

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20181225.014

周金爱,余军,黄东萍,等.速生桉叶水提物对肝癌细胞株 HepG2 生长的抑制和凋亡作用[J].广西科学,2018,25(6):678-683,700.

ZHOU J A, YU J, HUANG D P, et al. Growth inhibition and apoptosis of hepatocellular carcinoma HepG2 cells by the *Eucalyptus robusta* leaf water extract[J]. Guangxi Sciences, 2018, 25(6): 678-683, 700.

## 速生桉叶水提物对肝癌细胞株 HepG2 生长的抑制和凋亡作用\*

## Growth Inhibition and Apoptosis of Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells by the *Eucalyptus robusta* Leaf Water Extract

周金爱<sup>1,2</sup>, 余军<sup>1,3</sup>, 黄东萍<sup>3</sup>, 吴睿<sup>4</sup>, 臧宁<sup>1,2\*\*</sup>

ZHOU Jin'ai<sup>1,2</sup>, YU Jun<sup>1,3</sup>, HUANG Dongping<sup>3</sup>, WU Rui<sup>4</sup>, ZANG Ning<sup>1,2</sup>

(1. 广西医科大学生命科学研究院,广西南宁 530021;2. 广西艾滋病防治研究重点实验室,广西南宁 530021;3. 广西医科大学公共卫生学院,广西南宁 530021;4. 广西科技经济开发中心,广西南宁 530022)

(1. Life Sciences Institute, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, 530021, China; 2. The Key Laboratory of AIDS Prevention and Research, Nanning, Guangxi, 530021, China; 3. Public Health of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, 530021, China; 4. The Center of Guangxi Science and Technology Economic Development, Nanning, Guangxi, 530022, China)

**摘要:**【目的】探讨速生桉叶水提物(*Eucalyptus robusta* leaf water extract, ELWE)在体外对 HepG2 细胞的抗肿瘤作用及其机制。【方法】用荧光显微镜观察 ELWE 对 HepG2 细胞核形态学的改变,用甲基噻唑基四唑(Methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)比色法检测 ELWE 对 HepG2 细胞生长的影响;用免疫印迹法(Western blotting, WB)检测 ELWE 对激活型半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)蛋白的表达影响;用反转录实时荧光定量聚合酶链式反应技术(Real-time reverse transcription polymerase chain reaction, RT-RT-PCR)检测 ELWE 对 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关因子  $\beta$ -catenin、Tcf-4、CD44v6 表达水平的影响。【结果】ELWE 处理 HepG2 细胞 48 h、72 h, 稀释 5 倍和 10 倍 ELWE 的处理组细胞均出现凋亡的形态学改变;MTT 法检测稀释 5 倍和 10 倍的 ELWE 处理组,在处理 48 h 细胞生长抑制率分别为(44.13 $\pm$ 10.93)%和(25.93 $\pm$ 8.37)%,与未处理组相比,两组值差异显著且具有统计学意义( $P < 0.05$ );WB 法检测稀释 10 倍的 ELWE 处理组,同样在 48 h 进行凋亡相关蛋白因子 caspase-3 表达情况的检测,处理组 caspase-3 蛋白表达水平上调,为对照组的 1.73 倍,差异显著并具有统计学意义( $P < 0.01$ );同样处理组的  $\beta$ -catenin、Tcf-4、CD44v6 3 个基因的 mRNA 表达水平均下降,与对照组相比差异均显著

并均具有统计学意义( $P < 0.01$ )。【结论】ELWE 在 10 倍稀释处理 48 h 条件下对 HepG2 细胞生长有抑制作用和促进细胞凋亡的作用。该作用与 caspase-3 介导的凋亡程序和 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路有关。

