

鸡豆黄素 A 对 MPP⁺ 诱导 PC12 细胞凋亡的保护作用

俞益桂 薛海霞 韩俊辉 尹艳艳

摘要 目的 观察鸡豆黄素 A (Bioch A) 对 1-甲基-4-苯基吡啶离子 (MPP⁺) 诱导的 PC12 细胞的凋亡是否有保护作用。方法 用 MTT 法检测 MPP⁺ 对 PC12 细胞的毒性作用和 Bioch A 的最适药物浓度, 为后续实验筛出诱导细胞凋亡的 MPP⁺ 剂量和恰当的 Bioch A 剂量。常规培养的 PC12 细胞被分为: Control 组、MPP⁺ (1 μ mol/L) 组、Bioch A (1.25 μ mol/L) + MPP⁺ 组、Bioch A (2.5 μ mol/L) + MPP⁺ 组、Bioch A (5 μ mol/L) + MPP⁺ 组、雌二醇 (E2) (0.1 μ mol/L) + MPP⁺ 组。DCFH-DA 探针被用于活性氧 (ROS) 的检测; Annexin V-FITC/PI 双染法被用作细胞凋亡百分比的测定; cleaved Caspase-3 和 cleaved Caspase-9 的表达水平采用 Western blot 法检测。结果 MPP⁺ 模型组较 Control 组其 ROS 含量有所升高, Bioch A (2.5, 5 μ mol/L) 组的 ROS 的含量有所下降。MPP⁺ 模型组与 Control 组比较, 其细胞凋亡百分率和活化的 cleaved Caspase-3 以及 cleaved Caspase-9 蛋白表达量增多, Bioch A (2.5, 5 μ mol/L) 组与 MPP⁺ 模型组比较, 细胞凋亡百分率下降, cleaved Caspase-3 和 cleaved Caspase-9 蛋白的表达量减少。结论 Bioch A 对 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞凋亡具有一定的保护作用。

关键词 MPP⁺; 活性氧; 凋亡; PC12 细胞; 鸡豆黄素 A

中图分类号 R 285.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)08-1204-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.08.011

帕金森病 (parkinson's disease, PD) 是世界第二大神经退行性疾病, 临床症状主要包括静态震颤、运动迟缓和僵硬肌肉, 其病理学特征为黑质 (substantia nigra, SN) 多巴胺 (dopamine, DA) 能神经元的凋亡和丧失^[1-2]。研究^[3]表明在 PD 疾病中, 长期或严重的氧化应激可以诱导 DA 能神经元受到损伤甚至凋亡。相关研究^[4]发现在细胞凋亡中活性氧 (reactive oxygen species, ROS) -NO 通路起到了至关重要作用, 说明凋亡的启动与 ROS 是密不可分的。含半

胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (cysteiny aspartate specific proteinase, Caspase) 家族的激活一般被认为是细胞凋亡的重要一环, Caspase-9 被凋亡相关因子诱导形成凋亡小体, 而凋亡小体随即激活凋亡执行者 Caspase-3, 而 Caspase-3 在很多凋亡信号的传导过程中发挥重要作用^[5]。鸡豆黄素 A (biochanin A, Bioch A) 是从鹰嘴豆等豆科植物中提取分离的异黄酮类有机化合物, 是一种天然的植物雌激素, 该课题组前期实验表明 Bioch A 对 DA 能神经元发挥保护作用与其对小胶质细胞活化, 炎症相关因子分泌和氧化应激等的抑制有关^[6-7]。然而, Bioch A 能否直接保护神经元尚待进一步研究。该文通过 1-甲基-4-苯基吡啶离子 (1-methyl-4-phenylpyridinium, MPP⁺) 损伤 PC12 细胞来建立体外模型, 研究 Bioch A 能否通过抗氧化作用而发挥神经元保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 从中国医学科学院协和医科大学基础细胞中心细胞室获得大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤细胞 (pheochromocytoma cell, PC12) 株。

