

# 长裂苦苣菜水提取物对肺癌细胞 A549 增殖和凋亡的影响

贺燕云\*, 刘小敏, 张彩艳, 华子义

上海大学生命科学学院实验教学中心, 上海 200444

**摘要:** 为了探讨长裂苦苣菜水提取物对肺癌细胞 A549 的影响, 本研究用不同浓度的长裂苦苣菜水提取物作用于体外培养的 A549 细胞, 从细胞形态(显微镜观察)、细胞增殖活力(CCK-8 法)、细胞凋亡(Annexin V-FITC/PI 染色)、线粒体膜电位(JC-1 染色)和细胞内活性氧水平(荧光探针 DCFH-DA 染色)几个方面检测长裂苦苣菜水提取物对体外培养的 A549 细胞的影响。当处理浓度达到 1 mg/mL 作用细胞 48 h 后, 细胞出现明显皱缩的凋亡形态学特征, 与对照组相比处理组细胞增殖活力明显下降( $P < 0.05$ )。进一步用流式细胞仪检测发现  $\geq 1$  mg/mL 的处理浓度作用细胞 48 h 后细胞凋亡率显著提高( $P < 0.05$ ), 同时检测到处理组细胞的膜电位都明显下降, 细胞内活性氧水平明显上升, 都呈剂量依赖关系。这些结果表明长裂苦苣菜水提取物可以诱导 A549 细胞凋亡, 并抑制其生长和增殖, 是一种潜在的预防和抑制肿瘤生长的药食两用植物。

**关键词:** 长裂苦苣菜; 肺癌细胞; 增殖; 凋亡

中图分类号: Q28

文献标识码: A

## Apoptosis of Lung Cancer Line A549 Induced by *Sonchus branchyotus* DC Aqueous Extracts

HE Yan-yun\*, LIU Xiao-ming, ZHANG Cai-yan, HUA Zi-yi

Experimental Center for Life Sciences, School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China

**Abstract:** To illustrate the effects of *Sonchus branchyotus* DC (SBDC) aqueous extracts on human lung cancer A549 cells, assays, including morphologic changes observed by microscope, cell proliferation vitality tested by cell growth assay using cck8 kit, the apoptosis detected by Flow Cytometry, mitochondrial membrane potential assessed with the fluorescent probe JC-1 and reactive oxygen species formation measured by DCFH-DA staining, were performed. Observed with microscope, cells treated with high dose ( $\geq 1$  mg/mL) of SBDC were shrunken and the morphological characteristics of apoptosis was obvious compared with the control group. Also, cell proliferation was significantly inhibited compared with the control group ( $P < 0.05$ ). Furthermore, flow cytometry analysis revealed the apoptosis cells treated with high dose of SBDC ( $\geq 1$  mg/mL) for 48 hours were significantly increased compared with the control group. Finally, it was found in all treatment groups that the significant decrease of cell mitochondrial membrane potential and the increase of reactive oxygen species level. These results demonstrated that SBDC may induce human lung cancer A549 cells apoptosis and inhibit the cells growth and proliferation. SBDC is a potential edible herb for cancer prevention and treatment.

**Key words:** *Sonchus branchyotus* DC; lung cancer cell; apoptosis; proliferation

长裂苦苣菜(*Sonchus brachyotus* DC.)是菊科植物苦苣菜属的全草。我国长裂苦苣菜资源丰富,在西北、华北、东北、华中地区都有分布,民间人们有多种食用方法,普遍认为这种野菜无论怎样食用,如生吃,或煮熟后生水拌食或发酵后食用,食后人体都不会有异样反应,而且吃后生津止渴,清热解毒,消暑

保健作用较为明显。文献报道苦苣菜具有消炎、抗氧化、抗菌、抗肿瘤和降胆固醇活性<sup>[1,2]</sup>。Thomson等<sup>[3]</sup>研究表明,在新西兰,多吃苦苣菜的毛利人比不吃苦苣菜的非毛利人患结肠直肠癌的比例低一半。长裂苦苣菜抑癌作用的研究报道较少,本研究在细胞水平上首先探索长裂苦苣菜对肺癌细胞 A549 表型的影响,由于长裂苦苣菜是可食用植物,所以以长裂苦苣菜水提取物作为原料,作用 A549 后,探讨长裂苦苣菜的水提取物对肿瘤细胞的生长抑制及诱导细胞凋亡的作用,为保健品和新药的研