**关键词:**速生桉叶水提物 HepG2 细胞 细胞生长 细胞凋亡

**中图分类号:** R-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9164(2018)06-0678-06

收稿日期:2018-08-29

作者简介:周金爱(1994-),女,硕士研究生,主要从事植物提取研究。

\* 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科能 1598025-12)资助。

\*\* 通信作者:臧宁(1968-),女,副教授,博士,主要从事肿瘤学和流行病学分子机制研究,E-mail:1979616281@qq.com。

**Abstract:【Objective】**To investigate the anti-tumor effect and the mechanism of *Eucalyptus robusta* leaf water extract (ELWE) on HepG2 cells in vitro. **【Methods】**The antitumor activity of ELWE were studied by observing morphological changes and nuclear damage of HepG2 cells by fluorescence microscope. The effect of ELWE on the growth of HepG2 cells was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetry. Western blotting (WB) was used to detect the effect of ELWE on the expression of activated caspase-3 protein. The effect of ELWE on the expression levels of  $\beta$ -catenin, Tcf-4 and CD44v6, which were signal pathway correlation factors of Wnt/ $\beta$ -catenin, was detected by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-RT-PCR). **【Results】**The HepG2 cells were treated by ELWE for 48 h and 72 h, the morphological changes of apoptosis were observed in the treatment group of ELWE which was diluted 5 times and 10 times. Using MTT method to detect ELWE treatment group which was diluted 5 times and 10 times, HepG2 cells growth inhibition ratio were  $(44.13 \pm 10.93)\%$  and  $(25.93 \pm 8.37)\%$  respectively after 48 h. Compared with the untreated group, the difference between the two groups was significant and had statistical significance ( $P < 0.05$ ). The ELWE treatment group was diluted 10 times by WB method. The expression of apoptosis-related protein factor caspase-3 was also detected at 48 h. The expression level of caspase-3 protein was up-regulated in the treatment group, which was 1.73 times that of the control group. The difference was significant and had statistical significance ( $P < 0.01$ ). Moreover, the mRNA expression levels of  $\beta$ -catenin, Tcf-4 and CD44v6 in the same treatment group decreased, and the difference was significant and had statistical significance compared with the control group ( $P < 0.01$ ). **【Conclusion】**ELWE inhibited the growth of HepG2 cells and promoted apoptosis in a 10-fold dilution treatment for 48 h. This effect was related to the caspase-3 mediated apoptosis program and the Wnt/ $\beta$ -catenin signal pathway.

**Key words:** ELWE, HepG2 cells, cell proliferation, cell apoptosis

## 0 引言

**【研究意义】**广西是我国速生桉种植面积最大的省份,速生桉的药用价值例如对于肝癌的辅助治疗作用以及对肿瘤细胞生长的影响等值得进行深入研究 and 探讨。**【前人研究进展】**速生桉属桃金娘科植物,其皮、树脂、叶、花、果、种子、木材皆有医疗用途,如桉叶油具有抗菌、抗氧化及杀虫等作用<sup>[1-2]</sup>;速生桉中的小帽桉多酚和富含抗氧化剂成分能抑制胰腺癌细胞的增殖<sup>[3]</sup>。有研究发现,在肝癌研究方面,速生桉的树脂能抑制肝癌细胞株 HepG2 细胞增殖,其机制在于将 HepG2 细胞阻滞于 G0/G1 期,诱导 HepG2 细胞凋亡<sup>[4]</sup>。**【本研究切入点】**广西是全国肝癌高发区,肝癌发病率在肿瘤登记地区居于全国第二位,中标发病率为 36.93/10 万、中标死亡率为 30.29/10 万,高于全国水平<sup>[5]</sup>,且发病率和死亡率呈现逐年上升的趋势<sup>[6]</sup>,这些肿瘤患者约 70% 确诊时已处于晚期,不适合手术治疗<sup>[7]</sup>,据此针对控制肿瘤的发生、发展、细胞失控性增殖和肿瘤细胞凋亡寻找新的肝癌治疗候选药物,可为发现疾病治疗新型先导化合物提供依据。**【拟解决的关键问题】**通过观察速生桉叶水提物 (*Eucalyptus robusta* leaf water extract, ELWE) 对 HepG2 细胞增殖和诱导细胞凋亡的影响,在分子水平上探讨可能的作用机制,为速生桉用于肝癌预防和治疗提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验提取物和细胞

速生桉叶采集于广西南宁市郊区的桉树林,采集时间为春季,选取位于速生桉树中部叶龄为 3 年生树叶,叶片大小控制为叶长 8~17 cm,叶宽 3~7 cm。速生桉叶片经蒸馏水冲洗,风干,粉碎,以烧杯为容器,按照 1:6 的质量比加水煎煮至溶液体积浓缩为原先的 1/3,经滤纸过滤残渣后收取速生桉水提液,2 000 g、30 min 常温离心后取上清,最后用 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤残渣得到实验用的速生桉叶水提物初始溶液。

人肝癌细胞系 HepG2 细胞,由本实验室保存。

### 1.2 主要试剂和仪器

试剂:二甲亚砜(DMSO)购自 Sigma 公司;DMEM 细胞培养基、胎牛血清(FBS)、青霉素、链霉素均购自 Gibco 公司;无菌 PBS 购自 HycHyClone 公司。即用型细胞核染料 DAPI 溶液购自北京索莱宝科技有限公司;荧光染料 CFSE 购自东仁化学科技上海有限公司。6 孔、24 孔、96 孔细胞培养板均购自 Greiner Bio-One 公司。MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司。RIPA 裂解液购自杭州联科生物技术公司;蛋白酶抑制剂(PMSF)购自武汉 Boster 生物工程公司; $\beta$ -actin 鼠单克隆抗体(货号:TA-09)购自 Abcam 公司,

