

棉酚对 Jurkat T 细胞增殖与凋亡的影响

许文彬 徐丽慧 卢宏松 施焕敬 何贤辉*

(暨南大学生命科学技术学院组织移植与免疫实验中心, 广州 510632)

摘要 研究棉酚(gossypol)对 Jurkat T 细胞增殖和凋亡的影响及可能机制。将不同浓度的棉酚作用于 Jurkat T 细胞, 用 MTS 比色法检测细胞存活率; 以膜联蛋白 V-PE 染色分析细胞凋亡; 用 Hoechst33342 染色观察核形态; 用荧光染料 Mitocapture 结合流式细胞术和激光共聚焦显微镜检测线粒体跨膜电位变化。结果显示棉酚作用 Jurkat T 细胞 24 h、48 h、72 h, 其 IC_{50} 值分别为 77.2 $\mu\text{mol/L}$ 、57.3 $\mu\text{mol/L}$ 、23.3 $\mu\text{mol/L}$, 对细胞的抑制作用与药物存在时间-剂量依赖关系; 终浓度为 8、16、32 $\mu\text{mol/L}$ 的棉酚处理 24 h 后的细胞凋亡率分别为 5.30%、15.20%、51.19%, 对照组凋亡率为 3.43%; 高浓度棉酚作用后大量细胞核呈现染色质固缩、核碎裂和致密浓染等凋亡特征; 随着浓度增加细胞线粒体跨膜电位明显降低。研究表明棉酚能有效抑制 Jurkat T 细胞增殖和诱导其发生凋亡, 并呈现出时间-剂量依赖关系, 其诱导凋亡的作用可能依赖于线粒体途径。

关键词 棉酚; Jurkat T 细胞; 细胞增殖; 凋亡; 流式细胞术

棉酚(gossypol)是一种天然黄色多酚类化合物, 存在于锦葵科植物棉花的根、茎和种子中, 我国学者最早发现棉酚具有抗男性生育作用, 之后被作为男性避孕药应用于临床^[1]。近年研究发现, 棉酚具有明显的诱导肿瘤细胞凋亡的能力^[2,3], 其中包括前列腺癌、黑素瘤、淋巴瘤、乳腺癌和结肠癌等多种恶性肿瘤。最近研究显示棉酚可作用于依赖活性氧(ROS)的线粒体途径, 从而诱导人类结肠癌细胞^[4]和白白血病细胞株 HL-60^[5]的凋亡。然而关于棉酚对淋巴系起源的白血病细胞株 Jurkat T 细胞的作用机制, 国内外很少报道。因此, 本文以不同浓度棉酚作用于 Jurkat T 细胞, 探讨其对细胞增殖和凋亡作用的影响及可能机制, 为白血病治疗的实验研究和临床应用提供参考数据。

1 材料和方法

1.1 细胞株和主要试剂

Jurkat T 细胞株购自武汉大学中国典型培养物保藏中心; RPMI-1640、新生小牛血清(NBS)为 Gibco 公司产品。膜联蛋白 V-PE 凋亡检测试剂盒(包括膜联蛋白 V-PE 和 7-AAD 两种染料)购自 BD 公司。Mitocapture 试剂盒为美国 Biovision 公司产品。棉酚、二甲基亚砜(DMSO)、Hoechst33342 购自美国 Sigma 公司。试剂 MTS[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymeth-oxy-phenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-

tetrazolium, inner salt, MTS]为 Promega 公司产品。FACSCalibur 流式细胞仪为美国 Becton Dickinson 公司产品。Ultraview 激光共聚焦显微镜为 Perkin Elmer 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Jurkat T 细胞用含 10% 新生小牛血清的 RPMI-1640 培养液培养, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度的细胞培养箱中, 2~3 天换液传代。

1.2.2 细胞增殖测定 MTS 比色法取对数生长期的 Jurkat T 细胞, 调整细胞密度为 5×10^5 个/ml 接种于 96 孔培养板内, 体系为 100 μl 。加入溶于 DMSO 的棉酚进行培养, 终浓度分别为 8、16、32、64、128 $\mu\text{mol/L}$, 对照组加 0.05% DMSO, 同时设不加细胞只加培养液的孔为空白对照。分别于培养 24、48、72 h 后加入 20 μl MTS, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下继续培养 4 h。在酶标仪测定吸光度, 测定波长 490 nm。存活率 = 实验组光吸收值 / 对照组光吸收值 $\times 100\%$ 。抑制率 = $1 - \text{存活率}$ 。以细胞抑制率对剂量的对数作图, 通过线性回归拟合法求出棉酚对 Jurkat T 细胞的半数抑制浓度(IC_{50} 值)。

