文章编号:1001-6880(2016)3-0424-05

兖州卷柏乙醇提取物对食管癌细胞增殖及 NO-cGMP 通路的影响

谢永华,温扬敏,罗彩林,杨维群*

泉州医学高等专科学校,泉州 362000

摘　要:采用体外培养人食管鳞癌细胞(EC-9706),观察兖州卷柏乙醇提取物对食管鳞癌细胞增殖的影响,并检测兖州卷柏乙醇提取物作用于食管鳞癌细胞后,一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(NOS)、环鸟苷酸(cGMP)含量的变化;同时,观察兖州卷柏乙醇提取物对培养小鼠肝细胞的影响。结果显示不同浓度兖州卷柏乙醇提取物能不同程度地抑制食管鳞癌细胞的增殖,降低其细胞中 NO、NOS 和 cGMP 含量,且对培养小鼠肝细胞的损伤具有保护效果。

关键词:兖州卷柏;食管鳞癌;NO;cGMP;肝细胞

中图分类号:R282.71　　**文献标识码**:A　　DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.3.019

Effect of *Selaginella involven* Ethanol Extract on Proliferation and NO-cGMP Pathway of Esophagus Squamous Carcinoma Cell

XIE Yong-hua, WEN Yang-min, LUO Cai-lin, YANG Wei-qun*

Quanzhou Medical College, Quanzhou 362000, China

Abstract: *Selaginella involven*, an herbal medicine, was traditionally used to treat cardiovascular diseases. In this study, *S. involven* ethanol extract was applied to esophagus squamous carcinoma cell (EC-9706) cultured *in vitro* for evaluating its effect of inhibiting EC-9706 proliferation. Meanwhile, NO-cGMP pathway as a potential key gateway was investigated by determining the level variation of nitric oxide (NO), nitricoxide synthase (NOS) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) in EC-9706, and hepatoprotective effects of *S. involven* were observed as well. The results showed that *S. involven* decreased the levels of NO, NOS and cGMP in EC-9706 cells, and suppressed cell proliferation. In addition, *S. involven* showed hepatoprotective effects on hepatic cell of mice cultured *in vitro*.

Key words: *Selaginellae involven*; esophagus carcinoma; NO; cGMP; hepatic cell

兖州卷柏(*Selaginellae involventis*, Sping)为卷柏科植物兖州卷柏的全草。传统医学认为其性味辛、甘、平、涩,微寒,主治湿热黄疸、痢疾、水肿、腹水、咳喘、肺炎、小儿惊风、咳血崩漏、痔疮、烫伤等[1]。近年来,对兖州卷柏活性成分提取及药理机制研究越来越受到关注,现已从兖州卷柏中提取出抗肿瘤、消炎、抗病毒、抗菌、抗氧化、降血糖血压等活性成分。韩国东洋科学研究所以卷柏提取物为主要活性成分,研制出预防与治疗骨质疏松症的药物,并申请专利[2]。

一氧化氮(NO)是一种重要信号分子,在维持血流和血管形成中发挥重要作用。基于 NO 信号途径开发了许多药物,其中最典型的是 Sildenafil(Viagra,伟哥)的开发,影响数百万人的生活。Sildenafil 是治疗勃起功能障碍和肺动脉高压的药物。其机制为:性兴奋后,阴茎海绵体释放 NO,NO 结合并激活溶解性鸟苷酸环化酶 sGC,生成环鸟苷酸(cGMP),导致阴茎螺旋动脉血管内膜平滑肌舒张,增加血流量而勃起。因此,基于 NO 信号通路是新型药物开发的重要途径与思路[3,4]。本文研究兖州卷柏乙醇提取物对人食管鳞癌细胞(EC9706)增殖及 NO-cGMP 信号通路的影响,为探讨兖州卷柏抗食管癌作用及机制提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　材料

兖州卷柏采自福建宁化县治平乡泥坑村,由泉州市医药研究所苏齐主任医师鉴定。人食管鳞癌细胞株 EC-9706 购自天呈科技生物公司。NO 和一氧化氮合酶(NOS)测定试剂盒购自上海贝博生物公

收稿日期:2015-08-12　　接受日期:2015-12-03

基金项目:福建省教育厅 A 类项目(JA13394);福建省卫生厅青年基金(2013-2-132)

