

## 连香树精油对人肝癌 SMMC-7721 细胞抗肿瘤机制的研究

李 飞,杨添雁,沙秀芬,李 群\*

四川师范大学生命科学院,成都 610101

**摘要:**为探讨连香树精油的体外抗肿瘤活性。以人肝癌 SMMC-7721 细胞为受试细胞株,利用 MTT 法、流式细胞术、JC-1 法和 Western blot 法评价连香树精油的体外抗肿瘤活性。结果表明:连香树精油处理 24 h 后可降低 SMMC-7721 细胞存活率;细胞中 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期的比例下降,G<sub>2</sub>/M 期的比例升高;细胞线粒体膜电位降低;自噬相关蛋白 LC3-II、Beclin-1 表达上升,加入自噬抑制剂氯喹后 LC3-II 蛋白与 Bcl-2 抗凋亡蛋白表达下降。综上说明连香树精油能抑制 SMMC-7721 细胞的增殖活性,通过阻滞 G<sub>2</sub>/M 期抑制细胞分裂,通过降低线粒体膜电位诱导 SMMC-7721 细胞凋亡,而自噬在 SMMC-7721 细胞凋亡过程中作为一种保护机制而存在。

**关键词:**连香树精油;抗肿瘤;凋亡;自噬

中图分类号:R96

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)12-2058-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.12.006

## Anti-tumor mechanism of *Cercidiphyllum japonicum* oil on human hepatoma SMMC-7721 cells

LI Fei, YANG Tian-yan, SHA Xiu-fen, LI Qun\*

College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China

**Abstract:** To explore the *in vitro* antitumor activity of *Cercidiphyllum japonicum* oil. Human hepatoma SMMC-7721 cells were used as test cell strains. The *in vitro* antitumor activities of *Cercidiphyllum japonicum* oil were evaluated by MTT, flow cytometry, JC-1 and Western blot. The results showed that the survival rate of SMMC-7721 cells could be decreased after treatment with *Cercidiphyllum japonicum* oil for 24 hours; the proportion of G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase in cells decreased the proportion of G<sub>2</sub>/M phase increased; the mitochondrial membrane potential decreased; autophagy-related protein LC3-II, Beclin-1 expression increased. After adding the autophagy inhibitor chloroquine, LC3-II and Bcl-2 expression decreased. In summary, the *Cercidiphyllum japonicum* oil can inhibit the proliferation activity of SMMC-7721 cells, inhibit cell division by blocking G<sub>2</sub>/M phase, and induce apoptosis of SMMC-7721 cells by decreasing mitochondrial membrane potential. Autophagy exists as a protective mechanism in the apoptosis of SMMC-7721 cells.

**Key words:** *Cercidiphyllum japonicum* oil; anti-tumor; apoptosis; autophagy

肝癌是发生于肝细胞或肝内胆管细胞的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>,具有发病年龄轻、恶性程度高、起病隐匿、进展快等特点<sup>[2]</sup>。目前肝癌治疗手段主要包括手术、化疗和放疗等,但手术切除不彻底、复发率和转移率高是影响肝癌临床治疗疗效的主要问题,其治疗的总体疗效仍不理想<sup>[3]</sup>。而天然抗肿瘤药物因具有疗效显著、副作用小、作用独特与研究成本低的特点逐渐广泛应用于临床治疗。

连香树(*Cercidiphyllum japonicum*)又名山白果、云义树和五君树,是连香树科连香树属的一种古老落叶高大乔木<sup>[4]</sup>。主要分布于日本和我国山西南部、四川西部与东南部等海拔 400~2 500 m 的常绿和落叶阔叶混交林中<sup>[5]</sup>。连香树果实主要治疗小儿的惊风抽搐肢冷等症状;树皮煎水后饮服,对感冒、痢疾等疾病具有特殊疗效<sup>[4]</sup>;其甲醇提取物能抑制蔬菜病原菌的活性<sup>[6]</sup>。虽然连香树拥有较高药用价值,但缺乏对其功效的系统科学研究。目前对连香树的研究大多数是关于濒危状况、培育繁殖、群落结构、遗传多样性和生态特性等方面,而针对其次生代谢和功能开发方面研究较少。本实验采用连

收稿日期:2019-07-04 接受日期:2019-11-27

基金项目:香料植物资源开发与利用四川省高校重点实验室开放基金(2018XLZ012,2016XLZ006)

\*通信作者 Tel:86-018011457355; E-mail:liqun01234@163.com

香树精油处理人肝癌 SMMC-7721 细胞,探究其对该细胞增殖、凋亡与自噬的影响,并检测自噬与凋亡相关蛋白探究其可能的抗肿瘤机制,进一步为肝细胞癌的治疗提供依据,同时为连香树的开发利用提供理论参考。