1.2.3 膜联蛋白 V-PE 试剂盒检测细胞凋亡 收

收稿日期: 2008-06-18 接受日期: 2008-08-18

国家自然科学基金(No.30572199, No.30230350, No.30371651)和生物化学与分子生物学广东省重点学科资助项目

* 通讯作者。Tel: 020-85220679, E-mail: thehx@jnu.edu.cn

集不同浓度棉酚处理 24 h 的 Jurkat T 细胞, 用冷 PBS 洗 2 次, 将细胞重悬浮于结合缓冲液至 1×10^6 个/ml, 每管加入 100 μ l 细胞悬液, 再加入 5 μ l 膜联蛋白 V-PE 和 5 μ l 7-AAD, 25 $^{\circ}$ C 避光放置 15 min, 加入 400 μ l 的结合缓冲液, 利用流式细胞仪分析细胞凋亡的比例。设定 0.05% 的 DMSO 为阴性对照。

1.2.4 细胞核形态观察 将不同浓度棉酚和对照组处理 24 h 后的细胞悬液离心, 去上清液后用 PBS 洗涤两遍(250 g, 5 min)。加入 Hoechst33342(终浓度为 2.5 μ g/ml), 在 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min。离心(同上)并留约 100 μ l 液体, 封片, 用激光共焦显微镜在激发光波长 352 nm 下观察细胞核形态。

1.2.5 流式细胞仪(FACS)检测线粒体膜势能 收集对照组和不同浓度棉酚处理 24 h 的 Jurkat T 细胞; 临时配制 Mitocapture 染液及温育液; 离心(500 g, 5 min)收集细胞, 分别用 1 ml 稀释的 Mitocapture 染液重悬细胞, CO₂ 恒温培养箱内避光温育染色 15 min; 离心并用预先温育的温育缓冲液重悬细胞, 立即以流式细胞仪检测。

1.2.6 激光共焦显微镜观察 收集 DMSO 对照组和 4、8、16 μ mol/L 的棉酚处理 24 h 的 Jurkat T 细胞, Mitocapture 染液染色后, 分别置于载玻片上, 立即用激光共焦显微镜观察线粒体膜电位的变化。在正常细胞中, 线粒体凋亡试剂以多聚体的形式存在于

线粒体中并发橘黄色荧光; 在凋亡细胞中, 线粒体凋亡试剂以单体的形式弥散分布于细胞质中并发绿色荧光。

1.2.7 统计学分析 全部数据使用均以 Excel 进行处理, 数据以均数 $\pm$ 标准差表示。组间数据比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性, $P < 0.01$ 为差异有极显著性。

2 结果

2.1 棉酚对 Jurkat T 细胞活性的抑制作用

结果见表 1。棉酚作用 24 h、48 h、72 h 对 Jurkat T 细胞的 IC₅₀ 值约分别为 77.2 μ mol/L、57.3 μ mol/L、23.3 μ mol/L。随着浓度的增高, 棉酚对 Jurkat T 细胞的生长抑制率也逐渐增高, 同时将 0.05% DMSO 对照组与只加培养基的对照组比较, 显示 0.05% DMSO 自身对 Jurkat T 细胞生长并无明显影响。以上结果说明棉酚能明显抑制 Jurkat T 细胞的增殖和存活, 且抑制作用与药物存在时间-剂量依赖关系。

2.2 棉酚诱导 Jurkat T 细胞发生凋亡

用膜联蛋白 V-PE、7-AAD 双染色后, 通过流式细胞仪检测不同浓度棉酚作用后细胞凋亡的情况(图 1)。结果显示随着棉酚浓度的增加, 膜联蛋白 V-PE 单阳性细胞逐渐增加, 即早期凋亡百分率逐渐增加。

表 1 MTS 法检测 Jurkat T 细胞存活率(均数 $\pm$ 标准差, $n=3$, 单位 %)

