

黄芩苷对香烟烟雾提取物诱导的细胞损伤保护作用研究

刘福荣, 李文芳*, 石梦蝶, 万丹(武汉科技大学预防医学系, 武汉 430065)

摘要: 目的 研究黄芩苷对香烟烟雾提取物(cigarette smoke extract, CSE)诱导的人肺泡上皮细胞损伤的影响, 并初步探讨其机制。方法 制备 CSE, 用不同浓度黄芩苷对人肺泡上皮细胞 A549 进行预处理, 再用 CSE 刺激细胞。用 MTT 法检测细胞存活率, 流式细胞术测定细胞凋亡率, 彗星实验观察 DNA 损伤情况, 荧光法测定细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS) 含量。结果 随着 CSE 浓度的增加和作用时间的延长, 细胞存活率下降, 各组之间有统计学差异($P<0.05$); 黄芩苷能减少 CSE 诱导的细胞存活率下降, 抑制 CSE 诱导的细胞内 ROS 的产生, 并有剂量依赖关系($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 黄芩苷+CSE 组细胞的彗星尾长、尾部 DNA 含量、尾距、Olive 尾距均小于 CSE 组($P<0.05$), 并且黄芩苷可以减少 CSE 导致的细胞凋亡。结论 黄芩苷可以拮抗 CSE 对细胞的损伤, 提高细胞的存活率, 降低凋亡率, 其原因可能与黄芩苷能降低细胞 ROS 含量, 减少 DNA 损伤有关。

关键词: 黄芩苷; 香烟烟雾提取物; 细胞凋亡; 活性氧; DNA 损伤

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2011)05-0391-05

Effect of Baicalin on Cell Damage Induced by Cigarette Smoke Extract

LIU Furong, LI Wenfang*, SHI Mengdie, WAN Dan(Department of Preventive Medicine, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430065, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of baicalin on A549 cells exposed to cigarette smoke extract (CSE). **METHODS** Cultured human lung adenocarcinoma A549 cells. Mainstream smoke was collected by using dimerhyl sulfoxide as absorbent. A549 cells were incubated with different concentrations of baicalin and CSE. Cell viability was evaluated by MTT assay. Cell apoptosis was detected by flow cytometry annexin V-FTTC/PI staining assay. Comet assay was used to detected DNA damage. The contents of reactive oxygen species (ROS) was examined by fluorescence method. **RESULTS** MTT assay results showed that CSE decrease the viability of A549 cells in time- and concentration-dependent manners($P<0.05$). Baicalin inhibited the decrease of viability induced by CSE($P<0.05$ or $P<0.01$), decreased the contents of ROS in A549 cells ($P<0.01$). The comet assay indicated that baicalin inhibited the DNA damage induced by CSE on A549 cells, tail length, tail DNA%, TM, OTM were lower than CSE group($P<0.05$). And apoptosis rate of cells injured by CSE was decreased by baicalin. **CONCLUSION** Bacalin can inhibit the injury induced by CSE, increase viability, decrease apoptosis. The results may be related to the decrease of ROS and a lower DNA damage rate caused by baicalin.

KEY WORDS: baicalin; cigarette smoke extract; apoptosis; reactive oxygen species; DNA damage

肺泡上皮细胞不仅作为肺的被动生理屏障起到防止外界有害物质侵入的作用, 而且在先天性免疫反应中扮演重要的角色, 在急性肺损伤的研究中, 肺泡上皮细胞损伤程度可以作为疾病严重程度和判断预后的重要因素^[1]。香烟烟雾中存在数千种有毒有害物质, 对吸烟者多种肺部疾病的发生扮演着直接或间接的作用, 黄芩苷是植物黄芩的有效成分之一, 具有清热解毒、调节免疫、抗炎、抗氧化、抗变态反应等多方面的作用^[2], 本研究用黄芩苷和香烟烟雾提取物(cigarette smoke extract, CSE)作用于肺泡上皮细胞, 观察黄芩苷对 CSE 诱导的细胞损伤