## 1 材料与仪器

### 1.1 受试细胞株

人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞购自成都哈里生物工程有限公司,由本实验室培养。

### 1.2 供试材料

连香树叶片采自海拔 1 800 米的四川省广元市旺苍县盐井河采育场,经宜宾学院魏琴教授鉴定为连香树科连香树属连香树(*Cercidiphyllum japonicum*)。在实验室将叶片干燥后粉碎至粉末,通过水蒸气蒸馏法提取连香树叶片中的精油。

### 1.3 主要仪器

G154TW 型高压蒸汽灭菌锅(厦门致微仪器有限公司);飞鸽牌 TGL-16B 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂);stratos 型 Thermo Fisher Scientific 高速冷冻离心机(上海天呈医流科技股份有限公司);MD/Spectra Max M2 多功能细胞分析仪(美国 Molecular Devices 公司);Leica DMIL LED 型倒置显微镜(北京冠普佳科技有限公司);Leica DM3000 型荧光显微镜(北京瑞科中仪科技有限公司);cytoflex 流式分析仪(Beckman)。

### 1.4 主要试剂

吡啶橙/溴化乙锭 AO/EB、碘化丙啶 PI、噻唑兰 MTT(Biosharp 生物公司);二甲基亚砜 DMSO(Amersco 生化公司);RPMI-1640 液体培养基、无支原体新生牛血清、胰蛋白酶(成都哈里生物工程有限公司);5-氟尿嘧啶(中国食品药品检定研究院);Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司);JC-1 线粒体膜电位试剂检测盒(上海碧云天生物公司);磷酸氯喹 CQ(上海陶素生化科技有限公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 细胞培养

人肝癌细胞 SMMC-7721 细胞采用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 完全培养基,置于 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 的二氧化碳培养箱中培养,细胞呈贴壁生长,用含

0.25% EDTA 的胰酶消化传代,取对数生长期的细胞用于实验。

### 2.2 MTT 法检测人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖活性

取对数生长期的 SMMC-7721 细胞 100 μL(1 × 10<sup>4</sup> 个/mL)接种于 96 孔板。培养 24 h 后,分别加入 98 μL 培养基和 2 μL 终浓度为 0.0375、0.075、0.15、0.3、0.6 mg/mL 的连香树精油,并设置空白对照、阴性对照、阳性对照(80 μg/mL 5-氟尿嘧啶)和溶剂对照(DMSO)。培养 12、24、48 h 后,加入 20 μL MTT,4 h 后吸去上清液,加入 150 μL DMSO,用酶标仪检测 480 nm 处的吸光度,计算细胞抑制率:

$$\text{抑制率} = 1 - \left( \frac{\text{OD}_{\text{实验组}}}{\text{OD}_{\text{空白组}}} \right) \times 100\%$$

### 2.3 流式细胞仪检测人肝癌 SMMC-7721 细胞周期

取对数生长期的 SMMC-7721 细胞 2 mL(1 × 10<sup>6</sup> 个)接种于 6 孔板。预培养 24 h 后,分别加入 0.15、0.3、0.6 mg/mL 的连香树精油 20 μL,并以 DMSO 作为溶剂对照。培养 24 h 后收集细胞。加入预冷的 70% 的乙醇 2 mL 置于 4 °C 冰箱固定 24 h。PBS 洗涤后加入 1 mg/mL 的 RNase 和碘化丙啶(PI)各 25 μL,避光染色 30 min,用 ACEA Novo-Cyte 流式细胞仪检测细胞周期变化。

### 2.4 人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡检测

#### 2.4.1 细胞凋亡率检测

参照 2.3 细胞前期处理方法,培养 24 h 后收集细胞。参照 AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒说明书操作,用 ACEA NovoCyte 流式细胞仪检测细胞凋亡率。

#### 2.4.2 细胞凋亡形态观察

参照 2.3 细胞前期处理方法,培养 24 h 后收集细胞。PBS 重悬细胞,加入 100 mg/mL 的 AO/EB 染液 5 μL,取混匀后的细胞悬液 10 μL 于载玻片,用 Leica DM3000 型荧光显微镜下观察形态并拍照。

#### 2.4.3 线粒体膜电位检测

参照 2.3 细胞前期处理方法,培养 24 h 后收集细胞。重悬细胞,加入 1 mL JC-1 染色工作液,二氧化碳培养箱孵育 40 min。离心 5 min,弃上清液,JC-1 染色缓冲液(1 ×)洗涤 2 次,加入 2 mL 培养基。取 150 μL 细胞悬液于黑色 96 孔板,测定 JC-1 聚合体和 JC-1 单体的吸光度。

