松油烯 4 醇体内外对人肺癌细胞系 A-549 增殖抑制作用

潘乾广[1a],石 瑶[1a],叶秀峰[1ab],胡仕林[2],晏家瑛[2],周也涵[1a],万 丹[1a] (1. 重庆医科大学:a. 病理科;b. 神经科学研究中心,重庆 400016;2. 重庆市日用化学工业研究所,重庆 400065)

[摘 要] **目的** 探讨松油烯 4 醇体内外对人肺癌细胞系 A-549 增殖抑制作用及其可能机制。**方法** 不同浓度松油烯 4 醇作用于 A-549 细胞 24 h 后,应用 MTT 法检测抑制率及 IC_{50};CCK-8 比色分析法绘制不同浓度下的生长曲线;透射电镜观察药物作用后细胞超微结构的变化;流式细胞仪检测细胞周期、凋亡、细胞内 Ca^{2+} 浓度变化;将 A-549 细胞移植瘤裸鼠分为对照组、低剂量组、高剂量组药物连续腹腔注射 10 d 后分别测量各组移植瘤体积和重量,观察药物的体内抗肿瘤作用。**结果** A-549 细胞 24 h 的 IC_{50} 为 0.067% v/v;CCK-8 实验结果表明给药组生长曲线明显较对照组平缓,并与给药剂量呈显著相关性;电镜观察可见经松油烯 4 醇处理的 A549 细胞内自噬泡数量明显增加。FCM 检测周期显示 S 期阻滞;检测显示细胞凋亡率明显增加,凋亡率呈现浓度-效应关系;各药物干预组 A-549 细胞内 Ca^{2+} 荧光强度均明显高于对照组($P<0.05$)。体内实验显示各实验组经松油烯 4 醇治疗后移植瘤生长缓慢,治疗结束时治疗组移植瘤质量及瘤体积明显低于对照组($P<0.05$),高、低剂量组的瘤质量抑制率分别为 77.6% 和 53.3%。**结论** 松油烯 4 醇在体外能抑制 A-549 细胞的增殖。

[关键词] 松油烯 4 醇;A-549;裸鼠成瘤;Ca^{2+};凋亡;自噬

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2014)05-0481-05

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201405013

[基金项目] 重庆市科委攻关计划项目(CSTC,2012ggB10002)

[通讯作者] 叶秀峰,E-mail:yxf1960@126.com

[收稿日期] 2014-01-05 [修回日期] 2014-02-03

[8] Yang HN, Park JS, Woo DG, et al. Chondrogenesis of mesenchymal stem cells and dedifferentiated chondrocytes by transfection with SOX Trio genes[J]. Biomaterials, 2011, 32(30):7695 – 7704.

[9] Kim HJ, Im GI. Electroporation-mediated transfer of SOX trio genes (SOX-5, SOX-6, and SOX-9) to enhance the chondrogenesis of mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells Dev, 2011, 20(12):2103 – 2114.

[10] Kupcsik L, Stoddart MJ, Li Z, et al. Improving chondrogenesis: potential and limitations of SOX9 gene transfer and mechanical stimulation for cartilage tissue engineering[J]. Tissue Eng Part A, 2010, 16(6):1845 – 1855.

[11] Hargus G, Kist R, Kramer J, et al. Loss of Sox9 function results in defective chondrocyte differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro[J]. Int J Dev Biol, 2008, 52(4):323 – 332.

[12] Ikeda T, Kamekura S, Mabuchi A, et al. The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage[J]. Arthritis Rheum, 2004, 50(11):3561 – 3573.

[13] Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, et al. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6[J]. Genes Dev, 2002, 16(21):2813 – 2828.

[14] Amano K, Hata K, Sugita A, et al. Sox9 family members negatively regulate maturation and calcification of chondrocytes through up-regulation of parathyroid hormone-related protein[J]. Mol Biol Cell, 2009, 20(21):4541 – 4551.

