

薄荷醇对肝癌 HepG2 细胞增殖、迁移及 IL-8, CXCL-12, VEGF 表达的影响

陶兴魁*, 张兴桃, 王海潮, 段红, 程瑾

(宿州学院 生物与食品工程学院, 宿州市天然产物与功能性食品工程技术研究中心, 安徽 宿州 234000)

[摘要] 目的: 体外实验观察不同剂量薄荷醇对肝癌 HepG2 细胞增殖、迁移及白细胞介素-8 (IL-8), 趋化因子-12 (CXCL-12) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 表达的影响, 阐释薄荷醇抗肝癌的作用及其相关机制。方法: 设立薄荷醇 (25, 50, 100, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组以及空白组作用于肝癌 HepG2 细胞, 利用细胞增殖与毒性检测 (CCK-8) 法和 5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷 (EDU) 检测方法检测薄荷醇对 HepG2 细胞增殖的影响, 利用迁移实验 (Transwell) 检测薄荷醇对 HepG2 细胞迁移能力的影响, 利用实时荧光定量聚合酶链式反应检测薄荷醇处理 HepG2 细胞炎症和趋化因子 IL-8, CXCL-12 mRNA 表达水平, 通过蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测薄荷醇处理对 HepG2 细胞中 VEGF 蛋白的表达水平。结果: 与空白组比较, 薄荷醇 (25, 50, 100, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 在体外对 HepG2 细胞增殖和迁移均有抑制作用。薄荷醇 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时抑制作用明显 ($P < 0.05$); 薄荷醇 (50, 100, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对 HepG2 细胞迁移能力有明显抑制作用 ($P < 0.05$), 呈剂量依赖性。与空白组比较, 薄荷醇 (100, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 均能显著抑制 HepG2 细胞中的 IL-8, CXCL-12 mRNA 和 VEGF 蛋白的表达水平 ($P < 0.05$), 进一步证实薄荷醇通过抑制炎症趋化因子起到抗癌作用。结论: 薄荷醇在体外对肝癌 HepG2 细胞增殖、迁移具有明显抑制作用, 潜在机制可能与其抑制细胞 IL-8, CXCL-12, VEGF 的表达有关。此结论为薄荷醇抗肝癌作用的阐释提供了实验依据。

[关键词] 薄荷醇; 细胞增殖; 细胞迁移; HepG2 细胞

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)21-0060-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192124

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190717.1023.004.html>

[网络出版时间] 2019-07-17 16:04

Effect of Menthol on Proliferation, Migration and Expressions of IL-8, CXCL-12 and VEGF in Hepatoma HepG2 Cells

TAO Xing-kui*, ZHANG Xing-tao, WANG Hai-chao, DUAN Hong, CHENG Jin

(Suzhou Engineering and Technological Research Center of Natural Medicine and Functional Food, School of Biological and Food Engineering, Suzhou University, Suzhou 234000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of menthol on proliferation, migration and expressions of interleukin-8 (IL-8), C-X-C motif chemokine-12 (CXCL-12) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in hepatoma HepG2 cells *in vitro*, in order to elucidate the anti-liver cancer activity of menthol and relevant mechanisms. **Method:** Different concentrations of menthol (25, 50, 100, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and blank group were applied to Hepatoma HepG2 cells. Cell counting kit-8 (CCK-8) and EDU were used to detect the proliferation effect of menthol on HepG2 cell. Transwell experiment was used to detect the migration effect of menthol on HepG2

[收稿日期] 20190531(007)

[基金项目] 安徽省高校省级自然科学研究重点项目 (KJ2017ZD36); 安徽省卓越人才教育培养计划项目 (2013zjjh039); 校企合作实践教育基地项目 (2017sjjd032); 宿州学院自然科学研究重点项目 (2016yzd04); 宿州学院特色种植业种苗生产工程技术研究中心开放课题项目 (2017ykf02); 宿州市天然产物与功能性食品工程技术研究中心 (SZ2017ZX06)