## 2.5 人肝癌 SMMC-7721 细胞自噬检测

参照 2.3 细胞前期处理方法,在透射电子显微镜下观察细胞自噬体形态并拍照,用 Western blot 法测定 SMMC-7721 细胞中 LC3-I、LC3-II、Beclin-1 蛋白表达水平。

## 2.6 人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡与自噬的联系

参照 2.3 细胞前期处理方法,培养 24 h 后收集细胞。弃上清液,用 Western blot 方法检测 SMMC-7721 细胞中 LC3-I、LC3-II、Bcl-2 蛋白表达水平。

## 2.7 统计学分析

所有实验数据采用统计软件 SPSS 22.0 处理,Probit 法计算  $IC_{50}$  值,单因素方差分析显著性差异,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义,各实验组均重复 3 次。

## 3 结果与分析

### 3.1 连香树精油对人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖的影响

连香树精油对 SMMC-7721 细胞增殖的影响结果见图 1,由图 1 可知,精油对人肝癌 SMMC-7721 细胞有明显抑制作用,且呈剂量依赖性。处理 12、24、48 h 后的  $IC_{50}$  值分别为 0.108、0.104、0.132 mg/

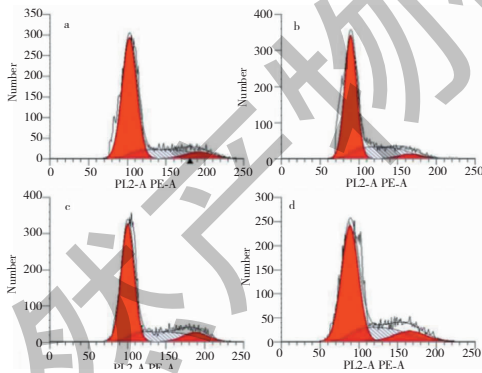


图 2 连香树精油对人肝癌 SMMC-7721 细胞周期的影响

Fig. 2 Effect of *C. japonicum* oil on the cell cycle of human hepatoma SMMC-7721 cells

注:a,b,c,d 依次为 0、0.15、0.3、0.6 mg/mL 的连香树精油。Note:a:control group;b:0.15 mg/mL;c:0.3 mg/mL;d:0.6 mg/mL.

### 3.3 连香树精油诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡

#### 3.3.1 连香树精油对 SMMC-7721 细胞凋亡率的影响

用流式细胞仪检测连香树精油诱导 SMMC-7721 细胞凋亡率的结果见图 3,随着连香树精油浓度的升高,细胞凋亡率呈剂量依赖性升高。当处理浓度为 0 mg/mL 时,细胞凋亡率(早凋 + 晚凋)为 4.19%;当处理浓度为 0.6 mg/mL 时,细胞凋亡率

mL,可得出 24 h 处理后  $IC_{50}$  值为最小,因此选取 24 h 作为后续试验的处理时间。

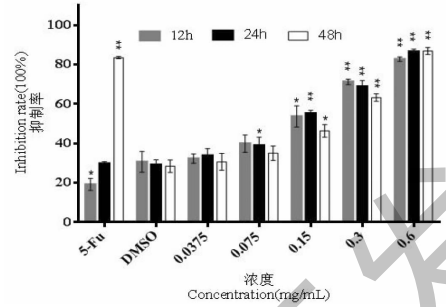


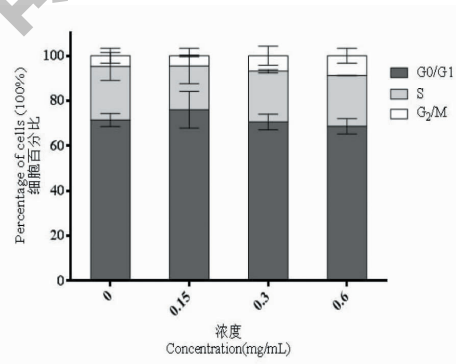
图 1 连香树精油对人肝癌 SMMC-7721 细胞活力的影响

Fig. 1 Effect of *C. japonicum* oil on the viability of human hepatoma SMMC-7721 cells

注:与溶剂对照组相比,\* $P < 0.05$ ,显著差异;\*\* $P < 0.01$ ,极显著差异。Note:Compared to the solvent control group,\* $P < 0.05$ , significant difference;\*\* $P < 0.01$ ,extremely significant difference.