[15] Spokony RF, Aoki Y, Saint-Germain N, et al. The transcription factor Sox9 is required for cranial neural crest development in Xenopus[J]. Development, 2002, 129(2):421 – 432.

[16] Vidal VP, Chaboissier MC, de Rooij DG, et al. Sox9 induces testis development in XX transgenic mice[J]. Nat Genet, 2001, 28(3):216 – 217.

[17] Bowles J, Schepers G, Koopman P. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators[J]. Dev Biol, 2000, 227(2):239 – 255.

[18] 赵庆华. SOX9 蛋白对人颈椎退变疾病透明软骨细胞作用的实验研究[D]. 第二军医大学. 2007.

[19] Lee JM, Im GI. SOX trio-co-transduced adipose stem cells in fibrin gel to enhance cartilage repair and delay the progression of osteoarthritis in the rat[J]. Biomaterials, 2012, 33(7):2016 – 2024.

[20] Kim KI, Park YS, Im GI. Changes in the epigenetic status of the SOX-9 promoter in human osteoarthritic cartilage[J]. J Bone Miner Res, 2013, 28(5):1050 – 1060.

[21] Lee JS, Im GI. SOX trio decrease in the articular cartilage with the advancement of osteoarthritis[J]. Connect Tissue Res, 2011, 52(6):496 – 502.

[22] Haag J, Gebhard PM, Aigner T. SOX gene expression in human osteoarthritic cartilage[J]. Pathobiology. 2008, 75(3):195 – 199.

(编辑:魏 源)

Effect of Terpinen-4-ol on the proliferation of lung adenocarcinoma A-549 cells in vitro and in vivo

PAN Qian-guang, SHI Yao, YE Xiu-feng, HU Shi-lin, YAN Jia-yin, ZHOU Ye-han, WAN Dan (Department of Pathology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of Terpinen-4-ol on the proliferation of lung adenocarcinoma A-549 cells and its related mechanism. **Methods** A-549 cells were treated with different concentrations of Terpinen-4-ol. The inhibitory effect of Terpinen-4-ol on A-549 cells was tested by MTT method. Cell grow ability was determined by CCK-8 colorimetry. The ultrastructure of A549 cells were observed by transmission electron microscopy before and after Terpinen-4-ol treatment. The changes of cell cycle, apoptosis, and the level of intracellular calcium were inspected by flow cytometry. Inoculated the lung adenocarcinoma A-549 cells on the nude mice to form transplantation tumor. The experimental nude mice with transplantation tumors were divided into three groups: negative control group, high dose positive control group and low dose positive control group. The mice were given continuously intraperitoneal injection for 10 days, and then the transplantation tumors were taken and the size and weight of them were detected. **Results** After Terpinen-4-ol treatment for 24 h, MTT assay showed that the IC_{50} value of A549 cells was 0.067% v/v. The growth curves of positive control groups were significantly smooth than the negative control group. The formation of autophagosome increased after treatment with Terpinen-4-ol. The results of flow cytometry showed that the cell cycle was arrested in S phase, Terpinen-4-ol could induce apoptosis of A549 cell, The intracellular calcium concentrations in positive control groups were significantly higher than the negative control group ($P < 0.05$). Low dose group and high dose group restrained the growth of the transplantation tumor obviously, and the tumor inhibitory rate were 53.33% and 77.76% respectively. **Conclusion** Terpinen-4-ol has inhibitory effect on the proliferation of A-549 cells in vitro and in vivo。

Keywords: terpinen-4-ol; A-549; tumor-bearing mice; calciumion; apoptosis; autophagy

松油烯 4 醇是一种存在于多种植物精油中的单萜类化合物,具有多种生物活性。研究发现含有该种成分的精油具有抗菌、抗炎、除螨、镇咳、抗氧化、抗肿瘤等活性,已经被用于治疗口腔溃疡、牙龈炎、牙根管炎、手足癣以及皮肤感染等疾病,同时也用作护肤品的原料,可减少痤疮引起的红肿等[1-3]。但目前国内外针对松油烯 4 醇单体的研究还鲜有报道,本实验希望通过松油烯 4 醇对肺癌细胞株 A-549 增殖抑制作用及可能的作用机制的研究为肺癌及其他肿瘤化疗提供一个新的选择。

