

# 龙脑液导致癌细胞凋亡的实验研究

李菲菲<sup>1,2</sup> 方 静<sup>1</sup> 马 琼<sup>1</sup> 付 辉<sup>1</sup> 毛建平<sup>1\*</sup>

(1 军事医学科学院放射与辐射医学研究所 北京 100850 2 吉林大学药学院 长春 130021)

**摘要** 目的:在细胞培养下检验加入龙脑液诱导癌细胞凋亡的作用。方法:采用人鼻咽癌、肺鳞癌、肺腺癌、乳腺癌细胞和正常细胞株,保持细胞正常培养基浓度下,用不同浓度稀释的龙脑液培养细胞,培养不同时间用四唑盐(MTT)比色试验观察龙脑液对癌细胞增殖的影响,采用细胞涂片染色观察细胞死亡性质,在流式细胞仪分析其凋亡率和性质。结果:二倍稀释浓度的龙脑液能快速导致癌细胞凋亡,四倍稀释浓度的龙脑液培养,均有细胞凋亡发生,凋亡程度从高到底依次为肺鳞癌、肺上皮癌和鼻咽癌,正常细胞293T则只有基础水平的凋亡发生;在撤出龙脑液回到正常培养环境下正常细胞能较快恢复到正常生长状态,而癌细胞则在一定时间内继续发生凋亡。在形态学上出现胞膜起泡或出芽,染色质凝聚分裂、细胞质减少,细胞碎片化等。早期细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻明显导致细胞凋亡,也通过Caspases3凋亡通路变化而引起癌细胞凋亡。结论:龙脑对癌细胞有促凋亡作用。

**关键词** 龙脑液 乳腺癌 肺鳞癌 肺腺癌 鼻咽癌 凋亡

**中图分类号** Q813

龙脑是天然冰片,从龙脑樟枝叶提取,稀有名贵,作为药用有千年历史。我国一直依赖进口,上世纪90年代末开始国内自产少量。因稀有昂贵因而大部分药品中均使用人工合成冰片。天然冰片性能好、毒性小,比化学合成冰片更具优越性,近年来引起了医药领域的关注。

龙脑是世界上最早应用的天然有机成分药物之一。中医认为其味辛、苦,微寒,归心脾肺经,具有开窍醒神、清热止痛<sup>[1]</sup>、散郁火、去翳明目等功效,龙脑对中枢神经有较强的双向调节作用,既能镇静安神又有醒脑作用<sup>[2-4]</sup>。可以改善缺血脑组织的血氧供应,对脑缺血有保护作用。能减少血管内皮细胞粘附因子ICAM-1的表达,对内皮细胞和血管有保护作用<sup>[5]</sup>,具有抗菌作用<sup>[6]</sup>。同时,龙脑能促进其它药物的透皮吸收<sup>[7]</sup>。龙脑常用于皮肤外用,可镇痛、止痒、消肿、化瘀、生肌。在痔疮膏等皮肤药膏中使用,能消除病变组织,因此可能有导致病变细胞凋亡的作用。早期有报道表明冰片具有抗炎及止痛作用<sup>[8]</sup>,我们课题组实验发现龙脑对

大鼠皮肤烫伤创面愈合具有促进作用,对紫外线所致大鼠角膜损伤具有促愈合作用<sup>[9]</sup>,证明龙脑导致损伤细胞快速凋亡以缩短了组织更新和重建过程,减少了炎症反应,促进愈合恢复。

龙脑挥发性强常用于呼吸吸入,因此本实验体外考察龙脑对呼吸道癌症细胞的促凋亡作用,实验采用鼻咽癌、肺癌和乳腺癌等细胞株,通过细胞学实验考察其凋亡发生及其原理,为龙脑相关应用提供进一步的科学依据。

## 1 材料与试剂

### 1.1 主要材料

DMEM 培养基、1640 培养基、胎牛血清(FBS)、Trypsin、EDTA 均购自 Gibco 公司。MTT 为 Amersco 分装产品。二甲基亚砜(DMSO)购自 Sigma 公司。Annexin V-FITC 凋亡试剂盒购自宝赛生物公司。Caspase3/7 检测试剂盒购自 Promega 公司。其它实验相关试剂及材料由本院条件处提供。

