

## 黄芩苷诱导 Jurkat T 细胞凋亡的体外研究

李 林, 曾耀英, 宋 兵, 贺 芳, 赖新强, 黄秀艳

(暨南大学组织移植与免疫中心, 广东 广州 510632)

**[摘 要]** 目的: 研究黄芩苷(BA)抑制 Jurkat T 细胞(人 T 淋巴细胞白血病细胞株)的生长和诱导其凋亡的作用及机制。方法: 以噻唑兰(MTT)比色法测定 BA 对细胞生长的抑制率; 胞内  $[Ca^{2+}]_i$  和线粒体跨膜电势( $\Delta\Psi_m$ )分别用 Fluo-4/AM 和 DiOC<sub>6</sub>(3) 荧光探针标记, 流式细胞仪检测; PI 染色流式细胞术分析细胞周期分布及凋亡率; 凋亡细胞形态以 Hoechst33342/PI 染色后荧光显微镜观察。结果: BA 明显抑制 Jurkat 细胞增殖( $P < 0.01$ ), 并呈时间、浓度依赖性; BA 可浓度依赖的诱导 Jurkat 细胞  $[Ca^{2+}]_i$  浓度上升、线粒体膜电势  $\Delta\Psi_m$  降低, 将细胞周期阻滞在 S 期, 凋亡率增加, 荧光显微镜下可见经 BA(100 mg/L)作用的细胞呈现典型的凋亡核固缩表现, 胞核呈致密浓染的颗粒状荧光。结论: BA 体外显著抑制 Jurkat T 细胞增殖及诱导其凋亡, 其机制可能与胞内  $[Ca^{2+}]_i$  及线粒体依赖的凋亡通路有关。

**[关键词]** 黄芩苷; 胞内钙离子; 线粒体; 细胞周期; 凋亡

**[中图分类号]** R285.5, R979.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2008)06-0573-05

## Effects and mechanism of baicalin in inducing apoptosis of Jurkat cells *in vitro*

LI Lin, ZENG Yao-ying, SONG Bing, HE Fang, LAI Xin-qiang, HUANG Xiu-yan

(Institute for Tissue Transplantation and Immunology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**[Abstract]** **Aim:** To investigate the effects and mechanism of baicalin (BA) on growth inhibition and inducing apoptosis of Jurkat T cell (human T lymphocyte leukemia cell line) *in vitro*. **Methods:** The inhibitory effect of BA on growth of Jurkat cells was measured by MTT assay. Intracellular free  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) and mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) in cells were labeled with Fluo-4/AM and 3, 3'-dihexyloxy carbocyanine iodide [DiOC<sub>6</sub>(3)] and tested by flow cytometry (FCM). The distribution of the cell-cycle and apoptosis rates were analyzed by propidium iodide (PI) staining together with flow cytometry. Observe the morphological changes of the apoptosis cells by fluorescence microscope with Hoechst33342 and PI staining. **Results:** BA could inhibit the growth of Jurkat cells significantly in a time- and dose-dependent manner ( $P < 0.01$ ). BA induced apoptosis,  $[Ca^{2+}]_i$  increase and the decrease of  $\Delta\Psi_m$  of Jurkat cells in a dose-dependent manner, and led the cell-cycle to S arrest ( $P < 0.05$ ). The morphological changes of apoptosis, such as nuclear fragmentation or condensed particles were identified after incubation by BA (100 mg/L). **Conclusion:** BA showed the effects on growth inhibition and inducing ap-

**[收稿日期]** 2008-05-09

**[基金项目]** “973”国家重大基础研究项目(2006CB504200; 2004CB720100); 广东省基金项目(2006B36030016); 广州市科技局科技攻关重点项目(2006Z-E0091)

**[作者简介]** 李 林(1983-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 免疫分子识别与疾病研究

通讯作者: 曾耀英, 研究员, Tel: 020-85226219; E-mail: tzengy@jnu.edu.cn

optosis of Jurkat cells, the mechanism of the action resulted in activating mitochondria and  $\text{Ca}^{2+}$  signaling pathway.

