

丹参川芎嗪注射液对 A β 损伤的 PC12 细胞保护作用及机制研究

严钢莉 李朝武 聂海岭 黎逢光 成勇 毛高峰 方煌 魏海燕 谢军

【摘要】 目的 探讨丹参川芎嗪注射液对 A β 损伤的 PC12 细胞可能的保护作用及机制。**方法** 将 PC12 细胞分为 5 组:空白对照组(未加任何处理药物)、A β 诱导组(20 μ mol/L A β 处理组)和预处理组(分别加入浓度为 5 ml/L、10 ml/L、20 ml/L 的丹参川芎嗪注射液孵育 24 h 后加 20 μ mol/L A β)。通过 CCK-8 法检测细胞增殖活性,流式细胞术(FCM)检测细胞凋亡率,Hoechst 33258 染色观察 PC12 细胞核的改变,荧光分光光度计测定 LDH、SOD、GSH 及 caspase-3 活性水平,免疫组织化学方法观察细胞色素 C(Cyt-C)蛋白释放水平,Western Blot 检测 Bcl-2 的表达水平。**结果** 丹参川芎嗪注射液(5、10、20 ml/L)预处理对 A β 诱导的 PC12 细胞损伤有较好的保护作用,其保护作用随着药物浓度的增加而增强。它能增加 A β 损伤的 PC12 细胞增殖活力,减少 A β 诱导的 PC12 细胞凋亡,降低细胞核凝聚现象,抑制 A β 损伤的 PC12 细胞 LDH 释放,增强 SOD 和 GSH 活性,促进 Cyt-C 在细胞内表达,降低 caspase-3 活性,促进 Bcl-2 的表达。**结论** 丹参川芎嗪注射液对 A β 诱导的 PC12 细胞损伤具有与线粒体通路相关的保护作用,其保护作用与它抑制细胞凋亡、抗氧化应激、维持线粒体正常功能、抑制 caspase-3 的激活、促进抗凋亡因子 Bcl-2 的表达有关。

【关键词】 丹参川芎嗪注射液 A β PC12 细胞 凋亡 神经保护

【中图分类号】 R741 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2016)01-0015-06

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2016.01.005

Protective effects and mechanism of salvia and TMP injection on A β -induced injury in PC12 cells Yan Gangli, Li Chaowu, Nie Hailing, et al. Department of Neurology, The Chinese PLA 161th Hospital, Wuhan 430012

【Abstract】 Objective To observe the possible protective effect and mechanism of Salvia and TMP injection on A β -induced injury in PC12 cells. **Methods** PC12 cells were divided into five groups: control group, A β -induced Injury in PC12 cells (Treatment with 20 μ mol/L A β alone); Pretreatment group (Pretreatment with 5ml/L, 10ml/L, 20 ml/L Salvia and TMP Injection on A β -induced Injury in PC12 cells). Then the cell viability was measured by CCK-8, apoptotic rate was measured by flow cytometry, variation of nucleus was measured by Hoechst33258 dye, and the vitality of LDH, SOD, GSH and caspase-3 were measured by the kits, respectively. Immunohistochemical method was used to observe Cyt-C protein release. And western blot was used to detecting Bcl-2 protein expression. **Results** Salvia and TMP injection (5, 10, 20 μ mol/L) pretreatment can protect the PC12 cells injured by A β which protective effect was increased with higher drug concentration. Salvia and TMP injection can promote cells proliferation, reduces apoptosis and nuclei condensation, inhibit LDH release, increase SOD, GSH activation, decrease caspase-3 activation, help Cyt-C and Bcl-2 generation. **Conclusion** Salvia and TMP injection have neuroprotective effect of PC12 cells induced by A β which was related with anti-oxidative stress, maintenance of mitochondrial function, improvement of the anti-apoptotic factor Bcl-2 and inhibition of caspase-3 activation. Salvia and TMP injection may be used to cure neurodegenerative disease such as AD.