的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

香烟由某卷烟厂提供(每支烟焦油含量 10 mg, 尼古丁含量 1.0 mg, CO 含量 10 mg); 肺泡上皮细胞 A549 购自武汉大学细胞典藏中心; 大气采样器, DMEM 细胞培养液购自 Hyclone; 胎牛血清购自杭州四季青生物试剂公司; 活性氧检测试剂盒、噻唑兰、二甲亚砜(DMSO)、细胞凋亡检测试剂盒均购自美国 Sigma 公司。美国宝特 Bio-Tek ELX 800 全自动酶标仪, 日本岛津荧光分光光度计, 日本

基金项目: 武汉科技大学校企联合研究基金

作者简介: 刘福荣, 女, 硕士生 Tel: 15827149747 E-mail: liufurong7@163.com *通信作者: 李文芳, 女, 硕士, 副教授, 硕士
Tel: 13871358879 E-mail: li-wf@163.com

中国现代应用药学 2011 年 5 月第 28 卷第 5 期

Chin JMAP, 2011 May, Vol.28 No.5

· 391 ·

OLYMPUS 公司 CKX41-F32FL 荧光显微镜, 日本岛津公司流式细胞仪。

1.2 CSE 的制备

用大气采样器作为采集器, DMSO 作为吸收液, 3 个分别含 3 mL 吸收液的 U 形吸收管串联, 将香烟点燃, 调节大气采样器的流量使香烟燃烧速度维持为 $1 \text{支} \cdot (5 \text{min})^{-1}$, 最后制得浓度为 $1 \text{支} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 CSE, 于 -20°C 保存备用。使用时用 DMSO 按照 10%、20% 和 50% 稀释。

1.3 细胞培养与处理

将细胞 A549 培养于高糖 DMEM 培养基中, 培养基中含有 10% 的灭活胎牛血清和双抗 ($100 \text{kU} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素, $100 \text{kU} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素), 放在 37°C 湿化的 5% CO_2 培养箱中培养, 取生长状态良好的细胞用于实验。

1.4 MTT 细胞活性测定

实验设空白对照组、溶剂对照组、CSE、CSE+黄芩苷组, 其中 CSE 组分为 4 个浓度组 (将 “1.2” 项下的 CSE 按 10%, 20%, 50%, 100% 配制, 每孔加入含 1% 受试物的培养基 $200 \mu\text{L}$), 分别培养 12, 24, 36 h; CSE+黄芩苷组是将黄芩苷配制为 4 个终浓度 ($5, 10, 20, 40 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 培养 12 h, 在细胞融合率为 60% 时, 加入含不同终浓度的黄芩苷培养液作用 12 h 后加入 50% 的 CSE 作用 4 h。以上各组均按每个浓度设 5 个平行孔, 分别培养 12, 24, 36 h。

按照常规 MTT 实验操作。在酶标仪上测定 490 nm 波长的吸光度 A 值, 以实验组占对照组的百分率表示细胞存活率。细胞存活率 = 实验组 A 值 / 空白对照组 A 值 $\times 100\%$ 。

1.5 细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的测定

采用活性氧检测试剂盒, 按说明书操作。接种细胞浓度为 1×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 将细胞接种于 6 孔板中, 每孔加入 2 mL 培养基, 当细胞融合率为 70% 时, 每孔加入不同浓度的黄芩苷 $200 \mu\text{L}$, 作用 12 h 后, 加入 50% CSE $20 \mu\text{L}$, 同时设 1% DMSO 溶剂对照, 作用 4 h, 收集细胞后用荧光分光光度计测定, 激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm, 整个过程严格避光。

1.6 Annexin V-FTTC/PI 分析

采用 Annexin V-FTTC/PI 检测试剂盒, 按照说明书操作。接种细胞密度为 1×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 接种于 6 孔板中, 每孔加入 2 mL 培养基, 在细胞融合率达到 70% 时, 加入不同浓度的黄芩苷 $200 \mu\text{L}$, 同时设立 1% DMSO 溶剂对照, 作用 12 h 后, 加入 50% CSE 20