Caspase-3 兔单克隆抗体(货号:9662S)购自美国 CST 公司;鼠二抗(Goat polyclonal Secondary Antibody to Mouse IgG H&L, HRP)(货号:ab97023)、兔二抗(Goat polyclonal Secondary Antibody to Rabbit IgG H&L, HRP)(货号:ab6741)购自英国 Abcam 公司。PVDF(0.22  $\mu\text{m}$ )膜、PBST(20 $\times$ )购自于北京索莱宝公司,脱脂奶粉购自于伊利实业集团股份有限公司。Trizol Reagent 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;氯仿购自国药集团化学试剂有限公司;异丙醇购自上海江莱生物科技有限公司;酒精购自成都科龙生物有限公司;无酶水(DNase/RNase-Free water)购自天根生化科技北京有限公司;逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂购自大连宝生物工程公司。 $\beta$ -catenin、Tcf-4、CD44v6 的引物由生工生物工程上海股份有限公司合成。

仪器:二氧化碳培养箱(Thermo 公司);全自动荧光倒置显微镜(型号:Evos FL Auto2,美国 Thermo Scientific 公司);多功能酶标仪(BioTek 公司);ABI StepOnePlus™ 荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems 公司);ODYSSEY 双红激光成像仪(LICOR 公司)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 细胞培养与传代

人肝癌细胞系 HepG2 细胞用含 10% 灭活的 FBS、100 U/mL 青霉素和 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  链霉素的 DMEM 培养基于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度培养箱中培养,用 0.25% 胰酶 37 $^{\circ}\text{C}$  消化细胞 5~10 min 后,加入 5 倍培养基将细胞充分吹打混匀,按 1:3 比例进行传代培养。

#### 1.3.2 实验分组和药物处理浓度设定

本研究设实验组、阴性对照组。实验组分别为 0 倍、5 倍、10 倍、30 倍、50 倍稀释的 ELWE。阴性对照组为加入等体积的 PBS 处理 HepG2 细胞,每组设 5 个重复孔。

#### 1.3.3 染色法观察 ELWE 处理后细胞核形态的变化

取对数生长的细胞,用 0.25% 胰酶 37 $^{\circ}\text{C}$  消化细胞制备成单细胞悬液,以  $5 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 24 孔板,每孔 900  $\mu\text{L}$ ,37 $^{\circ}\text{C}$  的 5% 的  $\text{CO}_2$  培养箱培养,当细胞生长至融合度约 80% 时,分别加入 100  $\mu\text{L}$  稀释 5 倍和 10 倍的 ELWE,继续培养 24 h、48 h、72 h。进行细胞核形态学观察,用预冷的 PBS 洗细胞 2 次后加入 100  $\mu\text{L}$  DAPI 在室温避光染色 5~10 min,吸除 DAPI 染色液,用预冷的 PBS 洗细胞 2 次。每孔加入稀释 200 倍的荧光染料 CFSE,室温避光孵育

30 min,弃去染色液用预冷的 PBS 洗 2 次,之后置于荧光倒置显微镜下观察。

#### 1.3.4 MTT 实验检测 ELWE 处理对细胞生长的影响和 $\text{IC}_{50}$ 的计算

取对数生长的细胞,用 0.25% 胰酶 37 $^{\circ}\text{C}$  消化细胞制备成单细胞悬液,以  $1 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 96 孔板,每孔 90  $\mu\text{L}$ ,37 $^{\circ}\text{C}$  的  $\text{CO}_2$  培养箱培养,当细胞生长至融合度约 80% 时,加入稀释 0 倍、5 倍、10 倍、30 倍、50 倍的 100  $\mu\text{L}$  ELWE,培养箱中继续培养 48 h。每孔加入  $1 \times \text{MTT}$  液(1 mg/mL) 50  $\mu\text{L}$ ,放置 4 h 后,吸弃培养液,并加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO,轻度振荡 10 min,于 550 nm 波长处测定光吸收值( $\text{OD}_{550}$ )。按下列公式计算细胞生长抑制率,细胞生长抑制率(%) =  $1 - [(A_{\text{ELWE 处理组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{阴性对照组}} - A_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。用 SPSS 软件计算  $\text{IC}_{50}$ 。每次每组设 5 个重复孔。

#### 1.3.5 Western Blot 检测 ELWE 处理后 caspase-3 蛋白表达的变化

提取稀释 10 倍 ELWE 处理 48 h 后的 HepG2 细胞总蛋白,经 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转到 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭后,一抗(1:1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,PBST 洗膜 3 次后,二抗(1:15 000)避光孵育 1 h 后、PBST 洗膜 3 次,用 ODYSSEY 双红激光成像仪检测波长的光吸收。