[Key words] baicalin;  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ; mitochondria; cell-cycle; apoptosis

黄芩苷(Baicalin, BA),属葡萄糖醛酸苷类,水解后产生黄芩素和葡萄糖醛酸,临床用于肺炎、高血压、肝炎、感染和先兆流产等疾病的治疗,具有清热解毒、抑菌炎、降压、抗变态反应和清除自由基等多方面的药理作用,并有广泛的抗肿瘤活性<sup>[1-2]</sup>,而且其对人正常造血细胞和组织细胞几乎无损伤作用<sup>[3]</sup>,但对其抗肿瘤的机制研究甚少,所以本研究选用人体淋巴瘤细胞株 Jurkat T 为靶细胞,探讨黄芩苷体外诱导肿瘤细胞凋亡的机制,旨在为黄芩苷治疗肿瘤方面提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

Jurkat T 细胞株购自武汉大学中国典型培养物保藏中心;黄芩苷购自陕西慧科植物开发有限公司;碘化丙锭(propidium iodide, PI)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、四甲基偶氮唑盐溶液(MTT)、TritonX-100、Rnase A 与 EDTA 均购自 Sigma 公司;Fluo-4/AM, DiOC<sub>6</sub>(3) 和 Hoechst33342 均购自美国 Molecular Probes 公司;RPMI-1640 培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、L-谷氨酰胺、青霉素、链霉素与  $\beta$ -巯基乙醇等购自 GibcoBRL 公司。流式细胞仪(FACSCalibur)为美国 Becton Dickinson 公司产品;荧光显微镜型号为 Nikon-TE2000-S。

### 1.2 细胞培养与分组

Jurkat 细胞悬浮于含体积分数为 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养液中,在 37 ℃、体积分数为 5% 的 CO<sub>2</sub> 恒温饱和湿度细胞培养箱内培养。计数并且调整细胞密度至  $5 \times 10^5/\text{L}$ ,加入 6 孔细胞培养板,并使每孔终体积为 4 mL,分对照组和 BA 组(终质量浓度分别为 50、100、200 mg/L);MTT 法检测时,按上述细胞浓度和分组方法,细胞加入到 96 孔板,并增设空白组,只加培养基无细胞。

### 1.3 MTT 法检测 BA 对 Jurkat 细胞生长的抑制率

BA 作用细胞 24、48 h 后,各孔加入四甲基偶氮唑盐溶液(终质量浓度为 0.5 mg/mL),37 ℃避光孵

育 4 h,离心(250 g, 5 min),弃上清液,加入 100  $\mu\text{L}$  DMSO 溶解结晶,酶联免疫标记分析仪于 570 nm 波长检测各孔的吸光度  $A$  值,计算各孔细胞的生长抑制率。细胞生长抑制率 =  $[1 - (A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。

### 1.4 Jurkat 细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度检测

BA 作用细胞 6、12 h 后,各孔加入 Fluo-4/AM 工作液(终浓度为 1  $\mu\text{mol/L}$ ),混匀后 37 ℃、体积分数为 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中蔽光孵育 30 min,收集细胞 PBS 洗涤 2 次(250 g, 5 min),200  $\mu\text{L}$  PBS 重悬细胞,通过流式细胞仪检测。

### 1.5 Jurkat 细胞线粒体跨膜电势( $\Delta\Psi_m$ )检测

用 DMSO 将 DiOC<sub>6</sub>(3) 溶解成 10  $\mu\text{mol/L}$  的储存液,临用前 PBS 稀释成 20 nmol/L 的工作液。BA 作用 24 h 后收集细胞,以 1 mL 4 ℃预冷 PBS 离心(125 g, 5 min)洗涤细胞 2 次,加入 500  $\mu\text{L}$  配好的工作液重悬细胞,置于 37 ℃水浴中 15 min,流式细胞仪检测。

### 1.6 PI 染色分析 Jurkat 细胞周期及凋亡率(APO%)

细胞在铺板前先经无血清 1640 培养基诱导周期同步化,BA 作用 48 h 收获各组细胞,PBS 洗涤 1 次(250 g, 5 min),用体积分数为 70% 乙醇在 4 ℃下固定 30 min,再用 PBS 洗涤细胞 2 次(250 g, 5 min),PI 染液(50 mg/L PI、体积分数为 0.1% Triton X-100、0.1 mmol/L EDTA 及 50 mg/L RNase A)避光染色 30 min,流式细胞术分析细胞周期分布及凋亡率。