【Key words】 Alvia and TMP injection A β PC12 cells Apoptosis Neuroprotection

阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD)是较常

见的中老年神经系统退行性疾病,主要表现为进行性记忆能力下降、认知功能障碍和精神行为的异常,严重影响患者的生活质量。AD 在老年期痴呆中发病率最高,约占痴呆患者的 50%~60%。随着人口老龄化的加速,AD 的发病率呈逐年上升趋势^[1]。

尸检发现,AD 患者脑内神经细胞出现大量凋亡、神经元细胞外老年斑沉积和胞内神经纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFT),其主要是由于 β -淀粉样蛋白(β amyloid protein, A β)、自由基、兴奋性氨基酸、神经毒素、Ca²⁺ 超载、炎症等有害因子的共同作用所致^[2-3]。因此,国内外均有将 A β 诱导具有神经元细胞特性的 PC12 细胞作为病体外 AD 细胞模型^[4]。

近年国内有报道证实川芎嗪、丹参素均具有神经保护作用,可参与神经组织修复。川芎嗪的化学结构为四甲基吡嗪(TMP),可透过血脑屏障,通过阻滞钙离子通道、清除氧自由基、影响内皮素和 NO 合成等对中枢神经系统产生多种作用,具有扩张血管、抑制血小板聚集、改善微循环、抗脂质氧化等作用^[5-6]。丹参素可改善脑损伤所致的线粒体氧化磷酸化功能障碍,抑制脑损伤对线粒体的损害;丹参素还可以稳定线粒体膜电位(MMP),调节神经元的能量代谢抑制其凋亡^[7-8]。

本研究拟以 A β 诱导 PC12 细胞损伤建立 AD 细胞模型,通过细胞生物学、分子生物学等实验技术进行深入研究,探讨丹参川芎嗪注射液对 A β 诱导 PC12 细胞损伤的可能保护作用及机制,为 AD 防治提供新的治疗途径。

1 材料与方法

1.1 试剂

丹参川芎嗪注射液(贵州拜特制药有限公司,含盐酸川芎嗪100 mg与丹参素2 mg);A β 25-35(美国 Sigma 公司),-20℃保存,使用前7 d用去离子水配置(终浓度1 mmol/L)置于37℃水浴箱孵育;高糖培养基(DMEM)、胎牛血清(FBS)(美国 Gibco 公司);AnnexinV-FITC、PI(碘化丙啶)、CCK-8、Hoechst 33258(上海碧云天生物公司);LDH、SOD、GSH 试剂盒、caspase-3 试剂盒(上海宸凛生物公司),Cyt-C 抗体、Bcl-2 抗体、GAPDH 抗体(艾博抗上海贸易有限公司)。

1.2 细胞培养及处理

PC12 细胞为大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞株,购于中国科学院上海细胞生物研究所,使用含 10% FBS + 100 U/ml 青霉素的 DMEM 5% CO₂ 37℃ 培养箱孵育。待细胞在培养皿内生长密度达单层 70%,0.25% 胰蛋白酶常规消化,细胞传代培养。按实验要求确定细胞的接种密度。PC12 细胞分组如下:(1)空白对照组未加任何处理药物;(2)A β 诱导

组加入 A β 20 μ mol/L 处理;(3)预处理组分别加入终浓度为 5、10、20 ml/L 的丹参川芎嗪注射液孵育 24 h 后再加入 A β 20 μ mol/L。同批实验,每组设置 3 个复孔。所有的实验在相同的条件下重复 3 次。

1.3 细胞增殖活力测定

CCK-8 测定各组细胞活力。取对数生长期细胞,以 1.6×10^3 /孔种植于 96 孔板。细胞分组处理后,每孔加入 1 μ l 的 CCK-8 溶液,37℃ 下孵育 1 h,酶联免疫检测仪 570 nm 处测量每孔的吸光度值。细胞活力以与空白组相比的百分比表示。

1.4 FCM 检测

PC12 细胞以 2.5×10^5 /mL 的密度接种于 60 mm 培养皿,分组处理后收集,1500 r/min 离心 7 min,弃上清,预冷的 PBS 溶液冲洗沉淀 2 次,将细胞密度调整为 1×10^6 /mL;70% 冰乙醇悬浮细胞 4℃ 固定过夜,1500 r/min 4℃ 离心 10 min, PBS 冲洗沉淀 2 次,细胞重新悬浮于 1 mL 的结合缓冲液,加入 AnnexinV-FITC 10 μ L、PI 5 μ L,4℃ 避光孵育 30 min,即刻上机检测。PI 用氩离子激发荧光,激发光波波长 488 nm,发射光波波长大于 630 nm,流式细胞仪检测分析。