实验时间	DMSO 对照	棉酚浓度				
		8 μ mol/L	16 μ mol/L	32 μ mol/L	64 μ mol/L	128 μ mol/L
24 h	100	85.3 $\pm$ 4.3	79.5 $\pm$ 5.5	66.2 $\pm$ 4.2	54.4 $\pm$ 3.4	38.7 $\pm$ 2.3
48 h	100	80.75 $\pm$ 1.2	75.9 $\pm$ 2.6	65.2 $\pm$ 3.2	50.35 $\pm$ 0.4*	30.18 $\pm$ 1.7**
72 h	100	60.17 $\pm$ 1.7**	58.78 $\pm$ 0.6**	47 $\pm$ 1.7**	36.52 $\pm$ 0.8**	28.87 $\pm$ 0.2**

与 24 h 处理组比较, * $P < 0.05$; 与 24 h 处理组比较, ** $P < 0.01$ 。存活率 = 实验组光吸收值 / 对照组光吸收值 $\times 100\%$ 。

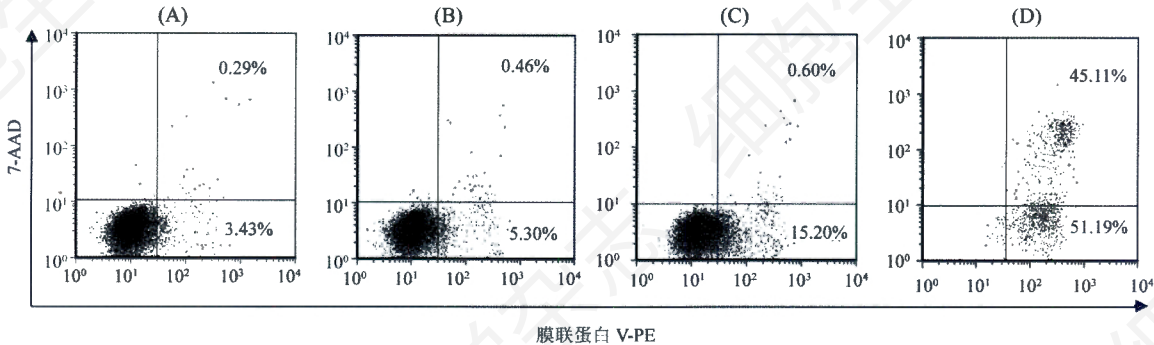


图 1 不同浓度的棉酚作用于 Jurkat T 细胞的膜联蛋白 V-PE 流式细胞仪检测结果

A: 对照(0.05% DMSO); B: 8 μ mol/L 棉酚; C: 16 μ mol/L 棉酚; D: 32 μ mol/L 棉酚。

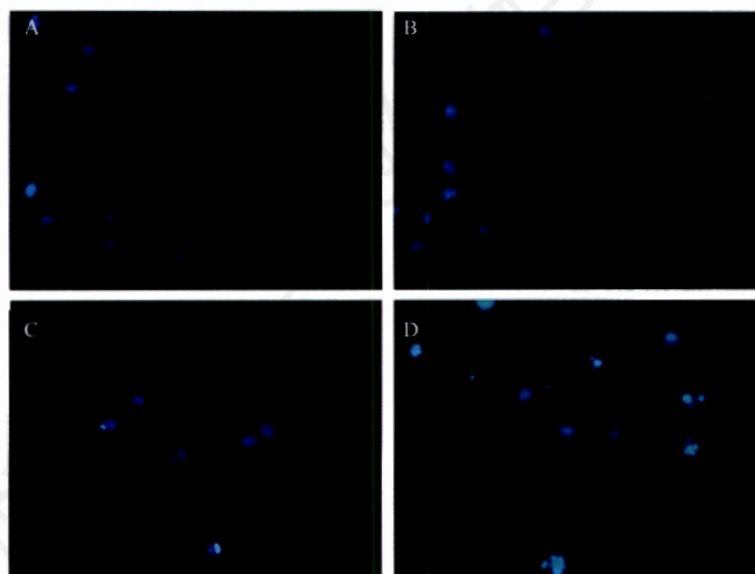


图2 棉酚作用于 Jurkat T 细胞 24 h 后 Hoechst33342 染色结果(400×)

A: 对照(0.05% DMSO) B: 8 $\mu\text{mol/L}$ 棉酚; C: 32 $\mu\text{mol/L}$ 棉酚; D: 64 $\mu\text{mol/L}$ 棉酚。