收稿日期:2014-2-28 接受日期:2014-07-02

基金项目:上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金资助项目(shu09064)

\* 通讯作者 Tel:86-21-66137535; E-mail:h.swallow@163.com

究开发提供线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 细胞株

人肺癌细胞株 A549, 购自中国科学院上海细胞生物研究所。

#### 1.1.2 主要试剂

长裂苦苣菜 (*Sonchus oleraceus* DC.) 为菊科苦苣菜属一年生或两年生草本植物, 本材料采于晋西北农田, 经上海大学生命学院王伟博士鉴定。RPMI-1640 培养基 (CORNING); 胎牛血清 (Hyclone); 胰蛋白酶 (Hyclone); CCK-8 试剂盒 (上海七海复泰生物公司); Annexin V-FITC/PI 双染法细胞凋亡检测试剂盒 (上海七海复泰生物公司); 线粒体膜电位检测试剂盒 (Jc-1, 碧云天生物公司); 活性氧检测试剂盒 (碧云天生物公司)。

#### 1.1.3 主要仪器

流式细胞仪为 Moflow XDP; CO<sub>2</sub> 培养箱; 倒置相差荧光显微镜为 LEICA 公司产品; 酶标仪为美国 BioRad 产品; 冷冻干燥机为美国 LABCONCO 公司产品。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 长裂苦苣菜水提取物制备

采全草, 阴干, -80 °C 保存。将 8 g 的干长裂苦苣菜, 粉碎, 浸泡到 100 mL 沸水中, 超声 1 h, 沸水浴 30 min, 过滤两次, 分装原液经 24 h 冷冻干燥后制成冻干粉, -80 °C 保存, 备用。使用时, 用培养基重新溶解冻干粉, 0.22 μm 滤膜过滤后使用。

#### 1.2.2 细胞培养

以含 10% 新生牛血清、100 μg/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养基培养 A549, 37 °C、5% CO<sub>2</sub>, 恒温培养箱中常规消化传代。

#### 1.2.3 细胞形态观察

细胞均匀铺在 24 孔板中, 待细胞贴壁生长至覆盖培养板底部 50% ~ 60% 时, 用不同浓度长裂苦苣菜水提取物处理细胞 48 h, 另设不加药的空白对照, 每个剂量设三个重复, 在光学显微镜下观察细胞形态。

#### 1.2.4 细胞增殖活力检测 (CCK-8 法)

将细胞均匀铺于 96 孔板中, 待细胞贴壁生长至

覆盖培养板底部 50% ~ 60% 时, 用不同浓度长裂苦苣菜水提取物处理细胞 48 h, 检测前 4 h 先换无血清培养基培养, 每孔加 5 μL CCK-8 溶液, 避光温育 1 ~ 2 h, 用酶标仪测 450 nm 下的吸光值, 每个剂量重复 4 次, 实验重复 3 次。

#### 1.2.5 Annexin V-FITC/PI 法检测细胞凋亡

不同浓度长裂苦苣菜水提取物处理细胞 48 h 后收集到的细胞, 200 μL loading buffer 悬浮细胞, 2.5 μL FITC 染色, 室温避光处理 15 min, 再用 5 μL PI 染色, 冰浴避光处理 5 min 后上流式细胞仪检测, 用 Summit 5.2 获取数据并分析。

#### 1.2.6 细胞膜电位的检测

不同浓度长裂苦苣菜水提取物处理细胞 48 h 后收集到的细胞, 加入 Jc-1 染色工作液后, 避光温育 20 min。染色完成后, 用 1 mL Jc-1 (5X) 与 4 mL 超纯水比例配制的 Jc-1 (1X) 洗涤缓冲液 (冰浴) 洗涤两遍后流式细胞仪检测, 用试剂盒提供的 CCCP 作为诱导线粒体膜电位下降的阳性对照。用 FL1 (FITC) 和 FL2 (RPE-TR) 通道接收信号。

