

# 新型 $\beta$ -榄香烯衍生物 MDCI 对肝癌细胞增殖的抑制作用及机制研究

滕佳奕<sup>1</sup> 张一鸣<sup>1</sup> 夏广磊<sup>1</sup> 高慕聪<sup>1</sup> 刘国都<sup>2</sup> 夏勇<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> 济宁医学院临床医学院, 济宁 272013; <sup>2</sup> 内蒙古大学化学化工学院, 呼和浩特 010030;

<sup>3</sup> 济宁医学院医药工程学院, 济宁 272199)



夏勇,男,济宁医学院教授,医药工程学院副院长,全南国立大学(韩国)生物医学博士,纽约大学(美国)博士后,山东省“泰山学者”青年专家,享山东省政府特殊津贴,济宁市高层次人才,山东大学和山东第一医科大学硕士生导师。获 2022 年山东省“青年科技奖”,2022 年济宁市“最美科技工作者”,2023 年全国博士后创新创业大赛优胜奖。长期从事生物医学方面研究,主要方向为:1) 肿瘤发生与发展的重要分子病理机制;2) 新型抗肿瘤分子的筛选及药理机制研究。目前已在《Nature Communications》《Cancer Research》《PNAS》等高水平国际学术期刊发表 SCI 论文 45 篇,其中以第一作者或通讯作者发表 SCI 论文 25 篇,单篇最高影响因子 17.694。主持国家自然科学基金面上项目、中央本级重大增减支项目(1 项)、省部级项目及横向项目共计 8 项。目前以第一发明人或唯一发明人获授权国家发明专利 6 项以及国际发明专利 1 项,完成成果转化 3 项。担任 SCI 学术期刊《Frontier in Pharmacology》的 Topic Editor,国家留学基金委评审专家,山东省医药生物技术协会常务理事,济宁医学院欧美同学会副秘书长,担任《Advanced Science》《Biochemistry and Cell Biology》《International Journal of Biological Macromolecules》《Journal of Cellular Biochemistry》等 10 余家 SCI 学术期刊的审稿人。

**摘要** 目的  $\beta$ -榄香烯是我国自主知识产权的创新药,但是其起效浓度偏高,抑癌效率偏低。本研究旨在筛选具有高效抗肝癌活性的  $\beta$ -榄香烯衍生物,并初步揭示其抑制肝癌细胞恶性表型的细胞学机制。方法 选取人肝癌细胞株 MHCC97-H 作为实验对象,分别用  $\beta$ -榄香烯、 $\beta$ -榄香烯衍生物(MDCC、MCMC、MDCI)处理细胞,通过 CCK-8 实验对细胞活性变化进行评估。经对比后选择对肝癌细胞活性抑制最强的 MDCI 进行深入研究;在显微镜下跟踪监测细胞的形态变化,通过细胞划痕实验检测其对细胞迁移能力的影响,采用 EdU 荧光染色实验判断其对肝癌细胞 DNA 复制能力的影响,借助流式细胞仪测定其对细胞周期的作用,使用活/死细胞荧光染色法对 MDCI 诱发细胞死亡作用进行评价,并借助 Annexin-V-FITC 凋亡试剂盒检测细胞凋亡。结果 3 种  $\beta$ -榄香烯衍生物对肝癌细胞的抑制能力较  $\beta$ -榄香烯均有不同程度提升,其中 MDCI 对肝癌细胞的抑制能力最强。随着 MDCI 浓度和孵育时间的增加,MHCC97-H 细胞的活性受到显著抑制,但是迁移能力未发生显著变化( $F=2.636, P>0.05$ )。MDCI 可以降低 DNA 复制速率( $F=133.100, P<0.001$ )进而阻滞细胞周期进入 S 期( $F=224.500, P<0.001$ )。当提高 MDCI 浓度达到  $10\mu\text{M}$  时,MHCC97-H 细胞开始发生细胞死亡,其主要方式为细胞凋亡。结论 我们筛选到一种全新的  $\beta$ -榄香烯衍生物—MDCI,对肝癌细胞有出色的抑制效果,在低浓度时主要通过抑制 DNA 合成阻滞细胞周期,进而抑制细胞过度增殖;在高浓度时,主要通过诱导细胞凋亡(Apoptosis)起到杀伤肿瘤细胞的作用。MDCI 具备潜力成为一种新型的肝癌治疗先导化合物,对于丰富肝癌治疗药物线具有积极意义。

**关键词** 肝癌;榄香烯;细胞增殖;细胞周期;细胞凋亡

中图分类号:R735.3+5 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2024)10-365-08

[基金项目]国家中医药管理局科技司共建科技项目(G2Y-KJS-SD-2023-097);山东省泰山学者青年专家基金(tsqn201909147);山东省自然科学基金(ZR2023LZL005)

[通信作者]刘国都,E-mail:guoduliu@imu.edu.cn

夏勇,E-mail:xiaoyong@mail.jnmc.edu.cn

## Inhibitory effect and mechanism of MDCl, a novel $\beta$ -elemene derivative, on the proliferation of hepatocellular carcinoma cells

TENG Jiayi<sup>1</sup>, ZHANG Yiming<sup>1</sup>, XIA Guanglei<sup>1</sup>, GAO Mucong<sup>1</sup>, LIU Guodu<sup>2</sup>, XIA Yong<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>School of Clinical Medicine, Jining Medical University, Jining 272013, China;

<sup>2</sup>School of Chemistry and Chemical Engineering, Inner Mongolia University, Hohhot 010030, China;

<sup>3</sup>School of Medical Engineering, Jining Medical University, Jining 272199, China)

