

论著·基础研究      doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.06.006

# 香叶醇联合对丙基苯甲醛抑制肝癌 HepG2 细胞增殖作用及机制研究<sup>\*</sup>

付薛艳<sup>1</sup>,黄羽静<sup>1</sup>,王 玲<sup>1</sup>,杨 扬<sup>1,2△</sup>

(1. 桂林医学院药学院,广西桂林 541000; 2. 广西肝脏损伤与修复分子医学重点实验室,广西桂林 541004)

**[摘要]** **目的** 探讨香叶醇联合对丙基苯甲醛抑制肝癌 HepG2 细胞增殖的作用及机制。**方法** 采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测香叶醇和对丙基苯甲醛单独及联合用药对 HepG2 细胞的抑制作用,分析不同浓度的香叶醇和对丙基苯甲醛对 HepG2 细胞增殖的影响,以 AnnexinV-FITC/PI 双染法结合流式细胞术检测香叶醇与对丙基苯甲醛单独及联合作用对肝癌 HepG2 细胞凋亡的影响。**结果** 浓度依次递增的香叶醇和对丙基苯甲醛单独作用于 HepG2 细胞增殖的抑制率分别为(2.33±0.22)%、(3.25±0.08)%、(9.23±0.06)%、(12.00±0.26)%、(6.86±0.23)%、(12.86±0.18)%、(14.43±0.30)%、(26.49±0.50)%,香叶醇和对丙基苯甲醛均对 HepG2 细胞增殖有一定的抑制作用。联合用药处理 HepG2 细胞的抑制率较单独用药组明显提高( $P<0.05$ ),均表现出协同作用。与对照组比较,单独用药组促进了肝癌 HepG2 细胞的凋亡,联合用药组与单独用药组相比促凋亡能力更明显。**结论** 香叶醇和对丙基苯甲醛联合应用可能通过成分间的协同作用有效地抑制 HepG2 细胞增殖并促进其凋亡。

**[关键词]** 香叶醇;对丙基苯甲醛;HepG2 细胞;药物治疗,联合;细胞凋亡

**[中图分类号]** R735.7      **[文献标识码]** A      **[文章编号]** 1671-8348(2019)06-0921-04

## Study on inhibitory effect of geraniol combined with p-propylbenzaldehyde on proliferation of hepatocellular carcinoma HepG2 cells and its mechanism<sup>\*</sup>

FU Xueyan<sup>1</sup>,HUANG Yujing<sup>1</sup>,WANG Ling<sup>1</sup>,YANG Yang<sup>1,2△</sup>

(1. College of Pharmacy,Guilin Medical University,Guilin,Guangxi 541000,China;2. Guangxi Key Laboratory of Molecular Medicine in Liver Injury and Repair,Guilin,Guangxi 541004,Ghina)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of geraniol combined with p-propylbenzaldehyde on inhibiting the proliferation of hepatocellular carcinoma HepG2 cells and its mechanism. **Methods** The inhibitory effects of single geraniol and its combination with p-propylbenzaldehyde on HepG2 cells were detected by adopting the MTT assay; the effects of different concentrations of geraniol and p-propylbenzaldehyde on the proliferation of HepG2 cells were investigated. The effects of single geraniol and its combination with p-propylbenzaldehyde on HepG2 cells were detected by using the AnnexinV-FITC/PI double staining and flow cytometry. **Results** The inhibitory rates of geraniol and p-propylbenzaldehyde with increasing concentration orders for acting HepG2 cells alone were (2.33±0.22)%, (3.25±0.08)%, (9.23±0.06)%, (12.00±0.26)%, (6.86±0.23)%, (12.86±0.18)%, (14.43±0.30)% and (26.49±0.50)% respectively, and geraniol and p-propylbenzaldehyde had a certain inhibitory effect on HepG2 cell proliferation. The inhibitory rate of combined medication for processing HepG2 cells was significantly increased compared with the single medication, all manifested by synergistic effect. Compared with the control group, the single medication group promoted the apoptosis of hepatocellular carcinoma HepG2 cells and the combined medication group had stronger apoptosis-promoting effect compared with the single medication group. **Conclusion** The combination of geraniol and p-propylbenzaldehyde may effectively inhibit HepG2 cell proliferation and promote apoptosis through the synergistic effects between components.