龙脑液购自湖南省新晃县龙脑开发有限责任公司,为蒸馏冷却水溶液。经中国药品生物制品标准化

收稿日期:2013-01-30 修回日期:2013-03-01

\* 通讯作者,电子信箱:maojp@nic.bmi.ac.cn

研究中心检测,含有两种主要成分为龙脑 64.4% (CAS 号 507-70-0, 分子式  $C_{10}H_{18}O$ , 分子量为 154.25) 和樟脑 28.03% (CAS 号 76-22-2, 分子式  $C_{10}H_{16}O$ , 分子量为 152.23)。实验采用产品标号为 Q/VUCK001-2008。

## 1.2 细胞

人鼻咽癌细胞株 CNE-2Z、人肺鳞癌细胞株 NCI-H1703、人胚肾 T 细胞株 293T、人肺上皮癌细胞株 A549、人乳腺癌细胞株 MCF-7 均购自中国医学科学院细胞库。

## 2 实验方法

### 2.1 细胞培养

MCF-7、293T 细胞均在含 10% FBS 的 DMEM 培养基中培养; CNE-2Z、NCI-H1703、A549 细胞均在常规条件下含 10% FBS 的 1640 培养基中培养。细胞均为贴壁细胞,用 0.05% 胰酶进行消化以应用或传代。

含龙脑液的培养基配制,需要配置  $2 \times$  DMEM 和  $2 \times$  1640 基础培养基,并过滤除菌,龙脑精华液过滤除菌。含不同浓度龙脑液的完全培养基配法如下,即 8 倍龙脑液培养基采用  $2 \times$  培养基加龙脑精华液加无菌水分别为 4:1:3 体积,4 倍龙脑液培养基采用  $2 \times$  培养基加龙脑精华液加无菌水分别为 2:1:1 体积,2 倍龙脑液培养基采用  $2 \times$  培养基加龙脑精华液分别为 1:1 体积。

### 2.2 May-Grünwald 染色法细胞形态学观察凋亡

先选取 293T、A549 细胞,将细胞接种于 10cm 培养皿中培养 24h (细胞数大概至 80% 融合),分成对照组和实验组,换液时对照组用完全培养基培养,实验组用含不同浓度龙脑精华液 (龙脑精华液终浓度分别为 2 倍、4 倍和 8 倍稀释) 的完全培养基。两组培养 18h 后,同时更换为含 10% FBS 的培养基继续进行培养,分别在此后 0h、6h 收集细胞、涂片。涂片后在空气中干燥,甲醇固定 3min,加入 May-Grünwald 染色液 10min,然后在 Giemsa 稀释液中染色 20min。用 M/15 磷酸盐缓冲剂速洗,晾干,中性树胶封固。

### 2.3 MTT 法检测龙脑精华液对细胞增殖能力的影响

各采用  $1 \times 10^5$  个/ml 细胞,将 293T、MCF-7、CNE-2Z、A549、NCI-H1703 五种细胞分别接种于 96 孔板,培养 24h (细胞数大概至 80% 融合),分成对照组和实验组,每组采用 5 孔。换液时对照组用完全培养基培养,实验组用含不同浓度龙脑精华液的完全培养基培养 (据 1.3.1 龙脑精华液终浓度)。龙脑精华液终浓度分别为 2 倍稀释和 4 倍稀释,在含龙脑液的环境下培养

18h,恢复常规培养条件下分别在此后 0h、6h、24h 时间点检测细胞增殖能力,分析其抑制率。检测时,各孔加入 MTT 溶液 (5mg/ml)  $20 \mu\text{l}$  37℃ 继续孵育 4h,此后加入  $100 \mu\text{l}$  DMSO,室温震荡 10min 溶解结晶。用酶联免疫测定仪于 490nm 处测定各孔吸光度值 ( $A_{490}$ ),记录结果,以作用时间为横坐标、吸光度值为纵坐标绘图。

抑制率 =  $1 - \text{加药组 OD 值} / \text{对照组 OD 值}$

### 2.4 龙脑精华液对细胞凋亡性质分析

采用 AnnexinV-FITC/PI 法, BD FACSCalibur 流式细胞仪分析。各采用  $1 \times 10^6$  个/孔细胞,将 293T、MCF-7、CNE-2Z、A549、NCI-H1703 五种细胞分别接种于 6 孔板,培养 24h (细胞数大概至 80% 融合)。分成对照组及实验组,换液对照组用完全培养基 (分为 12h 组和 18h 组,共 2 组),实验组用龙脑精华液 2 倍稀释和 4 倍稀释的龙脑精华液的完全培养基培养 (两种浓度处理两个组各设培养时间 12h 和 18h 两组,共 4 组),6 个组每组设 3 个样本孔。