1.1.2 药品与试剂 FBS 和高糖 DMEM 完全培养基购自美国 Gibco 公司; MTT、Bioch A、PI、雌二醇 (Estradiol) 和 DMSO 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 青-链霉素混合溶液、胰蛋白酶 (Trypsin)、ROS 检测试剂盒 (DCFH-DA 荧光探针法)、RIPA 裂解液 (弱)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; PVDF 膜购自美国 Millipore 公司; 超高敏的化学发光底物 (Super Signal West Femto Kit) 购自美国 Thermo 公司; HRP 标记山羊抗兔 IgG (1:10 000) 和 HRP 标记山羊抗鼠 IgG (1:10 000)、PBS 和鼠抗 β -actin 抗体 (1:1 000) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自上海市贝博公司; 一抗兔抗 Caspase-3 (1:1 000) 和兔抗 Caspase-9 (1:1 000) 均购自美国 Bioworld 公司。

1.1.3 主要仪器 倒置显微镜 CHL2FM3 型购自日本 OLYMPUS 公司; 全波长酶标仪 SpectraMax190

2020-05-25 接收

基金项目: 安徽省教育厅自然科学基金 (编号: KJ2018A171); 安徽省自然科学基金 (编号: 1908085MH270)

作者单位: 安徽医科大学药理学教研室, 合肥 230032

作者简介: 俞益桂, 女, 硕士研究生;

尹艳艳, 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: yinyanyan5678@126.com

型购自美国 Molecular Device 公司; 恒温培养箱 HealForce100 型购自香港力康生物科技控股有限公司; bioshine ChemiQ4600 mini 化学发光成像系统购自上海市欧翔科学仪器有限公司; 自动细胞计数分析仪 IC 1000-Countstar 购自睿钰(上海)生物科技有限公司; 流式细胞仪 BD FACSVerser 购自美国 Becton Dickinson 公司; TGL-16H 型高速离心机购自黑马(珠海)医学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 PC12 细胞的培养 将购回的 PC12 细胞接种在含有 10% FBS 和 1% 青-链霉素混合溶液双抗的 DMEM 高糖培养基中于恒温培养箱(5% CO₂, 37 °C) 进行培养。细胞每隔 1 d 更换 1 次培养液 2~3 d 传代 1 次。当细胞生长至对数生长期时, 用胰酶消化细胞并进行传代。

1.2.2 MPP⁺ 和 Bioch A 剂量的筛选 为了检测 MPP⁺ 和 Bioch A 的浓度对 PC12 细胞活力的影响。实验将 PC12 细胞分为 7 组。分别为 MPP⁺ (0、0.125、0.25、0.5、1、2、4 μmol/L) 与 Bioch A (0、0.625、1.25、2.5、5、10、20 μmol/L) 组, 每组加相对应的药物孵育 36 h。36 h 后, 每组加 MTT 20 μl (5 mg/ml) 培育 4 h。4 h 后, 弃去孔中培养液。每孔再加 DMSO 200 μl 振荡 10 min 以便结晶物完全溶解。用酶标仪在 490 nm 波长处测量各孔的吸光度值。

1.2.3 实验分组 本实验 PC12 细胞被分为 6 组。Control 组: 未加任何药物孵育 36 h; MPP⁺ 组: 加入 1 μmol/L 的 MPP⁺ 孵育 36 h; MPP⁺ + Bioch A (1.25、2.5、5 μmol/L) 组: 选用 Bioch A (1.25、2.5、5 μmol/L) 预处理细胞 2 h 后再加入 1 μmol/L 的 MPP⁺ 共同孵育 36 h; E2 组: E2 (0.1 μmol/L) 预处理细胞 2 h 后再加入 1 μmol/L 的 MPP⁺ 共同孵育 36 h。

1.2.4 ROS 检测 使用 DCFH-DA 探针法检测 Bioch A 对 MPP⁺ 刺激的 PC12 细胞的 ROS 表达的影响。加药处理 2 h 后, Control 组除外, 剩余各组加入 MPP⁺ (1 μmol/L) 培养 36 h。36 h 后进行 DCFH-DA 孵育, 孵育完成后, 在显微镜下观察并拍照, 利用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析各组平均荧光强度。

