreated with nicotine for 2 h, then 6-OHDA was added and incubated 24 h. The survival rate was measured by MTT method. $\bar{x} \pm s$, $n = 7$. $** P < 0.01$, compared with control; $\#\# P < 0.01$, compared with $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA alone.

2.2 二乙酸荧光素染色法检测尼古丁对 6-OHDA 诱导 PC12 细胞凋亡的影响

FDA 活细胞染色显示, 对照组 PC12 细胞生长密度均匀, 胞体清晰, 细胞间通过突起相互交织连接成网状, 图像分析仪计数活细胞为 256 ± 32 (表 2)。用 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 处理细胞 24 h 后, 细胞密度明显减少, 核仁聚集、胞体皱缩、正常胞突网状连接消失, 镜下活细胞数为 38 ± 12 , 与对照组有显著差异。从尼古丁保护 6-OHDA 所致 PC12 细胞损伤的量-效关系中显示, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尼古丁的拮抗效应最明显, 因此, 选择此剂量来检测尼古丁拮抗 6-OHDA 诱导 PC12 细胞

Tab 2. Antagonistic effect of nicotine on PC12 cell apoptosis induced by 6-OHDA with fluorescein diacetate nuclear staining

Drug/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Survival cell number
Control	256 ± 32
6-OHDA 50	$38 \pm 12^{**}$
Nicotine 10 + 6-OHDA 50	$196 \pm 29^{\#\#}$
C_6 10 + nicotine 10 + 6-OHDA 50	$35 \pm 18^{**}$
Atropine 0.1 + nicotine 10 + 6-OHDA 50	$229 \pm 32^{\#\#}$

6-OHDA group: treatment with 6-OHDA for 24 h. Nicotine + 6-OHDA group: pretreatment with nicotine for 2 h before the treatment with 6-OHDA. Hexamethonium bromide (C_6) or atropine + nicotine + 6-OHDA group: pretreatment with C_6 or atropine for 2 h, and followed by the treatment as nicotine + 6-OHDA group, respectively. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. $** P < 0.01$, compared with control; $\#\# P < 0.01$, compared with 6-OHDA group.

凋亡的作用。在加入 6-OHDA 前用 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尼古丁预处理 PC12 细胞 2 h, 活细胞计数为 196 ± 29 , 与对照组比较无显著性差异 ($P > 0.05$), 较 6-OHDA 组显著增多; 用 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ C_6 预先阻断烟碱受体 2 h, 或用 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 阿托品预先阻断 M 型胆碱受体 2 h, 再加入 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尼古丁重复以上实验, 结果可见, C_6 预处理组的活细胞数降至 6-OHDA 组水平, 说明尼古丁的拮抗作用被阻断, 而阿托品预处理组的活细胞数与对照组比无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.3 流式细胞仪检测尼古丁对 6-OHDA 诱导 PC12 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测 PC12 细胞, 在对照组未见凋亡峰出现(图 1A)。加入 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 后 24 h, 可见明显的 PC12 细胞凋亡峰(图 1B)。在加入 6-OHDA 前用 5 或 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尼古丁预处理 PC12 细胞 2 h, 流式细胞仪又未能检测出明显的凋亡峰(图 1C, D)。用 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 C_6 预先阻断烟碱受体后出现明显的凋亡峰(图 1E), 提示尼古丁对 6-OHDA 诱导的 P12 细胞凋亡的拮抗作用是由烟碱受体介导的。用 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的阿托品预先阻断 M 型胆碱受体, 再加入 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尼古丁重复实验, 流式细胞仪检测不到凋亡峰(图 1F, 表 3), 提示尼古丁对 6-OHDA 诱发 P12 细胞凋亡的拮抗作用与 M 型胆碱受体无关。