收集上清液和细胞用  $1 \times$  PBS 清洗两次 ( $1000 \text{r/min}$  5min 离心),将细胞重悬于  $200 \mu\text{l}$  的 Binding Buffer 中,将细胞转移于流式管中。加入  $10 \mu\text{l}$  AnnexinV-FITC 轻轻混合后,室温,避光,反应 15min。加入  $300 \mu\text{l}$  Binding Buffer 以及  $5 \mu\text{l}$  PI 混匀。1h 内上流式细胞仪检测。

Caspase3 活性分析,采用流式细胞仪分析。MCF-7 等细胞按  $1 \times 10^5$  个/ml 细胞密度分别接种于 96 孔板,培养 24h (细胞数大概至 80% 融合),分成对照组和实验组,对照组为无龙脑的正常培养条件。换液时对照组用完全培养基培养 (每孔  $100 \mu\text{l}$ ),实验组用 2 倍稀释和 4 倍稀释的龙脑精华液完全培养基培养 (每孔  $100 \mu\text{l}$ ),每组设 5 孔,各组孵育时间又设有 12h 和 18h 组。孵育结束后各孔加入  $100 \mu\text{l}$  预先混合好的 Caspase3/7 试剂,室温避光震荡 3h,对应孔号将细胞转移到 96 孔白板上,用酶标仪进行发光强度检测。

### 2.5 数据分析

采用 SPSS13.0 软件对数据进行统计学处理分析,以 ( $\bar{X} \pm S$  形式表示,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义)。

## 3 结果

### 3.1 形态学观察

采用 May-Grünwald 染色法对细胞形态学进行观察,发现在细胞培养条件中加入 2 倍稀释 (即二分之一浓度) 龙脑液能快速导致癌细胞凋亡,多次试验均发现 4 倍稀释即四分之一浓度的龙脑液就能导致癌细胞凋

亡(如图1所示),而8倍稀释组不明显。因此在后续实验中重点观察了龙脑在2倍和4倍稀释条件下的细胞凋亡情况。细胞出现胞膜起泡或出芽,染色质凝聚分裂、细胞质减少,细胞碎片化等。如图1。

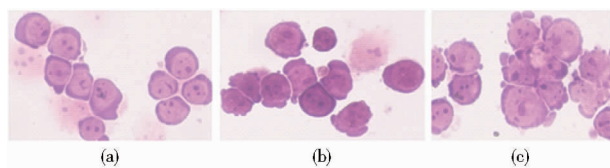


图1 正常和龙脑液处理的 A549 细胞形态(400倍光镜)

Fig.1 The A549 morphology in normal and borneol mediums

a: Concentration of borneol liquid was 0% b:Concentration of borneol liquid was 25% c:Concentration of borneol liquid was 50%

3.2 MTT 法检测龙脑精华液对细胞增殖能力的影响  
含 1/4 和 1/2 浓度龙脑精华液的完全培养基培养 18h 均表现为生长抑制情形(如图2),三种呼吸道癌细

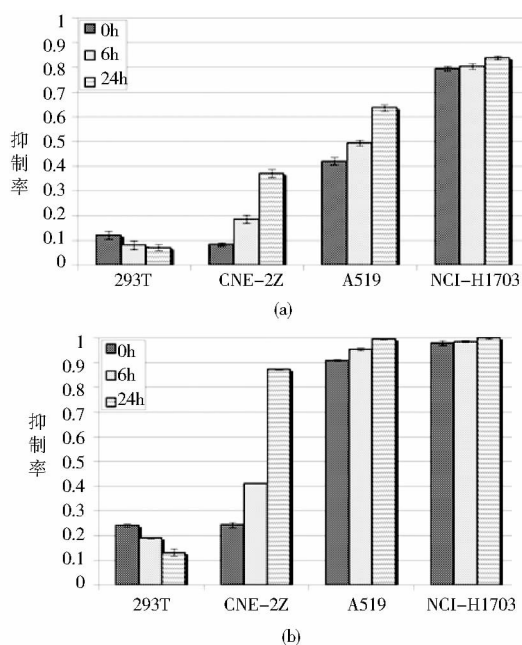


图2 不同浓度龙脑液的培养条件对细胞增殖的抑制率

Fig.2 The inhibition rate on cell proliferation of different concentrations of borneol medium