1.2.5 流式细胞仪测定细胞凋亡 用 Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒双染细胞来检测 Bioch A 对 MPP⁺ 刺激的 PC12 细胞凋亡的影响。使用胰蛋白酶消化细胞, 1 000 r/min, 离心 5 min, 弃上清液, PBS 洗 2 次。加 Binding Buffer 400 μl 反复吹打使细胞混和均匀, 细胞浓度高于 1 × 10⁵ 个/ml 为宜,

然后继续加入 Annexin V-FITC 5 μl 摇匀, 在避光条件下 2~8 °C 放置 15 min, 后加入 PI 10 μl 摇匀, 在避光 2~8 °C 下静置 5 min, 最后用流式细胞仪和显微镜检测。

1.2.6 Western blot 在培养好的细胞中加入含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液提取蛋白。BCA 试剂盒定量后各组取适量样品按样品和蛋白上样缓冲液 4:1 比例进行变性。将变性后蛋白加入进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜, 后用脱脂奶粉和 TBST 溶液配制成浓度为 5% 的封闭液室温下封闭 1 h, 封闭好的膜用 TBST 洗 3 次, 后将膜置于相应的一抗中 4 °C 过夜。次日, TBST 洗 3 次后, 室温孵二抗 1 h, 然后再用 TBST 洗 3 次, 再按 1:1 比例配制 ECL 发光液, 将膜放在显影仪中曝光, 保存。用 Image J 软件对蛋白条带的灰度值进行分析。

1.3 统计学处理 所有的实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组均数比较采用 SPSS 13.0 统计软件进行 ANOVA 单因素的方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MPP⁺ 和 Bioch A 剂量的筛选 采用 MTT 法检测细胞活力为后续实验筛出合适的 MPP⁺ 和 Bioch A 剂量。从表 1 结果可以看出, MPP⁺ 剂量和细胞活力呈负相关, 剂量增加活力下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。大多情况下, 在 MPP⁺ 刺激细胞凋亡模型中, 细胞活力选择在 50%~60% 比较适宜, 因此选取 MPP⁺ (1 μmol/L) 来刺激 PC12 细胞凋亡。从表 2 结果可以看出, PC12 细胞中加入 Bioch A (0.625、1.25、2.5、5、10、20 μmol/L) 36 h 后, Bioch A (0.625、1.25、2.5、5 μmol/L) 组与 Control 组比较, 细胞活力无明显变化, 因此选取 3 个浓度梯度的 Bioch A (1.25、2.5、5 μmol/L) 进行后

表 1 MPP⁺ 对 PC12 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量(μmol/L)	PC12 细胞活力(%)
Control	—	100.000
MPP ⁺	0.125	85.380 ± 3.650*
	0.250	81.560 ± 6.470*
	0.500	55.870 ± 6.472*
	1.000	53.883 ± 2.120**
	2.000	51.744 ± 1.300**
	4.000	44.869 ± 4.709**
F 值		24.750
P 值		<0.001

与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表2 Bioch A 对 PC12 细胞活力的影响($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

组别	剂量($\mu\text{mol/L}$)	PC12 细胞活力(%)
Control	—	100.000
Bioch A	0.625	102.240 $\pm$ 7.900
	1.250	100.630 $\pm$ 7.010
	2.500	100.640 $\pm$ 16.770
	5.000	101.910 $\pm$ 20.250
	10.000	75.510 $\pm$ 6.394*
	20.000	53.170 $\pm$ 6.684**
F 值		2.870
P 值		0.049

与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

续实验。

2.2 Bioch A 对 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞 ROS 表达的影响 使用 DCFH-DA 荧光探针,来检测 MPP⁺ 刺激的 PC12 细胞 ROS 的荧光强度,用统计学手段分析各组 ROS 的表达情况。从图 1 所示结果可以看出,MPP⁺ 模型组相较于 Control 组,ROS 荧光强度增加;Bioch A(2.5、5 $\mu\text{mol/L}$) 组以及 E2 组与 MPP⁺