### 3.2 连香树精油使人肝癌 SMMC-7721 细胞阻滞在 $G_2/M$ 期

连香树精油对 SMMC-7721 细胞周期的影响如图 2,  $G_0/G_1$  期的细胞比例由 73.47% 下降到 66.27%;  $G_2/M$  期的细胞比例由 7.14% 升高至 11.14%,说明此时部分细胞阻滞在  $G_2/M$  期。



(早凋 + 晚凋)为 20.58%。

#### 3.3.2 AO/EB 染色观察人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡形态

AO/EB 染色后 SMMC-7721 细胞凋亡形态结果见图 4,由图 4 可知,随着连香树精油浓度的升高,绿色荧光的活细胞数目减少,呈桔红色或红色荧光的凋亡细胞数增多。

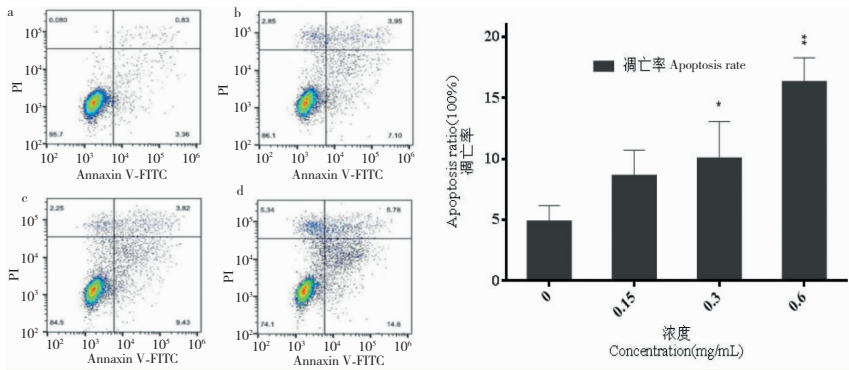


图3 连香树精油对人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡率的影响

Fig. 3 Effect of *C. japonicum* oil on the apoptosis rate of human hepatoma SMMC-7721 cells

注:a,b,c,d 依次为 0、0.15、0.3、0.6 mg/mL 的连香树精油。与溶剂对照组相比, \*  $P < 0.05$ , 显著差异; \* \*  $P < 0.01$ , 极显著差异。Note: a: control group; b: 0.15 mg/mL; c: 0.3 mg/mL; d: 0.6 mg/mL. Compared to the solvent control group, \*  $P < 0.05$ , significant difference; \* \*  $P < 0.01$ , extremely significant difference.

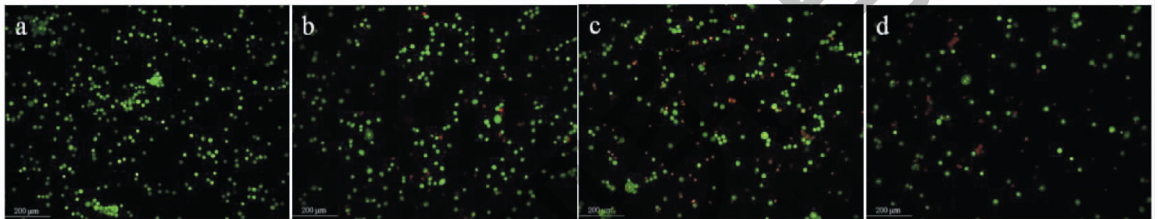


图4 AO/EB 染色观察连香树精油诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡

Fig. 4 AO/EB staining observe the apoptosis of human hepatoma SMMC-7721 cells induced by *C. japonicum* oil

注:a,b,c,d 依次为 0、0.15、0.3、0.6 mg/mL 的连香树精油。Note: a: control group; b: 0.15 mg/mL; c: 0.3 mg/mL; d: 0.6 mg/mL.

### 3.3.3 连香树精油对人肝癌 SMMC-7721 细胞线粒体膜电位的影响

表 1, 由表 1 可知, 随着连香树精油浓度的升高, SMMC-7721 细胞内的膜电位比值呈剂量依赖性下降。表明连香树精油诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞线粒体膜电位下降。

经 JC-1 法测定连香树精油处理人肝癌 SMMC-7721 细胞后胞内线粒体膜电位的变化情况结果见

表 1 连香树精油对人肝癌 SMMC-7721 细胞的线粒体膜电位的影响

Table 1 Effect of *C. japonicum* oil on mitochondrial membrane potential of human hepatoma SMMC-7721 cells

连香树精油浓度 Concentration of essential <i>C. japonicum</i> oil (mg/mL)	线粒体膜电位比值 (OD <sub>聚合体</sub> /OD <sub>单体</sub> ) Mitochondrial membrane potential ratio (OD <sub>聚合体</sub> /OD <sub>单体</sub> )
0	1.41 ± 0.009 <sup>a</sup>
0.15	1.37 ± 0.009 <sup>b</sup>
0.3	0.94 ± 0.005 <sup>c</sup>
0.6	0.82 ± 0.012 <sup>d</sup>

注:试验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,  $n = 3$ ; 同一列不同字母表示在  $P = 0.05$  水平差异显著。

Note: Mean ± STDEV,  $n = 3$ ; Different letters in the same column show significant difference at  $P = 0.05$  level.