a:Concentration of borneol liquid was 25%

b:Concentration of borneol liquid was 50%

胞在撤出龙脑恢复到正常培养基6h和24h条件下发生进行性抑制或死亡,而正常293T细胞在撤出龙脑恢复到正常培养基6h和24h条件下则快速恢复到增殖,抑

制减除;1/2浓度龙脑精华液的完全培养基的生长抑制强于含1/4浓度龙脑精华液的完全培养条件;生长抑制由强到弱顺序为:人肺鳞癌细胞 NCI-H1703 大于人肺癌细胞 A549、人鼻咽癌细胞 CNE-2Z,正常细胞 293T 受到较弱抑制。

### 3.3 AnnexinV-FITC/PI 法分析龙脑精华液对细胞凋亡性质

293T、MCF-7、CNE-2Z、A549、NCI-H1703 五种细胞,每孔  $2 \times 10^6$  个。实验发现含 1/4 浓度龙脑精华液的完全培养基培养下肺癌细胞发生凋亡,图3。

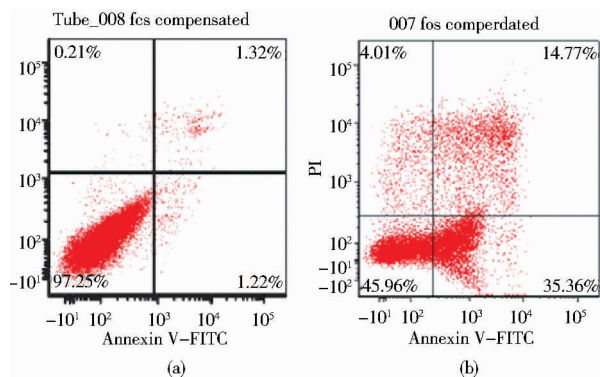


图3 Annexin V 分析肺癌 A549 细胞在含 1/4 和 1/2 浓度龙脑液的培养条件的早期凋亡

Fig.3 The early stage apoptosis of A549 cells in 1/4 and 1/2 borneol medium by Annexin V

a:Concentration of borneol liquid was 25%

b:Concentration of borneol liquid was 50%

因此,在添加四分之一浓度的龙脑液常规培养液中 12h 和 18h 分析了细胞凋亡,结果如图4和表1。

图4 五种细胞的流式细胞分析结果中,采用了每个图右上部分和图右下部分的数据,两者分别为膜翻转且能被 PI 染色的晚期凋亡细胞及早期凋亡发生膜翻转的细胞。左上部分为仅能被 PI 染色的死亡细胞未列入统计。总体上,细胞凋亡程度从高到底依次为肺鳞癌 NCI-H1703 细胞、肺上皮癌 A549,鼻咽癌 CNE-2Z 相比之下要低些,正常细胞 293T 则只有低水平的凋亡发生;乳腺癌细胞 MCF-7 也对龙脑较为敏感容易发生凋亡。

表1 总结了每种细胞的晚期凋亡及早期凋亡数据。肺癌 A549 细胞和鼻咽癌 CNE-2Z 细胞表现出在 12h 凋亡较少随时间延长到 18h 凋亡相对较高;而肺鳞癌 NCI-H1703 细胞和乳腺癌 MCF-7 细胞则在 12h 比 18h 凋亡更为快速。和 293T 细胞相比, A549、NCI-