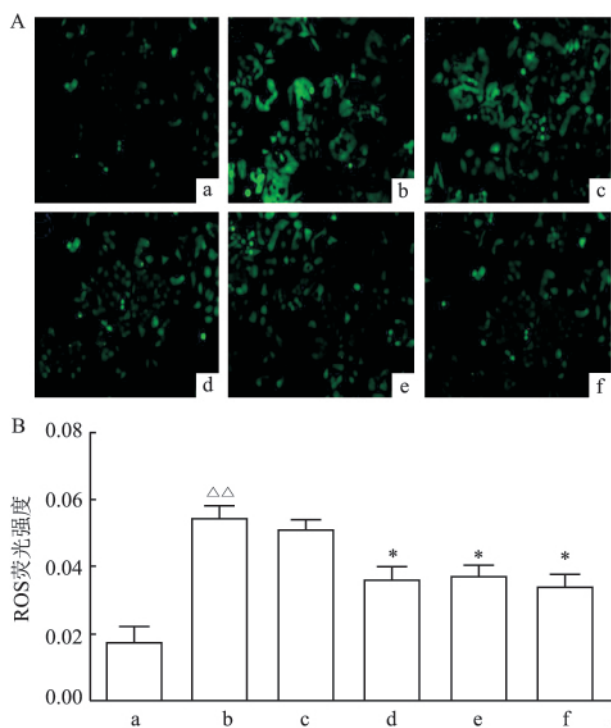


图1 Bioch A 对 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞 ROS 表达的影响
($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

A: DCFH-DA 探针检测 MPP⁺ 刺激的 PC12 细胞内 ROS 荧光强度 $\times 400$; B: 各处理组中 ROS 的比例; a: Control 组; b: MPP⁺ (1 $\mu\text{mol/L}$) 组; c: Bioch A (1.25 $\mu\text{mol/L}$) + MPP⁺ 组; d: Bioch A (2.5 $\mu\text{mol/L}$) + MPP⁺ 组; e: Bioch A (5 $\mu\text{mol/L}$) + MPP⁺ 组; f: E2 (0.1 $\mu\text{mol/L}$) + MPP⁺ 组; 与 Control 组比较: △△ $P < 0.01$; 与 MPP⁺ 比较: * $P < 0.05$

组比较,ROS 表达量均有所减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。以上结果表明,Bioch A 可以对 MPP⁺ 刺激的 PC12 细胞内 ROS 的表达增加有一定的抑制作用。

2.3 Bioch A 对 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞凋亡的影响 采用 Annexin V-FITC/PI 双染法和流式细胞仪来检测 Bioch A 对 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞凋亡的影响。从如图 2 所示结果可以看出,MPP⁺ 处理 36 h 后,MPP⁺ 组相较 Control 组,细胞凋亡率达到(44.43 $\pm$ 4.95) % ($P < 0.01$); Bioch A (2.5、5 $\mu\text{mol/L}$) 预处理组与 MPP⁺ 组比较,细胞凋亡百分率降至(31.57 $\pm$ 2.25) % 和(27.53 $\pm$ 1.75) % ($P < 0.05$, $P < 0.01$); E2 预处理组与 MPP⁺ 组比较,细胞凋亡百分率降至(19.63 $\pm$ 1.95) % ($P < 0.01$)。

2.4 Bioch A 对 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞 cleaved Caspase-3 和 cleaved Caspase-9 蛋白表达的影响

采用 Western blot 法来检测 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞中 cleaved Caspase-3 和 cleaved Caspase-9 蛋白的表达情况,结果如图 3 所示,MPP⁺ 组相较于 Control 组,cleaved Caspase-3 和 cleaved Caspase-9 蛋白的表达增多,差异有统计学意义($P < 0.01$); Bioch A (2.5、5 $\mu\text{mol/L}$) 组以及 E2 组与 MPP⁺ 组比较,cleaved Caspase-3 和 cleaved Caspase-9 蛋白水平均有所降低($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结果表明,Bioch A 对 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞的 cleaved Caspase-3 和 cleaved Caspase-9 蛋白水平增加有一定的抑制作用。