1.5 细胞核染色检测

PC12 细胞接种于盖玻片,按分组要求处理,预冷的 PBS 漂洗细胞 2 次,4% 多聚甲醛 4℃ 包埋 45 min, PBS 冲洗后加入 Hoechst 33258 溶液 (10 μ g/mL),室温避光放置 5 min,用含抗荧光衰退功能的介质包埋,荧光显微镜观察拍照。正常的细胞核为弥漫且均匀的低强度荧光;凋亡的细胞核为浓染致密的固缩形态或者发出颗粒样荧光。凋亡率 = 凋亡细胞/总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.6 LDH、SOD、GSH 活力测定

PC12 细胞按 $1 \sim 2 \times 10^5$ /孔接种于 24 孔板中,分组处理后 PBS 冲洗,1500 r/min 离心 7 min,收集细胞,预冷的 PBS 冲洗,悬浮于 0.5 ml 的缓冲液,4℃ 3000 r/min 离心 17 min。取上层液,使用全自动定量酶标仪分别在波长 440 nm、550 nm、412 nm 处进行 LDH、SOD 及 GSH 活力测定,活力值使用标准曲线计算。

1.7 caspase-3 酶活性检测

按照 Caspase-3 试剂盒说明书操作。细胞分组处理后收集细胞,悬浮于细胞裂解缓冲液 (25 μ L/10⁶ 个细胞),冰上裂解 10 min,4℃ 15000 r/min 离心 17 min,50 μ L 上清液、148 μ L 结合缓冲液 (含 DMSO

2 μL 、0.1 mM DTT 10 μL)、2 μL DEVD-pNA (caspase-3 显色底物)混合后加入 96 孔黑板,避光孵育 4 h。酶标仪于波长 405 nm 处检测吸光度值。

1.8 Cyt-C 免疫细胞化学染色

PC12 细胞常规爬片、药物处理后,用预冷的 PBS 漂洗细胞 3 min \times 2 次,再次清洗、固定及封闭,加入 1:100 的一抗,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。用辣根过氧化物酶标记的 1:100 的二抗室温孵育 30 min, PBS 冲洗 3 min \times 3 次;加入 SABC 复合物 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min, PBS 冲洗 3 min \times 3 次;DAB 显色后使用苏木素复染、乙醇梯度脱水、二甲苯透明,最后封片观察。光镜下观察。

1.9 Western blotting

各组细胞裂解后提取总蛋白,根据申能博彩 BCA 法测定蛋白水平,蛋白进行定量后将上样蛋白配置为每孔 70 μg /10 μL 。SDS-PAGE 凝胶电泳分离,转膜,脱脂牛奶封闭,室温封闭 1 h,加入一抗 (1:500),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。第 2 d 加入二抗 HRP (1:500),室温 1 h,洗涤 3 次后,使用 ABI Veriti 显影、拍照。

1.10 统计学处理

计量数据使用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述,单因素方差分析 (Dunnett'- t 检验) 进行组间比较。采用 SPSS 18.0 统计软件包,以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 丹参川芎嗪注射液对 $\text{A}\beta$ 引起的 PC12 细胞增殖活力的影响

与未处理的空白组 (空白对照组) PC12 细胞比较,5、10、15、20、25、30 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组细胞活力分别下降了 19.3%、30.4%、56.5%、26.9%、19.7% ($P < 0.05$) (图 1A)。与 $\text{A}\beta$ 组比较,5、10、20 ml/L 丹参川芎嗪注射液预处理组 (预处理组) 细胞活性分别上升 16.2%、30.4%、36.6% ($P < 0.05$) (图 2)。