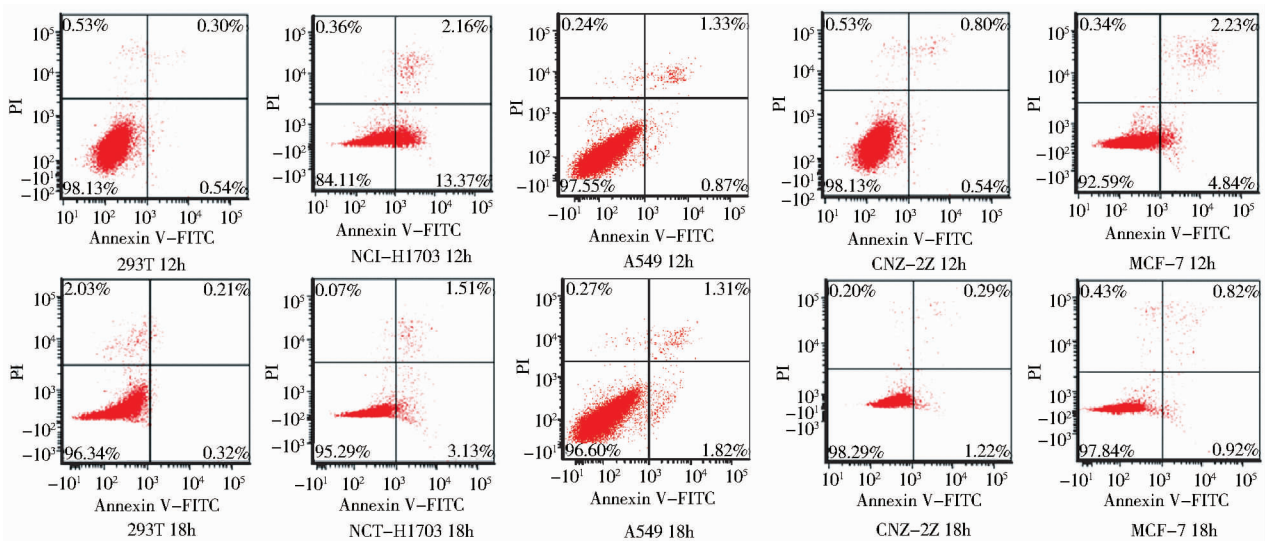


图4 含1/4浓度龙脑液的培养条件对5种细胞培养不同时间的凋亡 Annexin V 分析  
Fig.4 Annexin V labeled apoptosis cells in medium containing 1/4 borneol

表1 含1/4浓度龙脑液的培养条件下的5种细胞凋亡  
Table 1 he apoptosis of five cells in dedium contained 25% borneol ( % ,  $\bar{X} \pm S$  , n=3)

分组	早期凋亡(%)	晚期凋亡(%)	总凋亡(%)
293T 12h	0.62 ± 0.14	0.38 ± 0.07	0.99 ± 0.20
293T 18h	0.33 ± 0.13	0.28 ± 0.06	0.77 ± 0.43
A549 12h	0.90 ± 0.30	1.32 ± 0.01 **	2.22 ± 0.30 **
A549 18h	1.81 ± 0.01 **	1.3 ± 0.12 **	2.77 ± 0.70 *
CNE-2Z 12h	0.48 ± 0.10	1.03 ± 0.41 *	1.51 ± 0.32
CNE-2Z 18h	1.28 ± 0.27 *	0.36 ± 0.07	1.65 ± 0.33 *
NCI-H1703 12h	11.62 ± 5.94 **	2.29 ± 0.82 **	13.91 ± 5.14 **
NCI-H1703 18h	4.61 ± 4.04 **	0.94 ± 0.06 **	5.56 ± 4.06 **
MCF-7 12h	2.48 ± 2.07 **	2.08 ± 0.32 **	4.56 ± 2.26 **
MCF-7 18h	0.87 ± 0.05 **	0.79 ± 0.06 **	1.66 ± 0.11 **

Compared with 293T cell, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

H1703 和 MCF-7 细胞在早期晚期和总体凋亡方面均比对照组有显著意义(表1)。进一步看出肺鳞癌细胞、肺上皮癌 A549 容易被龙脑诱导发生凋亡,乳腺癌细胞 MCF-7 也容易被龙脑诱导凋亡。

实验中,未加入龙脑的正常条件培养下细胞也发生一定的凋亡,采用 293T 和 A549 细胞的总体分析表明,培养细胞在 12h 和 18h 平均为早期凋亡  $0.64 \pm 0.14$ ,晚期凋亡为  $0.85 \pm 0.65$ 。表1中显示 293T 细胞的凋亡和正常条件下细胞平均凋亡无显著差异。龙脑液对 293T 细胞造成的凋亡不明显。