μL , 作用 16 h 后, 按说明书操作, 收集细胞后上流式细胞仪进行检测。

1.7 细胞 DNA 损伤的测定

按照 MTT 的实验结果, 选择细胞存活率 70% 以上的 CSE 浓度以及作用时间。细胞接种在 6 孔板中, 融合率在 70% 时加入含不同终浓度的黄芩苷作用 4 h 后加入 50% 的 CSE 作用 4 h, 以 1% DMSO 为溶剂对照, 按常规方法制片, 裂解, 解旋, 电泳。电泳结束后用 $40 \mu\text{L}$ 的溴化乙锭染色 ($\text{EB}, 20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 荧光显微镜下观察结果并拍照。用 CASP 图像分析软件测量每组中 50 个拖尾细胞的 Olive 尾距和尾长, 重复 3 次。

1.8 统计分析

所有实验结果最少重复 3 次, 细胞活性检测值用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 统计分析软件, 采用 One-Way ANOVA 进行检验, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 MTT 细胞活性测定结果

随 CSE 浓度和作用时间的增加, 细胞活性逐渐降低。与 DMSO 溶剂对照组比较, 除 10% CSE 作用组外, 其他各组与对照组比较均有统计学差异 ($P < 0.05$); 而随着 CSE 浓度的增大和作用时间的延长, 细胞存活率明显降低, 从用 20% CSE 作用 12 h 组的 $97.31\% \pm 2.15\%$ 下降到用 100% CSE 作用 36 h 组的 $4.77\% \pm 0.65\%$, 各浓度处理组和对照组间具有统计学差异 ($P < 0.05$), 结果见图 1。单独作用下黄芩苷各浓度组对细胞存活率影响和对照组比较没有统计学差异 ($P > 0.05$), A549 细胞加入 CSE 4 h 后, 细胞的存活率为 $85.85\% \pm 2.03\%$, 而 10, 20, $40 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄芩苷 + CSE 组细胞存活率分别为 $87.74\% \pm 1.62\%$, $91.73\% \pm 2.01\%$, $94.68\% \pm 1.54\%$, 显著高于 CSE 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 结果见图 2。

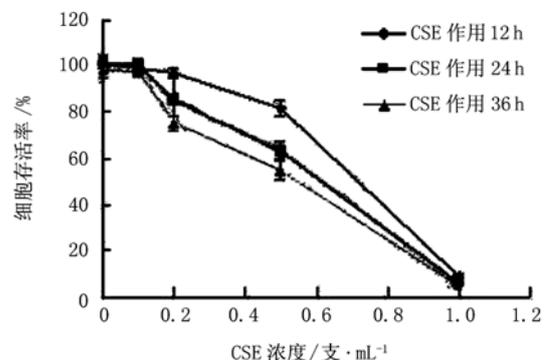


图 1 经 CSE 处理不同时间后 A549 细胞的存活率

Fig 1 Time- and concentration-dependent effect of CSE on the viability of A549 cells

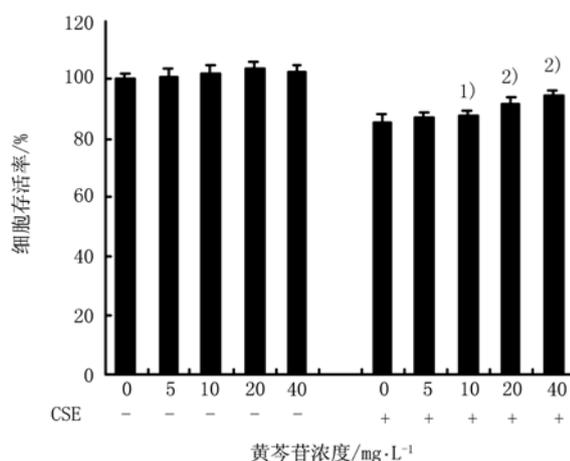


图 2 黄芩苷对 CSE 作用下 A549 细胞存活率的影响
CSE作用浓度为 0.5支·mL⁻¹, F=160.077, 与没有用黄芩苷治疗的CSE组比较, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01