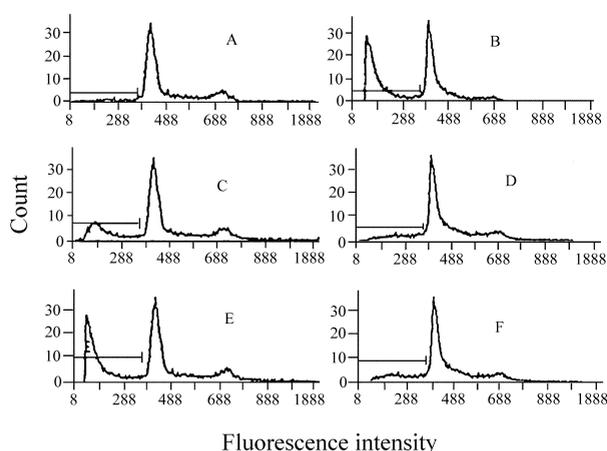


Fig 1. Antagonistic effect of nicotine on PC12 cell apoptosis induced by 6-OHDA with flow-cytometry. Apoptotic peak area represents apoptotic cell number. A: normal control; B: 6-OHDA $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 24 h; C, D: pretreated with nicotine 5 and $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively, 2 h before 6-OHDA treatment; E, F: pretreated with C_6 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (E) or atropine $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (F) for 2 h, and followed by the treatment as nicotine $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + 6-OHDA $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Tab 3. Antagonistic effect of nicotine on PC12 cell apoptosis induced by 6-OHDA with flow-cytometry

Drug/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	DNA fragmentation/%
Control	6.8 ± 1.5
6-OHDA 50	$45.4 \pm 4.9^{**}$
Nicotine 5 + 6-OHDA 50	$22.4 \pm 2.3^{\#\#}$
Nicotine 10 + 6-OHDA 50	$13.3 \pm 2.1^{\#\#}$
C_6 10 + nicotine 10 + 6-OHDA 50	$38.7 \pm 4.3^{**}$
Atropine 0.1 + nicotine 10 + 6-OHDA 50	$17.8 \pm 1.4^{\#\#}$

See Fig 1 for the drug treatments. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$. $^{**} P < 0.01$, compared with control; $^{\#\#} P < 0.01$, compared with 6-OHDA alone.

2.4 凝胶电泳检测尼古丁对 6-OHDA 诱导的 PC12 细胞凋亡的影响

在对照组, P12 细胞的 DNA 琼脂糖凝胶电泳未见 DNA 梯度条带(图 2, 泳道 1)。在加入 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-OHDA 24 h 后, P12 细胞的 DNA 电泳呈现典型的梯度条带(泳道 2)。在加入 6-OHDA 前用 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的尼古丁预处理 PC12 细胞 2 h, DNA 电泳未见 DNA 梯度条带(泳道 4)。用 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 C_6 预先阻断烟碱受体, 尼古丁不能拮抗 6-OHDA 的作用, 凝胶电泳又出现典型的 DNA 梯度条带(泳道 3)。结果提示尼

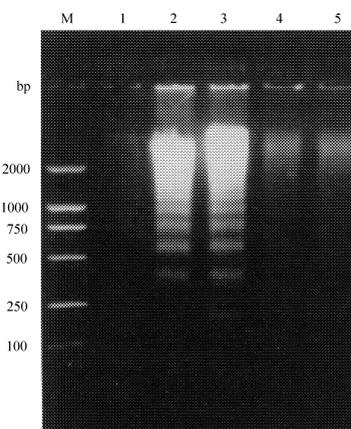


Fig 2. Antagonistic effect of nicotine on PC12 cell apoptosis induced by 6-OHDA with DNA fragmentation electrophoresis in agarose gel. M: DNA marker; lane 1: normal control; lane 2: 6-OHDA $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 24 h; lanes 3-5: C_6 + nicotine + 6-OHDA, nicotine + 6-OHDA and atropine + nicotine + 6-OHDA, respectively, the cells were pretreated with C_6 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ or atropine $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 2 h before nicotine $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 6-OHDA $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ was added 2 h after nicotine and coincubated for another 24 h.

古丁能明显拮抗 6-OHDA 诱导 PC12 细胞凋亡,这种作用是通过烟碱受体介导的。用 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的阿托品预先阻断 M 型胆碱受体,再加入 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尼古丁重复实验, DNA 电泳无典型的梯度条带(泳道 5),提示尼古丁对 6-OHDA 诱发的 P12 细胞凋亡作用与 M 型胆碱受体无关。

3 讨论

本研究用 MTT 法、FDA 活细胞染色、流式细胞仪和 DNA 琼脂糖凝胶电泳等方法检测 6-OHDA 诱导的 PC12 细胞凋亡。观察到 6-OHDA 明显降低 P12 细胞的存活率,使 PC12 细胞出现凋亡峰和明显的 DNA 梯度条带,提示 6-OHDA 可诱导 P12 细胞凋亡。尼古丁可明显减少 6-OHDA 诱导的 PC12 细胞的凋亡,呈钟型量-效关系,提示尼古丁可拮抗 6-OHDA 诱导的 PC12 细胞凋亡。用非竞争性 N 受体阻断剂 C_6 可阻断尼古丁拮抗 6-OHDA 诱导 PC12 凋亡的作用;而 M 型胆碱受体阻断剂阿托品则无此作用。这些结果提示,尼古丁具有拮抗 6-OHDA 诱导 PC12 细胞凋亡的作用,这种作用是由烟碱受体介导的, M 型胆碱受体不参与这种作用。