2.2 丹参川芎嗪注射液对 $\text{A}\beta$ 损伤的 PC12 细胞凋亡率的影响

空白对照组大多为正常活细胞,凋亡细胞占 16.8%; $\text{A}\beta$ 15 $\mu\text{mol/L}$ 处理后凋亡细胞增加至 56.4% ($P < 0.05$); 丹参川芎嗪注射液 (5、10、20 ml/L) 预处理组凋亡细胞数目减少,分别为 34.0% ($P < 0.05$)、23.2% ($P > 0.05$) 和 19.2% ($P > 0.05$)。与 $\text{A}\beta$ 诱导组比较,丹参川芎嗪注射液 (5、10、20 ml/L) 预处理组凋亡率分别增加 22.4%、33.2%、37.2% ($P < 0.05$) (图 2)。

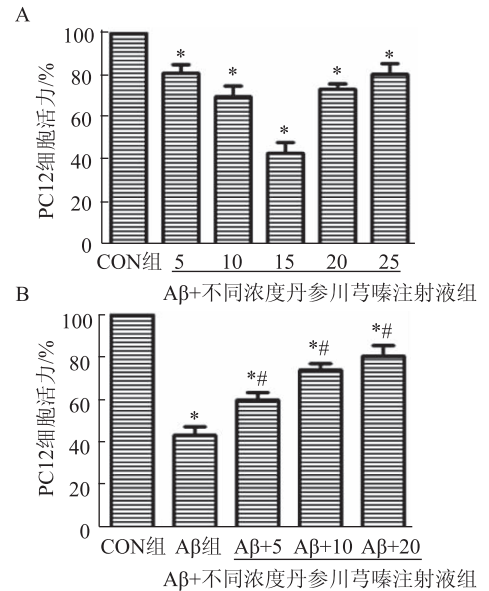


图 1 PC12 细胞活力 A 为不同浓度 $\text{A}\beta$ 对 PC12 细胞活力影响; B 为不同水平丹参川芎嗪注射液对 $\text{A}\beta$ 损伤的 PC12 细胞活力影响; 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与 $\text{A}\beta$ 诱导组比较, # $P < 0.05$

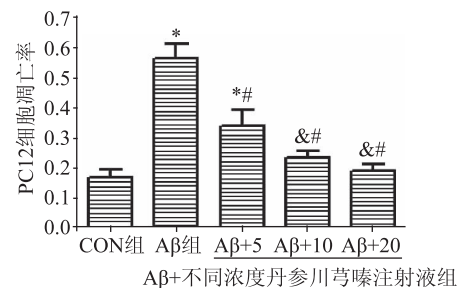


图 2 PC12 细胞凋亡率 与空白对照组比较, * $P < 0.05$, 与空白对照组比较, $\Delta P > 0.05$; 与 $\text{A}\beta$ 诱导组比较, # $P < 0.05$

2.3 丹参川芎嗪注射液对 $\text{A}\beta$ 损伤的 PC12 细胞核的影响

空白对照组细胞保持正常活性细胞的细胞核状态 (图 3A); $\text{A}\beta$ 诱导组中大多数 PC12 细胞发生凋亡, 出现细胞核凝聚、DNA 断裂 (图 3B)。丹参川芎嗪注射液预处理组 (10 ml/L) PC12 细胞核凝聚现象较 $\text{A}\beta$ 诱导组明显减弱, 即凋亡细胞减少, 活性细胞数目增多 (图 3C)。

2.4 丹参川芎嗪注射液对 $\text{A}\beta$ 损伤的 PC12 细胞的 LDH、GSH、SOD 活力的影响

与空白对照组比较, $\text{A}\beta$ 诱导组 LDH 释放增加, SOD、GSH 活性下降, $P < 0.05$; 与 $\text{A}\beta$ 诱导组比较, 丹参川芎嗪注射液 (5、10、20 ml/L) 预处理组 LDH 释放减少, 而 SOD 和 GSH 活性明显升高, 且