3.4 Caspase3 活性分析龙脑精华液对细胞凋亡性质

为了进一步看龙脑对癌细胞的凋亡性质,又做了 Caspase3 的检测。Caspase3 属于半胱氨酸蛋白酶家族,

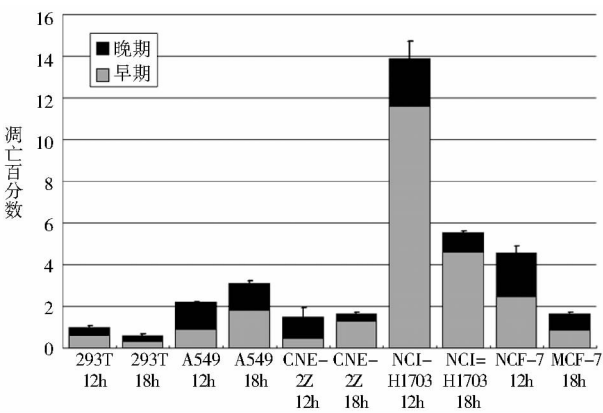


图5 含1/4浓度龙脑液的培养条件下5种细胞凋亡百分数

Fig.5 The percentage of the apoptosis of five cells in medium contained 25% borneol liquid

其在哺乳动物细胞凋亡中扮演着重要的角色。当外界凋亡信号作用于 Caspase 前体时,前体可活化蛋白酶激活因子,激活因子可以活化蛋白酶效应等,可以通过 Caspase 的激活来检测细胞的凋亡情况。综合上述实验可见 MCF-7 细胞凋亡发生较为迅速。因此对其进行了 caspase3 的活性分析,结果如图6。

从图可见,1/4 浓度龙脑诱导凋亡中,在较晚时期发生 Caspase3 激活,而 1/2 浓度龙脑诱导凋亡在 12h 和 18h 对 Caspase3 激活基本相同。高浓度龙脑在 12h 即可引发 Caspase3 较快激活诱导凋亡。表现出了浓度依赖性。

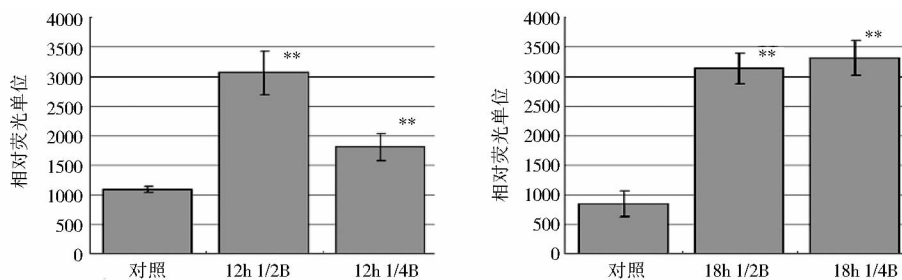


图6 1/4 浓度龙脑液培养下调亡 MCF-7 细胞的 caspase3 活性检测

Fig.6 Caspase3 analysis in the apoptosis MCF-7 cells cultured in 25% borneol

Compared with the control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

## 4 讨论

龙脑为挥发性物质,作为药物常用于皮肤给药渗透吸收,日常也常用于呼吸吸入醒神通窍用,因此实验采用鼻咽癌、肺癌等细胞株考察其对呼吸道癌细胞的作用。呼吸吸入常采用挥发性精油,参考北京大学中医药研究中心对同批次龙脑精油的分析,精油含有主要成分为龙脑占 28.6%、樟脑占 15.5%,其余次要成分均 5% 以下,因此实验采用水溶性龙脑液,含龙脑 64.4% 次要成分樟脑 28.03%,主要考查龙脑水溶液在细胞培养环境下对呼吸道癌细胞的作用。实验表明龙脑液 2 倍稀释造成凋亡显著,4 倍稀释液培养中各种细胞的凋亡表现出差异,人肺鳞癌细胞株 NCI-H1703、人乳腺癌细胞株 MCF-7 和肺上皮癌细胞株 A549 较易凋亡,人鼻咽癌细胞株 CNE-2Z 凋亡较低,正常细胞 293T 凋亡较少且不显著。