### 1.7 Hoechst33342/PI 染色荧光显微镜观察凋亡细胞形态

BA 作用细胞 48 h 后,各孔加入 Hoechst33342 (终质量浓度为 5  $\mu\text{g/mL}$ ),混匀后 37 ℃、体积分数为 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中蔽光孵育 10 min,加入 PI 染液(50 mg/L),混匀后避光孵育 15 min,PBS 洗涤 2 次,重悬,在荧光显微镜下观察。

### 1.8 数据分析与统计

实验结果用统计学软件包 SPSS 10.0 for Win-

dows 进行处理,以(均数±标准差)( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组样品间采用 One-way ANOVA 分析,两组样品间的比较用非配对 Student's *t*-test 检验。

2 结果

2.1 BA 对 Jurkat 细胞增殖的影响

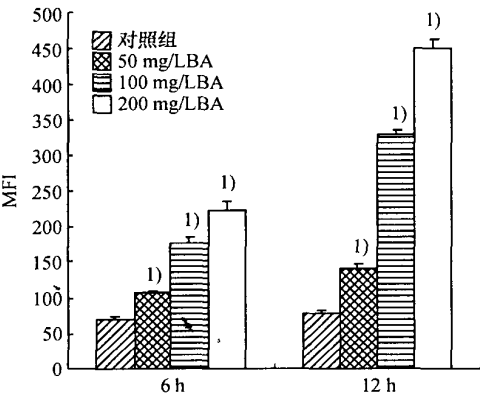
BA 可明显 Jurkat 细胞增殖,且呈时效和量效关系(表 1),不同质量浓度 BA 作用下,细胞增殖抑制率均明显高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

表 1 Baicalin 对 Jurkat 细胞增殖抑制率  
( $\bar{x} \pm s, n=5$ )的影响 %

| <i>t</i> /h | $\rho(\text{BA})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ |         |         |
|-------------|---|---------|---------|
|             | 50  | 100     | 200     |
| 12          | 3.36±1.21   | 9±1.55  | 13±1.92 |
| 24          | 10±2.37   | 22±1.79 | 42±3.83 |
| 48          | 19±2.23   | 36±3.29 | 61±4.51 |

2.2 BA 对 Jurkat 细胞[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>浓度的影响

在不同浓度 BA 处理细胞后,Fluo-4/AM 染色,以平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)来表示[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>浓度,[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>浓度与荧光强度成正比,发现两时间点实验组细胞[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>浓度均显著高于对照组(见图 1),差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。



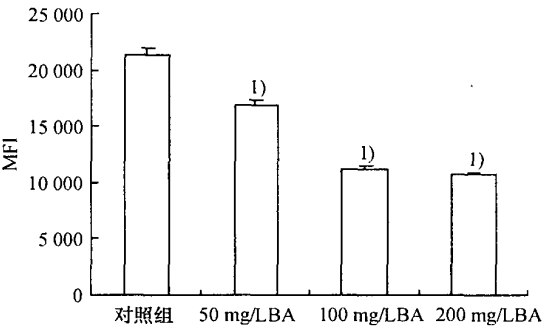
1) 与对照组比较,  $P < 0.01$

图 1 BA 作用 Jurkat 细胞不同时间对  
[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>( $\bar{x} \pm s, n=5$ )的影响

2.3 BA 对 Jurkat 细胞线粒体跨膜电势( $\Delta\Psi_m$ )的影响

DiOC<sub>6</sub>(3)是一种亲脂性荧光染料,其与线粒体的结合依赖于线粒体的负膜电位,当  $\Delta\Psi_m$  降低时

DiOC<sub>6</sub>(3)可染性下降,MFI 降低。在不同质量浓度 BA 作用细胞 24 h 后发现线粒体膜电势显著低于对照组( $P < 0.01$ ),即 MFI 降低(见图 2)。