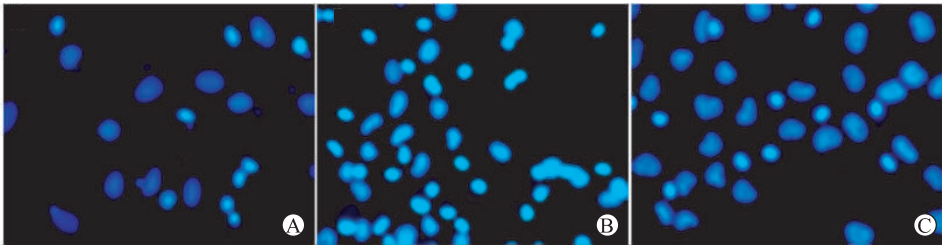


图3 细胞核 Hoechst 33258 染色 A 为空白对照组; B 为 A β 诱导组; C 为 10 ml/L 的丹参川芎嗪注射液孵育 24 h 后加入 15 μ mol/L A β

该改变与丹参川芎嗪注射液水平有关 ($P < 0.05$) (图 4)。

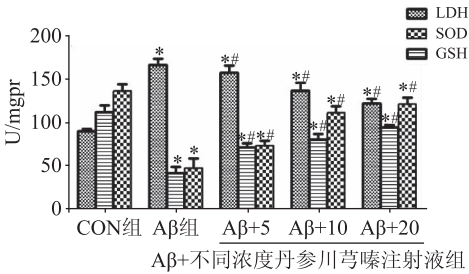


图4 LDH、GSH、SOD 活力测定 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与 A β 诱导组比较, # $P < 0.05$

2.5 丹参川芎嗪注射液对 A β 损伤的 PC12 细胞 Cyt-C 免疫活性影响

空白对照组细胞形态良好, Cyt-C 免疫化学染色

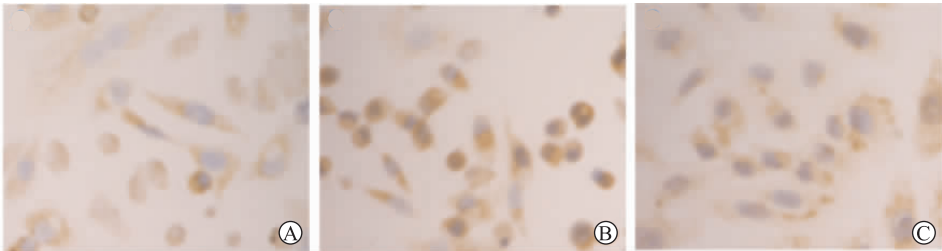


图5 Cyt-C 免疫组织化学染色 A 为空白对照组; B 为 A β 诱导组; C 为 10 ml/L 的丹参川芎嗪注射液孵育 24 h 后加入 15 μ mol/L A β

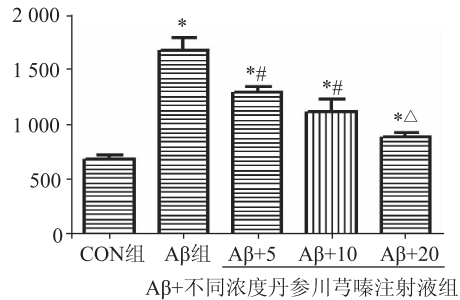


图6 caspase-3 活性测定 与空白对照组比较, * $P < 0.05$, $\Delta P > 0.05$, 与 A β 诱导组比较, # $P < 0.05$

呈淡棕黄色, 均匀分布于胞质及突起内; A β 诱导组部分细胞变圆、皱缩, Cyt-C 在细胞内表达增强, 呈深棕黄色; 相对于 A β 诱导组, 丹参川芎嗪注射液预处理组 Cyt-C 在细胞内着色变浅, 细胞形态结构也有改善 (图 5)。

2.6 丹参川芎嗪注射液对 A β 损伤的 PC12 细胞 caspase-3 活性的影响

与空白对照组比较, A β 诱导组、丹参川芎嗪注射液 (5、10 ml/L) 预处理组细胞 caspase-3 活性升高 ($P < 0.05$), 丹参川芎嗪注射液 (20 ml/L) 预处理组细胞 caspase-3 活性变化不显著 ($P > 0.05$)。与 A β 诱导组比较, 丹参川芎嗪注射液 (5、10、20 ml/L) 预处理组细胞 caspase-3 活性明显下降 ($P < 0.05$), 且下降程度与丹参川芎嗪水平有关 (图 6)。