Fig 2 The effect of baicalin on the viability of A549 cells exposed to CSE

Concentration of CSE: 0.5 cigarette·mL⁻¹, F=160.077. Compared with control cells without treatment group, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01

2.2 黄芩苷对CSE作用细胞内ROS水平的影响

在荧光分光光度计下, 荧光强度反映了细胞内ROS的生成情况。黄芩苷对CSE作用细胞内ROS水平的影响实验结果见表1。空白对照组荧光强度明显低于其他组, 有统计学差异(P<0.01)。CSE组荧光强度最高, 经过黄芩苷处理后的CSE组, 荧光强度降低, 说明黄芩苷能降低CSE诱导的细胞内ROS

的生成, 从而降低CSE对细胞造成的氧化损伤。

表 1 黄芩苷预处理对 CSE 作用下细胞内 ROS 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effect s of CSE and baicaline on the ROS of cells($\bar{x} \pm s$)

组别	荧光强度
空白对照组	0.424±0.007
CSE 处理组	0.736±0.011 ¹⁾²⁾
黄芩苷 10 mg·L ⁻¹ + CSE 组	0.685±0.011 ¹⁾²⁾
黄芩苷 20 mg·L ⁻¹ + CSE 组	0.653±0.006 ¹⁾²⁾
黄芩苷 40 mg·L ⁻¹ + CSE 组	0.633±0.006 ¹⁾²⁾

注: 与空白对照组比较, ¹⁾P<0.01; 与 CSE 处理组比较, ²⁾P<0.01

Note: Compared with blank control group, ¹⁾P<0.01; compared with CSE treatment group, ²⁾P<0.01

2.3 Annexin V-FTTC/PI分析结果

A549细胞经不同浓度黄芩苷预处理12 h后, 加入CSE作用16 h, 在Annexin V-FTTC/PI散点图上可见随着黄芩苷浓度的增加, 位于右上和右下象限的细胞量逐渐减少, 由单纯的CSE作用组的38.12%降到黄芩苷40 mg·L⁻¹预处理组的11.86%, 并且位于左下象限的正常细胞的数量也有增加, 由CSE组的60.80%增加到了黄芩苷40 mg·L⁻¹预处理组的83.66%。黄芩苷20 mg·L⁻¹和40 mg·L⁻¹作用组细胞凋亡率降低, 与CSE组比较有统计学差异(P<0.01)。结果见图3。

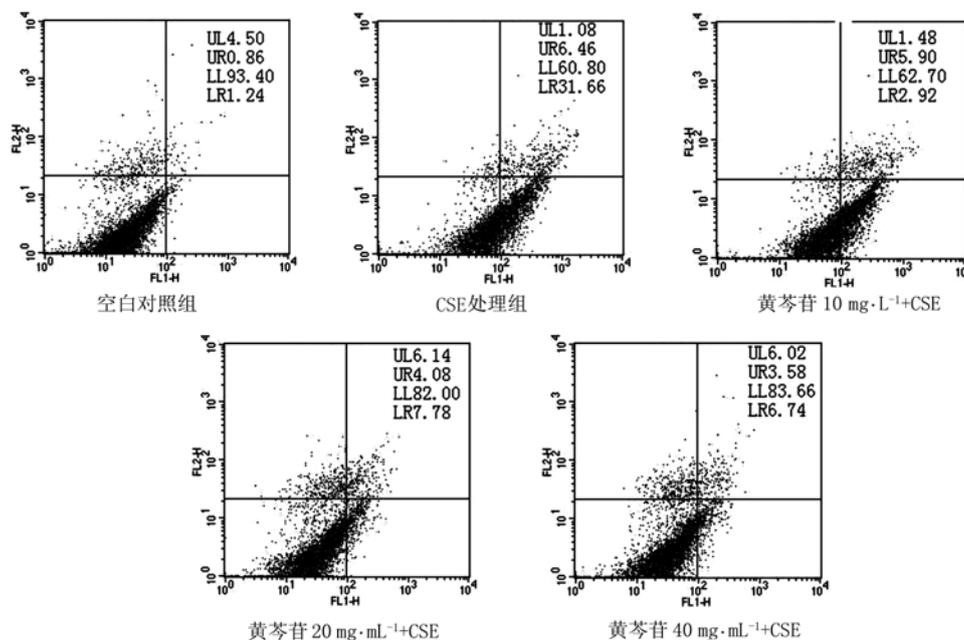


图 3 不同浓度黄芩苷与 CSE 作用 A549 细胞 16 h 后的凋亡结果(Annexin V-FTTC/PI 法)