[通信作者] *陶兴魁, 硕士, 实验师, 从事药用植物技术研究, E-mail: szxytk@163.com

cell. Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction technique was used to detect the inflammatory chemokines IL-8 and CXCL-12 mRNA expression levels in HepG2 cell. Western blot was used to detect the expression level of VEGF in HepG2 cells treated with menthol. **Result:** Compare with the blank group, menthol (25, 50, 100, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) significantly inhibited proliferation and migration of HepG2 cells *in vitro*. When the concentration of menthol was 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ microns, the inhibitory effect was significant ($P < 0.05$). Menthol significantly inhibited the migration of HepG2 cells. The higher the concentration of menthol was, the less the number of cell migration was. Compared with the blank group, menthol (100, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) significantly inhibited the expression levels of IL-8, CXCL-12 mRNA and VEGF protein in HepG2 cells ($P < 0.05$), indicating that menthol is an anticancer agent by inhibiting inflammation and chemokines. **Conclusion:** Menthol has an inhibitory effect on the proliferation and migration of hepatoma HepG2 cells *in vitro*, and the potential anti-liver cancer mechanism might be related to the inhibition of IL-8, CXCL-12 and VEGF expressions in the cells. This conclusion provides the experimental basis for elucidating the effect of menthol against liver cancer.

[**Key words**] menthol; cell proliferation; cell migration; HepG2 cells

癌症已成为严重威胁人们健康的重大慢性疾病^[1]。肝癌是我国高发且危害性极大的恶性肿瘤,据统计,我国每年的肝癌新发病例约占全球的一半^[2]。肝癌分为原发性肝癌和继发性肝癌,原发性肝癌是肝脏本身所引起的肿瘤,继发性肝癌是由其他部位的肿瘤转移至肝脏所引起的肿瘤^[3-4]。肝癌细胞极易转移及入侵其他组织,是术后复发的主要原因^[5]。研究表明,肝癌患者 5 年内转移复发率在 60% ~ 70%^[6],因此,研究抗肝癌的药物具有极其重要的意义和价值。

薄荷醇是一种单萜化合物,无色针状结晶或粒状,是薄荷中的主要成分,以游离和酯的状态存在。薄荷醇被广泛应用于食品、药品或者其他领域^[7]。近年来,有关薄荷醇在各种癌症中抗癌作用的基础研究取得一些进展。研究发现,薄荷醇对前列腺癌^[8]、膀胱癌^[9]、结肠癌^[10]、胃癌^[11]等多种肿瘤细胞增殖生长均有抑制作用,主要通过诱导肿瘤细胞的周期阻滞、凋亡及信号调控等方式^[12]。薄荷醇在适宜浓度时,对胃癌细胞生长抑制率为 26.73% ~ 42.53%,与大黄素及黄芩苷协同作用时,对胃癌细胞的增殖抑制作用更加明显^[13]。采用噻唑蓝(MTT)比色法检测,不同浓度薄荷醇可激活 DU145 细胞中的 TRPM8 通道,诱导 Ca^{2+} 荧光强度,从而抑制 DU145 细胞的增殖^[14]。目前,其他药物抗肝癌作用已有较多研究^[15-17],但关于薄荷醇的抗肝癌作用及机制方面研究还较少,因此,本实验以人肝癌 HepG2 细胞为体外研究材料,将不同浓度的薄荷醇作用于 HepG2 细胞,分析细胞增殖、迁移特性,并检测细胞炎症趋化因子白细胞介素-8(IL-8),趋化因子-12(CXCL-12) mRNA 的表达水平及血管内皮

生长因子(VEGF)蛋白的表达情况,以期薄荷醇抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖和迁移及抗肝癌活性阐释提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞株 人肝癌 HepG2 细胞,购自中国科学院上海细胞所,编号 SCSP-510,传至第 4 代用于后续实验。