2.7 丹参川芎嗪注射液对 A β 损伤的 PC12 细胞 Bcl-2 的影响

与空白对照组比较, A β 诱导组和丹参川芎嗪预处理组 Bcl-2 的表达水平均出现下降 ($P < 0.05$)。与 A β 诱导组比较, 丹参川芎嗪注射液 (5 ml/L) 预处理组 Bcl-2 的表达水平差异不明显 ($P > 0.05$); 丹参川芎嗪注射液 (10、20 ml/L) 预处理组 Bcl-2 的表达水平显著增加, 其增加幅度随丹参川芎嗪注射液的药物水平增加而增加 ($P < 0.05$) (图 7)。

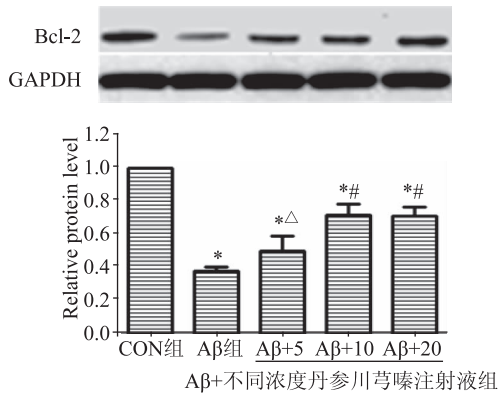


图 7 各组 Bcl-2 表达水平 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; $\Delta P > 0.05$; 与 A β 诱导组比较, # $P < 0.05$

3 讨论

尽管近些年来生物化学、分子生物学、流行病学、遗传学等学科发展使我们更进一步认识 AD, 但对 AD 的病因和发病机理还存在很多不明因素。通常认为 AD 是多基因遗传疾病, 发病原因与年龄、性别、能量代谢障碍、免疫功能异常、内分泌、感染等遗传和环境因素有关。在各种 AD 发病学中 β 淀粉样蛋白学说、氧化应激学说、神经递质代谢障碍学说是 AD 发生发展普遍公认的机制。最近研究提示, A β 可与 N-甲基-D-天冬氨酸受体(N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDA 受体)结合, 从神经细胞外转运到胞内, 再与 A 单体装配形成寡聚体 A β , 进一步促进 tau 蛋白的过度磷酸化和神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFT), 引起胞内 Ca^{2+} 超载、线粒体氧化损伤及氧化应激^[9-11]。

本实验结果发现与 A β 诱导组比较, 丹参川芎嗪注射液孵育后细胞增殖活力增加、凋亡减少, 表明 A β 诱导的细胞损伤受到丹参川芎嗪注射液的抑制。同时本研究发现丹参川芎嗪注射液孵育后受损细胞的 SOD、GSH 活性提高, 而 LDH 的释放减少。该结果表明丹参川芎嗪注射液的神经元保护作用与细胞内的氧化应激反应相关联, 其可以激活细胞内的抗氧化系统的防御反应, 清除异常增多的活性氧成分。

很多研究显示, 在神经退行性疾病患者的海马区存在有 caspases 蛋白的活化。Caspases 为半胱氨酸蛋白酶家族, 在启动神经元异常凋亡途径中有重要影响, 因此是 AD 发病的主要途径之一^[12-13], 其中 Caspase-3 被认为是促进细胞死亡的较为常见的细胞内蛋白酶。内源性内质网和线粒体的凋亡途径亦在细胞凋亡过程中起其关键性作用^[14-15]。多种刺

激因子如淀粉样蛋白 β 、肿瘤坏死因子 α 、活性氧、化学治疗、DNA 损伤剂和辐射等均能损伤线粒体, 增加线粒体膜通透性(MOMP), 促进因子如 Cyt-C、Omi 等从线粒体内释放到细胞液, 直接或间接启动 Caspases 相关凋亡途径^[16-18]。Bcl-2 家族是线粒体凋亡的重要调控因子。Bcl-2 能改变 MOMP, 减少凋亡促进因子的释放^[19]; Bcl-2 能降低 BAX 介导的 Cyt-C 释放、抑制 Caspase 激活、抑制凋亡诱导蛋白(AIF)从线粒体转移到细胞核^[20-21]。同时 Bcl-2 还能促进氧化应激下的 DNA 修复^[22]。因此, 本研究可以认为抑制 Caspases 激活、促进凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的高表达可减少细胞凋亡, 促进受损神经元细胞的功能恢复。