据报道, PD 病人脑内^[10,11]和尿中^[12]含有 6-OHDA,因此,6-OHDA 可能在 PD 发病中起作用。6-OHDA 引起神经元进行性损伤的机制尚未完全阐明,有研究提示其可能介导氧化应激的增强^[13]和增加细胞内 Ca^{2+} 浓度^[6],可能促进诱导神经元的凋亡^[14]。对 6-OHDA 诱导 PC12 细胞凋亡的机制也从生物化学和分子水平上进行了大量的研究。研究证实,在 6-OHDA 诱导 PC12 细胞凋亡过程有早反应基因起作用^[13];半胱天冬酶(caspase)则起重要作用^[15]。而转录因子 NF- κ B 通过增强抗凋亡基因 *bcl-2*、*bfl-1* 的表达,对 6-OHDA 诱导的 PC12 细胞凋亡有抑制作用^[16]。

PD 病人的尸体解剖研究证实,PD 病人的脑内烟碱受体明显丢失,尤其在尾壳核的背侧和腹侧、豆状核等部位的烟碱受体明显减少^[17]。为了开发有效的烟碱受体激动剂治疗 PD,不少研究集中在 PD 病人或动物模型中枢烟碱受体亚型丢失。大鼠和猴的研究证实,黑质和纹状体有 α_6 亚基组成的烟碱受体亚型,在黑质和纹状体受到损害时该亚型受体最易受损。因此,认为开发含 α_6 N 型受体激动剂可能用于 PD 病人的治疗^[3]。应用重组多肽的特异性抗体,通过免疫印迹技术,检测 PD 病人尸检标本发现,与对照

病例相比,尽管豆状核的^[3H]尼古丁结合显著减少,但组成神经元型烟碱受体不同亚型的 α_3 , α_4 , α_7 , β_2 和 β_4 亚基的免疫活性没有丢失,而 α_5 和 α_6 亚基免疫活性显著减少,提示后者亚基参与组成的烟碱受体亚型可能与 PD 的发病有关^[18]。虽然本研究结果清楚地证明,尼古丁对 6-OHDA 诱导 PC12 细胞的凋亡有明显的拮抗作用,这种拮抗作用是 N 受体介导的,但本研究使用的不是 N 受体亚型的高特异性拮抗剂,因此,无法分析某一类 N 受体亚型在其中的作用,这些工作有待进一步研究。

4 参考文献:

- [1] Arendash GW, Sengstock GJ, Sanberg PR, Kem WR. Improved learning and memory in aged rats with chronic administration of the nicotinic receptor agonist GTS-21[J]. *Brain Res*, 1995, **674**(2):252-259.
- [2] Gorell JM, Rybicki BA, Johnson CC, Peterson EL. Smoking and Parkinson's disease: a dose-response relationship[J]. *Neurology*, 1999, **52**(1):115-119.
- [3] Quik M, Kulak JM. Nicotine and nicotinic receptors: relevance to Parkinson's disease[J]. *Neurotoxicology*, 2002, **23**(4-5):581-594.
- [4] Arendash GW, Sanberg PR, Sengstock GJ. Nicotine enhances the learning and memory of aged rats[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 1995, **52**(3):517-523.
- [5] Akaike A, Tamura Y, Yokota T, Shimohama S, Kimura J. Nicotine-induced protection of cultured cortical neurons against *N*-methyl-*D*-aspartate receptor-mediated glutamate cytotoxicity[J]. *Brain Res*, 1994, **644**(2):181-187.
- [6] Kumar R, Agarwal AK, Seth PK. Free radical-generated neurotoxicity of 6-hydroxydopamine[J]. *J Neurochem*, 1995, **64**(4):1703-1707.
- [7] Rodriguez Diaz M, Abdala P, Barroso-Chinea P, Obeso J, Gonzalez-Hernandez T. Motor behavioural changes after intracerebroventricular injection of 6-hydroxydopamine in the rat: an animal model of Parkinson's disease[J]. *Behav Brain Res*, 2001, **122**(1):79-92.
- [8] Zigmond MJ, Stricker EM. Animal models of parkinsonism using selective neurotoxins: clinical and basic implications[J]. *Int Rev Neurobiol*, 1989, **31**:1-79.
- [9] Yan GM, Irwin RP, Lin SZ, Weller M, Wood KA, Paul SM. Diphenylhydantoin induces apoptotic cell death of cultured rat cerebellar granule neurons[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995, **274**(2):983-990.
- [10] Suarez-Fernandez MB, Soldado AB, Sanz-Medel A, Vega