#### 1.3.6 荧光定量 PCR 检测 ELWE 对 $\beta$ -catenin、Tcf-4、CD44v6 基因的影响

提取稀释 10 倍 ELWE 处理 48 h 的 HepG2 细胞总 RNA,将 mRNA 反转录成 cDNA,以 cDNA 为模板, $\beta$ -catenin 用上游引物 5'-GCCAAGTGGGTG-GTATAGAGG-3' 和下游引物 5'-CGGGA-CAAAGGGCAAGAT-3' 进行扩增;Tcf-4 用上游引物 5'-CAGAAGGCAGAGCGTGAG-3' 和下游引物 5'-TTTGAAAGCCTCGTTGATGT-3' 进行扩增;CD44v6 用上游引物 5'-TTTGAAAGCCTCGTTGATGT-3' 和下游引物 5'-CCTCCTGAAGTGCT-GCTCC-3' 进行扩增;看家基因 GAPDH 用上游引物 5'-GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA-3' 和下游引物 5'-GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT-3' 进行扩增。RT-RT-PCR 反应体系总体积为 25  $\mu\text{L}$ ,其中 12.5  $\mu\text{L}$  Hotstart Fluo-PCR mix,8  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O,0.5  $\mu\text{L}$  ROX,上下游引物各 1  $\mu\text{L}$ ,2  $\mu\text{L}$  反转录 cDNA 溶液。

### 1.4 统计学处理

计量资料均数以  $(\bar{x} \pm s)$  表示,不同处理组间以及处理组与阴性对照组的计量资料统计采用成组  $t$

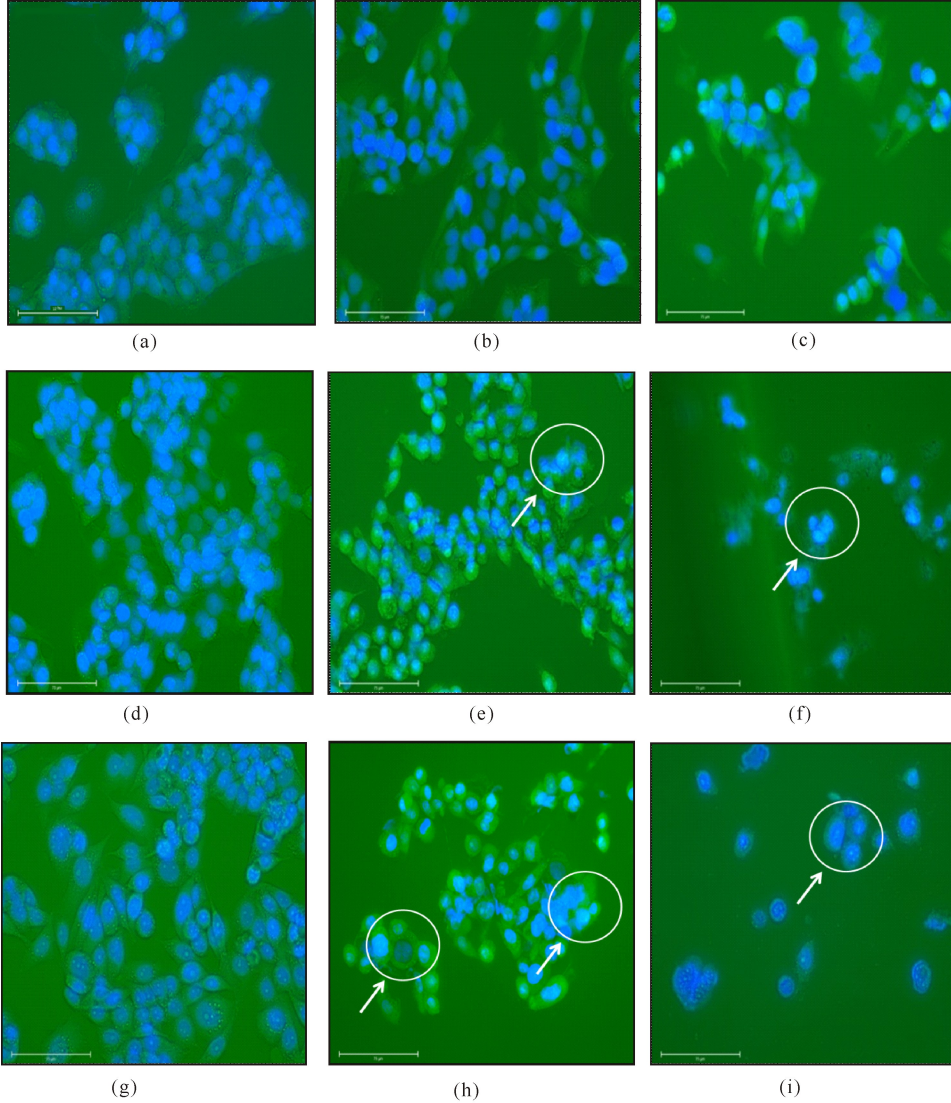
检验,多组间统计采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。统计学分析使用 SPSS22.0 软件进行分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 ELWE 对 HepG2 细胞增殖抑制作用的细胞形态学观察