*通讯作者 Tel:86-595-22136671;E-mail:qzwxywq@163.com

司。cGMP 测定试剂盒购自 Cayman chemical company。DMSO、MTT、RPMI1640 培养基,小牛血清购自赛默飞世尔科技公司(北京)。无水乙醇(西陇化工股份公司)。

1.2　实验方法

1.2.1　兖州卷柏乙醇提取物制备

取兖州卷柏全草除杂,水洗后晒干。放入粉碎机粉碎 3 min 成粉末。称取 30 g 兖州卷柏粉末,放入 1000 mL 玻璃瓶,加入固液比为 1∶30(g/mL)的 90% 乙醇溶液。将玻璃瓶放置于超声波清洗机(功率 400 W,频率 34 Hz),于温度 50 ℃条件下超声处理 60 min 后过滤,取上清液,减压蒸馏,得到乙醇提取物浸膏。

1.2.2　兖州卷柏乙醇提取物对人食管鳞癌细胞增殖的影响

人食管鳞癌细胞(Ec9706)用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液,在 5% CO_2、37 ℃饱和湿度条件下培养。收集对数生长期细胞,分于 96 孔板,调整细胞浓度约为 6000 个/孔。每孔分别加入含兖州卷柏乙醇提取物 0(空白对照组)、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 mg/mL 的培养液中培养,另设一组含 1 mg/mL 环磷酰胺(CTX)作为阳性对照。细胞分别培养 12、24 和 48 h。按 CCK8 试剂盒说明书测定细胞抑制率[5]。

抑制率(%) = (1-实验组吸光度/空白对照组吸光度) ×100%

1.2.3　兖州卷柏乙醇提取物对人食管鳞癌细胞 NO、NOS、cGMP 含量的影响

人食管鳞癌细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液,在 5% CO_2、37 ℃饱和湿度条件下培养。收集对数生长期细胞,分于 6 孔板,调整细胞浓度约为 1×10^5 个/孔。每孔分别加入含兖州卷柏乙醇提取物 0(空白对照组)、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 mg/mL 的培养液中培养,48 h 后,吸取培养上清液,按照 NO 试剂盒说明书测定 NO 含量;收集细胞,按照 NOS、cGMP 试剂盒说明书测定细胞 NOS、cGMP 含量。

1.2.4　兖州卷柏乙醇提取物对培养小鼠肝细胞的影响

断头处死 1 只清洁级昆明小鼠,放入 75% 乙醇浸泡 3 min 后带入细胞培养室。在无菌条件下解剖获取小鼠肝脏。肝脏组织用 PBS 反复漂洗 4 ~ 5 次,充分剪碎至 1 mm^3 小块;小块转至离心管,用 2% 胰蛋白酶 37 ℃水浴消化 10 min(其间每 2 ~ 3 min 振摇离心管 1 次)。80 目网过滤,取滤液离心,弃上清,加入细胞培养液,反复吹打混匀,离心,弃上清;细胞分于 96 孔板,调整细胞浓度约 1×10^5 个/孔。置入 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养,12 h 后更换培养液。分别设置:①药物处理组,细胞加入 5 mmol/L 的四氯化碳损伤培养 6 h 后。每孔分别加入溶解于 DMSO 的兖州卷柏乙醇提取物 0(control)、1、5、10、20、50 mg/mL 的培养液中培养,48 h 后按 CCK8 试剂盒说明书测定吸光度($A_{药物组}$)。②正常对照组,细胞不经过四氯化碳损伤培养 6 h 后,加入等体积的 DMSO 的培养液中培养,48 h 后按 CCK8 试剂盒说明书测定吸光度($A_{正常组}$)。③模型对照组,细胞加入 5 mmol/L 的四氯化碳损伤培养 6 h 后,加入等体积的 DMSO 的培养液中培养,48 h 后按 CCK8 试剂盒说明书测定吸光度($A_{模型组}$)。计算肝细胞保护率[6]。

肝细胞保护率(%) = ($A_{药物组}$ - $A_{模型组}$)/($A_{正常组}$ - $A_{模型组}$) ×100%

1.3　统计学方法

采用 SPSS11.5 统计软件,结果比较采用单因素方差分析。

2　实验结果

2.1　兖州卷柏乙醇提取物对人食管鳞癌细胞增殖的影响

兖州卷柏乙醇提取物对人食管鳞癌细胞(Ec9706)增殖的影响见图 1。从图 1 可以看出细胞培养 24 h 后,所有实验组与对照组(CTX)之间均无显著差异($P>0.05$)。细胞培养 48 h 后,与对照组