1 材料与方法

1.1 细胞株及实验动物

人细支气管肺泡癌细胞株 A-549 由重庆医科大学病理科惠赠;SPF 级 BALB/c-nu 裸小鼠 21 只购至重庆医科大学实验动物中心,4 ~ 5 周龄,体质量 15 ~ 19 g,雌雄不限,动物饲养合格证号:SCXK[渝]2007-0001。

1.2 主要试剂

标准胎牛血清(HyClone 公司);DMEM 培养基(高糖型,HyClone 公司);0.25% 胰蛋白酶(HyClone 公司);MTT(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司);CCK8(碧云天生物技术研究所);松油烯 4 醇(西亚试剂,纯度大于或等于 98%)。

1.3 细胞培养、动物饲养及药品配制

将 A549 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖完全培养基中,培养基中加入青霉素 100 U/mL 和链霉素 100 Lg/mL。将细胞置于 37 ℃,5% CO_2 孵箱中在饱和湿度下培养,隔日换液 1 次,每 3 天以 1∶2 正常传代培养 1 次,采用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞。裸鼠实验和饲养均在重庆医科大学动物实验中心恒温、恒湿的 SPF 动物房进行,12 h 昼夜节律,裸鼠可以自由进食和饮水。松油烯 4 醇以 11 ul 加入 5.5 mL 培养液中配成 0.2% v/v 的母液使用时按比例稀释成 0.02% ~ 0.1% v/v 工作液。过滤除菌分装后 4 ℃条件下保存备用。

1.4 MTT 法检测细胞增殖抑制及 IC50

将密度为 1×10^4/mL 的 A549 细胞接种于 96 孔板中过夜,每孔 100 μl,加入含不同浓度油烯 4 醇(0、0.02% 、0.04% 、0.06% 、0.08% 、0.1% v/v)的培养液(200 μl/孔)培养 24 h 后,每孔加入 20 μl 的 MTT(5 mg/mL 用 PBS 配制,pH 7.5)。继续培养 4 h 后,吸出废液,每孔加入 150 μl DMSO,于 60 r/min 的摇床中振荡 10 min。在 490 nm 波长处用酶联免疫检测仪测定各孔的光吸收值。计算抑制率:抑制率 = [1 - 处理组 D(490)值/对照组 D(490)值] × 100% ,再计算半数抑制浓度(IC50)。

1.5 实验分组

根据 MTT 实验结果将 A-549 细胞分为对照组和实验组,对照组用正常培养基培养细胞,实验组分为 0.04% 、0.06% 、0.08%(v/v)组分别以含有相应浓度的松油烯 4 醇的培养基培养。将 21 只裸鼠按随机数目表随机分为实验组(0% v/v)、低剂量组(0.06% v/v)、高剂量组(0.08% v/v)。

1.6 CCK-8 比色分析法绘制生长曲线

取对数生长 A-549 细胞按(每孔 1×10^3)接种于五块 96 孔板中,37 ℃,5% CO_2 培养隔夜贴壁后,加入含松油烯 4 醇(0、0.02% 、0.04% 、0.06% 、0.08% 、0.10% v/v)的培养液(每孔 200 μl),边缘孔以 PBS 填充,同时设置空白孔(培养基 CCK-8,无细胞),每组设 5 复孔,每隔 24 h 取出一块每孔加入 10 μLCCK-8 溶液,4 h 后测定 450 nm 各孔的吸光度值,连测 5 d。以时间为横轴,每天的吸光度值为纵轴绘制生长曲线。实验重复 3 次。

1.7 透射电镜观察细胞超微结构改变

细胞培养 24 h 后用胰酶消化 PBS 洗涤 1 次后,将细胞悬液转移到 EP 管中以 1 200 r/min 离心 10 min。吸弃上清液,沿管壁缓慢加入预先配制好的固定液,4 ℃保存过夜后送电镜室,用 HITACHI-7500 透射电镜观察各组细胞的超微结构变化。