荧光显微镜观察用 5 倍和 10 倍 ELWE 原液稀

释物处理 HepG2 细胞 24 h、48 h、72 h 后,细胞经 DAPI 核染色和 CFSE 细胞质染色,结果如图 1 所示。阴性对照组的细胞形态规则,大小均一、生长状态好,细胞核染色均匀(图 a~c);而 5 倍和 10 倍稀释处理 HepG2 细胞 48 h、72 h 时,形态变小,胞浆浓缩,细胞核发生改变,部分细胞核出现断裂、边缘化和凋亡小泡等明显的凋亡特征,见箭头指向(图 e、f、h、i)。5 倍和 10 倍 ELWE 原液稀释物处理 HepG2 细



(a)24 h 对照组细胞核形态;(b)48 h 对照组细胞核形态;(c)72 h 对照组细胞核形态;(d)稀释 10 倍 ELWE 处理 24 h 细胞核形态;(e)稀释 10 倍 ELWE 处理 48 h 细胞核形态;(f)稀释 10 倍 ELWE 处理 72 h 细胞核形态;(g)稀释 5 倍 ELWE 处理 24 h 细胞核形态;(h)稀释 5 倍 ELWE 处理 48 h 细胞核形态;(i)稀释 5 倍 ELWE 处理 72 h 细胞核形态

(a)Nuclear morphology of control group for 24 h; (b)Nuclear morphology of control group for 48 h; (c)Nuclear morphology of control group for 72 h; (d)10 times dilutions of ELWE initial concentration treatment cells nuclear for 24 h; (e) 10 times dilutions of ELWE initial concentration treatment cells nuclear for 48 h; (f)10 times dilutions of ELWE initial concentration treatment cells nuclear for 72 h; (g) 5 times dilutions of ELWE initial concentration treatment cells nuclear for 24 h; (h) 5 times dilutions of ELWE initial concentration treatment cells nuclear for 48 h; (i) 5 times dilutions of ELWE initial concentration treatment cells nuclear for 72 h

图 1 免疫荧光观察不同处理组和不同处理时间产生的细胞核聚集现象(40×10)

Fig. 1 Immunofluorescence microscopic observation of nuclear condensation by DAPI and CFSE stains after ELWE treatments(40×10)

胞 24 h, 细胞生长未受到明显的抑制, 5 倍和 10 倍 ELWE 原液稀释物处理 HepG2 细胞 72 h, 细胞死亡数量大于 48 h 的, 这可能是经过 72 h 细胞生存环境已经不利于细胞生存所致, 故后续实验以 48 h 作为 ELWE 处理时间。

## 2.2 ELWE 对 HepG2 细胞生长的影响

分别用稀释 0 倍、5 倍、10 倍、30 倍、50 倍的 ELWE 处理 HepG2 细胞 48 h, 了解 ELWE 对 HepG2 细胞生长的影响。HepG2 细胞抑制率分别为  $(81.59 \pm 3.61)\%$ 、 $(44.13 \pm 10.93)\%$ 、 $(25.93 \pm 8.37)\%$ 、 $(17.37 \pm 7.72)\%$ 、 $(8.05 \pm 8.03)\%$ , 比较差异具有统计学意义 ( $F = 25.79, P = 0.002$ ), 各个浓度的 ELWE 对 HepG2 的细胞均具有抑制作用 (图 2)。稀释 5 倍与稀释 10 倍 ELWE 处理 HepG2 细胞 48 h 细胞生长抑制率比较, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。经计算, 48 h  $IC_{50}$  位于 4.30 倍 ELWE 稀释计算浓度, 据此, 本研究后续实验采用稀释 10 倍的半致死剂量的 ELWE 处理 HepG2 细胞, 48 h 检测各项分子指标。

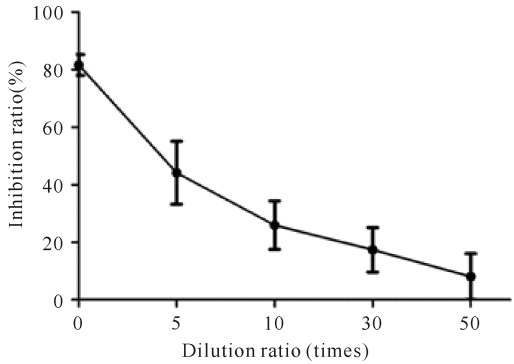


图 2 不同浓度 ELWE 处理 HepG2 细胞 48 h 细胞生长的抑制效果

Fig. 2 Inhibitory effect of different ELWE dilution treatments after 48 h in HepG2 cells