### 3.3.4 连香树精油对人肝癌 SMMC-7721 细胞 Caspase1 和 8 的影响

连香树精油对凋亡与焦亡相关蛋白的影响如表 2 所示, 由表 2 可知, 随着连香树精油浓度的升高, SMMC-7721 细胞内 Caspase8 相对对照组无明显上

调趋势, Caspase1 相对对照组先下降后上升但无明显升高趋势, 表明连香树精油没有明显通过诱导死亡受体介导的细胞凋亡和活化 Caspase1 介导的细胞焦亡两条途径来诱导细胞死亡。

表2 连香树精油对人肝癌 SMMC-7721 细胞中 Caspase8 和 Caspase1 的影响

Table 2 Effects of *C. japonicum* essential oil on Caspase8 and Caspase1 in human hepatoma SMMC-7721 cells

连香树精油浓度 Concentration of essential oil of <i>C. japonicum</i> ( mg/mL)	Caspase8 蛋白相对表达量 Relative expression level of Caspase8 protein	Caspase1 蛋白相对表达量 Relative expression level of Caspase1 protein
0	0.757 4	0.984 5
0.15	0.121 8	0.787 0
0.3	0.498 9	0.612 4
0.6	1.000 0	1.000 0

### 3.4 连香树精油诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞自噬

#### 3.4.1 透色电镜观察自噬体形态

透色电镜下自噬体形态如图 5 所示,由图可知,当连香树精油浓度为 0 mg/mL 时,细胞结构完整,

核膜清晰;当连香树精油浓度为 0.3 mg/mL 时,细胞内染色质呈无规律的块状分布,出现许多明显的双层膜结构或者包裹着需要降解的细胞器的自噬体,说明连香树精油诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞自噬。

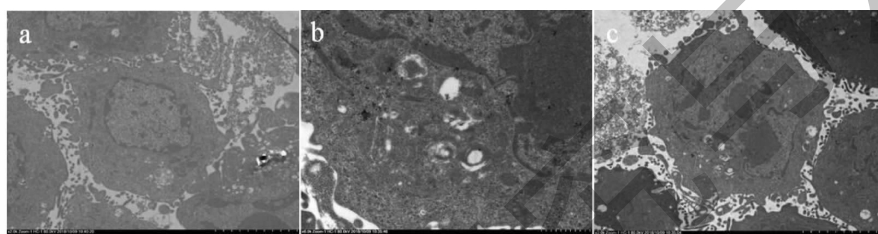


图5 透射电镜观察连香树精油诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞自噬

Fig. 5 Transmission electron microscopy observe the autophagy of human hepatoma SMMC-7721 cells induced by *C. japonicum* oil  
注:a (5.0 μm)、b (5.0 μm)、c (1.0 μm) 依次为 0、0.3、0.3 mg/mL 的连香树精油。Note:a (5.0 μm):control group;b (5.0 μm):0.3 mg/mL;c (1.0 μm):0.3 mg/mL.

#### 3.4.2 连香树精油对自噬相关蛋白的影响

连香树精油对自噬相关蛋白的影响如图 6 所示,结果表明,随着连香树精油浓度的升高,细胞中自噬相关蛋白 LC3- I 逐渐向 LC3- II 转化,造成 LC3- II 蛋白的大量积累,Beclin-1 的蛋白水平明显上调,表明连香树精油诱导了人肝癌 SMMC-7721 细胞发生较高水平的自噬。

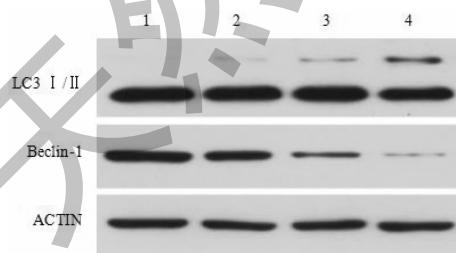


图6 连香树精油对人肝癌 SMMC-7721 细胞中自噬相关蛋白的影响

Fig. 6 Effect of *C. japonicum* oil on autophagy-

associated protein in human hepatoma SMMC-7721 cells

注:1、2、3、4 依次为 0.6、0.3、0.15、0 mg/mL 的连香树精油。

Note:1:0.6 mg/mL;2:0.3 mg/mL;3:0.15 mg/mL;4:control

group.