1.8 细胞周期及凋亡检测

取对数生长期 A-549 细胞按 5×10^5 个/孔的浓度接种于六孔板中。培养箱内培养过夜贴壁后弃上清,加入无血清 DMEM 高糖培养液,饥饿同步 18 h,使细胞停滞于 G0 期。按分组方法分组培养 24 h 后,收集上清液细胞;0.25% 胰酶-EDTA 消化,1 000 r/min离心 10 min,收集贴壁细胞,PBS 洗涤 2 次,1 000 r/m离心 10 min。在检测细胞凋亡的试管中先后加入 1 × Buffer 100 mL,AV 染液 5 μL,PI 染液 1 μL,避光 15 min,再加入 1 × Buffer 400 μL,上机检测;检测周期细胞加入 70% 冷乙醇在 4 ℃固定 12 h 后在试管中加入 1 mL 的 DNA 染色剂,避光 30 min,上机检测。用随机软件进行数据分析,每组重复 3 次。

1.9 细胞内钙离子浓度测定

对数生长期的 A-549 细胞按分组方法分组培养 24 h,1 000 r/min,离心 5 min。洗涤后,在结合缓冲液中,加入终浓度为 5 μmol · L^{-1} 的 Flou-3/AM,,置 CO_2 培养箱中孵育 1 h 后反复洗涤后用流式细胞仪检测各组荧光强度,激发波长 488 nm。每组重复 3 次。

1.10 BALB/C(nu/nu)裸小鼠体内移植瘤建立

将肺癌 A-549 细胞按常规方法培养,消化离心收集后,台盼蓝染色活细胞计数大于 99%,计数并调整细胞浓度为 5×10^6 个/mL。用带 6 号针头注射器抽取癌细胞悬液接种于裸鼠右前腋部皮下,每个部位接种 0.2 mL(含活细胞数 1×10^6 个),接种后每天观察有无肿瘤形成及注射点有无破溃红肿,经过 3 ~ 7 d 潜伏期,可见接种部位皮下出现瘤结节,并逐渐长大,呈圆形或椭圆形突出于体表,以肿瘤直径 0.5 cm 为成瘤。

1.11 治疗后抑瘤率的测定

按分组方法将 21 只裸小鼠按随机数目表随机分为对照组、低剂量组、高剂量组,以相应药物浓度进行腹腔注射给药,每只每天 0.1 mL,治疗 10 d 后脱颈处死,分离瘤组织测量其长短径和重量,移植瘤的体积按公式:$V(mm^3)=\pi ab^2/6$ 计算。根据治疗结束后移植瘤瘤质量及体积计算各组平均瘤质量及平均瘤体积。通过各组平均瘤质量计算抑瘤率(inhibition ratio, IR)。IR = (对照组平均瘤质量 - 治疗组平均瘤质量)/对照组平均瘤质量 ×100%。

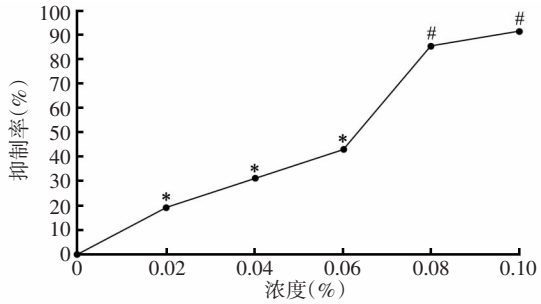
1.12 统计学处理

数据以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,使用 SPSS 17.0 统计软件做数据处理,多组数据间比较采用单因素方差分析,两两比较用 LSD-t 检验。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 松油烯 4 醇对 A-549 细胞增殖抑制影响及 IC50