本研究发现, A β 损伤 PC12 细胞后 Caspase-3 活性明显增强, 细胞核出现凝聚, Cyt-C 表达增强, 而丹参川芎嗪注射液预处理后 Caspase-3 活性被显著抑制, 细胞核凝聚现象改善, Cyt-C 表达减少, 凋亡抑制因子 Bcl-2 的表达量随着丹参川芎嗪注射液水平增加而增加。该结果说明丹参川芎嗪注射液预处理对 PC12 细胞的神经保护作用可能通过抑制 Caspases-3 活性、改善 MOMP、促进 Bcl-2 表达等途径实现。

综上所述, 丹参川芎嗪注射液具有强大的抗氧化、抗凋亡活性, 对 A β 诱导的神经元损伤有着多重的保护作用, 也许可以用来治疗如 AD 等神经变性疾病。

参考文献

- [1] Bames DE, Yaffe K. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence[J]. Lancet Neurol, 2011, 10(9): 819-828.
- [2] Matveev SV, Spielmann HP, Metts BM, et al. A distinct subfraction of A β is responsible for the high-affinity Pittsburgh compound B-binding site in Alzheimer's disease brain[J]. J Neurochem, 2014, 131(3): 356-368.
- [3] Veerhuis R. Histological and direct evidence for the role of complement in the neuroinflammation of AD[J]. Curr Alzheimer Res, 2011, 8(1): 34-58.
- [4] Ma B, Meng X, Wang J, et al. Notoginsenoside R1 attenuates amyloid- β -induced damage in neurons by inhibiting reactive oxygen species and modulating MAPK activation[J]. Int Immunopharmacol, 2014, 22(1): 151-159.
- [5] 温旭敏, 魏涛, 白利萍, 等. 川芎嗪对 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞凋亡的保护作用研究[J]. 中国药物与临床, 2013, 13(1): 25-27.
- [6] 纳鑫, 汪雪兰, 皮荣标. 川芎嗪对中枢神经系统的药理作用及其机制的研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2008, 19(1): 77-80.
- [7] 殷明伟, 王利枝, 蒋燕, 等. 七味中药对酒精致 PC12 细胞保护

- 作用的研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(7): 1602-1604.
- [8] Meng XF, Zou XJ, Peng B, et al. Inhibition of ethanol-induced toxicity by tanshinone IIA in PC12 cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2006, 27(6): 659-664.
- [9] Salazar-Weber NL, Smith JP. Copper inhibits NMDA Receptor-Independent LTP and modulates the Paired-Pulse ratio after LTP in mouse hippocampal slices[J]. Int J Alzheimers Dis, 2011, 2011: 864753.
- [10] Chohan MO, Iqbal K. From tau to toxicity: emerging roles of NMDA receptor in Alzheimer's disease[J]. J Alzheimers Dis, 2006, 10(1): 81-87.
- [11] Pohanka M. Alzheimer's disease and oxidative stress: a review [J]. Curr Med Chem, 2013, 21(3): 356-364.
- [12] Lee S, Shea TB. Caspase-mediated truncation of tau potentiates aggregation[J]. Int J Alzheimers Dis, 2012: 731063.
- [13] Rohn TT, Head E. Caspase activation in Alzheimer's disease: early to rise and late to bed[J]. Rev Neurosci, 2008, 19(6): 383-393.
- [14] Luo DJ, Feng Q, Wang ZH, et al. Knockdown of phosphotyrosyl phosphatase activator induces apoptosis via mitochondrial pathway and the attenuation by simultaneous tau hyperphosphorylation[J]. J Neurochem, 2014, 130(6): 816-825.
- [15] Yan MH, Wang X, Zhu X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease [J]. Free Radic Biol Med, 2013, 62: 90-101.
- [16] Krajewski S, Bodrug S, Krajewska M, et al. Immunohistochemical analysis of Mcl-1 protein in human tissues. Differential regulation of Mcl-1 and Bcl-2 protein production suggests a unique role for Mcl-1 in control of programmed cell death in vivo[J]. Am J Pathol, 1995, 146(6): 1309-1319.
- [17] Naderi J, Somayajulu-Nitu M, Mukerji A, et al. Water-soluble formulation of Coenzyme Q10 inhibits Bax-induced destabilization of mitochondria in mammalian cells[J]. Apoptosis, 2006, 11(8): 1359-1369.
- [18] Verma YK, Gangenahalli GU, Singh VK, et al. Cell death regulation by B-cell lymphoma protein[J]. Apoptosis, 2006, 11(4): 459-471.
- [19] Liu J, Li ZS, Wan XJ, et al. Expression and function of apoptosis-related genes Bcl-2/Bax and Fas/Fas L in the course of stress ulcer[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2003, 83(6): 504-509.
- [20] Cui S, Sun Y, Liu C. Effect of bushenyisui formula on brain tissue apoptosis and Bcl-2 in beta-amyloid protein-induced Alzheimer's disease rat models[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2012, 32(4): 646-650.
- [21] Onyango I, Khan S, Miller B, et al. Mitochondrial genomic contribution to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease [J]. J Alzheimers Dis, 2006, 9(2): 183-193.
- [22] Onyango I, Khan S, Miller B, et al. Mitochondrial genomic contribution to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease [J]. J Alzheimers Dis, 2006, 9(2): 183-193.