**[Key words]** geraniol;p-propylbenzaldehyde;HepG2 cell;drug therapy,combination;cell apoptosis

肝癌是第五大常见的癌症,病死率排名全球第三。目前,治疗早期肝癌的首选方法是手术切除,术

<sup>\*</sup> 基金项目:广西自然科学基金资助项目(2014GXNSFAA118235,2016GXNSFAA380041)。 作者简介:付薛艳(1991—),在读硕士,主要从事药物作用于肿瘤相关机制的研究。 △ 通信作者,E-mail:35112908@qq.com。

后生存率较高,但是许多肝癌患者在确诊时已是晚期,错过了最佳治疗时机,只能依赖化疗或放疗等治疗方式<sup>[1]</sup>。化疗和放疗都是有着高副作用的方法,对身体损害很大。因此,开发高效、低毒的抗肝癌药物仍是目前的一个研究焦点。长期以来,中草药具有毒副作用小、价格低廉等优点,用于肿瘤的治疗越来越受到国内外学者的关注和认可<sup>[2]</sup>。

草果为姜科豆蔻属多年生草本植物草果的干燥果实,分布于中国云南、广西、贵州等地,具有燥湿除寒、祛痰截疟、健脾开胃、利水消肿的功能。课题组前期研究发现草果挥发油具有体内外抑制肝癌细胞增殖的作用<sup>[3-4]</sup>,且通过体内外实验确证了其能够诱导 HepG2 细胞凋亡,但目前对其抗肝癌作用的有效成分及作用方式尚不清楚。因此本课题以 HepG2 细胞为实验对象初步研究了其主要成分香叶醇和对丙基苯甲醛的抗肝癌活性及作用方式,为揭示草果挥发油抑制肝癌 HepG2 细胞增殖抗肝癌的物质基础和作用机制提供科学依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 香叶醇、对丙基苯甲醛均购自美国 Sigma-Aldrich 公司;人肝癌细胞系 HepG2 细胞由桂林医学院药理实验室提供;四甲基偶氮唑蓝(MTT)粉末、双抗、胰酶、PBS 均购自北京索莱宝科技有限公司;DMEM 购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自浙江天杭生物科技股份有限公司;DMSO 购自北京索莱宝生物科技有限公司;6 孔板、96 孔板、培养皿均购自广州 JET-BIOFIL 公司;培养瓶购自美国 Thermo 公司;AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自美国 BD Biosciences 公司。

**1.2 仪器** 洁净工作台(上海智城分析仪器制造有限公司);倒置显微镜(日本 Olympus);分选型流式细胞仪(美国 BD Biosciences 公司);CO<sub>2</sub> 恒温细胞培养箱(MCO-15PC 日本三洋);恒温水浴锅(金坛恒丰仪器厂);微量振荡器(江苏泰县医疗器械厂);离心机(上海安婷科学仪器厂);电热恒温鼓风干燥(重庆银河试验仪器有限公司);血细胞计数板(上海市求精生化试剂仪器有限公司);酶联免疫检测仪(南宁市精密仪器仪表有限公司)。

## 1.3 方法

**1.3.1 细胞培养** 将肝癌 HepG2 细胞培养于含 10% 胎牛血清 1% 双抗(即 100 μg/mL 链霉素和 100 μg/mL 青霉素)的 DMEM 高糖培养液中,于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下的细胞培养箱中传代培养,取对数生长期细胞进行实验<sup>[5]</sup>。