1) 与对照组比较,  $P < 0.01$

图 2 BA 作用 Jurkat 细胞 24 h 对线粒体膜  
电势( $\bar{x} \pm s, n=5$ )的影响

2.4 BA 对 Jurkat 细胞周期分布及凋亡率(APO%)的影响

经不同质量浓度 BA 作用后,Jurkat 细胞逐渐被阻滞在 S 期,在 DNA 直方图中出现明显的亚二倍体凋亡峰,凋亡率随药物剂量增加而增高,与对照组相比有显著差异( $P < 0.01$ ,见表 2)。

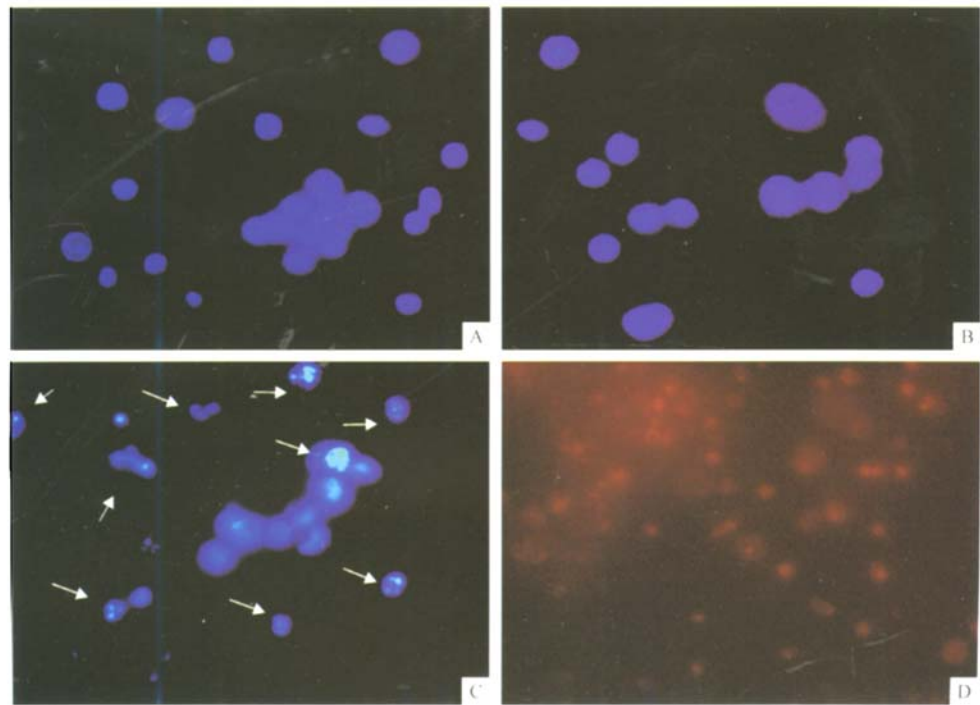
表 2 BA 作用 Jurkat 细胞 48 h 后的细胞周期分布及  
凋亡率( $\bar{x} \pm s, n=5$ ) %

| 分组/周期                          | 对照组        | $\rho(\text{BA})/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ |                          |                          |
|--------------------------------|------------|---|--------------------------|--------------------------|
|                                |            | 50  | 100                      | 200                      |
| G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> | 14.69±0.23 | 14.27±0.83  | 7.64±1.12 <sup>2)</sup>  | 2.91±0.41 <sup>2)</sup>  |
| S                              | 79.25±0.55 | 79.84±2.09  | 88.56±3.27 <sup>1)</sup> | 96.05±3.59 <sup>2)</sup> |
| G <sub>2</sub> /M              | 6.05±0.17  | 5.88±0.61   | 3.60±0.28 <sup>2)</sup>  | 1.05±0.11 <sup>2)</sup>  |
| APO                            | 3.84±0.35  | 16.81±0.39 <sup>2)</sup>                          | 39.65±1.54 <sup>2)</sup> | 53.45±2.16 <sup>2)</sup> |