**Abstract Objective**  $\beta$ -elemene is an innovative drug with independent intellectual property rights in China, but its effective concentration is high and its anticancer efficiency is low. The aim of this study was to screen  $\beta$ -elemene derivatives with high anti-hepatocellular carcinoma activity and reveal the cytological mechanism of their inhibition of malignant phenotype of hepatocellular carcinoma cells. **Methods** Human liver cancer cell MHCC97-H was selected as the experimental object, and the cells were treated with  $\beta$ -elemene, MDCC, MCMC, and MDCl. The cells activities were evaluated by CCK-8 assay. After comparison, we found MDCl had the strongest inhibition on liver cancer cells, and selected MDCl for further study. The morphological changes of the cells were tracked and monitored under the microscope, and the effects on cell migration were detected by cell scratch test. EdU fluorescence staining was used to determine the effects on DNA replication of liver cancer cells. The effects on cell cycle were measured by flow cytometry, and the effects of the cell death-inducing effect of MDCl were evaluated by live/dead cell fluorescence staining. Apoptosis was detected by Annexin-V-FITC apoptosis kit. **Results** The inhibitory capacity of three  $\beta$ -elemene derivatives on hepatocellular carcinoma cells was improved in different degrees compared with  $\beta$ -elemene, and MDCl had the strongest inhibitory capacity on hepatocellular carcinoma cells. Increasing the concentration and incubation time of MDCl resulted in a significant inhibition of MHCC97-H cell activity, while migration ability remained relatively unchanged ( $F=2.636, P>0.05$ ). It has been demonstrated that MDCl reduces the rate of DNA replication ( $F=133.100, P<0.001$ ), thereby blocking cell cycle progression into the S phase ( $F=224.500, P<0.001$ ). At a concentration of  $10\mu\text{M}$ , MHCC97-H cells began to undergo apoptosis as the primary mode of cell death. **Conclusions** We have screened a novel  $\beta$ -elemene derivative, MDCl, which exhibits excellent inhibitory effects on hepatocellular carcinoma cells. At low concentrations, MDCl primarily inhibits DNA synthesis to block cell cycle progression and thus suppress excessive cell proliferation. At high concentrations, it primarily induces cell apoptosis to kill tumor cells. This research results suggest that MDCl has good potential to be a novel lead compound for liver cancer treatment, which has positive implications for enriching the drug pipeline for liver cancer treatment.

**Keywords:** Liver cancer; Elemene cell; Cell proliferation; Cell cycle; Apoptosis

肝癌是世界上第 6 大最常见诊断的癌症。《全球癌症流行病学报告》中显示,在 2022 年全球恶性肿瘤的新增人数中,肝癌发病率位居第 6 名,占比 4.3%;而致死率排在第 3 位,占总数的 7.8%<sup>[1]</sup>。国家癌症中心发布的 2022 年中国恶性肿瘤疾病负担情况中显示原发性肝癌的发病率在全部恶性肿瘤中居第 4 位,死亡率居于第 2 名的高位<sup>[2]</sup>。由此可见,肝癌对人类的健康产生的威胁是巨大的。目前,我国多数患者在初诊时已处于中晚期,因此,一期根治切除手术不能进行,转变治疗方案让患者看到了希望<sup>[3]</sup>。近年来,随着局部介入和系统药物联合方案的应用,肝癌患者的治疗取得了前所未有的效果,但肝癌对于我国乃至全球的负担仍然是沉重的<sup>[4]</sup>。因此,探索新药物、新模

式、新方案的研究一直是肝癌药物领域的研究热点。在我们前期研究中,从实验室合成 3 种  $\beta$ -榄香烯衍生物(MDCC、MCMC、MDCl),通过筛选,发现其中一种衍生物(MDCl)对肝癌有显著的抑制效果。此论文中,我们在显微镜下跟踪监测 MDCl 对人肝癌细胞株 MHCC97-H 形态的影响,通过细胞划痕实验检测其对细胞迁移能力的影响,采用 EdU/H33342 荧光双染色实验研究其对肝癌细胞 DNA 复制能力的影响,借助 PI 染色和流式细胞仪测定其对细胞周期的作用,使用活/死细胞荧光染色(Calcein-AM/PI)对其诱发细胞死亡作用进行评价,并借助 Annexin-V-FITC 凋亡试剂盒与流式细胞仪检测细胞凋亡,对其在抑制肝癌方面的作用从多个角度进行研究<sup>[5]</sup>。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

$\beta$ -榄香烯, MDCC, MCMC, MDCI 来自内蒙古大学刘国都教授课题组; MHCC97-H 细胞购自北纳生物; BSA、TritonX-100 (索莱宝生物科技有限公司, 北京); 胰蛋白酶 (沃卡威生物技术有限公司, 北京); CCK-8 细胞活性试剂盒, Edu 细胞生长测定试剂盒, HT33342 伊红染液, 4%多聚甲醛, Calcein AM 细胞活力测定试剂盒, RNA 酶, PI 染液, Annexin-V-FITC 细胞凋亡测定试剂盒 (碧云天生物技术股份有限公司, 上海)。DMEM, PBS, 血清, PG/STR 双抗 (BI 公司, 以色列), 细胞划痕插件 (Ibidi 公司, 德国) 由济宁诺昂代购。

Cytoflexlx 流式细胞仪 (贝克曼库尔特公司, 中国), Cytation5 多功能酶标仪 (Berton 公司, 美国), 光学显微镜 (Japan8588, 尼康)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 将 MHCC97-H 细胞置于全培养基 (DMEM+10%FBS+1%PS) 中, 放置于 37℃ 恒温培养箱 (通 5%CO<sub>2</sub>) 中培养适宜时间, 定期观察细胞生长的状态和密度大小。