形态学上看,龙脑液引起细胞凋亡在后期可见细胞质减少、核碎片化。AnnexinV-FITC/PI 法分析显示龙脑在早期引起细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻是其凋亡早期原因,可能涉及龙脑对癌细胞膜的相互作用,癌细胞膜与正常细胞膜结构差异如聚束蛋白表达增高等可能是原因之一。龙脑也能通过激活 caspase3 的活性引起细胞凋亡,且其激活程度表现为龙脑浓度依赖性。

细胞的死亡有两种主要方式,即细胞坏死与细胞凋亡(apoptosis)。凋亡在生物进化、内环境的稳定以及多个系统的发育中起着积极作用。龙脑消除炎症反应已有报道<sup>[10-11]</sup>,龙脑液在紫外线眼损伤恢复中,同样能缓解角膜损伤,加快损伤细胞的凋亡,避免了炎症反应,对加快角膜损伤修复起到了促进作用<sup>[9]</sup>。龙脑加快烫伤皮肤局部损伤细胞的凋亡,减少了炎症发生,避免了损伤细胞内容物释放引起的组织炎症反应的发

生,因此龙脑诱导凋亡对损伤康复有促进作用。

引起癌细胞凋亡的因素很多,国内外报道如化学物质三氧化二砷、三苯氧胺等,药物如环磷酰胺、阿霉素等导致癌细胞凋亡。近年来中药和植物提取物诱导癌细胞凋亡研究也逐步增多,茶多酚,栝楼,穿心莲,灵芝等提取物,黄酮类、枸杞多糖、黄芪苷、黄芪素等导致癌细胞凋亡,筛选小分子物质诱导癌细胞凋亡是肿瘤治疗药物发掘方向之一<sup>[12]</sup>,而从天然产物筛选诱导癌细胞凋亡治疗肿瘤药物仍然是重要方式<sup>[13-14]</sup>。

迄今为止,尚没有特异诱导癌细胞凋亡的天然产物实验验证龙脑液导致呼吸道癌和乳腺癌细胞凋亡,提示吸入挥发性龙脑可能诱导呼吸道癌变细胞凋亡,并防止癌发生,该效果需继续验证,将对龙脑驱邪避秽功效,提供现代医学细胞学和分子学证据。

## 参考文献

- [1] 赵守训. 冰片(龙脑)——世界最早应用的天然有机成分药物. 亚太传统医药, 2006(2): 24-25.  
Zhao SH X. Borneol - the first natural organic ingredients for drug use in the world. Asian-Pacific Traditional Medicine, 2006(2): 24-25.
- [2] 黄卫东, 吕武清. 冰片的研究进展. 中国药业, 2008, 17(4): 64-66.  
Huang W D, Lv W Q. The research progress on borneol. China Pharmaceuticals, 2008, 17(4): 64-66.
- [3] 方永奇, 邹衍衍, 李羚, 等. 芳香开窍药和祛痰药对中枢神经兴奋性的影响. 中医药研究, 2002, 18(3): 40.  
Fang Y Q, Zou Y Y, Li L et al. Effects of FXKQY and QTY on CNS excitability. Traditional Chinese Medicine Research, 2002, 18(3): 40-42.
- [4] 刘养凤, 张军平, 张伯礼, 等. 冰片对大鼠血浆儿茶酚胺类物质影响的实验研究. 天津中医药, 2004, 21(2): 144-147.  
Liu Y F, Zhang J P, Zhang B L et al. Study of borneol on plasma catecholamines in Rats. Tianjin Journal of Traditional Medicine,