1) $P < 0.05$ , 2) $P < 0.01$  与对照组比较

2.5 BA 对 Jurkat 细胞形态学的影响

Hoechst33342 能透过胞膜完整的细胞,嵌入细胞核 DNA,使之发出明亮的蓝色荧光.PI 仅能透过胞膜受损的细胞,嵌入核 DNA,发橘红色荧光;染色质凝聚是凋亡细胞典型的细胞形态学变化之一。不同质量浓度 BA 作用 Jurkat 细胞 48 h 后,经 Hoechst33342/PI 染色,荧光显微镜下观察,100、200 mg/L BA 处理组可见细胞核固缩、核碎裂、染色质凝聚,细胞核或细胞质内出现浓染致密的块状或颗粒状荧光,200 mg/L BA 处理组可见坏死的细胞被染成红色(图 3),50 mg/L BA 处理组细胞与对照组无明显差别。



A: 对照组;B: 50 mg/L BA 处理组;C: 100 mg/L BA 处理组;D: 200 mg/L BA 处理组细胞经 Hoechst33342/PI 双染,在荧光显微镜下观察 (×200),A,B,C 组为 UV 激发光,D 组为 488 nm 激发光

图 3 BA 作用 48 h 后 Jurkat 细胞核形态学变化

3 讨论

细胞凋亡作为一种基本的生命现象,贯穿于个体生长、发育、死亡的整个生命过程中。研究表明,许多人类恶性肿瘤都是其细胞的凋亡过程严重受阻,而使肿瘤细胞在数量上无限制恶性增生的结果<sup>[4]</sup>,所以增殖与凋亡的动态平衡在维持机体组织器官正常的形态与功能中起着重要的作用。近年来,随着人们对细胞凋亡机制研究的深入,发现目前临床应用的大多数抗肿瘤药物具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用,而且其抗肿瘤作用与药物作用下细胞凋亡发生密切相关<sup>[5]</sup>。

本研究选用广泛用于抗肿瘤药物筛选的 MTT 法,测定黄芩苷对 Jurkat 细胞的增殖抑制率,结果表明,黄芩苷可明显抑制 Jurkat 细胞的增殖,且具有剂量、时间依赖性。利用流式细胞术检测黄芩苷诱导 Jurkat 细胞凋亡,发现凋亡早期胞内 $[Ca^{2+}]_i$  上升,线粒体膜电势 $\Delta\Psi_m$  降低,细胞周期被阻滞在 S 期,凋亡率随药物浓度增高而显著增多, Ma 等<sup>[6]</sup>通过异甘草素(isoliquiritigenin) 诱导人胃癌 MGC803 细

胞凋亡,也发现此现象,胞内 $[Ca^{2+}]_i$  升高和线粒体跨膜电位的下降在凋亡细胞都以剂量依赖性方式进行。钙离子是细胞内的一种重要胞内信使,在各种生命现象的信号传导过程中处于枢纽地位,细胞 $[Ca^{2+}]_i$  增加可启动细胞凋亡<sup>[7-8]</sup>,其机制多种多样,其中细胞 $[Ca^{2+}]_i$  增多可引起线粒体 $\Delta\Psi_m$  的降低,在细胞凋亡中,线粒体起着中心调控作用<sup>[9-10]</sup>;线粒体跨膜电位( $\Delta\Psi_m$ ) 的下降,被认为是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的事件,发生在细胞核凋亡特征如染色质浓缩、DNA 断裂等出现之前,一旦线粒体崩溃,则细胞凋亡不可逆转<sup>[11]</sup>, $\Delta\Psi_m$  下降时,一方面从线粒体外室释放的凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF) 激活 caspase3;另一方面线粒体内贮钙会进一步释放,引起胞内 $[Ca^{2+}]_i$  持续增加以及 DNA 断裂,而线粒体 $\Delta\Psi_m$  的降低,还影响了能量代谢过程,造成脂质过氧化而引起凋亡。

应用两种荧光染料 Hoechst33342/PI 同时进行活体标本染色,通过荧光显微镜观察 BA 对肿瘤细胞凋亡的影响,具有快速、易识别的优点,本实验发现未经 BA 处理的细胞染成蓝色,核呈正常结构,经

BA(100 mg/L)处理的细胞染成蓝色,核呈明显的固缩状或圆珠状,经高质量浓度 BA(200 mg/L)处理的细胞已发生晚期凋亡或坏死,可被活细胞拒染的 PI 染成红色。