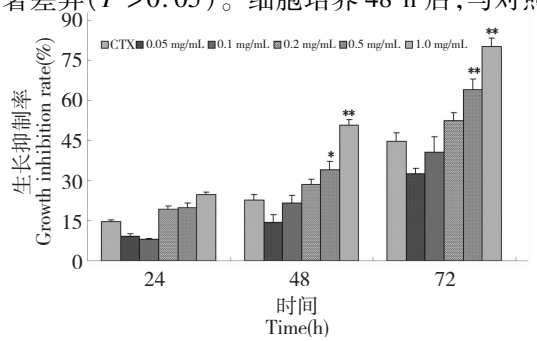

图 1　兖州卷柏乙醇提取物对人食管鳞癌细胞增殖的影响

Fig. 1　Effect of *S. involventis* ethanol extract on proliferation of esophagus carcinoma cell

注:与对照组(CTX)比较,* $P<0.05$;** $P<0.01$

Note: Compared with control (CTX), * $P<0.05$; ** $P<0.01$

比较,兖州卷柏乙醇提取物 0.5 mg/mL 实验组存在显著差异($P>0.05$),而 1.0 mg/mL 实验组存在极显著差异($P<0.01$)。细胞培养 72 h 后,兖州卷柏乙醇提取物 0.5 mg/mL 和 1.0 mg/mL 实验组与对照组存在极显著差异($P<0.01$)。细胞培养 48 h 和 72 h 后,随着兖州卷柏乙醇提取物浓度增加,肿瘤生长抑制率增加。

2.2 兖州卷柏乙醇提取物对人食管鳞癌细胞培养上清液 NO 含量的影响

从兖州卷柏乙醇提取物对人食管鳞癌细胞培养上清液 NO 含量的影响(图 2)可以看出,细胞培养上清液 NO 含量随乙醇提取物浓度增加而减小。与空白对照组比较不同浓度的乙醇提取物均能降低细胞培养液 NO 含量。兖州卷柏乙醇提取物浓度为 0.1 mg/mL 时,实验组 NO 含量与空白对照组之间存在显著差异($P<0.05$)。兖州卷柏乙醇提取物浓度大于 0.2 mg/mL 时,实验组 NO 含量与空白对照组之间均存在极显著差异($P<0.01$)。

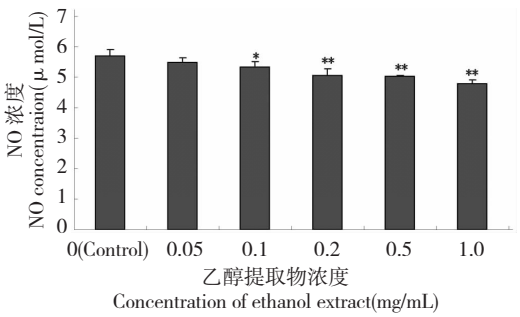

图 2 兖州卷柏乙醇提取物对人食管鳞癌细胞 NO 的影响

Fig. 2 Effect of *S. involventis* ethanol extract on NO of esophagus carcinoma cell

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;** $P<0.01$

Note: Compared with control, * $P<0.05$; ** $P<0.01$

2.3 兖州卷柏乙醇提取物对人食管鳞癌细胞 NOS 的影响

兖州卷柏乙醇提取物对人食管鳞癌细胞 NOS 的影响见图 3。从图 3 可以看出,人食管鳞癌细胞 NOS 活性随兖州卷柏乙醇提取物浓度增加而减少。除兖州卷柏乙醇提取物浓度为 0.05 mg/mL 的实验组外,各实验组 NOS 活性均比空白对照组有所降低。其中浓度为 0.1 mg/mL 时,实验组 NOS 活性与空白对照组之间存在显著差异($P<0.05$),而浓度大于 0.2 mg/mL 时,各实验组 NOS 活性与对照组之间均存在极显著差异($P<0.01$)。