#### 1.2.7 活性氧水平检测

不同浓度长裂苦苣菜水提取物处理细胞 48 h 后收集到的细胞, 用活性氧检测试剂盒染色, DCFH-DA 与无血清培养基 1:1000 的比例稀释 DCFH-DA (10 mM) 为 10 μM 作为工作液进行探针装载, 避光温育 20 min。处理完成后, 用无血清培养基洗涤三遍, 洗去未进入细胞的探针, 荧光显微镜下观察细胞。

#### 1.2.8 统计学处理

所得数据采用 GraphPad Prism5 软件进行统计学分析, 以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 实验结论

### 2.1 细胞形态观察

如图 1 所示, 长裂苦苣菜水提取物作用 A549 48 h 后, 光镜下直接可见未给药对照组细胞贴壁状况良好, 细胞透明, 状态佳, 细胞折光性好; 而实验组细胞的密度明显降低, 细胞贴壁能力减弱、细胞间连接松散、折光性差, 悬浮细胞和颗粒增加, 浓度越高, 细胞状态越差, 最高浓度时细胞稀疏已接近死亡。但用 1.25 mg/mL 的青菜处理 A549 48 h 后, 细胞并未出现凋亡特征, 反而比对照组细胞生长更好。

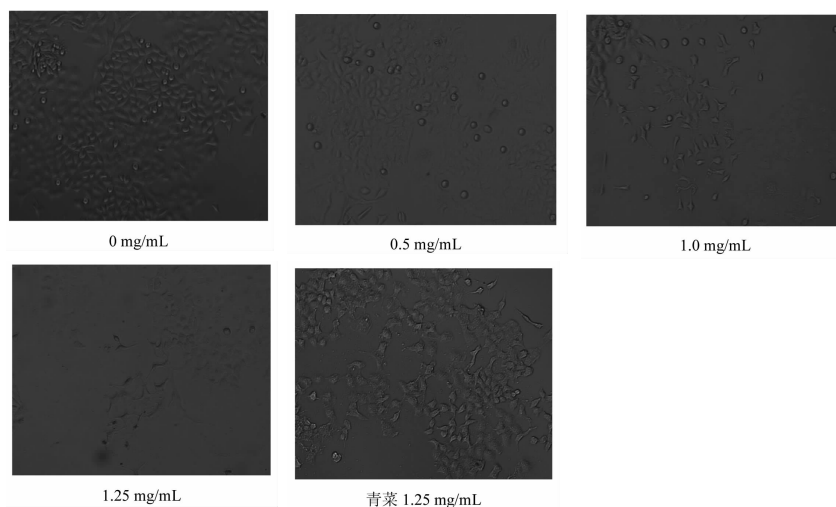


图1 不同浓度长裂苦苣菜水提取物对 A549 细胞生长的影响

Fig. 1 Morphologic changes of A549 cells after the treatment with different concentrations of SBDC

## 2.2 细胞增殖活力检测

如图 2 所示,长裂苦苣菜水提取物能抑制 A549 细胞的增殖,处理浓度大于 1 mg/mL 的处理组与其剂量、作用时间呈正相关,且与空白对照组比较,均有显著性差异( $P < 0.05$ )。而本实验中同时做了另外一种十字花科芸薹属蔬菜青菜对这两株细胞生长的影响,用同样方法处理材料,高浓度(1.25 mg/mL)的青菜水提取物处理肺癌细胞 A549 48 h 后却能很明显地促进细胞的生长。

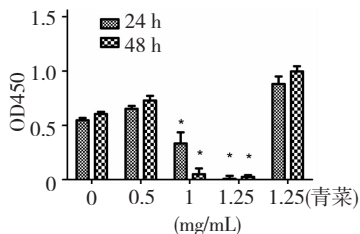


图2 不同浓度长裂苦苣菜的水提取物对 A549 细胞增殖的影响

Fig. 2 Proliferative activity changes of A549 after the treatment with different concentrations of SBDC