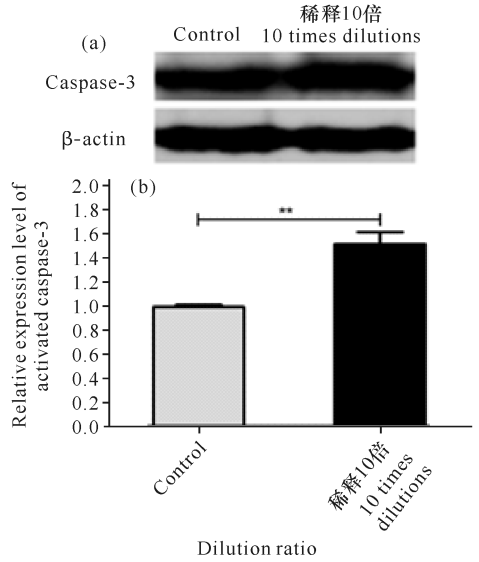
## 2.3 10 倍稀释 ELWE 处理 48 h 对 HepG2 细胞凋亡作用分析

为了探讨 ELWE 是否会导致 HepG2 细胞凋亡, 检测细胞凋亡的最典型蛋白 caspase-3 的表达情况。用稀释 10 倍 ELWE 处理 HepG2 细胞, 48 h 收集细胞并提取蛋白质, 用 Western Blot 检测蛋白的表达水平, 同时以对照组为对照, 结果如图 3 显示, 与对照组相比, 实验组的 caspase-3 蛋白表达水平显著上调, 比较差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

## 2.4 10 倍稀释 ELWE 处理对 HepG2 细胞凋亡相关基因表达的影响

用 10 倍稀释 ELWE 处理 HepG2 细胞, 48 h 收集细胞并提取 RNA, 用 Real time-PCR 检测 HepG2

细胞 mRNA 的表达水平, 探讨 ELWE 对 HepG2 细胞凋亡的机制。与对照组相比, 实验组的  $\beta$ -catenin、Tcf-4、CD44v6 基因表达水平均下降, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ) (图 4)。在基因水平上分析 ELWE 可下调  $\beta$ -catenin、Tcf-4、CD44v6 mRNA 表达水平。

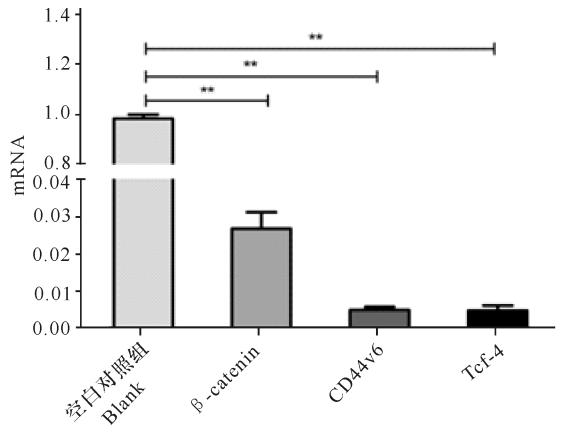


$\beta$ -actin 为内参; \* \* 与对照组相比,  $P < 0.01$   
 $\beta$ -actin were used as internal reference; \* \* compared with the control group,  $P < 0.01$   
 (a) Western blot 检测结果; (b) caspase-3 蛋白量比值灰度分析

(a) Western blot test results; (b) Gray scale analysis of caspase-3 protein ratio

图 3 10 倍稀释 ELWE 对 HepG2 细胞 caspase-3 蛋白表达量的影响

Fig. 3 Changes in caspase-3 proteins expressions observed after 48 h treatment with 10 times dilutions of ELWE



\* \* 与对照组相比,  $P < 0.01$   
 \* \* compared with the control group,  $P < 0.01$

图 4 10 倍稀释 ELWE 对 HepG2 细胞  $\beta$ -catenin、Tcf-4、CD44v6 基因表达的影响

Fig. 4 Changes in the expression of  $\beta$ -catenin, Tcf-4, CD44v6 observed in HepG2 cells after 48 h treatment with 10 times dilutions of ELWE

### 3 讨论

我国有丰富的药用植物资源,许多天然植物水提取物,如雷公藤、大黄素、紫杉醇和姜黄素等具有抑制肿瘤细胞增殖,诱导肿瘤细胞凋亡的作用<sup>[8-10]</sup>,利用天然植物提取物进行肿瘤辅助治疗的研究近年呈增长趋势。本研究采用不同浓度的 ELWE 处理 HepG2 细胞,发现 MTT 检测法检测到其稀释 5~10 倍对细胞增殖有抑制的作用,这种抑制作用可能通过下调  $\beta$ -catenin、Tcf-4、CD44v6 mRNA 表达水平,诱导细胞凋亡。