**1.3.2 MTT 法** 单独用药:取对数生长期的 HepG2 细胞制备成每毫升  $5 \times 10^4$  个的单细胞悬液,

以每孔 100 μL 接种于 96 孔细胞培养板中,将细胞培养板放在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中预培养。待细胞贴壁生长至 50%~60% 时,吸除旧培养液<sup>[6]</sup>,每孔单独加入 100 μL 含香叶醇(终浓度为 90、100、110、120 μg/mL)或对丙基苯甲醛(终浓度为 90、110、130、150 μg/mL)的 DMEM 培养液处理 HepG2 细胞;用等量的 DMSO 加入未经药物处理的细胞作为对照组;不含细胞的 DMEM 培养液作为空白组。培养 24 h 后每孔加入 20 μL 的 MTT,4 h 后弃去原培养液,加入 100 μL DMSO,于微量振荡器上振荡约 20 min 至结晶溶解均匀<sup>[7]</sup>;用酶标仪测定培养板在波长 490 nm 处的光密度值(OD 值),计算抑制率。细胞生长抑制率(%)=[1-(OD<sub>实验组</sub>-OD<sub>空白组</sub>)/(OD<sub>对照组</sub>-OD<sub>空白组</sub>)]×100%<sup>[8]</sup>。联合用药:分别联合不同浓度的香叶醇(终浓度 90、100、110、120 μg/mL)和对丙基苯甲醛(终浓度 90、110、130、150 μg/mL)处理 HepG2 细胞;用等量的 DMSO 加入未经药物处理的细胞作为对照组;不含细胞的 DMEM 培养液作为空白组。根据实验数据采用金正均法<sup>[9]</sup>计算两药协同作用的指数 Q 值, $Q = EAB / (EA + EB - EA \times EB)$ ,判断两药相互作用的性质<sup>[10]</sup>。EA、EB 为单独用药所得到的抑制率,EAB 为联合用药所得到的抑制率。当 Q 为 0.85~1.15 时,两药联合使用表现为简单的相加作用;当 Q>1.15 时,联合用药才具有协同作用;当 Q<0.85 时,联合用药表现为拮抗作用。

**1.3.3 AnnexinV-FITC/PI 双染法结合流式细胞术检测** 取对数生长期的 HepG2 细胞,以  $2 \times 10^4$  个/孔的密度接种于 6 孔板,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养细胞贴壁生长至 70%~80%,吸除旧培养液,分别加入含不同浓度香叶醇(终浓度为 80、120 μg/mL)、对丙基苯甲醛(终浓度为 80、120 μg/mL)及香叶醇联合对丙基苯甲醛的培养液处理 24 h,将培养液吸到 15 mL 离心管内(含悬浮凋亡坏死细胞),用冷 PBS 洗涤贴壁细胞 1 次,加入 0.5 mL 的胰酶消化液(不含 EDTA)消化 6 min,然后加入之前收集的细胞培养液 0.5 mL,轻轻吹打均匀,转移至相应的离心管中,1 000 r/min 离心 5 min。弃去上清液,收集细胞,用 1 mL 冷 PBS 轻轻重悬细胞并计数(细胞数量不少于  $5 \times 10^4$  个),然后 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 300 μL 的 1×Binding Buffer 悬浮细胞,5 μL 的 Annexin V-FITC 混匀,避光,室温孵育 15 min,加入 5 μL 的 PI 染色,上机前补加 200 μL 的 1×Binding Buffer,30 min 内进行流式细胞检测。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS20.0 统计软件进行分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 t 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 单独用药 90、100、110、120  $\mu\text{g/mL}$  香叶醇单独作用于 HepG2 细胞增殖的抑制率分别为 $(2.33 \pm 0.22)\%$ 、 $(3.25 \pm 0.08)\%$ 、 $(9.23 \pm 0.06)\%$ 、 $(12.00 \pm 0.26)\%$ ，90、110、130、150  $\mu\text{g/mL}$  对丙基苯甲醛单独作用于 HepG2 细胞增殖的抑制率分别为 $(6.86 \pm 0.23)\%$ 、 $(12.86 \pm 0.18)\%$ 、 $(14.43 \pm 0.30)\%$ 、 $(26.49 \pm 0.50)\%$ ，香叶醇和对丙基苯甲醛均对 HepG2 细胞增殖有一定的抑制作用。