\* 表示与对照组相比达到显著水平  $P < 0.05$

Compared with control group, \*  $P < 0.05$

## 2.3 细胞凋亡检测

在细胞凋亡的早期阶段,胞浆膜磷脂的不对称性丧失,导致膜内侧磷脂酰丝氨酸(PS)从细胞膜内层暴露于外层,从而可被 PS 特异的 Annexin-V 探针所标记,PI 不能透过完整的细胞膜,但在凋亡中晚

期的细胞和死细胞,PI 能够透过细胞膜而使细胞核红染。因此将 Annexin-V 与 PI 匹配使用,就可以将凋亡早晚期的细胞以及死细胞区分开来。流式 Annexin-V-FITC/PI 双参数图(图 3)可见,右下象限(FITC +/PI-)和右上象限(FITC +/PI+)分别代表细胞的早期凋亡和晚期凋亡,左下象限为活细胞(FITC-/PI-),左上象限为坏死细胞(FITC-/PI+)。不同剂量的长裂苦苣菜作用 A549 细胞的平均凋亡率分别为 8.1%、11.4%、43.7%、69.8%,当处理浓度达到 1 mg/mL,作用 48h 后,处理组凋亡率与对照组相比均有显著性意义( $P < 0.05$ )。

## 2.4 细胞膜电位的检测

线粒体膜电位的下降是细胞凋亡的一个标志性事件<sup>[4,5]</sup>。在线粒体膜电位较高时,探针 JC-1 聚集在线粒体的基质中,形成聚合物,产生红色荧光;在线粒体膜电位较低时,JC-1 不能聚集在线粒体的基质中,此时 JC-1 为单体,产生绿色荧光。因此可通过荧光颜色的转变来检测线粒体膜电位的变化。如图 4 所示活细胞线粒体膜电位高,线粒体内 JC-1 聚合物的浓度高,红色荧光很强,在流式图上表现为双阳性,而凋亡细胞则大多为 FITC 单阳性。用带红色荧光信号的细胞比例的下降来表示线粒体去极化程度,长裂苦苣菜水提取物处理 A549 48 h 后,经 JC-1 染色,双阳性细胞随着药物浓度的增加逐渐减少,表明长裂苦苣菜水提取物处理细胞后,细胞的膜电位明显下降,结合前期的实验结果表明长裂苦苣菜确

## 实能诱导肺癌细胞 A549 凋亡。

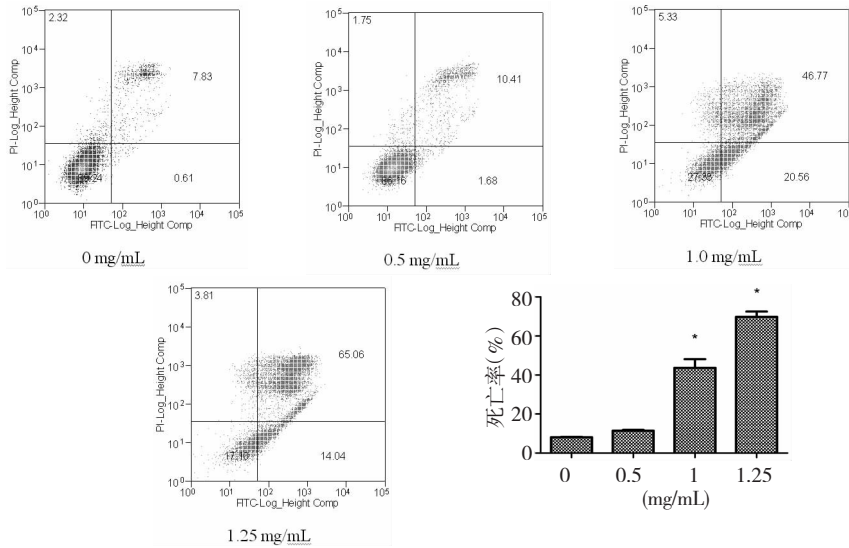


图3 不同浓度长裂苦苣菜水提取物作用 A549 细胞凋亡的检测

Fig. 3 Apoptosis of A549 cells by FCM after treatment with different concentrations of SBDC