1.2 药品及试剂 薄荷醇对照品(上海麦克林生化科技有限公司,批号 C10458801,纯度 $\geq 99.5\%$);细胞增殖与毒性检测(CCK-8)试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号 313B012);5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷(EDU)试剂盒(广州市锐博生物科技有限公司,批号 R1127);Cell Culture Insert Transparent PET Membrane(Falcon 公司,批号 8213015);BI 胎牛血清(舜冉上海生物科技有限公司,批号 10099-141);VEGF 抗体(Biorbyt 公司,批号 orb163157); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(Bioworld 公司,批号 AP0060);trizol(上海臻诺生物科技有限公司,批号 KGA1203);逆转录和实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)试剂盒(南京诺维赞生物公司,批号 R111-01);结晶紫(Solarbio 公司,批号 C8470);引物由生工生物(上海)股份有限公司合成,CXCL-12(417 bp)上游 5'-CGACTTCTCAGGCAGGTGA-3',下游 5'-GCCATTCCCATAGCATTCAT-3';IL-8(161 bp)上游 5'-CATGGATCTGTCTAGGGCT-3',下游 5'-CTGACCAACAGACCAGGGTT-3';甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH, 250 bp)上游 5'-ATGTTTG TGATGGCGTGAACC-3',下游 5'-CCCAGCATC GAAGGTAGAGGA-3';青霉素-链霉素溶液、甲醇等其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器 IX71 型倒置荧光显微镜及图像分析系统(日本 Olympus 公司);Infinite 200 PRO 型多功能酶标仪(奥地利 Tecan 公司);PWN224ZH 型电子天平(美国奥豪斯公司);Nanodrop 2000 型超微量分光光度计(美国 Thermo 公司);ViiA^{TM7} 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);Power/Pac300 型稳压稳流电泳仪,Trans-blot Turbo 型转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);FluorChem HD2 型荧光化学发光成像系统(美国 ProteinSimple 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 肝癌 HepG2 细胞采用 37 °C 水浴加热快速解冻,用含 12% 胎牛血清,100 U·mL⁻¹ 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基培养,37 °C 5% CO₂ 细胞培养箱中进行培养 3~4 代,实验取对数生长期的细胞。

2.2 CCK-8 法检测癌细胞增殖 当细胞达到 70% 及以上时进行铺板,次日在倒置显微镜下,观察细胞状态和细胞密度,细胞达 70%~80% 时,设置空白组(薄荷醇浓度为 0)和薄荷醇组(薄荷醇浓度 25, 50, 100, 200 μmol·L⁻¹)^[13,18],每组 6 个复孔。每孔加入薄荷醇溶液 100 μL,接种于 96 孔板,细胞做 4 个板,置于 37 °C 5% CO₂ 细胞培养箱中分别培养 24, 48, 72, 96 h,每孔加入配好 CCK-8 的溶液(纯 CCK-8-纯培养基 1:9)100 μL,放入 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养 2 h,用多功能酶标仪在 450 nm 处测定吸光度 *A*。

2.3 EDU 检测方法检测薄荷醇对癌细胞的增殖影响 分组及给药同 2.2 项,每组 6 个复孔,每孔加入薄荷醇溶液 250 μL,培养 24 h,按 EDU 试剂盒步骤操作^[19]。在倒置荧光显微镜下,计数观察拍摄图像。

2.4 Transwell 迁移实验检测薄荷醇对癌细胞迁移能力的影响 取对数生长期肝癌 HepG2 细胞,用 PET 膜进行铺板,37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养 12 h,进行薄荷醇培养操作。组别设置同 2.2 项,每组 3 个复孔,每个上室加入薄荷醇溶液 200 μL,下室加入薄荷醇溶液 500 μL,培养 24 h,进行固定、结晶紫染色,在倒置显微镜下进行分析观察细胞形态并拍照^[20]。

2.5 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测 IL-8, CXCL-12 mRNA 水平 对数生长期肝癌 HepG2 细胞接种于 6 孔板中(5 × 10⁵ 个/孔), 37 °C 5% CO₂ 培养箱培养,细胞达到 70%~80%, 分组及加药同 2.2 项,培养 24 h,收集细胞,利用

trizol 法提取各组细胞总 RNA,并测定浓度。应用反转录试剂盒进行反转录,逆转录条件为 37 °C 15 min,85 °C 5 s。保存于 -20 °C 冰箱中。进行 Real-time PCR 反应,反应条件为预变性 95 °C 30 s, 95 °C 5 s,60 °C 31 s,40 个循环。所得到的数据采用 $\bar{x} \pm s$ 法分析相关 mRNA 表达。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测蛋白水平 对数生长期肝癌 HepG2 细胞接种于 60 mm 培养皿中,37 °C 5% CO₂ 培养箱培养,细胞密度达到 70%~80%,分组及加药同 2.2 项,培养 24 h,收集细胞,加入蛋白裂解液 100 μL 收集蛋白样本,用 BCA 法测定蛋白浓度。取蛋白样品 30 μg,经电泳分离后转移至 PVDF 膜,放入 5% BSA 封闭液封闭 2 h,加入 VEGF(1:1 000),β-actin(1:8 000)抗体,4 °C 孵育过夜,次日磷酸盐缓冲液(PBS)洗 PVDF 膜 3 次,加入二抗(1:1 万)室温下孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次,ECL 显色,用 FluorChem HD2 凝胶成像系统拍照,并用该软件统计相应的灰度值。