**1.2.2 细胞活性检测** 采用  $\beta$ -榄香烯、MDCC、MCMC、MDCI 处理贴壁的 MHCC97-H 细胞 (每个浓度 6 个复孔), 继续放于恒温培养箱中培养。加入待测化合物孵育 48h 后, 弃掉培养基, 加入 CCK-8 检测试剂, 在 37℃, 5%CO<sub>2</sub> 恒温孵育箱内进行 20~40min 的孵育后, 利用波长为 450nm 的酶标仪检测细胞的吸光度。

**1.2.3 细胞形态检测** 6 孔板接种 MHCC97-H 细胞, 待细胞贴壁后加入不同浓度的 MDCI, 药物处理后的细胞需每日在显微镜下进行观察, 拍摄细胞形态的图像并保存。

**1.2.4 细胞迁移实验** 在 12 孔板上插入细胞迁移插件 (iBid), 并在每个小孔中接种 MHCC97-H 细胞。当细胞生长到填满插件时, 拔除插件并在显微镜下观察、拍摄并保存图像。随后, 在恰当的时间内使用 MDCI 处理, 经过 24h、48h 和 72h 的药物处理, 再次观察、拍摄和保存影像。利用 ImageJ (V. 1. 8. 0. 112) 软件对细胞划痕实验结果进行定量分析。

**1.2.5 细胞 DNA 复制速率检测** 将生长状态健康的 MHCC97-H 细胞接种到 12 孔板中, 待其生

长到密度适宜后使用不同浓度梯度的 MDCI 处理细胞。药物处理一段时间后, 弃掉培养基, 加入 Edu, 放置于恒温培养箱 (通入 5%CO<sub>2</sub>) 中孵育适宜时间。取出细胞标本后, 先添加于 4%的聚甲醛溶剂中, 然后在经过 PBS 的冲洗之后, 再加入于 Triton X-100 通透的 3%BSA (in PBS) 溶液中, 进行前期处理作业后加入 click 染液 (按照试剂盒说明书进行溶液配制), 然后再避光常温培养, 用 PBS 溶液冲洗均匀之后将细胞样本放在显微镜下得到荧光图片, 并拍照保存。

**1.2.6 细胞周期检测** 6 孔板接种培养 MHCC97-H 细胞, 贴壁后 24h 用不同浓度 MDCI 对细胞进行处理。把已消化过的细胞聚集在 1.5mlEP 管中, 经过离心操作后弃去上清液, 再加入 PBS 进行二次冲洗, 润洗后的细胞再进行离心后弃上清。然后以 70%乙醇对细胞进行重悬浮, 并在冰浴中保持 40min。固定完成后, 通过 PBS 洗涤并添加包括 PI、TritonX-100 和 RNA 酶等的细胞周期检测溶液, 将涡旋混匀后, 让试剂与细胞完全接触, 然后避光性培养约 20min。对于细胞周期的分析在流式细胞仪上进行。

**1.2.7 活细胞/死细胞双荧光染色实验** 将 MHCC97-H 细胞接种后在 6 孔板内培养, 待其贴壁生长至适当密度之后再用不同浓度的 MDCI 处理。药物处理后再进行较长时间的培育。先配制凋亡细胞悬液, 再加入严格遵照说明书规定使用的 Calcein AM 染料溶液, 并孵育至一定时期。之后加入 H33342 和 PI 染料溶液 (利用 PBS 配制), 避光孵育, PBS 清洗, 在荧光显微镜下使用不同波长的激发光观察, 拍摄并保存荧光照片。

**1.2.8 细胞凋亡检测** 6 孔板内接种 MHCC97-H 细胞培养, 贴壁生长到一定密度后加入不同浓度的 MDCI, 药物处理时间适宜。收集细胞, 合并上清和消化下来的细胞 (悬浮细胞进行离心), 使用 PBS 清洗细胞后加入 Annexin-V-FITC 和 PI 染料溶液 (用结合液配制), 分为不染组、单染 Annexin-V 组、单染 PI 组以及 PI 和 Annexin-V 双染组。避光孵育一段时间后弃去染料溶液, 在避光低温 (4℃) 下加入 PBS 配制的 H33342 染料溶液进行 15min 的孵育, 荧光照片拍摄保存。

### 1.3 统计学方法

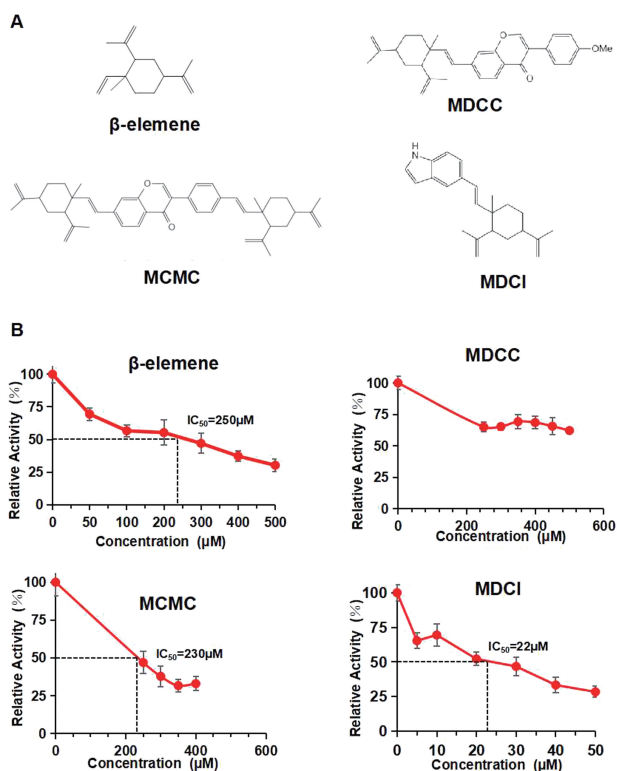
统计分析采用 SPSS17.0 软件。正态分布的计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示, 多组数据之间采用单因素方差