\* 表示与对照组相比达到显著水平  $P < 0.05$

Compared with control group, \*  $P < 0.05$

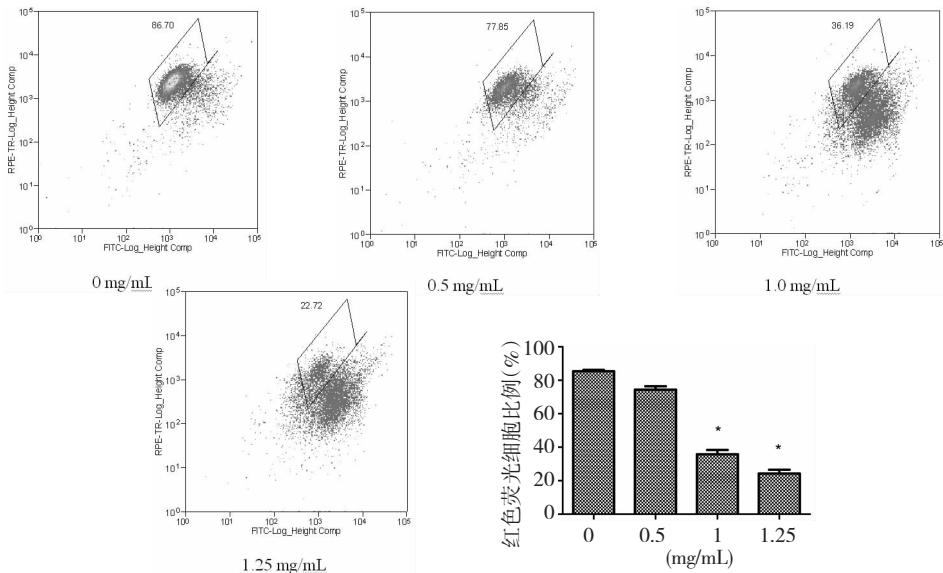


图4 流式细胞仪检测不同浓度长裂苦苣菜水提取物作用 A549 细胞膜电位的变化

Fig. 4 Mitochondrial membrane potential changes of A549 cells after treatment with different concentrations of SBDC

\* 表示与对照组相比达到显著水平  $P < 0.05$

Compared with control group, \*  $P < 0.05$

## 2.5 细胞内活性氧水平检测

活性氧是线粒体介导的细胞凋亡和 DNA 损伤的重要的效应分子。很多的证据表明活性氧影响细胞敏感性,激活细胞凋亡途径<sup>[6,7]</sup>。同时活性氧的产生在一些抗肿瘤新药诱导凋亡中发挥了重要作

用<sup>[8-10]</sup>。用荧光探针 DCFH-DA 染色检测经长裂苦苣菜水提取物处理后细胞活性氧水平的变化,如图 5 所示胞内活性氧的荧光强度(绿色荧光)随着药物浓度的增加而加强,表明长裂苦苣菜水提取物诱导肿瘤细胞 A549 细胞的凋亡途径中,活性氧可能是

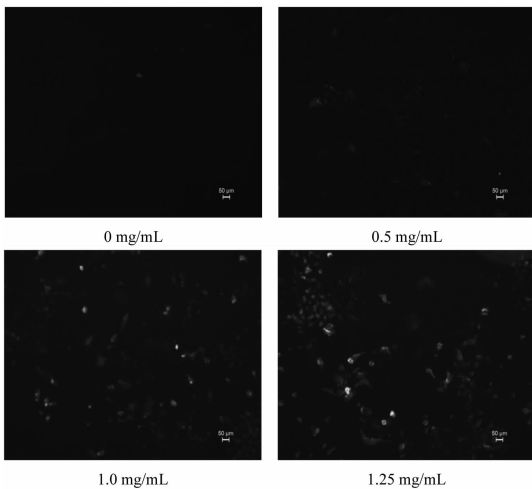


图5 不同浓度长裂苦苣菜水提取物作用 A549 细胞, 细胞内活性氧水平检测

Fig. 5 Reactive oxygen species level changes of A549 cells after treatment with different concentrations of SBDC