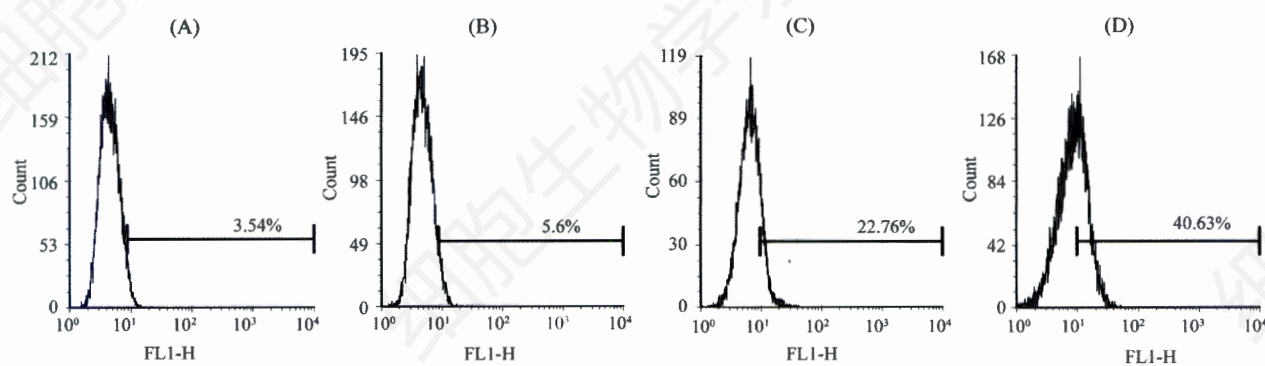


图3 流式细胞仪检测细胞线粒体膜势能

A: 对照(0.05% DMSO) B: 4 $\mu\text{mol/L}$ 棉酚; C: 8 $\mu\text{mol/L}$ 棉酚; D: 16 $\mu\text{mol/L}$ 棉酚。

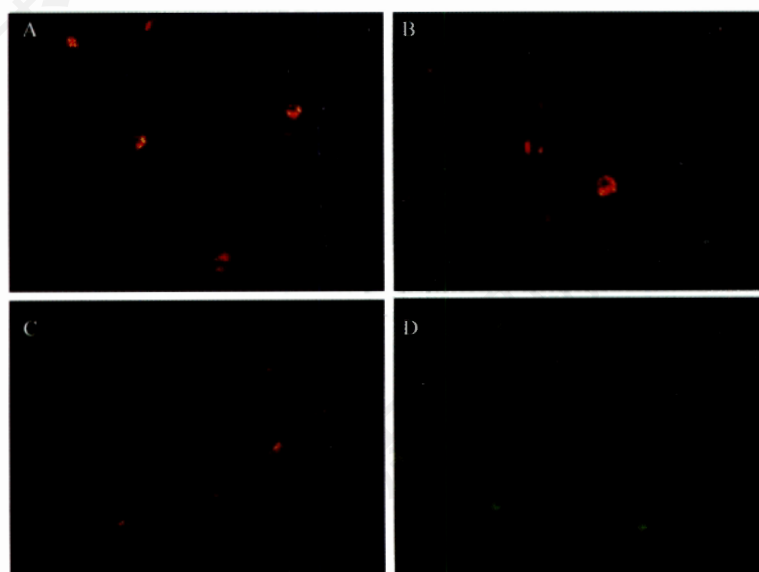


图4 激光共焦显微镜观察细胞线粒体膜电位变化(400×)

A: 对照(0.05% DMSO) B: 4 $\mu\text{mol/L}$ 棉酚; C: 8 $\mu\text{mol/L}$ 棉酚; D: 16 $\mu\text{mol/L}$ 棉酚。

终浓度为 8、16、32 $\mu\text{mol/L}$ 的棉酚处理 24 h 后的细胞凋亡率分别为 5.30%、15.20%、51.19%, 对照组凋亡率为 3.43%。高浓度 32 $\mu\text{mol/L}$ 棉酚处理组已有大量细胞坏死(即右上角的双阳性细胞群)。

2.3 棉酚对 Jurkat T 细胞核形态的影响

Hoechst33342染料可以通过细胞膜, 使活细胞和凋亡细胞的 DNA 染色, 用于观察细胞核形态。24 h 棉酚处理后结果显示(图 2), 正常的细胞核呈弥散均匀的蓝色荧光, 呈圆形, 染色质较均匀分布。凋亡细胞的荧光较强, 致密浓染, 呈现核固缩、核破碎块状或凋亡小体等凋亡特征。随着加入棉酚浓度提高, 如 64 $\mu\text{mol/L}$ 时, 可见细胞凋亡时期的不同阶段变化(图 2D)。