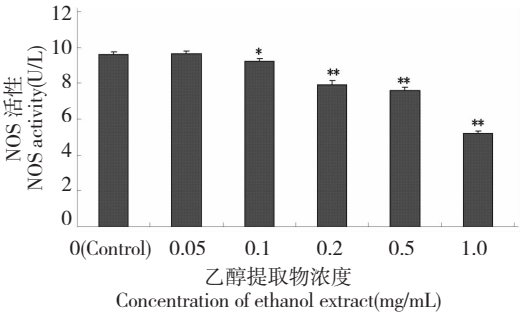

图 3 兖州卷柏乙醇提取物对人食管鳞癌细胞 NOS 的影响

Fig. 3 Effect of *S. involventis* ethanol extract on NOS of esophagus carcinoma cell

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;** $P<0.01$

Note: Compared with control, * $P<0.05$; ** $P<0.01$

2.4 兖州卷柏乙醇提取物对人食管鳞癌细胞 cGMP 的影响

从兖州卷柏乙醇提取物对人食管鳞癌细胞 cGMP 的影响(图 3)可以看出,不同浓度兖州卷柏乙醇提取物均能降低人食管鳞癌细胞的 cGMP 含量。其中兖州卷柏乙醇提取物浓度为 0.05 mg/mL 的实验组与空白对照组无显著差异,浓度为 0.1 mg/mL 的实验组与空白对照组之间存在显著差异($P<0.05$),浓度大于 0.2 mg/mL 的实验组 cGMP 含量与空白对照组之间存在极显著差异($P<0.01$)。

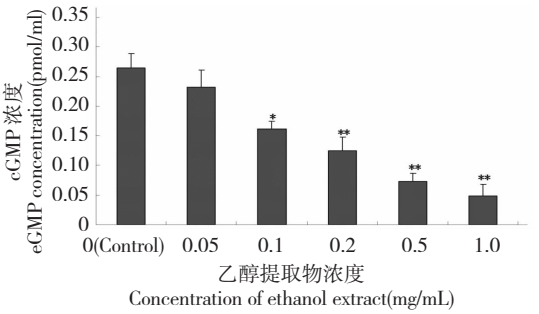

图4 兖州卷柏乙醇提取物对人食管鳞癌细胞 cGMP 的影响

Fig. 4 Effect of *S. involventis* ethanol extract on cGMP of esophagus carcinoma cell

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;** $P<0.01$

Note: Compare with control, * $P<0.05$; ** $P<0.01$

2.5 兖州卷柏乙醇提取物对培养小鼠肝细胞的影响

兖州卷柏乙醇提取物对培养小鼠肝细胞的影响见图 5。从图 5 可以看出,兖州卷柏乙醇提取物对原代培养小鼠肝细胞的损伤具有一定的保护作用,

并且其肝细胞保护率随浓度增加而增大。其中兖州卷柏乙醇提取物浓度为 20 mg/mL 和 50 mg/mL 实验组肝细胞保护率与对照组之间存在显著差异($P<0.05$)。

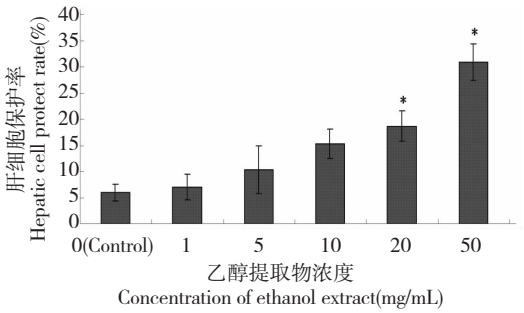

图 5　兖州卷柏乙醇提取物对培养小鼠肝细胞的影响

Fig. 5　Effect of *S. involventis* ethanol extract on hepatic cell of mice *in vitro*

注:与空白对照组比较,$^{*}P<0.05$;$^{**}P<0.01$

Note:Compare with control,$^{*}P<0.05$;$^{**}P<0.01$

3　讨论

3.1　兖州卷柏乙醇提取物对人食管鳞癌细胞增殖的影响

食管癌是人类常见的恶性肿瘤之一,我国食管癌发病率和病死率均居世界之首[7]。目前治疗食管癌的主要方法是手术治疗,由于肿瘤容易发生复发转移,单纯手术治疗食管癌患者 5 年生存率大约只有 20%[8]。如何减少食管癌术后复发转移已成为治疗食管癌的关键核心问题。虽然化疗药物辅助治疗对减少食管癌术后复发转移有一定效果,但一直未取得突破性进展。近年来,中医药在食管癌的治疗中越来越受重视,临床研究表明中药治疗食管癌在患者生存率、生存质量等效果均不亚于西药,但化疗药物的价格昂贵、毒副作用大[9]。