2.7 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析,各项检测结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,实验进行 3~6 次重复,*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 薄荷醇对肝癌 HepG2 细胞的增殖影响

3.1.1 CCK-8 法检测肝癌 HepG2 细胞增殖 与空白组比较,培养 24 h,薄荷醇 100, 200 μmol·L⁻¹ 组抑制效果显著(*P* < 0.01);培养 48 h,薄荷醇 100 μmol·L⁻¹ 组抑制效果明显(*P* < 0.05),薄荷醇 200 μmol·L⁻¹ 组抑制效果显著(*P* < 0.01);培养 72 h,薄荷醇 200 μmol·L⁻¹ 组抑制效果明显(*P* < 0.05);培养 96 h,薄荷醇 100, 200 μmol·L⁻¹ 组抑制效果显著(*P* < 0.01)。组间差异分析,薄荷醇 100, 200 μmol·L⁻¹ 组间未见统计学差异,见表 1。

3.1.2 EDU 法检测肝癌 HepG2 细胞的增殖 与空白组比较,薄荷醇 25, 50, 100, 200 μmol·L⁻¹ 组对 HepG2 有显著的抑制作用(*P* < 0.01),且随着浓度增加抑制作用越明显,此结果与 CCK-8 结果基本一致。见图 1,表 2。

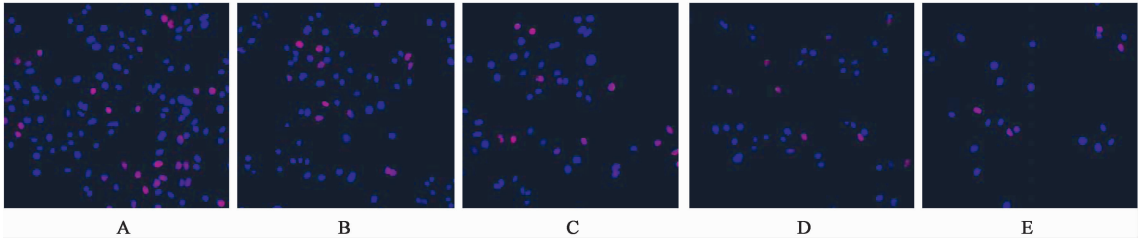
3.2 薄荷醇对癌细胞迁移能力的影响 薄荷醇培养 24 h,与空白组比较,薄荷醇对癌细胞的迁移侵袭能力有不同程度抑制作用,抑制强度与薄荷醇浓度呈正相关,综合薄荷醇性质及组间差异比较分析,薄荷醇浓度为 100 μmol·L⁻¹ 时,对肝癌 HepG2 迁移抑制作用最大。见图 2。

表 1 薄荷醇对 HepG2 细胞增殖抑制的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of menthol on HepG2 cell proliferation inhibition ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h	48 h	72 h	96 h
空白	-	1.172 ± 0.050	1.481 ± 0.057	1.040 ± 0.085	1.025 ± 0.050
薄荷醇	25	1.123 ± 0.057	1.439 ± 0.059	0.983 ± 0.091	0.975 ± 0.054
	50	1.048 ± 0.090	1.392 ± 0.061	0.943 ± 0.085	0.932 ± 0.053
	100	0.998 ± 0.073 ²⁾	1.347 ± 0.064 ¹⁾	0.894 ± 0.095	0.879 ± 0.051 ²⁾
	200	0.959 ± 0.072 ²⁾	1.297 ± 0.062 ²⁾	0.844 ± 0.088 ¹⁾	0.829 ± 0.054 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。



A. 空白组; B~E. 薄荷醇 25, 50, 100, 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组 (图 2, 3 同)

图 1 薄荷醇对肝癌 HepG2 细胞的增殖影响 (EDU, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of menthol on proliferation of HepG2 (EDU, $\times 200$)