值分析法 (One-way Anova Analysis)。P<0.05 则认为数据之间存在显著差异。

## 2 结果

### 2.1 β-榄香烯及其衍生物对肝癌细胞的抑制效果

图 1A 展示了 β-榄香烯及其 3 种衍生物 (MDCC、MCMC 和 MDCI) 的结构式。图 1B 展示了 β-榄香烯及其衍生物对 MHCC97-H 细胞具有不同程度的抑制作用。在这 4 种化合物中, MHCC97-H 细胞对 MDCI 表现出最高的敏感性, 并且其细胞活力受到显著抑制。通过定量计算得知, β-榄香烯、MCMC 和 MDCI 对 MHCC97-H 细胞的半抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 分别为 250 μM、230 μM、22 μM, 而 MDCC 对 MHCC97-H 细胞的抑制作用最弱, 无法通过计算得到其 IC<sub>50</sub>。



注: A. 本研究中 β-榄香烯及其 3 种衍生物的化学结构式; B. MHCC97-H 细胞的细胞活性随待测化合物浓度的变化曲线。

图 1 β-榄香烯及其 3 种衍生物的化学结构式及其对 MHCC97-H 细胞的抑制活性

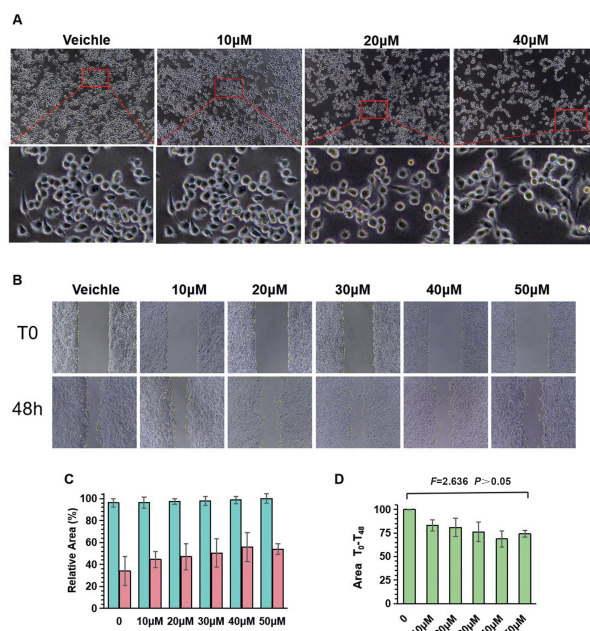
### 2.2 MDCI 对 MHCC97-H 细胞形态的影响

正常生长状态下的 MHCC97-H 细胞为圆形或椭圆形, 结构完整, 细胞贴壁情况良好。在增加

MDCI 浓度后, MHCC97-H 细胞密度逐渐降低, 并且其形态变得纤长, 且边缘出现丝状结构 (图 2A), 而且随着 MDCI 浓度增加, 细胞贴壁能力随药物浓度升高而逐渐减弱, 这些结果说明 MDCI 以浓度依赖性的方式影响 MHCC97-H 细胞的形态学表型。

### 2.3 MDCI 对 MHCC97-H 细胞迁移能力的影响

细胞划痕实验是检测细胞迁移能力的常用手段, 正常生长的 MHCC97-H 细胞能够大量迁移到划痕中央, 且细胞由球形延展伸长为椭圆形。在增加 MDCI 浓度后, MHCC97-H 细胞仍然大量向划痕中央迁移, 并且细胞伸长为梭形 (图 2B)。如图 2C 和 2D 所示, 经过 ImageJ 软件处理及统计学分析后发现, 不同浓度的 MDCI 处理 48h 后, MHCC97-H 细胞划痕的面积并无明显的差别 (F = 2.636, P > 0.05), 这说明 MDCI 对 MHCC97-H 细胞迁移并无显著抑制作用。



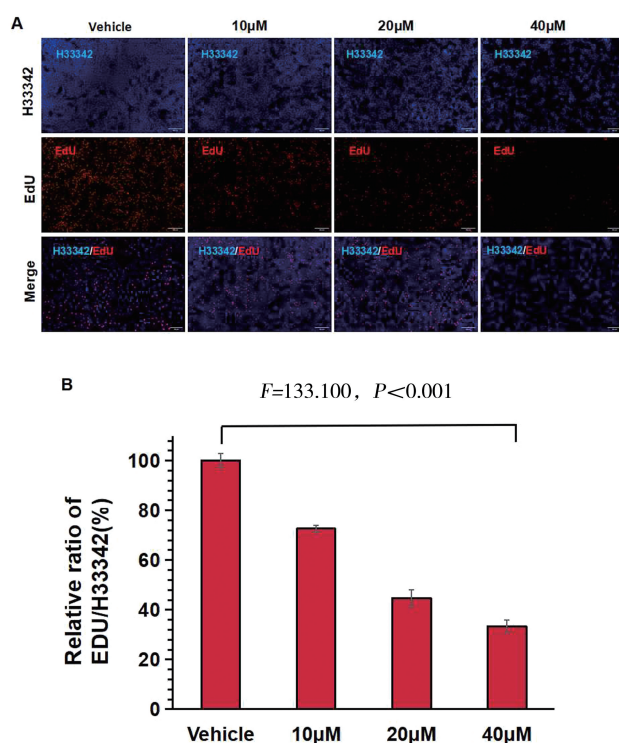
注: A. 不同浓度 MDCI 对 MHCC97-H 细胞形态的影响, 图中上图为大视野区域, 下图为小视野区域的白场细胞照片; B. 不同浓度的 MDCI 对 MHCC97-H 细胞迁移速率的影响, 显微镜下照片; C. 定量分析细胞迁移速率; D. 对比不同浓度的 MDCI 对 MHCC97-H 细胞迁移速率有无显著性差异。