- 2004, 21(2):144-147.
- [ 5 ] 赵保胜, 泌惠卿. 冰片对大鼠脑微血管内皮细胞 ICAM-1 表达量的影响. 中药新药与临床药理, 2001, 18(4):332.
- Zhao B S, Mi H Q. Effect of borneolum on expression of ICAM-1 in microvascular endothelial cells of rat Brain. Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology, 2001, 18(4):332-335.
- [ 6 ] 赵晓洋, 竭福, 葛荣明, 等. 冰片抗真菌作用的显微结构观察. 哈尔滨医科大学学报, 1992, 20(3):295.
- Zhao X Y, Jie F Ge R M et al. The borneol antifungal read microstructure observation. Journal of Harbin Medical University, 1992, 20(3):295-298.
- [ 7 ] 王原, 吴伟康, 黄志宏, 等. 冰片在正常人皮肤增加曲安缩钠的透皮生物利用度. 中药药理与临床, 1992, 8:178-180.
- Wang Y, Wu W K, Huang ZH H et al. Borneol increased transdermal bioavailability of triamcinolone acetonidesodium on normal human skin. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica, 1992, 8:178-180.
- [ 8 ] 侯桂芝, 廖仁德, 孟如松. 冰片对激光烧伤创面的镇痛及抗炎作用. 中国药学杂志, 1995, 30(0):532-534.
- Hou G ZH, Liao R D, Meng R S. The borneol analgesic and anti-inflammatory effects of burn wounds. Chinese Pharmaceutical Journal, 1995, 30(0):532-534.
- [ 9 ] 李菲菲, 白云伟, 康宏向, 等. 龙脑眼部清洁液对大鼠角膜损伤治疗作用的初步研究. 首都公共卫生, 2012, 6(6):253-256.
- Li F F, Bai Y W, Kang H X et al. The preliminary study on treatment effect for damaged cornea of rats by natural borneole eye care liquid. Capital Journal of Public Health, 2012, 6(6):253-256.
- [ 10 ] Juhás S, Cikós S, Czikková S, et al. Effects of borneol and thymoquinone on TNBS-induced colitis in mice. Folia Biol (Praha). 2008, 54(1):1-7.
- [ 11 ] Liu R, et al. Protection by borneol on cortical neurons against oxygen-glucose deprivation/reperfusion: involvement of anti-oxidation and anti-inflammation through nuclear transcription factor  $\kappa$ B signaling pathway. Neuroscience. 2011, Mar 10; 176:408-19.
- [ 12 ] Wang G, Wang X, Yu H, et al. Small-molecule activation of the TRAIL receptor DR5 in human cancer cells. Nat Chem Biol. 2012, 9(2):84-89.
- [ 13 ] Hui-Yu Xu, Zhi-Wei Chen, He Li, et al. 12-Deoxyphorbol 13-palmitate mediated cell growth inhibition, G2-M cell cycle arrest and apoptosis in BGC823 cell. Eur J Pharmacol. 2012, 700(1-3):13-22.
- [ 14 ] Yunyi Liu, Wei Wang, Bin Fang, et al. Anti-tumor effect of germacrone on human hepatoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest and promoting apoptosis. Eur J Pharmacol. 2013, 698(1-3):95-102.

## Natural Borneol Liquid Induced Cancer Cells Apoptosis

LI Fei-fei<sup>1,2</sup> FANG Jing<sup>1</sup> MA Qiong<sup>1</sup> FU Hui<sup>1</sup> MAO Jian-ping<sup>1</sup>

(1 Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China)

(2 College of Pharmacy, Jilin University, Changchun 130021, China)

**Abstract** Objective: To investigate the natural borneol liquid induce cancer cells apoptosis. Methods: Cells of human nasopharyngeal carcinoma, lung squamous cell carcinoma, lung adenocarcinoma and breast cancer lines were employed. Cells cultured in normal conditions but with medium diluted natural borneol liquid. At different dilutions, different time, cultured cells were detected the proliferation by MTT assay. Death cells were histologically observed on slides. Apoptosis cells were analysed on flow cytometry. Results: Cells cultured in half diluted natural borneol liquid were all quickly lead to apoptosis, and showed apoptosis apparently from 12hrs in quarter diluted natural borneol liquid. The obviousness of apoptosis showed order from breast cancer, lung squamous cell carcinoma, lung epithelial cancer and rhinitis cancer, to normal cells 293T. While 293T only had basal levels of apoptosis. In the culture, withdrawal of the borneol fluid led normal cells quickly restored to growth state, while the cancer cells continue to undergo apoptosis within a certain time. Histologically observed the apoptosis cells showed often the bubbling or sprouting of membrane, nuclear condensed and splitted, cytoplasm reduced, and cell fragmentation. The phosphatidylserine eversion obviously lead to apoptosis early, and Caspases 3 showed changes happened, which induced the cancer cell apoptosis of borneol. Conclusion: It showed that borneol induced cancer cells apoptosis.

**Key words** Borneol Breast cancer Lung squamous carcinoma Pneumonic adenocarcinoma Nasopharyngeal carcinoma Apoptosis