表 2 薄荷醇对肝癌 HepG2 增殖数目的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of menthol on proliferation of HepG2 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h/个
空白	-	38.00 ± 1.414
薄荷醇	25	22.00 ± 2.529 ²⁾
	50	18.00 ± 1.673 ²⁾
	100	11.00 ± 1.414 ²⁾
	200	6.00 ± 1.264 ²⁾

3.3 薄荷醇对 HepG2 细胞 IL-8, CXCL-12 mRNA 表达水平的影响 与空白组比较,薄荷醇(50, 100, 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组细胞中 IL-8, CXCL-12 mRNA 表达均明显下调 ($P < 0.05$),呈浓度依赖效应,见表 3。

3.4 薄荷醇对 HepG2 中 VEGF 蛋白表达的抑制作用 与空白组比较,薄荷醇(100, 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)对 VEGF 蛋白表达具有明显抑制作用 ($P < 0.05$),且呈现剂量依赖性。见图 3,表 4。

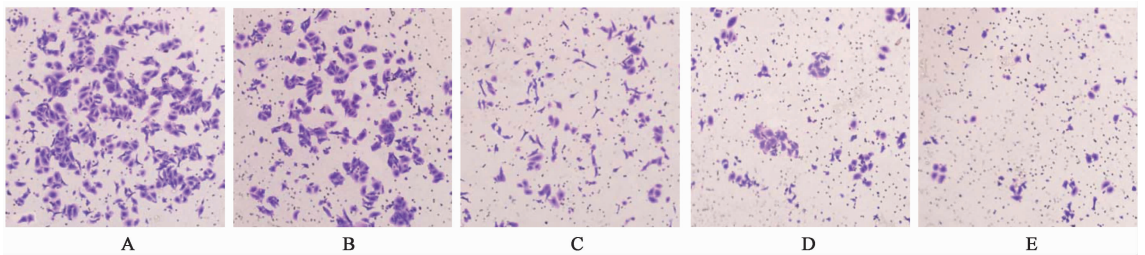


图 2 薄荷醇对肝癌 HepG2 迁移的影响 (结晶紫染色, $\times 200$)

Fig. 2 Effect of menthol on metastasis of HepG2 cells (crystal violet staining, $\times 200$)

4 讨论

在研究薄荷醇对雌性小鼠炎症、氧化应激和皮肤癌变的化学预防潜力中发现,薄荷醇能明显抑制皮肤癌细胞的增殖和生长,显著降低肿瘤发生率^[21]。在研究薄荷醇对前列腺癌细胞作用时发现,薄荷醇通过独立于 TRPM8 的 Ca^{2+} 流入机制在 PC-3 细胞中增加 Ca^{2+} ,在超摩尔浓度下可诱导前列腺癌细胞死亡^[22]。

本研究通过 CCK-8 法和 EDU 法分析薄荷醇对肝癌 HepG2 细胞增殖的影响,结果表明薄荷醇对肝癌 HepG2 细胞增殖有抑制作用。薄荷醇 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,肝癌 HepG2 细胞在作用 24, 48, 72, 96 h 时,抑制作用明显;EDU 实验结果显示,薄荷醇对肝癌 HepG2 细胞增殖的抑制作用明显;分析 Transwell 迁移实验结果,薄荷醇对肝癌 HepG2 细胞迁移作用随浓度升高抑制效果越明显;综合该部分

表 3 薄荷醇对 HepG2 细胞 IL-8, CXCL-12 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of menthol on IL-8 and CXCL-12 mRNA expressions in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	IL-8	CXCL-12
空白	-	4.907 ± 0.335	3.479 ± 0.268
薄荷醇	25	4.624 ± 0.196	3.243 ± 0.325
	50	1.135 ± 0.267 ¹⁾	2.716 ± 0.209 ¹⁾
	100	0.763 ± 0.411 ¹⁾	1.251 ± 0.348 ¹⁾
	200	0.392 ± 0.316 ¹⁾	0.814 ± 0.268 ¹⁾

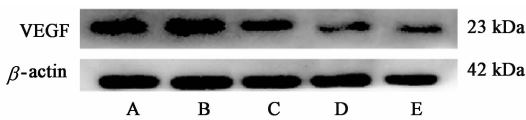


图 3 薄荷醇作用 HepG2 细胞 VEGF 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of menthol on VEGF expression in HepG2 cells