### 3.5 连香树精油诱导的自噬抑制人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡

为研究连香树精油诱导 SMMC-7721 细胞自噬在凋亡中的作用,将自噬抑制剂氯喹和连香树精油共同孵育 SMMC-7721 细胞,自噬相关蛋白表达结果如图 7 所示。由图 7 可知,LC3- I 蛋白积累较多,LC3- II 蛋白减少,表明自噬受到抑制。抑制连香树精油诱导 SMMC-7721 细胞的自噬后,蛋白表达结果如图 8 所示,Bcl-2 抗凋亡蛋白随连香树精油浓度的增大而明显下调,表明在抑制了连香树精油诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞的自噬后促进了连香树精油对人肝癌 SMMC-7721 细胞的凋亡作用。

## 4 结论

近年来,植物来源的天然提取物及其次生代谢产物生物活性的研究备受关[7],特别是植物抗肿瘤药物领域发展迅猛。目前已筛选出具有抗肿瘤活性的植物提取物多达 3 万种,应用于临床的抗肿瘤药物已有 80 多种[8]。具有生理或者药理活性的植物提取物能够通过阻滞细胞周期,诱导细胞发生凋亡和自噬等方式来抑制并杀死肿瘤细胞[9]。本研究

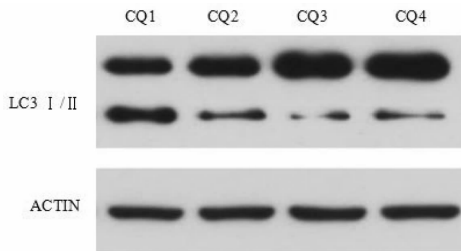


图7 抑制自噬后连香树精油对人肝癌 SMMC-7721 细胞中自噬相关蛋白的影响

Fig. 7 Effects of *C. japonicum* oil on autophagy-related proteins in human hepatoma

SMMC-7721 cells after autophagy inhibition

注: CQ1、CQ2、CQ3、CQ4 依次为自噬抑制剂氯喹与 0.6、0.3、0.15、0 mg/mL 的连香树精油共同孵育。Note: CQ1: 0.6 mg/mL + CQ; CQ2: 0.3 mg/mL + CQ; CQ3: 0.15 mg/mL + CQ; CQ4: control group + CQ.

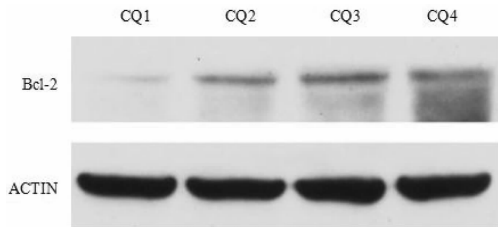


图8 抑制自噬后连香树精油对人肝癌 SMMC-7721 细胞中 Bcl-2 蛋白的影响

Fig. 8 Effect of *C. japonicum* oil on Bcl-2 protein in human hepatoma

SMMC-7721 cells after autophagy inhibition

注: CQ1、CQ2、CQ3、CQ4 依次为自噬抑制剂氯喹与 0.6、0.3、0.15、0 mg/mL 的连香树精油共同孵育。Note: CQ1: 0.6 mg/mL + CQ; CQ2: 0.3 mg/mL + CQ; CQ3: 0.15 mg/mL + CQ; CQ4: control group + CQ.

也从这几个方面研究了连香树精油对人肝癌 SMMC-7721 细胞的作用情况。

细胞有丝分裂的正常运行对细胞的增殖和生长有着重要的调控作用,阻滞细胞周期导致细胞周期紊乱已经成为药物作用于肿瘤细胞的新靶点<sup>[10]</sup>。研究表明,蛇床子通过阻滞 N87 胃癌细胞 G<sub>2</sub>/M 期从而抑制细胞增殖<sup>[11]</sup>;SHIP2 同样阻滞喉癌 Hep-2 细胞的 G<sub>2</sub>/M 期<sup>[12]</sup>。在本研究中,连香树精油处理人肝癌 SMMC-7721 细胞 24 h 后,细胞中 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期的比例由 73.47% 下降到 66.27%,G<sub>2</sub>/M 期的比例由 7.14% 升高至 11.14%,推测连香树精油通过将部分人肝癌 SMMC-7721 细胞阻滞在 G<sub>2</sub>/M 期达到抑制细胞分裂的作用。