不同浓度的松油烯 4 醇作用 A-549 细胞株 24 h 后,从松油烯 4 醇浓度 0.02% v/v 开始对细胞株的生长均有抑制作用,与对照组相比,差异均有统计学意义($P<0.05$),并呈浓度依赖性(图 1)。运用 SPSS 17.0 分析计算 A-549 细胞株 24 h 的 IC50 为 0.067% v/v。

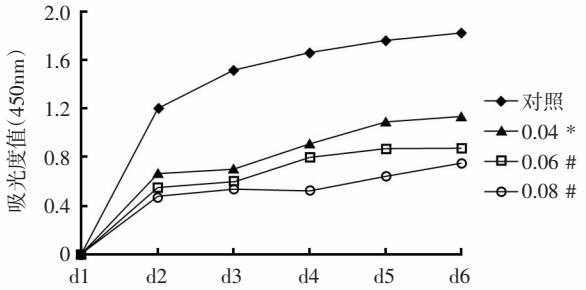


*:与对照组比较,$P<0.05$;#:与对照组比较,$P<0.01$

图 1 松油烯 4 醇作用 24 h 后对 A-549 增殖抑制的影响

2.2 不同浓度松油烯 4 醇对 A-549 细胞生长曲线的影响

根据 5 d 的 CCK8 结果来绘制生长曲线,结果显示给药组生长曲线明显较对照组平缓,表明松油烯 4 醇对 A-549 细胞的抑制作用呈时间、剂量依赖性(图 2)。

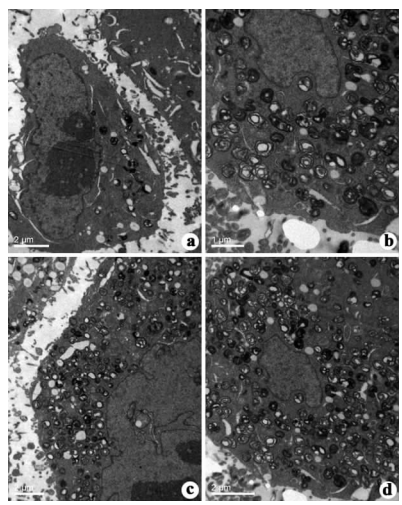


*:与对照组比较,$P<0.05$;#:与对照组比较,$P<0.01$

图 2 不同浓度松油烯 4 醇作用下的生长曲线

2.3 松油烯 4 醇对 A549 细胞超微结构的影响

透射电镜观察显示:未用松油烯 4 醇处理的细胞可见到少量自噬空泡(图 3a),松油烯 4 醇处理 24 h 后的细胞内可见大量自噬空泡、扩张的内质网等(图 3b、c、d)。



a:空白对照组;b:0.04 组;c:0.06 组;d:0.08 组

图 3 不同浓度松油烯 4 醇作用与 A549 细胞后透射电镜观察细胞超微结构改变情况

2.4 A-549 细胞周期分布、凋亡、细胞内 Ca^{2+} 浓度、细胞膜电位水平测定

2.4.1 A-549 细胞周期分布测定 实验结果显示不同浓度松油烯 4 醇处理细胞 24 h 后，药物组与对照组比较，松油烯 4 醇能降低 A-549 细胞的 G1 期细胞的比例，升高 G2 期和 S 期细胞比例，呈现 G2 期和 S 期阻滞作用，并呈剂量依赖性，差异具有统计学意义（$P<0.05$），见表 1、图 4。

2.4.2 肺癌 A-549 细胞凋亡检测 与空白对照组相比，经药物处理 24 h 后的细胞凋亡的比例均有明显升高，且晚期凋亡的比例呈现一定的剂量－效应关系，见表 2、图 5。