3 讨论

中枢退行性疾病与神经元功能的丧失有一定关联,PD 患者的黑质致密部 80% 的 DA 能神经元丧失了正常的功能。近年来,外源性的神经毒素诱导形成的 PD 细胞模型已成为 PD 发病机制重要的研究手段^[8]。来源于大鼠肾上腺髓质嗜铬细胞瘤的 PC12 细胞株,具有神经细胞的特性,且可稳定传代。MPP⁺ 是一种神经毒素,能够引起神经细胞的氧化应激,因此可作为诱导剂为 PD 的发病机制研究制备细胞模型^[9]。MPP⁺ 可以直接被 DA 转运蛋白有选择性的转运至 DA 能神经元,使神经元线粒体功能出现障碍,进而导致细胞凋亡的出现^[10]。本实验采用 MPP⁺ 刺激 PC12 细胞凋亡建立体外 PD 模型,观察 Bioch A 对 MPP⁺ 刺激的 PC12 细胞凋亡的作用。不同浓度 MPP⁺ 处理细胞,结果显示 1 $\mu\text{mol/L}$ MPP⁺ 处理细胞能引起大约 50% 细胞凋亡,因此本实验选用 1 $\mu\text{mol/L}$ MPP⁺ 用于后续建模。

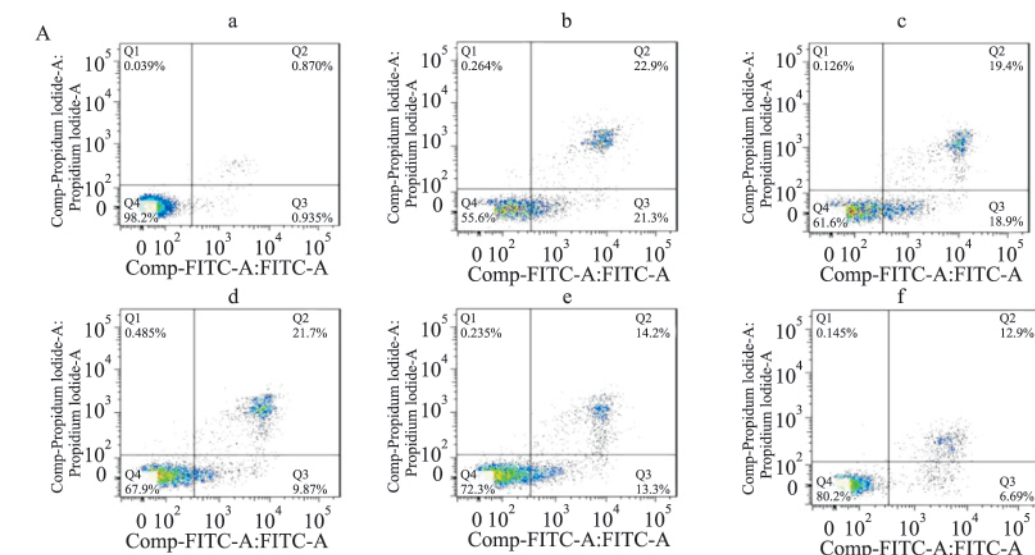


图2 细胞流式检测 Bioch A 对 MPP⁺ 诱导的 PC12 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

A: 流式细胞仪检测 Annexin V-FITC/PI 双荧光; B: 各处理组中 PC12 细胞凋亡的百分率; a: Control 组; b: MPP⁺ (1 μmol/L) 组; c: Bioch A (1.25 μmol/L) + MPP⁺ 组; d: Bioch A (2.5 μmol/L) + MPP⁺ 组; e: Bioch A (5 μmol/L) + MPP⁺ 组; f: E2 (0.1 μmol/L) + MPP⁺ 组; 与 Control 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 MPP⁺ 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