2.4 FACS 分析棉酚对细胞线粒体膜势能的影响

Mitocapture是一种阳离子染料, 当线粒体处于高势能状态时, Mitocapture以复合物的形式聚集到线粒体上, 发出明亮的橘黄色荧光; 随着线粒体跨膜电位($\Delta\Psi\text{m}$)的降低, 染料分子以单体形式进入胞浆而发出绿色荧光。结果显示(图 3), 终浓度为 4、8、16 $\mu\text{mol/L}$ 处理 24 h 后的细胞绿色荧光阳性率分别为 5.6%、22.76%、40.63%, 对照组为 3.54%。这些结果提示随着棉酚浓度增加, 线粒体膜势能下降加剧。

2.5 激光共焦显微镜观察线粒体膜电位变化

对照组和 4 $\mu\text{mol/L}$ 棉酚处理 24 h 后的绝大部分细胞胞质呈现明亮的橘黄色荧光, 呈针点状分布; 8 $\mu\text{mol/L}$ 棉酚作用后大部分细胞胞质呈现点状的浅橘黄色荧光, 提示线粒体的膜电位较对照组已有明显下降; 16 $\mu\text{mol/L}$ 作用后大部分细胞呈现弥散状绿色荧光, 荧光强度较弱, 说明线粒体膜电位进一步下降(图 4)。

3 讨论

本研究显示, 棉酚能明显抑制 Jurkat T 细胞的活性, 并且这种作用具有剂量和时间依赖性; 进一步的分析显示该药物能明显诱导 Jurkat T 细胞发生凋亡作用, 提示棉酚通过诱导细胞发生凋亡作用而发挥其抑制细胞增殖的效应。

凋亡是在生理或病理条件下细胞出现的一系列形态学和生化方面的改变。主要通过两条途径: 死亡受体途径(外源性途径)和线粒体途径(内源性途径)^[6]。近年来, 线粒体被视为细胞凋亡的关键元件, 线粒体跨膜电位的破坏是诱导细胞凋亡最早的细胞内事件之一。在致凋亡因子的刺激下, 细胞线粒体跨膜电位($\Delta\Psi\text{m}$)降低或丧失, 膜通透性转运孔(mitochondrial

permeability transition pores, MPT)的形成, 促使细胞色素 c、凋亡诱导因子、核酸内切酶 G 等的释放, 引发线粒体依赖性的细胞凋亡。本实验用荧光染料 Mitocapture 结合流式细胞术和激光共焦显微镜检测线粒体跨膜电位变化, 结果显示随着棉酚浓度增加细胞线粒体跨膜电位明显降低, 提示棉酚通过线粒体途径引起线粒体跨膜电位下降可能是其诱导肿瘤细胞凋亡的途径之一, 但其具体的作用机制仍有待进一步研究阐明。本研究结果显示, 相同浓度和时间处理条件下, 膜联蛋白 V-PE 检测出的细胞凋亡率明显低于用 Mitocapture 结合流式细胞术和激光共焦显微镜检测线粒体跨膜电位变化所表现出的凋亡率, 提示线粒体跨膜电位下降可能早于细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸(PS)外翻和细胞核染色质形态改变等一系列生化形态学变化。

近来的研究表明, 棉酚诱导的肿瘤细胞凋亡机制多样, 存在一定细胞类型特异性。Zhang 等^[7]发现在棉酚诱导 HT-29 细胞凋亡是由线粒体途径和死亡受体途径共同介导的。Moon 等^[8]发现棉酚能抑制人类白血病细胞株 U937 的 NF- κB 活性和 NF- κB 相关基因的表达, 从而发挥其抗肿瘤作用。ROS 可通过细胞脂质过氧化、损伤 DNA 分子、调节细胞凋亡相关基因诱导细胞凋亡。最近研究发现棉酚可作用于依赖 ROS 的线粒体途径, 从而诱导人类结肠癌细胞^[4]和白血病细胞株 HL-60^[5]的凋亡。棉酚是作用于 PKC 催化活性中心的非特异性抑制剂^[9,10], 能够同时抑制多克隆激活剂 PHA 和 PDB 对 T 细胞的活化作用^[10]。BALCI 等^[11]以棉酚作为 PKC 抑制剂作用于人急性早幼粒白血病细胞株 HL-60, 观察到细胞缩小, 核固缩, 膜包裹的凋亡小体等典型的凋亡形态学特征, 进一步证实了 PKC 依赖的信号通路在凋亡过程中发挥了重要作用。棉酚是小分子抑制剂, 能与 Bcl-2/Bcl-X_L 的疏水凹槽结合, 抑制其与促凋亡蛋白形成二聚体, 还能直接与促凋亡蛋白如 Bak 的 BH3 位点相结合, 因此推测棉酚可直接作用于线粒体阻断 Bcl-2/Bcl-X_L 介导的抗凋亡功能, 诱导肿瘤细胞发生凋亡^[12]。