2.4.3 A-549 细胞内钙离子浓度测定 不同药物浓度作用 24 h 后，各药物干预组细胞内 Ca^{2+} 荧光强度均明显高于正常对照组，且随着药物浓度的增加而增加，差异有统计学意义（$P<0.05$），见表 2、图 6。

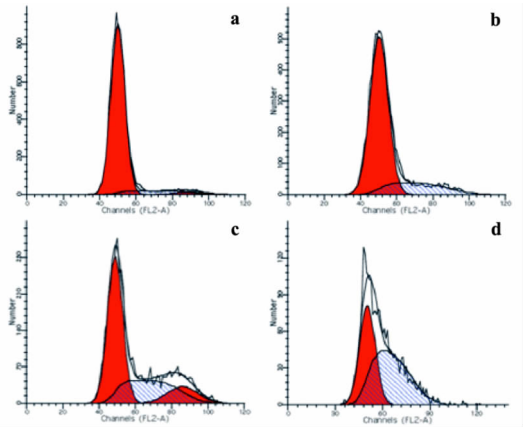
2.5 松油烯 4 醇对肺癌裸鼠移植瘤生长的影响

治疗结束时对照组移植瘤体积及平均瘤质量，见表 3、图 7。各组移植瘤平均体积和平均质量相互比较差异均有统计学意义（$P<0.05$）。计算高、低剂量的松油烯 4 醇对肺癌裸鼠移植瘤生长抑制率分别为 53.33% 和 77.46%。

表 1 松油烯 4 醇对 A-549 细胞周期的影响（$\bar{x}\pm s, n=3$）

组别	G1	G2	S
对照组	86.17 ± 5.05	3.24 ± 2.23	10.49 ± 2.97
0.04 组	79.66 ± 1.766 *	0.57 ± 0.81	18.94 ± 1.10 *
0.06 组	61.09 ± 4.29 #	10.06 ± 6.66	28.85 ± 5.61 #
0.08 组	42.56 ± 1.58 #	1.32 ± 1.46	55.98 ± 0.31 #

*：与对照组比较，$P<0.05$；#：与对照组比较，$P<0.01$



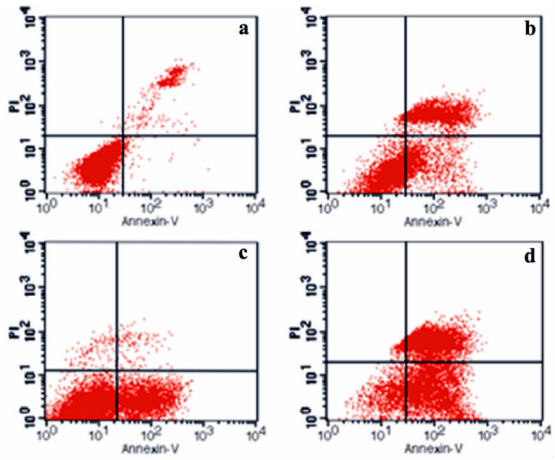
a：空白对照组；b：0.04 组；c：0.06 组；d：0.08 组

图 4 流式细胞仪分析松油烯 4 醇处理后 A-549 细胞周期变化

表 2 不同浓度松油烯 4 醇对 A-549 细胞凋亡和细胞内 Ca^{2+} 浓度的影响（$\bar{x}\pm s, n=3$）

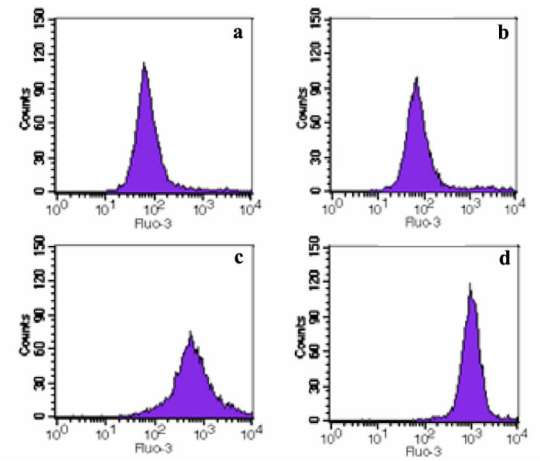
分组	总凋亡率（%）	Ca^{2+} 荧光强度
对照组	1.18 ± 0.16	100.30 ± 12.75
0.04 组	8.43 ± 0.51 *	129.7 ± 0.96 △
0.06 组	33.75 ± 0.65 *	781.78 ± 9.24 #
0.08 组	44.32 ± 2.35 *	1014.2 ± 83.47 #