综上,黄芩苷能够阻止 Jurkat 细胞增殖,通过胞内钙离子和线粒体途径诱导其发生凋亡,有直接抗肿瘤的作用,为黄芩苷发展成抗肿瘤药物、更准确地选择抗肿瘤靶点提供了一定的实验依据。

### [参考文献]

- [1] MARTIN J, DUSEK J. The Baikal sculcap (*Scutellaria baicalensis* Georgi)-a potential source of new drugs [J]. *Ceska Slov Farm*, 2002, 51(6): 277-283.
- [2] LI F Q, WANG T, FEI Z, et al. Inhibition of microglial activation by the herbal flavonoid baicalin attenuates inflammation-mediated degeneration of dopaminergic neurons [J]. *J Neurol Transm*, 2005, 112(3): 331-347.
- [3] LI B Q, FU T, DONGYANG Y, et al. Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 276(2): 534-538.
- [4] MARTIN S J, LENNON S V, BONHAM A M, et al. Induction of apoptosis (programmed cell death) in human leukemic HL-60 cells by inhibition of RNA or protein synthesis [J]. *J Immunol*, 1990, 145(6): 1859-1867.
- [5] SUZUKI M, SHINNAR A E, NACKER L A, et al. Laurinterol from red alga *L. nidificayamada* [J]. *Bull Chem Soc Japan*, 1997, 52(3): 352-355.
- [6] MA J, FU N Y, FANG D B, et al. Apoptosis induced by isoliquiritigenin in human gastric cancer MGC-803 cells [J]. *Planta Med*, 2001, 67(8): 754-757.
- [7] SALVESEN G S, DIXIT V M. Caspases: Intracellular signaling by proteolysis [J]. *Cell*, 1997, 91(4): 443-446.
- [8] MASAHICO K, TAKASHI N, MASATOSHI M, et al. Caspases cleave the aminoterminal calpain inhibitory unit of calpastatin during apoptosis in human Jurkat T cell [J]. *J Biochem*, 2000, 127(2): 297-305.
- [9] NEWMYER D D, FERGUSON-MILLER S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death [J]. *Cell*, 2003, 112(4): 481-490.
- [10] GREEN D R, KROEMER G. The pathophysiology of mitochondrial cell death [J]. *Science*, 2004, 305(5684): 626-629.
- [11] KROEMER G, ZAMAMI N, SUSIN S A. Mitochondrial control of apoptosis [J]. *Immunol Today*, 1997, 18(1): 44-51.
- [12] PISAREV V, YU B, SALUP R, et al. Full-length dominant-negative survivin for cancer immunotherapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 15(17): 6523-6533.
- [13] NAGARAJ S, PISAREV V, KINARSKY L, et al. Dendritic cell-based full-length survivin vaccine in treatment of experimental tumors [J]. *J Immunother*, 2007, 30(2): 169-179.
- [14] 刘毅,徐丽慧,曾学思,等. H-2Db 四聚体的制备及其在检测 LCMV 特异性 CD8<sup>+</sup> T 细胞中的应用 [J]. *生物工程学报*, 2008, 24(2): 278-284.
- [15] TACKEN P J, DE VRIES I J, TORENSMA R, et al. Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting [J]. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7(10): 790-802.
- [16] ANDERSEN M H, THOR S P. Survivin: a universal tumor antigen [J]. *Histol Histopathol*, 2002, 17(2): 669-675.
- [17] MESRI M, WALL N R, LI J, et al. Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus [J]. *J Clin Invest*, 2001, 108(4): 991-999.
- [18] ANDERSEN, PERDERSEN, CAPERLL E R B, et al. Spontaneous cytotoxic T-cell responses against Survivin-derived MHC class I-restricted T-cell epitopes in situ as well as ex vivo in cancer patients [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(15): 5964-5968.
- [19] SCHMITZ M, DIESTELKOETTER P, WEIGLE B, et al. Generation of survivin-specific CD8<sup>+</sup> T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(17): 4845-4849.

[责任编辑:朱颖娜]

[责任编辑:朱颖娜]

(上接第566页)