细胞凋亡是一个在相关基因调控下进行高度程

序化的过程,遵循固有的程序性自杀机制,细胞发生凋亡时可以形成凋亡小体,最后被邻近的细胞或吞噬细胞所吞噬<sup>[13]</sup>。在本实验中,连香树精油处理人肝癌 SMMC-7721 细胞 24 h 后诱导了肿瘤细胞的凋亡,表现为线粒体膜电位的下降。细胞外源死亡受体介导的凋亡主要的三条 Fas/FasL、TRAIL 和 TNFR 信号转导通路都需要 Caspase8 的活化。本研究中测定了连香树精油对人肝癌 SMMC-7721 细胞中 Caspase8 蛋白的影响,发现 Caspase8 蛋白水平相比对照组无显著上调,推测连香树精油没有通过外源死亡受体途径诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡。

细胞焦亡是近年来新的一种依赖于炎症小体半胱天冬酶-1 (Caspase-1) 的细胞死亡方式。Wei 等<sup>[14]</sup>的研究表明半夏凝集素通过激活 MAPKs/NF- $\kappa$ b 通路释放 IL-1 $\beta$ ,IL-1 $\beta$  依赖于 Caspase1 发挥促炎作用。本研究中,通过测定连香树精油对人肝癌 SMMC-7721 细胞中 Caspase1 蛋白的水平发现 Caspase1 与对照组相比先下调后上升,无明显上调趋势,推测连香树精油没有诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞焦亡。

细胞自噬是细胞通过自噬溶酶体途径从而降解细胞内自身物质的过程,与细胞凋亡都属于细胞程序性死亡。二者间存在紧密的联系,主要表现为:第一,自噬和凋亡共同促进细胞死亡;第二,自噬与凋亡互为拮抗作用,自噬为肿瘤细胞提供生存所须的原料或 ATP,抑制细胞凋亡;第三,自噬促进细胞向凋亡的转化<sup>[15]</sup>。Li 等<sup>[16]</sup>的研究发现药用植物远志中的甾黄酮诱导 SKOV3 和 OVCAR3 人卵巢癌细胞发生的自噬抑制了其诱导的凋亡作用;还有研究表明饥饿诱导 K562/ADM 白血病细胞发生保护性自噬,抑制其凋亡的发生<sup>[17]</sup>。本研究发现连香树精油诱导了人肝癌 SMMC-7721 细胞自噬,推测自噬过程抑制了肿瘤细胞的凋亡作用。在加入自噬抑制剂后,Bcl-2 抗凋亡蛋白水平显著下调,促进了 SMMC-7721 细胞的凋亡作用,表明连香树精油处理 SMMC-7721 细胞后诱导的自噬作为一种保护机制存在,二者表现为拮抗作用。可以考虑通过抑制细胞的自噬过程来促进连香树精油对人肝癌 SMMC-7721 细胞的凋亡作用来杀死肿瘤细胞。

综上所述,连香树精油对人肝癌 SMMC-7721 细胞具有显著的细胞毒性作用,显著降低了细胞活力并破坏细胞结构;通过阻滞部分 G<sub>2</sub>/M 期的细胞影响细胞周期;降低细胞中的线粒体膜电位诱导 SMMC-7721 细胞发生凋亡。同时连香树精油能够强烈人肝癌 SMMC-7721 细胞发生自噬,而自噬在精