2.2 联合用药 联合用药处理 HepG2 细胞的抑制率较单独用药组明显提高 $(P<0.05)$ ，均表现出协同作用，见表 1、2。

2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡率 对肝癌 HepG2 细胞用不同浓度的香叶醇、对丙基苯甲醛单独处理和联合应用处理后，利用 AnnexinV-FITC/PI 双标法，经流式细胞仪检测。香叶醇浓度为 80~120  $\mu\text{g/mL}$  时，HepG2 细胞凋亡率为 7.94%~9.69%；对丙基苯甲醛浓度为 80~120  $\mu\text{g/mL}$  时，HepG2 细胞凋亡率为 5.35%~5.60%；当香叶醇联合对丙基苯甲醛时，HepG2 细胞凋亡率为 19.24%~39.48%。与对照组

比较，单独用药组促进了肝癌 HepG2 细胞的凋亡，联合用药组与单独用药组相比促凋亡能力更明显，见图 1。

表 1 不同浓度联合用药作用于 HepG2 细胞的抑制率 $(\bar{x} \pm s, n=3)$

| 对丙基苯甲醛<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | 香叶醇( $\mu\text{g/mL}$ ) |                  |                  |                  |
|--------------------------------|-------------------------|------------------|------------------|------------------|
|                                | 90                      | 100              | 110              | 120              |
| 90                             | 60.84 $\pm$ 1.25        | 75.65 $\pm$ 1.38 | 90.36 $\pm$ 2.35 | 91.87 $\pm$ 2.21 |
| 110                            | 88.35 $\pm$ 2.84        | 88.69 $\pm$ 1.26 | 90.97 $\pm$ 4.51 | 93.21 $\pm$ 1.65 |
| 130                            | 87.96 $\pm$ 3.58        | 89.62 $\pm$ 2.32 | 92.62 $\pm$ 2.46 | 95.28 $\pm$ 1.68 |
| 150                            | 90.85 $\pm$ 4.31        | 91.69 $\pm$ 4.36 | 93.58 $\pm$ 2.56 | 95.89 $\pm$ 3.68 |

表 2 不同浓度联合用药作用于 HepG2 细胞的协同作用

| 对丙基苯甲醛<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) | 香叶醇( $\mu\text{g/mL}$ ) |      |      |      |
|--------------------------------|-------------------------|------|------|------|
|                                | 90                      | 100  | 110  | 120  |
| 90                             | 6.74                    | 7.65 | 5.85 | 5.09 |
| 110                            | 5.93                    | 5.65 | 4.35 | 3.40 |
| 130                            | 5.36                    | 5.21 | 4.15 | 3.86 |
| 150                            | 3.22                    | 3.17 | 2.81 | 2.72 |