为了进一步探讨 ELWE 对凋亡的影响机制,在蛋白质水平检测了作为细胞凋亡执行因子的 caspase-3 蛋白表达情况。Western Blot 结果显示,ELWE 可上调 caspase-3 蛋白表达量,由此分析 ELWE 对 HepG2 细胞生长的抑制作用可能是 ELWE 激活了细胞凋亡途径所致。当该细胞受到凋亡信号刺激后,caspase-3 通过水解天冬氨酸残基位点的蛋白而激活,从而引发 caspase 级联反应,导致细胞凋亡。例如小檗胺在体外通过抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路活化诱导卵巢细胞凋亡,同时小檗胺增加了 cleaved caspase-3 的蛋白水平<sup>[11]</sup>。当细胞受到外界凋亡因子信号刺激时,Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路中的  $\beta$ -catenin 被激活后通过抑制 caspase-8 而抑制 caspase-3 的活性,诱导细胞增殖和抑制细胞凋亡,导致癌症的发生与发展<sup>[12]</sup>。考虑到 ELWE 诱导 HepG2 细胞凋亡有可能具有相似的通路,本研究通过荧光定量 PCR 的方法比较 10 倍稀释 ELWE 处理经 48 h 的凋亡细胞和未经处理的对照组细胞中  $\beta$ -catenin、Tcf-4、CD44v6 基因的表达差异。数据显示 ELWE 能下调 HepG2 细胞中  $\beta$ -catenin、Tcf-4、CD44v6 基因的表达量,这表明 ELWE 引起的凋亡极有可能是由 Wnt/ $\beta$ -catenin 途径介导的。

Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路是一条具有高度保守的信号通路,在调控细胞生长增殖、细胞癌变中起重要的调节作用<sup>[13]</sup>。在正常的细胞中,Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路不被激活。在肿瘤细胞中该通路被激活时,其关键因子  $\beta$ -catenin 在细胞质内积聚,当其达到一定浓度时会向细胞核内转移,并与细胞核内的转录因子 TCF/LEF 结合,激活下游靶基因,如 TCF-4、CD44v6 的表达,导致细胞异常增殖<sup>[14]</sup>。本研究发现,一定浓度的 ELWE 处理 HepG2,可抑制  $\beta$ -catenin 及其调控的靶基因,这表明 ELWE 对 HepG2 的凋亡作用可能与抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路有关。因此 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路有望成为 ELWE 治疗

肝癌的靶点。

### 4 结论

速生桉叶水提取物中存在抑制 HepG2 细胞增殖和诱导细胞凋亡的成分,其作用方式可能是通过调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路和相关的凋亡途径实现,ELWE 有可能成为肿瘤基因治疗的候选靶点药物。

细胞凋亡受多种信号通路和凋亡基因的调控,受时间和人力财力所限,目前无法考量还存在哪些重要的信号分子和基因共同参与诱导 HepG2 细胞凋亡。另外,本研究结果的实际应用价值尚需进行动物实验加以验证。

#### 参考文献:

- [1] DHAKAD A K, PANDEY V V, BEG S, et al. Biological, medicinal and toxicological significance of Eucalyptus leaf essential oil: A review [J]. *J Sci Food Agric*, 2018, 98(3): 833-848.
- [2] VIEIRA M, BESSA L J, MARTINS M R, et al. Chemical composition, antibacterial, antibiofilm and synergistic properties of essential oils from eucalyptus globulus labill and seven mediterranean aromatic plants [J]. *Chem Biodivers*, 2017, 14(6): 1-12.
- [3] BHUYAN D J, VUONG Q V, BOND S R, et al. Eucalyptus microcorys leaf extract derived HPLC-fraction reduces the viability of MIA PaCa-2 cells by inducing apoptosis and arresting cell cycle [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 105: 449-460. [Epub ahead of print].
- [4] SHEN K H, CHEN Z T, DUH P D. Cytotoxic effect of Eucalyptus citriodora resin on human hepatoma HepG2 cells [J]. *Am J Chin Med*, 2012, 40(2): 399-413.
- [5] 陈万青, 郑荣寿, 张思维, 等. 2013 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析 [J]. *中国肿瘤*, 2017, 26(1): 1-7.  
CHEN W Q, ZHENG R S, ZHANG S W, et al. Report of cancer incidence and mortality in China, 2013 [J]. *China Cancer*, 2017, 26(1): 1-7.
- [6] CHEN W Q, ZHENG R S, ZHANG S W, et al. Cancer incidence and mortality in China in 2013: An analysis based on urbanization level [J]. *Chinese Journal of Cancer Research*, 2017, 29(1): 1-10.
- [7] PECK-RADOSAVLJEVIC M. Drug therapy for advanced-stage liver cancer [J]. *Liver Cancer*, 2014, 3: 125-131.
- [8] CHEN Y, LI J, CHEN S, et al. Nab-paclitaxel in combination with cisplatin versus docetaxel plus cisplatin as first-line therapy in non-small cell lung cancer [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 10760.