个重要的介导因子。

### 3 讨论

近年我国各类癌症发病率日益上升,迫切需要找出既能抑制癌细胞增殖又对人体危害较少的药物,因此开发天然抗癌药物成为研究热点。本研究中的菊科苦苣属植物长裂苦苣菜(*Sonchus branchyotus* DC)为药食两用野生植物,我国晋西北人长期采食,以其特有的苦寒属性及所含成份,煮熟放置后长期不馊、食后具有泄热宁神,清心明目,消炎解毒作用。由于苦菜的食用方法多为沸水煮食或阴干后泡食,所以实验材料用阴干的长裂苦苣菜全草的水浸泡提取物作用于癌细胞,以此探索长裂苦苣菜水溶状态下对癌细胞的作用。这样的研究为开发长裂苦苣菜这种食用野菜,寻找预防和治疗癌症的新药物提供理论基础。

本实验观察了长裂苦苣菜水提取物对体外培养的肺癌细胞 A549 生长、增殖、凋亡的影响。低浓度剂量组(0.5 mg/mL)不能抑制细胞生长,当处理浓度达到 1 mg/mL 时,长裂苦苣菜水提取物作用 A549 48h 后对细胞有显著的抑制作用。本实验中同时做了另外一种十字花科芸薹属蔬菜青菜对细胞生长的影响,用同样方法处理材料,高浓度(1.25 mg/mL)的青菜水提取物处理肺癌细胞 A549 48 h 后却能很明显的促进细胞的生长(结果如图 2 所示)。因此长裂苦苣菜与常食用的蔬菜青菜不同,含有能抑制

癌细胞生长和增殖的活性物质,对长裂苦苣菜所含抑癌成分的分析需进一步探索。

本实验所有数据表明长裂苦苣菜水提取物可以明显地抑制体外培养的肺癌细胞 A549 的增殖,而这种抑制作用可能是通过诱导细胞凋亡实现的,药物处理后细胞膜电位的下降说明这种凋亡可能是线粒体凋亡途径介导的。而胞内活性氧水平的上升说明细胞在凋亡过程中活性氧起了很重要的作用,这些只是初步结果,还需进一步验证。后期作者将对长裂苦苣菜水提取物诱导肺癌细胞 A549 凋亡的机制和对体内生长的细胞的影响做进一步研究,这对临床应用将有十分重要的指导意义。

### 参考文献

- 1 Xia DZ, Yu XF, Zhu ZY, *et al.* Antioxidant and antibacterial activity of six edible wild plants (*Sonchus* spp.) in China. *Nat Prod Res*, 2011, 25:1893-1901.
- 2 Vilela FC, Bitencourt AD, Cabral LD, *et al.* Anti-inflammatory and antipyretic effects of *Sonchus oleraceus* in rats. *J Ethnopharmacol*, 2010, 3:737-741.
- 3 Thomson B, Shaw I. A comparison of risk and protective factors for colorectal cancer in the diet of New Zealand maori and non-maori. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2002, 3:319-324.
- 4 Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science*, 1998, 281:1309-1312.
- 5 Ly JD, Grubb DR, Lawen A. The mitochondrial membrane potential [ $\Delta\psi(m)$ ] in apoptosis; an update. *Apoptosis*, 2003, 8:115-128.
- 6 Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8:579-591.
- 7 Wang J(王晶), Yi J(易静). Cancer cell killing via ROS; to increase or decrease, that is the question. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7:1875-1884.
- 8 Friesen C, Fulda S, Debatin KM. Induction of CD95 ligand and apoptosis by doxorubicin is modulated by the redox state in chemosensitive and drug resistant tumor cells. *Cell Death Differ*, 1999, 6:471-480.
- 9 Dai J, Weinberg RS, Waxman S, *et al.* Malignant cells can be sensitized to undergo growth inhibition and apoptosis by arsenic trioxide through modulation of the glutathione redox system. *Blood*, 1999, 93:268-277.
- 10 Sun SY, Li W, Yue P, *et al.* Mediation of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide induced apoptosis in human cancer cells by different mechanisms. *Cancer Res*, 1999, 59:2493-2498.