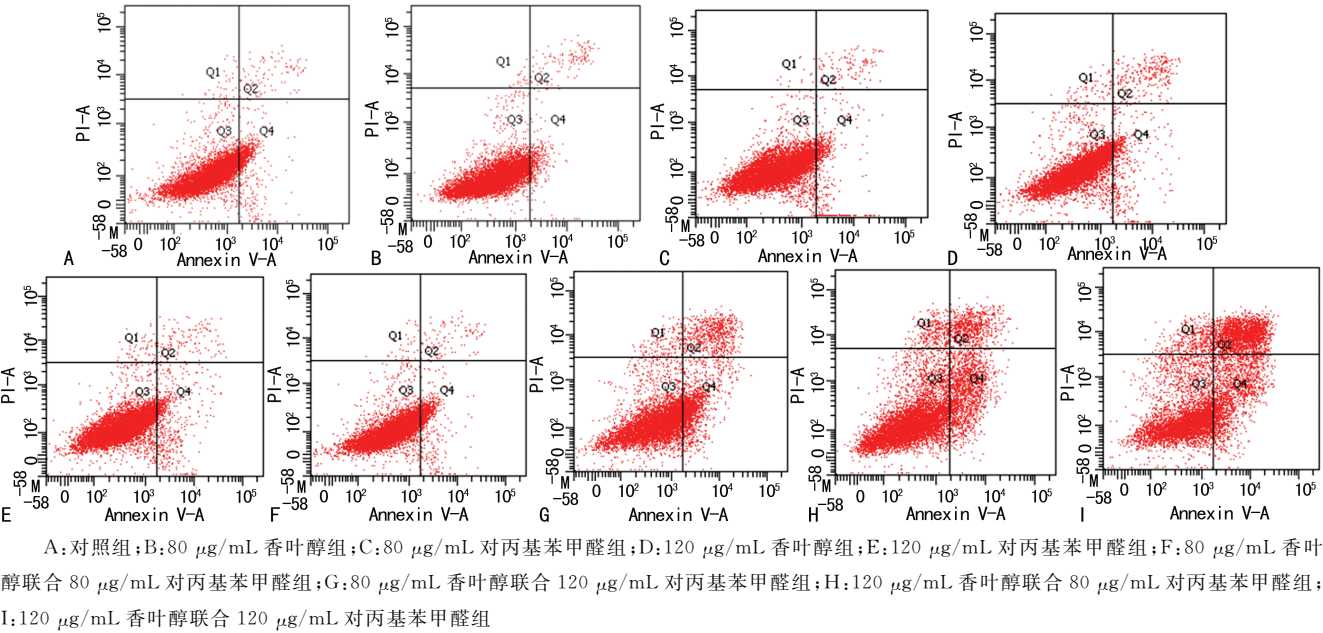


图 1 各组细胞凋亡率

3 讨 论

肝癌是一个世界性的健康问题，起病较隐匿，病程较短，病死率高，是当前世界上最常见的恶性肿瘤之一，尤其是在亚洲、非洲和欧洲南部，其发病率位居全球肿瘤疾病的第 7 位，病死率更是高居第 3 位<sup>[11]</sup>。肝癌的致癌过程非常复杂，由病毒、化学致癌物等诸多因素引起的肝细胞生长失控而导致的癌变，经历启动-促进-演变等多个阶段的发病过程，与多种基因的

调控和表达密切相关。目前肝癌的致病机制尚未研究清楚，疗效亦不确切。中国是肝癌高发地区，其生存率较低，对生命健康的危害极大<sup>[12-14]</sup>。长期以来，中医药治疗肝癌不断向前发展，其在改善症状、减轻痛苦、延缓进程、延长生命期限方面发挥着越来越大的作用，临床与实验研究也证实了多种中药的抗癌作用，为肝癌的治疗开辟了新的空间<sup>[13]</sup>。中医药在减轻化疗、放疗的毒副作用，增强机体抗病能力，提高患者

的生存质量方面均有明显的效果,是治疗肝癌的一种非常重要的方法<sup>[15-16]</sup>。香叶醇和对丙基苯甲醛是草果挥发油中最主要的成分,前期大量研究发现,香叶醇抑制细胞氧化应激,减轻血管内皮炎性反应,从而抗动脉粥样硬化;调节血胆固醇、三酰甘油代谢紊乱和抗多种肿瘤细胞增殖等作用<sup>[15]</sup>。但目前苯甲醛类物质的药理研究比较少见,暂无对丙基苯甲醛抗肿瘤的报道。