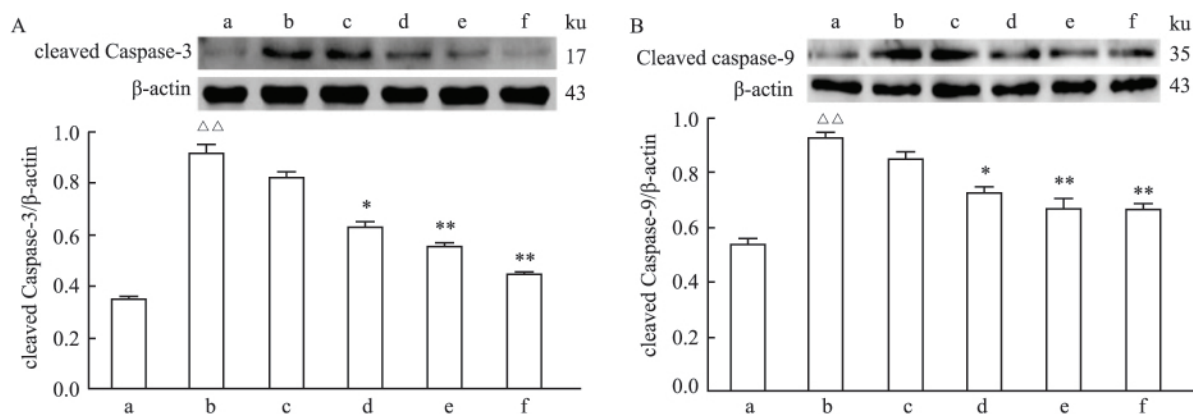


图3 Western Blot 检测 cleaved Caspase-3 和 cleaved Caspase-9 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

A: cleaved Caspase-3/β-actin 相对灰度值比较; B: cleaved Caspase-9/β-actin 相对灰度值比较; a: control 组; b: MPP⁺ (1 μmol/L) 组; c: Bioch A (1.25 μmol/L) + MPP⁺ 组; d: Bioch A (2.5 μmol/L) + MPP⁺ 组; e: Bioch A (5 μmol/L) + MPP⁺ 组; f: E2 (0.1 μmol/L) + MPP⁺ 组; 与 Control 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 MPP⁺ 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

氧化应激与许多人类变性疾病有关,如癌症、动脉粥样硬化以及神经退行性病变等,近年的研究^[11]表明氧化应激与 PD 的发生发展密不可分。ROS 增加是氧化应激的主要标志,在正常的机体或细胞内,ROS 总是与内在的抗氧化系统处于动态平衡中。当受到外界刺激时,平衡被破坏,从而产生氧化应激^[12]。在本实验中,Bioch A 预处理能够有效抑制 MPP⁺ 组中的 ROS 的升高。此结果提示 Bioch

A 可以减轻 PC12 细胞中 MPP⁺ 诱导的氧化应激。此外,由于 ROS 作为凋亡启动的一个重要条件,所以 Bioch A 也可能调节了细胞的凋亡过程。

Caspase 家族的活化被认为是凋亡的直接效应物,因为其在凋亡进程中起到了不可忽视的作用。ROS 等因素刺激线粒体,致使线粒体损伤和膜电位的下降,细胞色素 C 从受损的线粒体中释放,细胞色素 C 和 Caspase-9 酶原共同作用形成凋亡复合

体,其释放并使 Caspase-9 活化,随即活化的 Caspase-9 进一步刺激 Caspase-3,降解底物导致细胞凋亡^[13]。Caspase-3 是细胞凋亡的常见途径和执行者,其活化表明细胞凋亡进入了难以逆转的阶段,它的表达很大程度上能反映出细胞凋亡情况^[14-15]。一般情况下,Caspase-3 在细胞质内处于无活性状态,但当其被外界刺激所影响时便可触发自我凋亡程序,通过关键蛋白酶的激活而加快细胞凋亡的进程。根据 Western blot 结果可以看出,Bioch A 预处理能够抑制 MPP⁺ 刺激的 PC12 细胞 Caspase-3 和 Caspase-9 的活化。表明 Bioch A 对 PC12 细胞的凋亡起到一定程度的抑制作用。