*：与对照组比较，$P<0.05$；#：与对照组比较，$P<0.01$；△：与对照组比较，$P>0.05$



a：对照组；b：0.04% 组；c：0.06% 组；d：0.08% 组

图 5 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞仪分析松油烯 4 醇处理 A-549 细胞后细胞凋亡情况



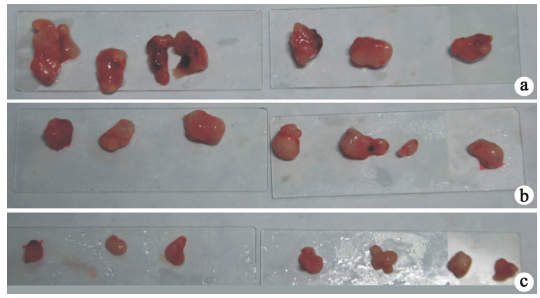
a：对照组；b：0.04 组；c：0.06 组；d：0.08 组

图 6 不同药物浓度作用于 A-549 细胞后细胞内 Ca^{2+} 浓度改变情况

表 3 各组裸鼠移植瘤体积、瘤质量及抑制率（$\bar{x}\pm s, n=7$）

组别	瘤体积（V/mm^3）	瘤重量（m/mg）	抑制率（%）
对照组	390.06 ± 32.85	537.00 ± 98.52	- -
低剂量组	213.67 ± 23.45 *	250.67 ± 14.77 *	53.33
高剂量组	83.40 ± 29.23 #	121.00 ± 40.51 #	77.46

*：与对照组比较，$P<0.05$；#：与对照组比较，$P<0.01$



a：对照组；b：低剂量组；c：高剂量组

图 7 裸鼠皮下移植瘤大小

3 讨论

肺癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,随着我国人口老龄化的加剧,经济快速发展带来的环境污染以及吸烟率居高不下等原因,肺癌已成为我国城市人口恶性肿瘤死亡原因的第一位[4-5]。化疗目前是肺癌特别是中晚期肺癌最有效的治疗方法之一。然而传统的肺癌化疗药物常因严重损害人体正常组织细胞而使临床应用受到限制[6-7]。人们期望一种既能抗肿瘤,又不过多损害机体正常组织的新化疗药物的出现。

本实验用人非小细胞肺癌细胞株 A-549 以及 BALB/C 裸小鼠移植瘤研究了松油烯 4 醇对人肺癌的体外及体内作用及其机制。MTT、CCK8 以及体内抗移植瘤实验显示与对照组相比,松油烯 4 醇在 0.02% ~ 0.1% v/v 浓度范围内对 A-549 细胞均有明显抑制作用,且呈剂量依赖和时间依赖性的关系。

细胞增殖即是细胞周期循环的过程,因此细胞增殖的抑制既是细胞周期循环停滞的结果。肿瘤细胞的增殖动力学特点表现为细胞群体分布主要与 DNA 合成活跃的 S 期有关,细胞一旦进入此期,如无特殊干扰,便能按细胞周期的顺序发展下去,直至重新回到 G1 期。本研究通过流式细胞仪分析细胞周期表明,不同浓度松油烯 4 醇处理细胞 24 h 后,药物组与对照组比较剂量依赖性的降低 G1 期细胞的比例,升高 S 期细胞比例,使细胞呈现 S 期阻滞。

肿瘤的发生不仅与细胞的异常增殖和分化有关,也与细胞程序性死亡功能紊乱有关。细胞程序性死亡是指机体在生长、发育以及受到外来刺激时清除多余、衰老或受损伤的细胞以保持机体内环境平衡和维持正常生理活动过程的一种自我调节机制。正常生命个体每天有数以亿计的细胞诞生,同时又有数以亿计的细胞程序性死亡,两者处于一种动态平衡,一旦失衡就可能导致肿瘤的发生。细胞凋亡和自噬被称为Ⅰ型和Ⅱ程序性细胞死亡,目前使用的大多数化疗药物就是通过诱导细胞凋亡和自噬而达到杀灭肿瘤细胞作用的[8-11]。本实验研究发现松油烯 4 醇具有诱导 A549 细胞凋亡和自噬增强的作用。