Fig 3 Apoptosis of A549 cells 16 h after the treatment of CSE and baicalin analyzed by flow cytometry (Annexin V-FTTC/PI staining)

2.4 黄芩苷对CSE诱导的细胞DNA损伤作用测定结果

彗星实验结果显示黄芩苷+CSE作用组,在尾部DNA百分含量、尾长、尾距、Olive尾距4个参数与CSE作用组相比均有统计学差异($P<0.05$),结果见表2。

表2 CSE和黄芩苷作用对A549细胞DNA损伤结果
Tab 2 Effects of CSE and baicalin on the DNA damage of A549 cells

组别	DNA损伤指标			
	尾部DNA含量/%	尾长	尾距	Olive尾距
空白对照组	8.49±5.62	6.00±3.26	0.66±0.76	0.94±0.67
黄芩苷10 mg·L ⁻¹ 组	44.83±8.83 ¹⁾	23.48±4.89 ¹⁾²⁾	11.27±5.59 ¹⁾²⁾	7.50±1.62 ¹⁾²⁾
黄芩苷20 mg·L ⁻¹ 组	34.47±7.24 ¹⁾²⁾	20.62±3.52 ¹⁾²⁾	7.21±2.33 ¹⁾²⁾	5.65±1.29 ¹⁾²⁾
黄芩苷40 mg·L ⁻¹ 组	23.44±7.11 ¹⁾²⁾	16.32±3.15 ¹⁾²⁾	4.00±1.84 ¹⁾²⁾	3.51±1.15 ¹⁾²⁾
CSE处理组	50.11±9.07 ¹⁾	25.48±4.45 ¹⁾	13.06±3.54 ¹⁾	9.04±2.10 ¹⁾

注:与空白对照组比较,¹⁾ $P<0.05$;与CSE处理组比较,¹⁾²⁾ $P<0.05$
Note: Compared with blank control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with CSE treatment group, ¹⁾²⁾ $P<0.05$

3 讨论

黄芩苷是唇形科植物黄芩的有效成分之一,目前报道的药理作用包括清热解毒、抑菌抗炎、螯合金属离子、降压、抗变态反应和清除超氧阴离子等,临床用于肝炎、高血压、感染等疾病^[3]。本研究主要就其对CSE引起的细胞损伤保护作用进行相关的研究,并对其可能的机制进行了初步探讨。

本研究以A549细胞作为研究对象,探讨黄芩苷对CSE诱导的人肺泡上皮细胞损伤的保护作用。研究结果显示CSE能降低A549细胞的存活率,并且有浓度和时间依赖关系。黄芩苷能明显抑制CSE导致的A549的细胞存活率下降,降低CSE引起的细胞凋亡率增加。

ROS的检测结果表明黄芩苷能降低CSE诱导的细胞内ROS的生成。ROS是真核细胞在有氧呼吸过程中,一小部分氧不能被完全还原而形成的,具有较强氧化作用,包括超氧阴离子(O₂⁻)、羟自由基(OH·)、过氧化氢(H₂O₂)等。在人体内可引起脂类的过氧化、蛋白质的变性以及DNA的断裂等,参与一系列炎症和变性疾病的形成,并且有研究表明活性氧自由基可以通过损伤DNA、影响信号传导以及参与记忆表达调控等途径来介导细胞凋亡^[4-5]。