中草药具有天然性、起效温和、毒副作用小、患者依从性好且价格便宜等特点,在抗肿瘤新药的研发中日益引人注目。兖州卷柏为卷柏科植物兖州卷柏的全草,广泛分布于我国的西南及陕西、浙江、江西、福建、台湾、湖北、广东、广西、西藏等地。兖州卷柏的抗肿瘤效果越来越受关注,张昊等[10]研究兖州卷柏四种黄酮类化合物对人肝癌细胞 HepG2 生长的抑制活性,四种化合物均显示出比阳性对照(抗肝癌药物甲氨蝶呤)具有更强的抑制活性。邱丹缨等[11]研究也表明,兖州卷柏生物碱对小鼠 H22 肝癌细胞具有较强抑制作用。本实验结果表明,不同浓度兖州卷柏乙醇提取物均对培养 48 h 后的人食管鳞癌细胞(Ec9706)的生长具有抑制作用,且对其生长抑制率随兖州卷柏乙醇提取物浓度增大而增加。此结论与我们前期有关兖州卷柏水提物对人食管癌细胞的抑制效果相似[12]。

3.2　兖州卷柏乙醇提取物对人食管鳞癌细胞 NO-cGMP 信号通路的影响

肿瘤的复发生长及转移需要新生血管形成以获取血供,血管形成是肿瘤复发生长和转移的基础。NO 是一种重要信号分子,在维持血流和血管形成中发挥重要作用。NO 是由一氧化氮合酶(NOS)氧化 L-精氨酸产生的,可通过质膜扩散到临近细胞与鸟苷酸环化酶(GC)结合,GC 催化产生环鸟苷酸(cGMP),cGMP 作为信号分子激活蛋白激酶 G(PKG),PKG 分子活化后可降低细胞内的钙离子浓度,调节 Cl^-的分泌,从而介导血管扩张、抑制血小板的活化、聚集和分泌等重要的细胞功能[13]。NO 对肿瘤血管、淋巴管生成和肿瘤血液动力学的影响不仅促进了肿瘤的生长,而且还增加了肿瘤的侵袭和转移能力[14]。NO 可抑制血管平滑肌细胞迁移,改变微血管结构,通过调节血管生成,影响肿瘤浸润和转移[15]。NO 还能通过激活环鸟苷-磷酸途径抑制细胞内钙离子释放,从而影响肿瘤侵袭与转移[16]。

本文通过研究兖州卷柏乙醇提取物对人食管鳞癌细胞 NO-cGMP 信号通路的影响,探讨其抗肿瘤机制。结果显示兖州卷柏乙醇提取物能降低人食管鳞癌细胞 NO、NOS 和 cGMP 含量,且 NO、NOS 和 cGMP 含量变化与兖州卷柏乙醇提取物浓度之间均存在梯度关系。表明兖州卷柏可能通过减少食管鳞癌细胞 NO、NOS 和 cGMP 的含量影响 NO-cGMP 信号通路。而 NO-cGMP 通路与血管的形成有密切关系,NO 增加能促进 cGMP 分泌,进而促进血管生成。提示兖州卷柏可能有抑制肿瘤血管生成的作用。

3.3　兖州卷柏乙醇提取物具有肝细胞保护作用

肝脏是药物代谢的主要场所,对于药物的代谢作用无可替代,故也是药物损伤的主要器官之一。化学抗癌药物在杀伤肿瘤细胞的同时也不同程度地引起肝功能的损伤,影响治疗效果与预后。随着对抗肿瘤药物体内安全性研究的不断认识和深入,抗肿瘤药物引起重要器官毒性越来越受到关注[17,18]。兖州卷柏作为中药对人肝炎的治疗应用已有悠久历史,并取得良好治疗效果。林美珍[19]等使用兖州卷柏治疗 20 例肝炎患者,结果疗效显著。本研究结果

表明,不同浓度的兖州卷柏乙醇提取物均对培养小鼠肝细胞的损伤具有不同程度的保护效果,而且肝细胞保护率随浓度增加而增大。提示兖州卷柏对肝细胞损伤的保护作用可能也有利于肿瘤的治疗。至于,其保肝作用的机制还有待进一步研究。

4 结论

采用体外细胞培养实验,研究表明不同浓度兖州卷柏乙醇提取物不同程度地抑制人食管鳞癌细胞(Ec9706)的增殖。兖州卷柏乙醇提取物能降低人食管鳞癌细胞 NO、NOS 和 cGMP 的含量,并且对培养小鼠肝细胞损伤具有一定的保护作用。

参考文献

1 Chen SL(陈士林),Lin YL(林余霖). Quintessence of Materia Medica (中草药大典). Beijing:Press of Military Medical Sciences,2006. 349-353.