很多文献指出,凋亡以及自噬过程与线粒体有着非常密切的关系,而线粒体是细胞内的钙库,调节着细胞内 Ca^{2+} 的平衡[12-14]。故本实验用流式细胞技术检测了药物处理后细胞内 Ca^{2+} 浓度改变情况,发现给药组 Ca^{2+} 浓度升高并呈剂量依赖性 ,说明在细胞程序性死亡过程中,Ca^{2+} 可能也参与其中,并发挥了一定的作用,但有关它们之间具体的联系还有待进一步的研究。

总之,本实验证实松油烯 4 醇具有抑制人肺癌 A-549细胞增殖的作用,并呈一定的剂量依赖性和时间依赖性,其可以阻止 A-549 细胞周期,并诱导细胞发生凋亡和自噬,诱导凋亡和自噬的途径可能与细胞内 Ca^{2+} 超载相关。至于松油烯 4 醇抑制 A-549 细胞增殖阻滞细胞周期以及诱导凋亡和自噬的确切机制仍需后期研究进一步证实。

[参考文献]

[1] Tighe S, Gao YY, Tseng SC. Terpinen-4-ol is the Most Active Ingredient of Tea Tree Oil to Kill Mites[J]. Transl Vis Sci Technol, 2013, 2(7): 2-8.

[2] Furneri PM, Paolino D, Saija A, et al. In vitro antimycoplasmal activity of Melaleuca alternifolia essential oil[J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 58(3): 706-707.

[3] Cox SD, Mann CM, Markham JL, et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of Melaleuca altenifolia (tea tree oil)[J]. J Appl Microbiol, 2000, 88(1): 170-175.

[4] 吴鹏昌, 张 伟. 茶树油的研究进展[J]. 综述报告, 2009, 18(3): 61-62

[5] 陈仁杰, 张金良, 阚海东. 中国大气污染与肺癌关系的流行病学研究回顾[J]. 卫生研究, 2011, 40(2): 243-245.

[6] 陈万青, 张思维, 邹小农. 中国肺癌发病死亡的估计和流行趋势研究[J]. 中国肺癌杂志, 2010, 13(5): 488-493.

[7] Lúcio KA, Rocha Gda G, Monção-Ribeiro LC, , et al. Oleanolic acid initiates apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines and reduces metastasis of a B16F10 melanoma model in vivo[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e28596.

[8] Fu ZY, Han JX, Huang HY. Effects of emodin on gene expression profile in small cell lung cancer NCI-H446 cells[J]. Chin Med J (Engl), 2007, 120(19): 1710-1715.

[9] Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(12): 961-967.

[10] Li J, Hou N, Faried A, et al. Inhibition of autophagy augments 5-fluorouracil chemotherapy in human colon cancer in vitro and in vivo model[J]. Eur J Cancer, 2010, 46(10): 1900-1909.

[11] Lockwood TD, Minassin IA. Protein turnover and proliferation. Failure of SV-3T3 cells to increase lysosomal proteinases, increase protein degradation and cease net protein accumulation[J]. Biochem J, 1982, 206(2): 251-258.

[12] Cao Y, Klionsky DJ. Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein[J]. Cell Res, 2007, 17(10): 839-849.

[13] Guo WJ, Ye SS, Cao N, et al. ROS-mediated autophagy was involved in cancer cell death induced by novel copper(II) complex[J]. Exp Toxicol Pathol, 2010, 62(5): 577-582.

[14] Rodriguez-Enriques S, He L, Lemasters JJ. Role of mitochondrial permeability transition pores in mitochondrial autophagy[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36(12): 2463-2472.

(编辑:左艳芳)