油诱导的细胞凋亡中作为一种保护机制存在。

### 参考文献

- Xiang D, Dai JG. Progress in comprehensive treatment of primary hepatocellular carcinoma[J]. Shandong Med J (山东医药), 2017, 57: 111-112.
- Cui TT, Yang Y. Progress in pharmacotherapy for the advanced hepatocellular carcinoma[J]. J Pharm Res (药学研究), 2018, 2: 108-111.
- Jiang H, Wen S, Shao GL. Clinical advances of molecular-targeted therapy on primary hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res Prev Treat (肿瘤防治研究), 2016, 5: 427-434.
- Liao XL, Li YX, Quan QM, et al. Research on physiological and biochemical material's change of *Cercidiphyllum japonicum* at different altitudes and adaptability[J]. Guihaia (广西植物), 2011, 5: 641-645.
- Huang SW. Biosystematics study on the endangered tree species *Cercidiphyllum japonicum*[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University (南京林业大学), 2007.
- Yu SC, Li JK, Liu XL, et al. Inhibitory activity of 6 ancient rare plants on 3 vegetable pathogenic bacteria[J]. Jiangsu Agr Sci (江苏农业科学), 2018, 6: 95-96.
- Wang HX, Min JX. Advances in discovering anticancer agents from plant secondary metabolites and their derivatives[J]. Chin Bull Life Sci (生命科学), 2015, 8: 1005-1019.
- Xie J, Tan F. Advances in studies on antitumor drugs originated from plant[J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2007, 2: 285-289.
- Liu WL, Xu RT, Zhao M. Research progress in anti-tumor mechanism of natural medicine[J]. Med Recapit (医学综述), 2015, 10: 1778-1780.
- Gao Y, Lin LP, Ding J. A review: cell cycle regulation[J]. Chin Bull Life Sci (生命科学), 2005, 17: 318-322.
- Yang Z, Yang L, Li XJ, et al. Osthole inhibits cell proliferation by promoting apoptosis and cell cycle arrest in gastric cancer cell line N87[J]. Chin J Biochem Mol Biol (中国生物化学与分子生物学报), 2019, 35(1): 74-80.
- Tang T, Xiao ZY, Zeng F. Effect of SHIP2 on the biological behavior of laryngeal carcinoma Hep-2 cells and mechanism of radiosensitization[J]. Med J Wuhan Univ (武汉大学学报:医学版), 2019, 40: 226-234.
- Li R, Wang XW, Yang XH, et al. Cell terminal fate-cell death[J]. Chin Sci Bull (科学通报), 2016, 61: 1983-1987.
- Wang W, Mao S, Yu H, et al. Pinellia pedatisecta lectin exerts a proinflammatory activity correlated with ROS-MAPKs/NF- $\kappa$ B pathways and the NLRP3 inflammasome in RAW264.7 cells accompanied by cell pyroptosis[J]. Int Immunopharmacol, 2019, 66: 1-12.
- Kan YY, Wang YJ, Li Q, et al. Interaction between autophagy and apoptosis during tumor development[J]. Chin J Comp Med (中国比较医学杂志), 2018, 28: 106-112.
- Zhu L, Liu X, Li D, et al. Autophagy is a pro-survival mechanism in ovarian cancer against the apoptotic effects of euxanthone[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 103: 708-718.
- Chen J, Xue MM, Ma HZ, et al. Relationship between the changes in autophagic activity and apoptosis of K562/ADM cells induced by starvation[J]. J Lanzhou Univ: Med Sci (兰州大学学报:医学版), 2018, 44(1): 53-58.
- Damtoft S, Jensen SR. Three phenylethanoid glucosides of unusual structure from *Chirita sinensis* (Gesneriaceae)[J]. Phytochemistry, 1994, 37: 441-443.
- Kamto ELD, Ngono DSB, Mbing FN, et al. An aromatic amide C-glycoside and a cyclitol derivative from stem barks of *Piper guineense* schum and thonn (Piperaceae)[J]. Phytochem Lett, 2014, 10: lxxvi-lxxxi.
- Choi YH, Kim HK, Linthorst HJM, et al. NMR metabolomics to revisit the tobacco mosaic virus infection in *Nicotiana tabacum* leaves[J]. J Nat Prod, 2006, 69: 742-748.
- Cheminat A, Zawatzky R, Becker H, et al. Caffeoyl conjugates from *Echinacea* species: structures and biological activity[J]. Phytochemistry, 1988, 27: 2787-2794.
- Merfort I. Caffeoylquinic acids from flowers of *Arnica montana* and *Arnica chamissonis*[J]. Phytochemistry, 1992, 31: 2111-2113.
- Hu JW, Wu L, Tu ZX, et al. Extraction and antioxidant activity of chlorogenic acids and isochlorogenic acids from *Gynura procumbens* (Lour.) Merr. [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2019, 31(1): 38-43.
- Wang X, Jiang L, He YL, et al. Effect of caffeoyl quinic acid from *Periploca forrestii* on anti-rheumatoid arthritis in vitro and its mechanism[J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2018, 34: 1362-1367.
- Xia C, Li MM, Li YL. Study on anti-RSV activities and QSAR of natural caffeoylquinic acid derivatives[J]. J Chin Med Mater (中药材), 2016, 39: 383-388.
- Wu AZ, Lin CZ, Zhu CC. Progress in structure-activity relationship of phenylethanoid glycosides[J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2013, 25: 862-865.
- Zhao BB, Li T, Yan YM. Research progress in anti-inflammatory effects of salidroside and its aglycone p-tyrosol[J]. E-J Transl Med (转化医学电子杂志), 2018, 5(8): 55-58.

(上接第 2081 页)