图 2 MDCI 对 MHCC97-H 细胞形态和细胞迁移的影响

### 2.4 MDCI 对 MHCC97-H 细胞 DNA 复制速率的抑制作用

我们利用 EdU 染色法检测了 MDCI 对 MH-

CC97-H 细胞 DNA 复制速率的影响。如图 3 所示,红色代表 DNA 发生了复制的细胞核,蓝色代表总细胞核。健康的 MHCC97-H 细胞染色后呈现强烈的红色和蓝色荧光,表明正常生长条件下的 MHCC97-H 细胞 DNA 合成旺盛、复制速度快、增殖速度快。随着 MDCI 药物浓度逐渐升高,荧光显微镜下可以明显看出红色和蓝色的荧光亮度均逐渐下降,更重要的是红/蓝比例也逐渐降低。随着药物浓度增加,DNA 复制和合成速率减慢,导致细胞密集程度降低,细胞增殖能力受到明显抑制 ( $F = 133.100, P < 0.001$ )。



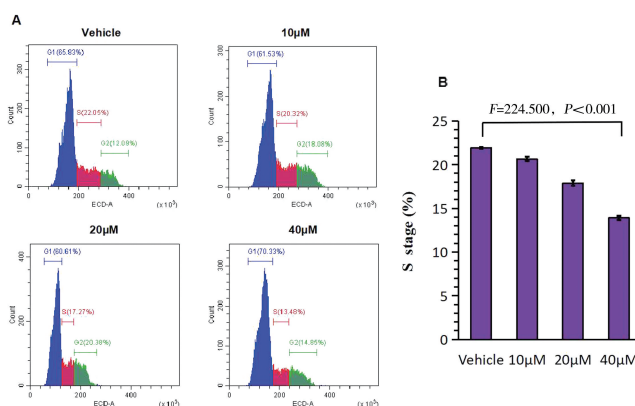
注:A.不同浓度的MDCI处理细胞24h后,加入EdU孵育30min,并用EdU检测试剂盒进行Click反应。分别拍摄红色荧光照片和蓝色荧光照片。B. EdU阳性细胞与占总细胞的比例定量图。

图3 EdU染色法检测MDCI对MHCC97-H细胞DNA复制速率的影响

### 2.5 MDCI对MHCC97-H细胞周期的作用

为了研究MDCI对肝癌细胞MHCC97-H细胞周期的影响,我们在流式细胞仪的帮助下,以PI作为染料,定量研究细胞在G1期、S期、G2/M期的比例。如图4所示,随MDCI药物浓度增加,MHCC97-H细胞周期中的G1和G2/M期并未随MDCI浓度的增加呈现有规律的变化,但是S期受

MDCI的影响显著,随着MDCI浓度升高,处于S期(DNA合成期)的细胞数量逐渐减少( $F = 224.500, P < 0.001$ ),表明MDCI可以呈浓度依赖性抑制MHCC97-H细胞进入S期,这与我们前面的EdU实验结果吻合。



注:A.流式细胞仪测定细胞周期的结果图,横轴代表PI的染色强度,纵轴代表细胞计数。B.不同浓度的MDCI对处于S期细胞的影响。

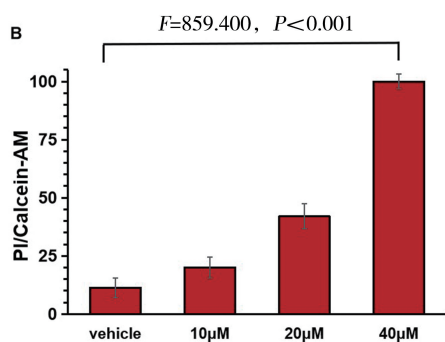
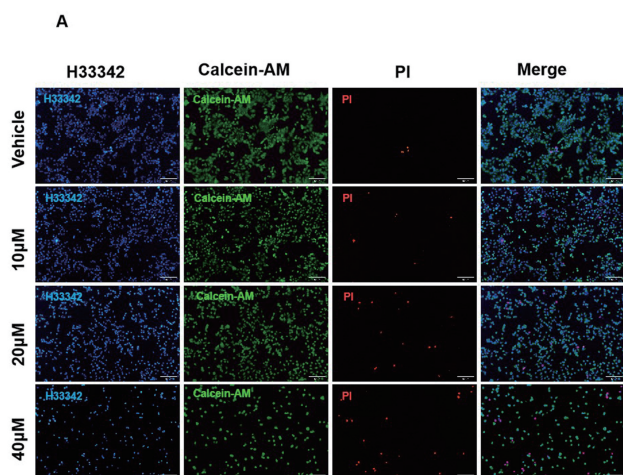
图4 MDCI对MHCC97-H细胞周期的影响