(2015-09-07 收稿)

• 投稿要求 •

《卒中与神经疾病》统计学要求

统计学符号:按照 GB3358. 1-2009《统计学词汇及符号》的有关规定,统计学符号一律采用斜体排印。常用的有:(1)样本的算术平均数用英文小写 (\bar{x});中位数用英文大写 M ; (2)标准差用英文小写 s ; (3)标准误用英文小写 $S_{\bar{x}}$; (4) t 检验用英文小写 t ; (5) F 检验用英文大写 F ; (6)卡方检验用希腊文小写 χ^2 ; (7)相关系数用英文小写 r ; (8)自由度用希腊文小写 ν ; (9)概率用英文大写 P 。

统计学研究设计:应交代统计研究设计的名称和主要做法。如调查设计,实验设计,临床试验设计(应交代属于第几期临床试验,采用了何种盲法措施等)。

主要做法应围绕 4 个基本原则(随机、对照、重复、均衡)概要说明,尤其要交代如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

资料的表达与描述:用 $(\bar{x} \pm s)$ 表达近似服从正态分布的定量资料,用 $M(QR)$ 表达呈偏态分布的定量资料。使用统计表时,要合理安排纵横标目,并将数据的含义表达清楚;使用统计图时,所用统计图的类型应与资料性质相匹配,并使数轴上刻度值的标度符合数学原则;使用相对数时,分母不宜 < 20 ,要注意区分百分率与百分比。

统计学分析方法的选择:对于定量资料,应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 t 检验和单因素方差分析;对于定性资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件以及分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 χ^2 检验。对于回归分析,应结合专业知识和散布图,选用合适的回归类型,不应盲目套用简单直线回归分析,对具有重复实验数据的回归分析资料,不应简单化处理;对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计学分析方法,以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系进行全面、合理的解释和评价。

统计结果的解释和表达:当 $P < 0.05$ (或 $P < 0.01$) 时,应说明对比组之间的差异具有统计学意义,而不应说对比组之间具有显著性(或非常显著性)差异;应写明所用统计学分析方法的具体名称(如成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等)。统计量的具体值应明确给出,如 $t = 3.45$, $\chi^2 = 4.68$, $F = 6.79$ 等, P 值亦应尽可能给出具体值(如 $P = 0.0238$)。在使用不等式表示 P 值的情况下,一般选用 $P > 0.05$, $P < 0.05$ 和 $P < 0.013$ 种表达方式即可满足需要,无需再细分为 $P < 0.001$ 或 $P < 0.0001$ 。当涉及总体参数(如总体均数、总体率等)时,在给出显著性检验结果的同时,应再给出 95% 可信区间(95% CI)。