本实验选用草果挥发油中最主要的成分香叶醇及对丙基苯甲醛作为研究对象,通过体外实验研究其抗肝癌作用及其作用方式。结果显示,香叶醇和对丙基苯甲醛单用对 HepG2 细胞增殖均有一定的抑制作用,但不明显。两种药物联合对 HepG2 细胞增殖的抑制作用明显优于单独用药,说明二者的作用方式很可能不是单独作用,而是通过协同来达到抑制的效果。同时证明这种协同作用是通过诱导细胞凋亡来实现的,这为草果挥发油的进一步应用提供了有效的实验依据。但本研究仅局限于体外实验,草果挥发油诱导细胞凋亡具体作用的有效成分还需要进一步开展体内实验验证。

参考文献

[1] WANG T H, WU C H, YE H C T, et al. Melatonin suppresses hepatocellular carcinoma progression via lncRNA-CPS1-IT-mediated HIF-1 $\alpha$  inactivation[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(47): 82280-82293.

[2] KOJIRO M. Histopathology of liver cancers[J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2005(19): 39-62.

[3] YANG Y, YUE Y, RUN W Y, et al. Cytotoxic, apoptotic and antioxidant activity of the essential oil of *Amomum tsao-ko* [J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101 (11): 4205-4211.

[4] 张琪, 杨扬. 草果挥发油对肝癌 H22 荷瘤小鼠的抑瘤作用及机制[J]. *武汉大学学报(理学版)*, 2015, 61(2): 179-

182.

[5] 马涛, 辛文锋, 张文生, 等. 三七皂苷 R<sub>1</sub> 对 A $\beta$ \_(1-42) 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡的保护作用[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(2): 303-307.

[6] 黄真真, 张丹玉, 师琪, 等. 北美海蓬子三萜皂苷 bigelovii E 抑制 mTOR 信号通路诱导乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡[J]. *中国药理学通报*, 2017, 33(12): 1655-1660.

[7] 赵行宇, 侯以森, 刘雅范, 等. 6-姜烯酚诱导胃癌 BGC-823 细胞凋亡及其机制研究[J]. *上海中医药杂志*, 2018, 52 (2): 84-88.

[8] 刘盛楠, 邵淑丽, 隋文静, 等. 白藜芦醇诱导肺癌 A549 细胞凋亡[J]. *基因组学与应用生物学*, 2015, 34 (4): 685-691.

[9] CAO L Q, SHAO Z L, PENG H P, et al. Rosiglitazone enhances 5-fluorouracil-induced cell growth inhibition in hepatocellular carcinoma cell line Hep3B[J]. *Chin J Cancer*, 2010, 29(8): 741-746.

[10] MING Z J, HU Y, QIU Y H, et al. Synergistic effects of beta-aescin and 5-fluorouracil in human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells[J]. *Phytomedicine*, 2010, 17 (8/9): 575-580.

[11] 李可欣, 马浩然, 张男男, 等. 肠道菌群在肝癌中的作用研究进展[J]. *实用医学杂志*, 2018, 34(9): 1575-1578.

[12] 魏矿荣, 彭侠彪, 梁智恒, 等. 全球肝癌流行概况[J]. *中国肿瘤*, 2015, 24(8): 621-630.

[13] 贺珊, 廖长秀. 中药治疗肝癌机制的研究进展[J]. *中成药*, 2017, 39(1): 155-160.

[14] 宋慧娴, 乔飞, 邵铭. 中医药治疗原发性肝癌的研究进展[J]. *临床肝胆病杂志*, 2016, 32(1): 174-177.

[15] 戚益铭, 吴霜霜, 沈敏鹤, 等. 中医药治疗原发性肝癌研究述评[J]. *中医学报*, 2015, 30(1): 14-16.

[16] 张松, 孙丽, 李悦. 香叶醇在医学领域的应用研究进展[J]. *西北药学杂志*, 2017, 32(1): 124-126.

(收稿日期: 2018-10-18 修回日期: 2018-12-21)