### 2.6 MDCI可诱导MHCC97-H细胞死亡

如图5所示,显示活细胞是绿色荧光,显示死亡细胞的是红色荧光,而显示细胞核的则是蓝色荧光。正常生长的健康状态下的MHCC97-H细胞在荧光显微镜下能够观测到绿色荧光与蓝色荧光均很强烈,并且在位置上存在着很大的一致性,而红色荧光则较弱甚至不能被肉眼直接观测到。由于MDCI药物含量的增加,绿色荧光水平逐步降低,说明细胞活性随着MDCI浓度的升高而逐渐降低;与此同时,红色荧光逐渐增多,显示出逐渐增多的死亡细胞。

### 2.7 MDCI引起细胞死亡的方式是诱导细胞凋亡

为了判断MDCI对MHCC97-H引起的细胞死亡是何种类型,我们采用了Annexin V-FITC/PI双染色,并且借助流式细胞仪检测其细胞分布。如图6所示,随着MDCI浓度的增加,正常生长的细胞(Q1-LL象限)比例递减,而发生早期凋亡(Q1-LR象限)和晚期凋亡(Q1-UR象限)的细胞比例不断增加,尤其是当MDCI处理的浓度为40 μM时效果最为明显,总凋亡细胞比例超过50%。而整个过程中,Q1-UL象限的细胞比例未发生显著变化,这说明MDCI是通过诱导细胞凋亡的方式来加速MHCC97-H细胞的死亡。

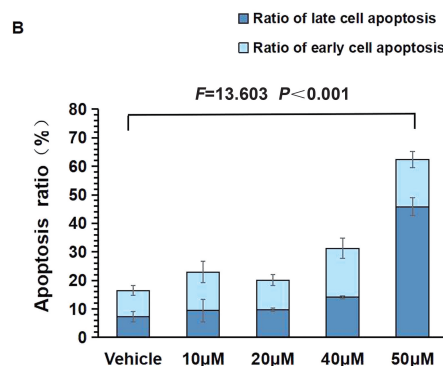
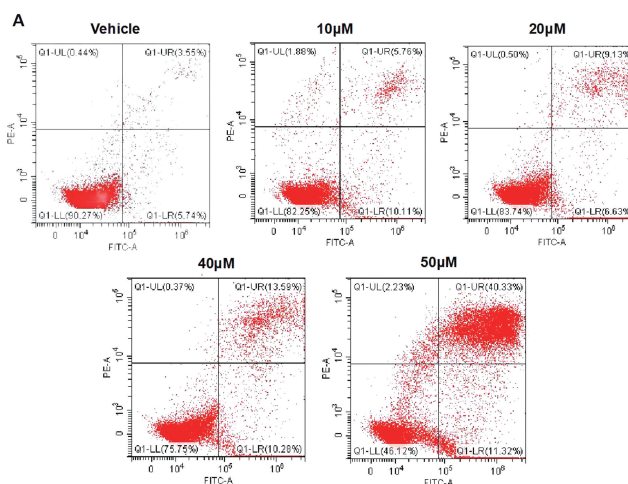


注:A. 不同浓度的 MDCI 处理 MHCC97-H 细胞后,使用 Calcein-AM 和 PI 对细胞进行双染色,然后在荧光显微镜下拍照。B. 不同浓度的 MDCI 对 PI 阳性细胞数量和 Calcein-AM 阳性细胞数量比例的影响(纵坐标代表 PI 阳性细胞与 Calcein-AM 阳性细胞比值,以最大浓度 MDCI 处理组为 100%计)。

图 5 MDCI 诱导的 MHCC97-H 细胞死亡

### 3 讨论

目前全球癌症的发病率和死亡率不断上升,肝癌的高发生率是主要原因之一<sup>[6]</sup>。目前临床上仍以手术切除为主,但因早期诊断困难而在体检中被意外发现的患者占多数,符合手术指征的比例较低(只有 15%~30%)<sup>[7-9]</sup>。正是得益于对肿瘤相关免疫逃逸机制的深入研究,近年来各种类型的免疫和靶向药物纷纷问世。这些针对中晚期肝癌患者(ORR 约为 30%)的系统治疗能取得较好的客观缓解效果,并能延长患者的生存期<sup>[10-11]</sup>。相对于传统的静脉化学治疗,系统治疗的针对性更好,不良反应也更小<sup>[12]</sup>。因此,探索影响肝癌细胞增殖和转移相关分子机制,并开发出能够延缓肿瘤细胞增殖、降低机体负荷作用的靶向药物对晚期肝癌患者



注:A. 不同浓度的 MDCI 处理 MHCC97-H 细胞后,使用 Annexin V-FITC 和 PI 对细胞进行双染色,然后在流式细胞仪中对各染色组分进行分群与记录。B. 不同浓度的 MDCI 对早期凋亡细胞和晚期凋亡细胞比例的影响。

图 6 MDCI 可以诱导 MHCC97-H 细胞发生细胞凋亡

具有重要意义。我们可以从大量的研究中总结出,恶性肿瘤的发生不仅是细胞的过度增殖导致的,还与细胞的异常凋亡有着密不可分的联系<sup>[13]</sup>。因此当前肿瘤治疗领域的重点课题之一就是针对如何引导和调控肿瘤细胞的凋亡这一问题<sup>[14]</sup>。榄香烯是我国自行研制的二类广谱抗癌新药,毒副作用小、没有抑制骨髓效果,临床应用前景广阔、优势突出<sup>[15-16]</sup>。以往的研究显示,榄香烯可以有效地阻止多种恶性组织生成、抑制癌细胞 DNA 合成,干预正常基因活动,而且已有实验已经证明榄香烯可以促进多种恶性肿瘤细胞产生细胞凋亡<sup>[17]</sup>。袁静等<sup>[18]</sup>科研人员发现,K562 系列血样经榄香烯处理后呈现出核固缩、染色质聚集、凋亡小体生成的特征,而这些都是细胞凋亡的典型特点。杨骅等<sup>[19]</sup>进一步研究发现,榄香烯对肿瘤细胞的杀伤作用最重要的一条机制是诱导细胞凋亡;徐学军等<sup>[20]</sup>针