参考文献

- [1] Pan P Y, Li X, Wang J, et al. Parkinson's disease-associated LRRK2 hyperactive kinase mutant disrupts synaptic vesicle trafficking in ventral midbrain neurons [J]. *J Neurosci*, 2017, 37 (47): 11366-76.
- [2] Gonzalez-Hernandez T, Cruz-Muros I, Afonso-Oramas D, et al. Vulnerability of mesostriatal dopaminergic neurons in Parkinson's disease [J]. *Front Neuroanat*, 2010, 4: 140.
- [3] Yang C, Mo Y, Xu E, et al. Astragaloside IV ameliorates motor deficits and dopaminergic neuron degeneration via inhibiting neuroinflammation and oxidative stress in a Parkinson's disease mouse model [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 75: 105651.
- [4] Rowley S, Patel M. Mitochondrial involvement and oxidative stress in temporal lobe epilepsy [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 62: 121-31.
- [5] Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, et al. Old, new and emerging functions of caspases [J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22(4): 526-39.
- [6] Chen H Q, Wang X J, Jin Z Y, et al. Protective effect of isoflavones from *Trifolium pratense* on dopaminergic neurons [J]. *Neurosci Res*, 2008, 62(2): 123-30.
- [7] Chen H Q, Jin Z Y, Li G H. Biochanin A protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced damage through inhibition of microglia activation and proinflammatory factors generation [J]. *Neurosci Lett*, 2007, 417(2): 112-7.
- [8] 陈璐, 张丽慧, 张家凤, 等. 帕金森病细胞模型及实验研究 [J]. *健康研究*, 2013, 33(3): 179-83.
- [9] Shin Do Y, Yamanaka R, Suzuki K, et al. Altered expression of Mg(2+) transport proteins during parkinson's disease-like dopaminergic cell degeneration in PC12 cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1863(8): 1979-84.
- [10] Xu L L, Wu Y F, Yan F, et al. 5-(3,4-Difluorophenyl)-3-(6-methylpyridin-3-yl)-1,2,4-oxadiazole (DDO-7263), a novel Nrf2 activator targeting brain tissue, protects against MPTP-induced subacute Parkinson's disease in mice by inhibiting the NLRP3 inflammasome and protects PC12 cells against oxidative stress [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 134: 288-303.
- [11] 朱羽婷, 朱向阳, 周永, 等. 氧化应激与帕金森病 [J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2019, 22(11): 1271-76.
- [12] Huang P S, Wang C S, Yeh C T, et al. Roles of Thyroid Hormone-Associated microRNAs Affecting Oxidative Stress in Human Hepatocellular Carcinoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, doi: 10.3390/ijms20205220.
- [13] 刘春华, 刘捷. 神经元凋亡与 Caspase 家族及细胞周期研究进展 [J]. *人民军医*, 2018, 61(7): 641-4.
- [14] Katayama S, Shimoda K, Takenaga Y. Loss of ADAR1 in human iPS cells promotes caspase-3-mediated apoptotic cell death [J]. *Genes Cells*, 2015, 20(8): 675-80.
- [15] 姜新, 张鑫, 顾欣霞, 等. 虫草素抑制帕金森病细胞凋亡的 caspase 激活途径研究 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2017, 34(10): 899-904.

The protective effects of Bioch A on MPP⁺ induced PC12 cell apoptosis

Yu Yigui, Xue Haixia, Han Junhui, et al

(Dept of Pharmacology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To observe whether biochanin A (Bioch A) exerts protective effects on MPP⁺-induced PC12 cells apoptosis. **Methods** Effects of MPP⁺ and Bioch A on PC12 cells viability were detected by MTT assay to screen out the MPP⁺-induced apoptosis dose and appropriate Bioch A dose. Conventional cultured PC12 cells were divided into: Control group, MPP⁺ (1 μmol/L) group, Bioch A (1.25 μmol/L) group, Bioch A (2.5 μmol/L) group, Bioch A (5 μmol/L) group and Estradiol (E2) (0.1 μmol/L) group. Reactive oxygen species (ROS) was detected by DCFH-DA probe method. Apoptosis rate was detected by Annexin V-FITC/PI double staining. The expression levels of cleaved Caspase-3 and cleaved Caspase-9 were detected by Western blot method. **Results** Compared with the control group, ROS content increased in MPP⁺ group. Compared with the MPP⁺ group, ROS content decreased in Bioch A (2.5, 5 μmol/L) groups. Compared with the control group, the apoptosis rate and the levels of cleaved Caspase-3 and cleaved Caspase-9 increased in MPP⁺ group. Compared with the MPP⁺ group, the rate of apoptosis and the expression levels of cleaved Caspase-3 and cleaved Caspase-9 decreased in Bioch A (2.5, 5 μmol/L) groups. **Conclusion** Bioch A exerts protective effects on MPP⁺-induced PC12 cells apoptosis.

Key words MPP⁺; reactive oxygen species; apoptosis; PC12 cells; biochanin A