细胞凋亡是一种程序性细胞死亡过程,是生物有机体在进化过程中形成的一种主动性细胞死亡

方式,该过程受到细胞外微环境和细胞内遗传物质的调控。用Annexin V-FTTC/PI双染可用于检测活细胞、凋亡细胞及坏死细胞。由于正常细胞不被染色,凋亡细胞可被标记上Annexin V,坏死细胞和凋亡晚期细胞可被PI染色,因此利用流式细胞仪技术可以将各个细胞群明显的区分开来。试验结果也看出黄芩苷作用后能够明显降低早期和晚期凋亡细胞量,增加正常细胞量。这一趋势与黄芩苷对细胞内ROS含量的影响趋势一致,提示黄芩苷对CSE引起的细胞损伤保护作用的机制可能是降低其ROS的作用所致。也有报道黄芩茎叶总黄酮能够减轻H₂O₂对心肌细胞的损伤作用,降低H₂O₂导致的培养心肌细胞凋亡率。并且黄酮类有明显的自由基清除活性,10 nmol·L⁻¹黄芩苷在培养人体神经细胞瘤SH-SY5Y细胞株中可对抗H₂O₂引起的损伤^[6-8]。彗星实验结果也显示黄芩苷干预组的DNA损伤指标与CSE组有明显的减轻。

目前普遍认为,烟气的危害主要与细胞的氧化损伤有关,香烟烟雾能够对多种细胞产生氧化应激损伤,抑制细胞的生长和增殖,促进细胞凋亡,使细胞内ROS含量上升,对细胞的DNA造成损伤。同样,抗氧化剂能减少烟雾细胞毒性。有研究表明维生素E、维生素C、乙酰半胱氨酸、阿魏酸等抗氧化剂均有保护细胞,拮抗烟气细胞毒性的作用,有抗氧化功能的植物化学提取物同样能拮抗烟气的细胞毒性作用^[7-10]。本研究结果显示有抗氧化作用的黄芩苷同样能够拮抗烟气的细胞毒性作用,为利用黄芩苷作为开发减毒香烟的资源提供了一定的实验依据。

REFERENCES

- [1] BALS R, HIEMSTRA P S. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens [J]. Eur Respir J, 2004, 23(2): 327-333.
- [2] ZHANG X P, TIAN H, CHENG Q H. The research situation of baicalin's pharmacological effect [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2003, 19(11): 1212-1215.
- [3] YAN W D, WANG R J, HE Y, et al. The research progress of baicalin's pharmacological effect [J]. Shaanxi J Tradit Chin Med (陕西中医), 2002, 23(12): 1127-1129.
- [4] TANG Z X, WANG X Y. Role of reactive oxygen species in apoptosis [J]. J Anim Sci Vet Med(畜牧兽医杂志), 1997, 16(3): 52-54.
- [5] MATES J M, FRANCISCA M, SANCHEZ J. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2000, 32(2): 157-170.
- [6] SHIMIZU I, MA Y R, MIZOBUCHI Y, et al. Effects of Sho-saiko-to, a Japanese herbal medicine, on hepatic fibrosis

- in rats [J]. *Hepatology*, 1999, 29(1): 149-160.
- [7] GAO Z, HUANG K, XU H, et al. Protective effects of flavonoids in the roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HS-SY5Y cells [J]. *Pharmacol Res*, 2001, 43(2): 173-178.
- [8] LIU Y P, ZHOU X H, YANG H M, et al. Protective effect of SSTF against H₂O₂ induced cardiomyocyte injury in rats [J]. *Tianjin Med J (天津医药)*, 2008, 36(11): 885-887.
- [9] SUDHEER A R, MUTHUKUMARAN S, KALPANA C, et al.

- Protective effect of ferulic acid on nicotine-induced DNA damage and cellular changes in cultured rat peripheral blood lymphocytes: A comparison with N-acetylcysteine[J]. *Toxicol In vitro*, 2007, 21(4): 576-585.
- [10] VANISREE A J, SUDHA N. Curcumin combats against cigarette smoke and ethanol-induced lipid alterations in rat lung and liver [J]. *Mol Cell Biochem*, 2006, 288(1/2): 115-123.

收稿日期: 2010-07-29