对榄香烯对肝癌细胞的作用展开研究,发现榄香烯能够直接抑制人体肝脏癌细胞生长,阻断肝癌细胞进入 S 期,抑制癌细胞的增殖和细胞凋亡的发生。王宝成等<sup>[21]</sup>对 BEL-7402/DOX 这一人类肝脏癌细胞抗药株的敏感性进行了调查,实验结果是榄香烯对于 MDR1 基因高表达的抗药株仍表现出较强的抑制作用。这说明在肿瘤细胞的抗药性检测中榄香烯具有明显优势,对临床治疗肝癌患者有较大的借鉴意义。

针对  $\beta$ -榄香烯的  $IC_{50}$  较大,治疗肝癌中效果不够明显的痛点,本研究旨在筛选更加高效的以  $\beta$ -榄香烯为母核结构的苗头化合物,本文筛选了 3 种  $\beta$ -榄香烯衍生物,发现 MDCI 对于肝癌细胞的抑癌活性较  $\beta$ -榄香烯本体有大幅提升。我们以 MDCI 为苗头化合物处理了 MHCC97-H 细胞,发现 MDCI 可以呈浓度依赖性抑制 MHCC97-H 细胞的增殖并促进其凋亡,进而抑制肝癌细胞的过度增殖。实验结果表明,经过 MDCI 处理的 MHCC97-H 细胞活性受到明显抑制,说明 MDCI 能有效抑制肝癌细胞的过度增殖。在细胞迁移实验中,MHCC97-H 细胞经过 MDCI 处理后的迁移活动并没有受到明显影响,这表明 MDCI 对肝癌细胞的迁移几乎没有抑制作用。EdU 染色实验说明 MDCI 能降低 MHCC97-H 细胞的 DNA 复制速度,因为随着给药浓度的升高,细胞增殖的速度呈现明显的下降趋势。经 MDCI 处理后,MHCC97-H 细胞周期中 S 期比例随药物浓度升高而逐渐减少,而 G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 期无明显变化规律,表明 MDCI 对 MHCC97-H 细胞 DNA 复制合成影响较大。细胞增殖周期可分为 G<sub>1</sub> 期、S 期、G<sub>2</sub> 期和 M 期 4 个阶段,细胞周期的异常调控是肿瘤发生的一个重要原因<sup>[22]</sup>。肿瘤细胞具有增殖速度快的特征,而细胞 DNA 的合成和复制过程主要在 S 期完成,因此肿瘤细胞的 S 期细胞比例(S-phase fraction)往往大于正常细胞。目前已发现褐藻多糖硫酸酯对多种癌细胞均有较强的抑制作用<sup>[23]</sup>,其抑癌机制是阻滞癌细胞 G<sub>1</sub> 期向 S 期的进程,造成 G<sub>1</sub> 期细胞堆积阻滞并阻断细胞的 DNA 合成和复制,从而抑制癌细胞增殖<sup>[24]</sup>。5-氟尿嘧啶(5-FU)及替加氟是一种抗嘧啶类的细胞周期特异性药物,主要作用于 S 期,能干扰和阻断 DNA 合成<sup>[25]</sup>。MDCI 的抗肿瘤作用机制可能与此类药物的抗癌机制相似。同时,在 MDCI 浓度为 20 $\mu$ M 时我们检测到细胞开始发生死亡,通过 An-

nexin V-FITC 和 PI 双染色,在流式细胞仪中检测到,MDCI 诱导的 MHCC97-H 细胞死亡,是“细胞凋亡”的死亡方式。但对于 MDCI 是通过何种分子机制诱导肝癌细胞凋亡,本文尚未涉及,我们将在下一步的工作中探索和验证。

综上,本研究揭示了  $\beta$ -榄香烯系列药物对肝癌细胞的抑制作用及其特性。相比于  $\beta$ -榄香烯、MDCC 和 MCMC,MDCI 表现出更强、更有效的抗肝癌能力。虽然 MDCI 几乎不影响 MHCC97-H 肝癌细胞的迁移能力,但它在细胞水平通过“双重机制”来对抗肝癌,即通过“阻滞细胞周期”和“诱发细胞凋亡”。具体地说,MDCI 通过阻断 DNA 的复制过程,还能延缓细胞进入 S 期,从而降低癌细胞的增殖速度。该研究结果为开发以  $\beta$ -榄香烯为母核结构的新型抑癌药物提供了有价值的参考依据,同时也为临床上治疗肝癌开发新的方案提供了重要实验基础。