表 4 薄荷醇对 HepG2 细胞中 VEGF 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of menthol on VEGF expressions in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	VEGF/ β -actin
空白	-	2.121 ± 0.197
薄荷醇	25	2.003 ± 0.198
	50	1.670 ± 0.114
	100	1.362 ± 0.256 ¹⁾
	200	0.836 ± 0.061 ¹⁾

薄荷醇实验结果发现,当薄荷醇为 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,肝癌 HepG2 细胞增殖和迁移抑制作用最好。

炎症趋化因子是一类多肽炎性细胞因子,IL-8, CXCL-12 是具有趋化作用的炎性细胞趋化因子,属于 CXC 家族^[23]。IL-8, CXCL-12 与配体结合能参与调控多种生理和病理学过程,在多种肿瘤细胞中都有较高表达^[24]。研究发现,IL-8, CXCL-12 参与多种肝脏疾病的发生发展,肝脏发生炎症或细胞癌变时,肝组织无论是 mRNA 还是蛋白质水平,均出现 IL-8, CXCL-12 表达升高情况^[25-27]。IL-8 与其相应受体 CXCR-1, CXCR-2 结合后,通过 G 蛋白信号传递,能促进肿瘤细胞的增殖、分化和转移,促进肿瘤部位血管生成,阻断或者抑制 IL-8 表达或将成为治疗癌症的新发现^[28]。VEGF 蛋白在肝癌细胞血管生成增殖过程中起重要作用,检测肝癌肿瘤组织发现,组织中的 VEGF 及受体阳性细胞数量明显增长,

术后病情恶化的患者血清中 VEGF 表达水平也明显升高^[29-30]。

本课题组前期已筛选了薄荷醇对乳腺癌、肺癌、肝癌、结直肠癌 4 种癌细胞增殖和迁移抑制作用,结果表明薄荷醇对肝癌 HepG2 细胞增殖和迁移抑制效果最好。故本研究选用肝癌 HepG2 细胞,检测薄荷醇对肝癌 HepG2 细胞炎性趋化因子 IL-8, CXCL-12, VEGF 蛋白的表达抑制效果。本研究结果表明,薄荷醇对肝癌 HepG2 细胞炎症趋化因子 IL-8, CXCL-12 mRNA 的表达水平和 VEGF 蛋白的表达水平均有显著抑制作用。薄荷醇通过干预 HepG2 细胞中炎症、趋化因子和 VEGF,从而抑制 HepG2 细胞增殖、迁移,该结果为薄荷醇抗肝癌研究的作用及分子机制提供了新思路,为薄荷醇在肝癌治疗上提供理论依据和实验基础。

[参考文献]

- [1] 陈万青,李霓,石菊芳,等. 中国城市癌症早诊早治项目进展[J]. 中国肿瘤, 2019, 28(1): 23-25.
- [2] 靳秀丽,李异玲. lncRNA 与肝癌相关性研究进展[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2019, 28(3): 345-349.
- [3] 黄硕,叶娜妮,张依静,等. 何若苹辨治原发性肝癌经验[J]. 中医杂志, 2019, 60(9): 737-740.
- [4] 朱丽娜,谢宝杰,殷风华,等. DynaCT 对肝转移瘤介入治疗具有指导意义[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(5): 2265-2269.
- [5] 万思哲,朱莹. RhoA 对肝癌进展的调节作用机制[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2019, 35(5): 480-485.
- [6] 张晶晶,金小宝,李小波,等. 过表达 Glypican-3 对高转移性肝癌细胞 HCLM3 生物学行为的影响[J]. 生物技术通报, 2017, 33(12): 176-184.
- [7] 于清跃,朱新宝. 薄荷种植与薄荷精油提取研究进展[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(13): 7911-7913.
- [8] Oz M, El Nebisi E G, Yang K H S, et al. Cellular and molecular targets of menthol actions [J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 472.
- [9] Nanda Prasad S V, Reddy A Y, Nonitha S. Effects of menthol-flavored substances at the cellular level on oral mucosal sites[J]. Dent Res J, 2019, 16(1): 7-11.
- [10] Yee N. Roles of TRPM8 ion channels in cancer: proliferation, survival, and invasion[J]. Cancers, 2015, 7(4): 2134-2146.
- [11] LIU Z, SHEN C, TAO Y, et al. Chemopreventive efficacy of menthol on carcinogen-induced cutaneous carcinoma through inhibition of inflammation and oxidative stress in mice[J]. Food Chem Toxicol, 2015,