综上所述, 本研究结果显示棉酚能有效抑制 Jurkat T 细胞的增殖并诱导其发生凋亡, 呈现时间-剂量依赖关系。棉酚通过线粒体途径引起线粒体跨膜电位下降可能是其诱导肿瘤细胞凋亡的途径之一, 并且线粒体跨膜电位下降可能早于细胞膜内侧的 PS 外翻和细胞核染色质形态改变等一系列变化。这些结果提示棉酚是潜在有效的抗白血病药物, 其抗肿瘤

作用的分子机制值得深入探讨。

参考文献(References)

- [1] Wu D. *Drugs*, 1989, **38**: 333
- [2] Tuszyński GP *et al. Cancer Res*, 1984, **44**: 768
- [3] Wang X *et al. Life Sci*, 2000, **67**: 2663
- [4] Ko CH *et al. Int J Cancer*, 2007, **121**: 1670
- [5] Hou DX *et al. Arch Biochem Biophys*, 2004, **428**: 179
- [6] Dnaial NN *et al. Cell*, 2004, **116**: 205
- [7] Zhang M *et al. Biochem Pharmacol*, 2003, **66**: 93
- [8] Moon DO *et al. Cancer Lett*, 2008, **264**: 192
- [9] Nakadate T *et al. Biochem Pharmacol*, 1988, **37**: 1541
- [10] 何贤辉等. *中国病理生理杂志*, 2001, **17**: 510
- [11] Balci A *et al. Tohoku J Exp Med*, 1999, **189**: 51
- [12] Olive CL *et al. Mol Cancer Ther*, 2005, **4**: 23

Effects of Gossypol on the Proliferation and Apoptosis of Jurkat T Cells

Wen-Bin Xu, Li-Hui Xu, Hong-Song Lu, Huan-Jing Shi, Xian-Hui He*

(Institute of Tissue Transplantation and Immunology, College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract To investigate the effect of gossypol on the proliferation and apoptosis of Jurkat T cells and to elucidate its mechanism. Jurkat T cells were treated with various concentrations of gossypol were assessed. The cell viability was measured by MTS assay. Cell apoptosis was analyzed by labeled with annexin V-PE. Nuclear morphological changes were ascertained by Hoechst33342. Mitochondrial transmembrane potential was detected by Mitocapture combined with flow cytometry (FCM) and laser scanning confocal microscope (LSCM). Results showed that when cells were treated with gossypol for 24 h, 48 h, 72 h, the IC_{50} value were about 7.2 $\mu\text{mol/L}$, 57.3 $\mu\text{mol/L}$, 23.3 $\mu\text{mol/L}$. The inhibitory effect shows time- and dose- dependent. When cells were treated with 8, 16, 32 $\mu\text{mol/L}$ of gossypol, the cells apoptosis ratio were about 5.30%, 15.20%, 51.19%, the control group was about 3.43%. With the increase of concentrations, the mitochondrial transmembrane potential was decreased significantly. Many nuclei showed chromatin condensation, nuclear fragmentation and pyknosis after being treated with high concentration of gossypol. The above results indicated that gossypol can effectively inhibit the proliferation of Jurkat T cells and induces apoptosis. The inhibitory effect shows time- and dose- dependent. The mechanism of gossypol induced Jurkat T cells apoptosis probably rely on mitochondria intrinsic pathway.

Key words gossypol; Jurkat T cells; proliferation; apoptosis; flow cytometry

Received: June 18, 2008 Accepted: August 18, 2008

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30572199, No.30230350, No.30371651) and the Key Subject of Biochemistry and Molecular Biology of Guangdong Province

*Corresponding authors. Tel: 86-20-85220679, E-mail: thehx@jnu.edu.cn