利益冲突:所有作者均申明不存在利益冲突。

#### 参考文献:

- [1] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-263. DOI: 10. 3322/caac. 21834.
- [2] Lu B, Luo J, Yan Y, et al. Evaluation of long-term benefits and cost-effectiveness of nation-wide colorectal cancer screening strategies in China in 2020-2060: a modelling analysis [J]. Lancet Reg Health West Pac, 2024, 51: 101172. DOI: 10. 1016/j. lanwpc. 2024. 101172.
- [3] 孙俪洋, 潘扬勋, 陈敏山. 2023 年度肝癌治疗研究现状与问题 [J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2024, 10(1): 19-24. DOI: 10. 12151/JMCM. 2024. 01-03.
- [4] 贺庆, 刘坤, 王超红, 等. 《原发性肝癌诊疗指南(2022 年版)》解读 [J]. 西部医学, 2023, 35(4): 474-479. DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-3511. 2023. 04. 002.
- [5] 刘鹭骏, 孙鑫怡, 郝校鹏, 等. 新型酚类化合物 DFTP 对结肠癌 SW480 细胞生物学表型的影响及其机制 [J]. 济宁医学院学报, 2022, 45(5): 315-320. DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-9760. 2022. 05. 003.
- [6] Shi J, Liu J, Tu X, et al. Single-cell immune signature for detecting early-stage HCC and early assessing anti-PD-1 immunotherapy efficacy [J]. J Immunother Cancer, 2022, 10(1): e003133. DOI: 10. 1136/jitc-2021-003133.
- [7] 中华预防医学会肝胆胰疾病预防与控制专业委员会, 中国抗癌协会肝癌专业委员会, 北京医学会外科学分会肝脏学组, 等. 基于免疫联合靶向方案的晚期肝细胞癌转化治疗中国专家共识(2021 版) [J]. 中华肝胆外科杂志, 2021, 27(4): 241-

251. DOI:10.3760/ema.j.cn113884-20210415-00138.
- [8] Lee M, Chan LL, Chan SL. The role of lenvatinib in the era of immunotherapy of hepatocellular carcinoma [J]. *J Liver Cancer*, 2023, 23(2):262-271. DOI:10.17998/jlc.2023.07.17.
- [9] Wang Q, Xia D, Bai W, et al. Development of a prognostic score for recommended TACE candidates with hepatocellular carcinoma: a multicentre observational study [J]. *J Hepatol*, 2019, 70(5):893-903. DOI:10.1016/j.jhep.2019.01.013.
- [10] Ballester MP, Abril C, Merino V, et al. Atezolizumab plus bevacizumab treatment for unresectable hepatocellular carcinoma: real-life experience from a single tertiary centre in Spain and ALBI score as a survival prognostic factor [J]. *Cancer Diagn Progn*, 2024, 4(5):623-630. DOI:10.21873/cdp.10373.
- [11] Benson AB, D'Angelica MI, Abrams T, et al. NCCN guidelines<sup>®</sup> insights: biliary tract cancers, version 2. 2023 [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2023, 21(7):694-704. DOI:10.6004/jnccn.2023.0035.
- [12] 何龙, 阎雄. 中晚期肝癌转化治疗方法的应用进展 [J]. *山东医药*, 2023, 63(3):108-111. DOI:10.3969/j.issn.1002-266X.2023.03.026.
- [13] Sahebnasagh R, Azizi Z, Komeili-Movahhed T, et al. In-silico and in-vitro investigation of key long non-coding RNAs involved in 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer cells: analyses highlighting NEAT1 and MALAT1 as contributors [J]. *Cureus*, 2024, 16(8):e66393. DOI:10.7759/cureus.66393.
- [14] Xue X, Quan Y, Gong L, et al. A review of the processed polygonum multiflorum (Thunb.) for hepatoprotection: clinical use, pharmacology and toxicology [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 261:113121. DOI:10.1016/j.jep.2020.113121.
- [15] 薛天乐, 王庆, 孙守国, 等.  $\beta$ -榄香烯与姬松茸萃取物的抗肿瘤作用和药理学研究 [J]. *中国食用菌*, 2019, 38(11):72-75. DOI:10.13629/j.cnki.53-1054.2019.11.015.
- [16] 时继慧. 温莪术挥发油的实验药理研究—— $\beta$ -榄香烯抗肿瘤作用的研究 [J]. *中药通报*, 1981(6):32-33.
- [17] 钱军. 抗癌新药——榄香烯的药理及临床 [J]. *中国肿瘤临床*, 1996(6):453-455.
- [18] 袁静, 顾振纶, 周文轩, 等. 榄香烯诱导人白血病 K562 细胞凋亡 [J]. *中国药理学通报*, 1998(5):410-412.
- [19] 杨骅, 王仙平, 郁琳琳, 等. 榄香烯抗癌作用与诱发肿瘤细胞凋亡 [J]. *中华肿瘤杂志*, 1996, 18(3):169-172.
- [20] 徐学军, 周子成, 罗元辉, 等.  $\beta$ -榄香烯诱导人肝癌细胞株 SMMC-7721 凋亡的研究 [J]. *第三军医大学学报*, 1999, 21(4):268-271. DOI:10.3321/j.issn:1000-5404.1999.04.012.
- [21] 王宝成, 郭军, 狄剑时, 等. 榄香烯乳剂与肿瘤多药耐药的基础研究 [J]. *中国肿瘤临床*, 1996(2):143-146.
- [22] Li G, Kim DH, Kim TD, et al. Protein-bound polysaccharide from *Phellinus linteus* induces G2/M phase arrest and apoptosis in SW480 human colon cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2004, 216(2):175-181. DOI:10.1016/j.canlet.2004.07.014.
- [23] 陈慧玲, 史锋. 褐藻糖胶的药理作用及机制的研究进展 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2005, 24(6):485-490. DOI:10.3969/j.issn.1007-7669.2005.06.021.
- [24] Li XK, Motwani M, Tong W, et al. Huanglian, A Chinese herbal extract, inhibits cell growth by suppressing the expression of cyclin B1 and inhibiting CDC2 kinase activity in human cancer cells [J]. *Mol Pharmacol*, 2000, 58(6):1287-1293. DOI:10.1124/mol.58.6.1287.
- [25] 张连波, 刘星野, 安玉杰. 紫杉醇联合小剂量顺铂、氟尿嘧啶治疗复发性乳腺癌的临床观察 [J]. *中国实用医药*, 2007(5):68.

(收稿日期 2024-07-02)

(本文编辑:石俊强)