- 82;12-18.
- [12] 陈晨,刘兆国,汪思亮,等.薄荷醇及其受体 TRPM8 与肿瘤关系研究进展[J].中国药理学通报,2015,31(3):312-314.
- [13] 苗延青,梁静,刘漫.黄芩苷协调大黄素薄荷醇对胃癌 SGC-7901 细胞增殖抑制作用的研究[J].山西医药杂志,2019,48(8):888-890.
- [14] 于文建,王磊,韩利平,等.雄激素非依赖性前列腺癌 DU145 细胞中 TRPM8 和 TRPA1 的表达及活性研究[J].癌症进展,2017,15(7):754-758.
- [15] 肖潺潺,陈茂剑,梅凡彪,等.辣椒碱对肝癌 SMMC-7721 细胞迁移和侵袭的影响及机制[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(18):124-129.
- [16] 刘婷,丁艳,杨婷婷,等.鲜枸杞子提取物通过 p38 MAPK 信号通路抑制人肝癌细胞 HepG2 诱导小鼠恶病质的作用及机制[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(9):89-94.
- [17] 郑雪莹,曹宁宁,裴帅,等.人参皂苷 Rh₂ 抗肝癌作用机制的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2019, doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20191329.
- [18] 黎勤.薄荷醇通过 TRPM8 通道诱导人膀胱癌 T24 细胞株死亡的试验研究[D].广州:南方医科大学,2010.
- [19] 刘雷,杨立业. EdU 在检测细胞增殖中的应用[J].医学综述,2010,16(19):2901-2904.
- [20] 郭苇,谭为,王昌俊. miRNA 与肝癌的关系[J].广州中医药大学学报,2015,32(3):185-188.
- [21] LIU Z G, SHEN X S, TAO Y, et al. Chemopreventive efficacy of menthol on carcinogen-induced cutaneous carcinoma through inhibition of inflammation and oxidative stress in mice[J]. Food Chem Toxicol, 2015, 82:12-18.
- [22] LIU B, FAN L, Balakrishna S, et al. TRPM8 is the principal mediator of menthol-induced analgesia of acute and inflammatory pain [J]. Pain, 2013, 154 (10): 2169-2177.
- [23] Domanska U M, Kruizinga R C, Nagenagast W B, et al. A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide[J]. Eur J Cancer, 2013,49:219-230.
- [24] 李思睿,刘阳,李果,等. CXCR4/CXCL12 轴与肿瘤发生发展中的作用研究进展[J].生理科学进展,2018,49(5):375-378.
- [25] 杨敏,傅海涛,杨再兴,等. IL-8 及其受体 CXCR1、CXCR2 与肝癌关系的研究进展[J].临床检验杂志,2013,31(12):926-928.
- [26] Akiba J, Yano H, Ogasawara S, et al. Expression and function of interleukin-8 in human hepatocellular carcinoma[J]. Int J Oncol,2001,18(2):257-264.
- [27] Gentilini A, Rombouts K, Galastrì S, et al. Role of the stromal-derived factor-1 CXCR4 axis in the interaction between hepatic stellate cells and cholangiocarcinoma [J]. J Hepatol, 2012,57(4):813-820.
- [28] 施国英,施德金,吕伟标,等.基质细胞衍生生长因子-1 及其受体 CXCR4 在肝细胞癌和肝硬化中的表达[J].中华肝脏病杂志,2007,15(4):276-278.
- [29] Mohamed A, Chenna A, Abdelfatah M, et al. Microvessel density analysis in patients with viral hepatitis-related hepatocellular carcinoma [J]. J Gastrointest Cancer,2015,46(2):104-108.
- [30] Kasprzak A, Surdacka A, Tomczak M, et al. Expression of angiogenesis-stimulating factors (VEGF, CD31, CD105) and angiogenetic index in gingivae of patients with chronic periodontitis [J]. Folia Histochem Cytobiol,2012,50(4):554-564.

[责任编辑 张丰丰]