- JA, Novelli A, Fernandez-Sanchez MT. Aluminum-induced degeneration of astrocytes occurs *via* apoptosis and results in neuronal death[J]. *Brain Res*, 1999, **835**(2):125–136.
- [11] Curtius HC, Wolfensberger M, Steinmann B, Redweik U, Siegfried J. Mass fragmentography of dopamine and 6-hydroxydopamine. Application to the determination of dopamine in human brain biopsies from the caudate nucleus[J]. *J Chromatogr*, 1974, **99**:529–540.
- [12] Andrew R, Watson DG, Best SA, Midgley JM, Wenlong H, Petty RK. The determination of hydroxydopamines and other trace amines in the urine of parkinsonian patients and normal controls[J]. *Neurochem Res*, 1993, **18**(11):1175–1177.
- [13] Seth K, Agrawal AK, Aziz MH, Ahmad A, Shukla Y, Mathur N, *et al.* Induced expression of early response genes/oxidative injury in rat pheochromocytoma (PC12) cell line by 6-hydroxydopamine: implication for Parkinson's disease[J]. *Neurosci Lett*, 2002, **330**(1):89–93.
- [14] Mayo JC, Sainz RM, Uria H, Antolin I, Esteban MM, Rodriguez C. Melatonin prevents apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in neuronal cells: implications for Parkinson's disease[J]. *J Pineal Res*, 1998, **24**(3):179–192.
- [15] Xu R, Liu J, Chen X, Xu F, Xie Q, Yu H, *et al.* Ribozyme-mediated inhibition of caspase-3 activity reduces apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in PC12 cells[J]. *Brain Res*, 2001, **899**(1–2):10–19.
- [16] Blum D, Torch S, Nissou MF, Verna JM. 6-Hydroxydopamine-induced nuclear factor-kappa B activation in PC12 cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2001, **62**(4):473–481.
- [17] Court JA, Piggott MA, Lloyd S, Cookson N, Ballard CG, McKeith IG, *et al.* Nicotine binding in human striatum: elevation in schizophrenia and reductions in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Alzheimer's disease and in relation to neuroleptic medication[J]. *Neuroscience*, 2000, **98**(1):79–87.
- [18] Martin-Ruiz CM, Piggott M, Gotti C, Lindstrom J, Mendelow AD, Siddique MS, *et al.* Alpha and beta nicotinic acetylcholine receptors subunits and synaptophysin in putamen from Parkinson's disease[J]. *Neuropharmacology*, 2000, **39**(13):2830–2839.

Antagonism of nicotine on PC12 cell apoptosis induced by 6-hydroxydopamine

ZHU Xiao-Nan, WANG Xue-Lan, HE Jin, YU Jian-Ping, WANG Qin, CHEN Ru-Zhu*

(Department of Pharmacology, Zhongshan Medical School, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510089, China)

Abstract: **AIM** To explore whether nicotine antagonises the PC12 cell apoptosis induced by 6-hydroxydopamine (6-OHDA). **METHODS** MTT assay, fluorescein diacetate nuclear staining, flow-cytometry and DNA fragmentation electrophoresis in agarose gel were used for detecting PC12 cell apoptosis. **RESULTS** Apoptosis of the cultured PC12 cells induced by 6-OHDA $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ was antagonised by pretreating with nicotine (0.1, 1, 10, 100, $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) for 2 h, in a bell-shape concentration-dependent manner with the strongest protective effect at $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The antagonistic effect of nicotine was completely blocked by hex-

amethonium $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, but not atropine $0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, suggested that this effect be mediated by nicotinic receptor. **CONCLUSION** Nicotine may prevent PC12 cell from apoptosis induced by 6-OHDA, which is mediated by nicotine receptor. **Key words:** nicotine; receptors, nicotinic; hydroxydopamines; apoptosis; cells, PC12

Foundation item: The project supported by Ministry of Health of China(98-010-086)

* Corresponding author.

(本文编辑 乔虹)