2 Yeul MJ,Shuk S,Hee LY,*et al*. Composition for prevention or treatment of osteoporosis comprising extract of *Selaginellae herba*. South Korea,KR20120044451,2012-05-08.

3 Mahmood G,Mei Z,Hojjat H,*et al*. Therapeutic effect of sildenafil on blast-induced tinnitus and auditory impairment. *Neuroscience*,2014,269:367-382.

4 Bredt DS,Hwang PM,Glatt CE,*et al*. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P450 reductase. *Nature*,1991,351:714-718.

5 Xu SY(徐淑云),Bian RL(卞如濂),Chen X(陈修),*et al*. Experimental Methodology of Pharmacology(药理实验方法学). Beijing:People's medical Publishing House,2001. 292-295.

6 Fan S(范适). The separation of hepatoprotective active ingredient and HPLC fingerprint of *Phyllanthus urinaria L.* Changsha:Hunan Agricultural University(湖南农业大学),PhD,2007.

7 Jason B,Wheeler F,Carolyn E,*et al*. Epidemiology of esophageal cancer. *Surgical Clin North Am*,2012,92:1077-1087.

8 Li XM(李学民),Tang S(汤萨),Peng XQ(彭秀青),*et al*. Changes of five-year survival rates in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res Pre Treat*(肿瘤防治研究),2014,41:237-242.

9 Lu P,Liang QD,Li R,*et al*. Effect of traditional Chinese medicine on survival and quality of life in patients with esophageal carcinoma after esophagec. *Chin J Integr Med*,2006,12:175-179.

10 Zhang H(张昊). Component analysis and research on antitumor activity of *Selaginellae involventis*. Changsha: Central South University(中南大学),PhD. 2009.

11 Qiu DY(邱丹婴),Wen YM(温扬敏),Xie YH(谢永华),*et al*. Effect of ultrasonic-assisted extraction and anti-proliferation activities on hepatocellular carcinoma cell H22 of alkaloid from *Selaginella involvens*. *Sci Technol Food Ind*(食品工业科技),2013,34:265-268.

12 Xie YH(谢永华),Wen YM(温扬敏),Luo CL(罗彩林),*et al*. Extraction of active substances from *Selaginellae involventis* spring and inhibitory effects on human esophageal carcinoma cells. *Herald Med* (医药导报),2012,31:1132-1135.

13 Lecarpentier E,Claes V,Timbely O,*et al*. Role of both actin-myosin cross bridges and NO-cGMP pathway modulators in the contraction and relaxation of human placental stem villi. *Placenta*,2013,34:1163-1169.

14 He HL(何海蕾),Tang WP(唐维平). Review of nitric oxide research in tumor growth and metastasis. *Acta Acade Med Jiangxi*(江西医学院学报),2009,49:131-134.

15 Knipp BS,Ailawadi G,Ford JW,*et al*. Increased MMP-9 expression and activity by aortic smooth muscle cells after nitric oxide synthase inhibition is associated with increased nuclear factor-kappa B and A activator protein-1 activity. *J Surg Res*, 2004,116(1):70-80.

16 Ohhashi T,Mizuno R,Ikomi F, *et al*. Current topics of physiology and phamacology in the lymphatic system. *Pharmacol Ther*,2005,105:165-188.

17 Tian M(田梅). Advances in drug-induced liver injury. *Chin J Urban Rural Ind Hygiene*(中国城乡企业卫生),2014,161:35-37.

18 Ren J(任军),Zhou XN(周心娜). Advances in liver damage of antitumor drugs. *Chin J Drug Applic Monitor* (中国药物应用与监测),2012,9:309-312.

19 Lin MZ(林美珍),Xu ZQ(许振强). Recognition of *Selaginellae involventis* spring and treatment on hepatitis. *Strait Pharm J*(海峡药学),2004,16:94-95.