(下转第 700 页 Continue on page 700)

soil co-contaminated with arsenic, lead, zinc and copper using *Pteris vittata*: A field study[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2010, 30(1): 165-171.

- [15] 黄闰, 孟桂元, 陈跃进, 等. 苕麻对重金属铅耐受性及其修复铅污染土壤潜力研究[J]. 中国农学通报, 2013, 29(20): 148-152.

HUANG G, MENG G Y, CHEN Y J, et al. Study on Pb tolerance and remediation potential of lead-contaminated soil of ramie[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29(20): 148-152.

- [16] 廖晓勇, 陈同斌, 阎秀兰, 等. 提高植物修复效率的技术途径与强化措施[J]. 环境科学学报, 2007, 27(6): 881-893.

LIAO X Y, CHEN T B, YAN X L, et al. Enhancement of heavy metal removal in phytoremediation of soils contaminated with heavy metals[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2007, 27(6): 881-893.

- [17] 郭彬, 李伟东, 丁能飞, 等. 重金属污染土壤的植物修复技术的问题及对策[J]. 浙江农业学报, 2013, 25(4): 852-857.

GUO B, LI W D, DING N F, et al. Problems in operation and corresponding countermeasures of phytoremediation of soils contaminated by heavy metals[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2013, 25(4): 852-857.

- [18] 李静, 余天明, 周洁, 等. 铅锌矿区及周边土壤铅、锌、镉、铜的污染健康风险评估[J]. 环境科学, 2008, 29(8): 2327-2330.

LI J, YU T M, ZHOU J, et al. Assessment of health risk for mined soils based on critical thresholds for lead, zinc, cadmium and copper[J]. Environmental Science, 2008, 29(8): 2327-2330.

- [19] 谢华, 刘晓海, 陈同斌, 等. 大型古老锡矿区土壤和蔬菜重金属含量及其健康风险[J]. 环境科学, 2008, 29(12): 3503-3507.

XIE H, LIU X H, CHEN T B, et al. Concentration and health risk of heavy metals in vegetables and soils in region affected by an ancient tin ore[J]. Environmental Science, 2008, 29(12): 3503-3507.

- [20] 刘庆, 吴晓芙, 陈永华, 等. 铅锌矿区的植物修复研究进展[J]. 环境科学与管理, 2012, 37(5): 110-114.

LIU Q, WU X F, CHEN Y H, et al. Progress on phytoremediation in lead-zinc mine areas[J]. Environmental Science and Management, 2012, 37(5): 110-114.

- [21] 杨刚, 沈飞, 钟贵江, 等. 西南山地铅锌矿区耕地土壤和谷物产品重金属含量及健康风险评估[J]. 环境科学学报, 2011, 31(9): 2014-2021.

YANG G, SHEN F, ZHONG G J, et al. Concentration and health risk of heavy metals in crops and soils in a zinc-lead mining area in southwest mountainous regions[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2011, 31(9): 2014-2021.

(责任编辑: 陆 雁)

(上接第 683 页 Continue from page 683)

- [9] SHAHABIPOUR F, CARAGLIA M, MAJEE D, et al. Naturally occurring anticancer agents targeting EZH2[J]. Cancer Letters, 2017, 400: 325-335.

- [10] ZHANG J, LIN M T, TUNG H Y, et al. Bruceine D induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia K562 cells via mitochondrial pathway[J]. Am J Cancer Res, 2016, 6(4): 819-826.

- [11] HENG Z, YUN P J, CHUN Y S, et al. Berbamine suppresses cell proliferation and promotes apoptosis in ovarian cancer partially via the inhibition of Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2018, 50(6): 532-539.

- [12] ZHAO X, SUN S, XU J, et al. MicroRNA-152 inhibits cell proliferation of osteosarcoma by directly targeting

Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in a DKK1-dependent manner[J]. Oncol Rep, 2018, 40(2): 767-774.

- [13] NISHIKAWA K, OSAWA Y, KIMURA K. Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling as a potential target for the treatment of liver cirrhosis using antifibrotic drugs[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(10): 1-12.

- [14] VALLEE A, LECARPENTIER Y. Crosstalk between peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the canonical Wnt/ $\beta$ -Catenin pathway in chronic inflammation and oxidative stress during carcinogenesis[J]. Front Immunol, 2018, 9: 1-18.

(责任编辑: 陆 雁)