

• 药理与临床 •

肉桂醛诱导食管癌鳞状细胞癌 Eca109 细胞凋亡作用及机制研究

冯 苏^{1,2}, 李晓亚¹, 白函瑜¹, 戴素丽¹, 张 璁¹, 魏思思¹, 赵连梅¹, 单保恩^{1*}

1. 河北医科大学第四医院 科研中心, 河北 石家庄 050011

2. 石家庄市第一医院 检验科, 河北 石家庄 050011

摘 要: **目的** 探究肉桂醛对食管癌鳞状细胞癌 Eca109 细胞增殖活性及凋亡的作用, 并探讨其机制。 **方法** MTS 实验检测不同质量浓度 (1.88、3.75、7.50、15.00、30.00 $\mu\text{g/mL}$) 肉桂醛对 Eca109 细胞增殖活性的影响; 倒置相差显微镜观察 Eca109 细胞形态学变化; 流式细胞术检测不同质量浓度肉桂醛对 Eca109 细胞周期分布和凋亡的影响; Western blotting 检测不同质量浓度肉桂醛作用 24 h 对 Eca109 细胞凋亡相关蛋白 Caspase-3/Caspase-9、促凋亡蛋白 Bax 以及抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Mcl-1 表达水平的影响。 **结果** 质量浓度为 15.00、30.00 $\mu\text{g/mL}$ 的肉桂醛作用 Eca109 细胞 24 h 后, 与对照组相比, 肉桂醛组细胞增殖活性显著降低 ($P < 0.05$); 经肉桂醛作用后, Eca109 细胞呈现明显的凋亡形态学变化; 经不同质量浓度肉桂醛处理 Eca109 细胞 24 h 后, G_0/G_1 期细胞比例明显下降 ($P < 0.05$), 而 G_2/M 期细胞比例明显增加 ($P < 0.05$); 肉桂醛处理 Eca109 细胞 24 h 后, 细胞凋亡率明显上升 ($P < 0.05$); 与对照组相比, 经不同质量浓度肉桂醛处理 24 h 后, Eca109 细胞中凋亡蛋白 Caspase-3 和 Caspase-9 出现明显的裂解片段 ($P < 0.05$), 抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Mcl-1 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 而促凋亡蛋白 Bax 表达明显上调 ($P < 0.05$)。 **结论** 肉桂醛可抑制食管癌鳞状细胞癌 Eca109 细胞增殖, 促进其凋亡, 其作用机制可能与上调凋亡蛋白 Caspase-3、Caspase-9、促凋亡蛋白 Bax 表达, 以及下调抗凋亡蛋白 Bcl-2、Mcl-1 表达有关。

关键词: 肉桂醛; 食管癌鳞状细胞癌; Eca109 细胞; 凋亡; 线粒体凋亡途径

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)16-3840-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.16.015

Effects of cinnamaldehyde on apoptosis of oesophageal squamous cell carcinoma Eca109 cells and its mechanism

FENG Su^{1,2}, LI Xiao-ya¹, BAI Han-yu¹, DAI Su-li¹, ZHANG Cong¹, WEI Si-si¹, ZHAO Lian-mei¹, SHAN Bao-en¹

1. Research Center, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

2. Clinical Laboratory, the First Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050011, China

Abstract: Objective To investigate effects of cinnamaldehyde (CA) on the proliferation and apoptosis of oesophageal squamous cell carcinoma Eca109 cells and to explore its mechanism. **Methods** The effects of different concentrations (1.88, 3.75, 7.50, 15.00, 30.00 $\mu\text{g/mL}$) of CA on the proliferation of Eca109 cells were detected by MTS assay; Morphological changes were observed by phase contrast microscope; Flow cytometry was used to detect cell cycle distribution and apoptosis rate of Eca109 at different concentrations of CA; The expression of apoptosis-related protein Caspase-3/Caspase-9, pro-apoptosis protein Bax and anti-apoptosis protein Bcl-2 and Mcl-1 in ECA109 cells treated with different concentrations of CA for 24 h was detected by Western blotting. **Results** After treated by CA with a concentration of 15.00, 30.00 $\mu\text{g/mL}$ for 24 h, compared with the control group, the cell proliferation of Eca109 cells was significantly inhibited [(42.91 $\pm$ 2.15)%, (36.04 $\pm$ 2.97)% vs (100.00 $\pm$ 0.00)%, $P < 0.05$]; After treated by CA, Eca109 cells showed obvious apoptotic morphological changes; After treated with different concentrations of CA for 24 h, the proportion of cells in G_0/G_1 phase was decreased significantly ($P < 0.05$), while the proportion of cells in G_2/M phase was increased significantly ($P < 0.05$); After treated by CA for 24 h, the apoptosis rate of Eca109 cells was increased significantly [(4.3 $\pm$

收稿日期: 2019-01-16

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81673642); 国家自然科学基金面上项目 (81772550)

作者简介: 冯 苏 (1981—), 女, 硕士研究生, 主要从事中药抗肿瘤研究。E-mail: fengsusu2008@126.com

*通信作者 单保恩 (1962—), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事肿瘤免疫研究。E-mail: shanbaoen@163.com

0.11)%, (4.8 ± 0.07)%, (9.1 ± 0.13)% vs (1.0 ± 0.03)%, $P < 0.05$]; Compared with the control group, the fragment of protein Caspase-3 and Caspase-9 was significantly cleaved in Eca109 cells treated with different concentrations of CA for 24 h ($P < 0.05$); The expression levels of anti-apoptotic protein Bcl-2 and Mcl-1 were significantly decreased ($P < 0.05$), while the pro-apoptotic protein Bax expression was significantly up-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion** Cinnamaldehyde can inhibit the proliferation of oesophageal squamous cell carcinoma Eca109 cells and promote its apoptosis. The mechanism may be associated with the up-regulation of Caspase-3, Caspase-9, pro-apoptotic protein Bax and down-regulation of anti-apoptotic protein Bcl-2 and Mcl-1.

Key words: cinnamaldehyde; oesophageal squamous cell carcinoma; Eca109 cells; apoptosis; mitochondrial apoptosis pathway

食管癌鳞状细胞癌 (oesophageal squamous cell carcinoma, ESCC) 是严重危害人类健康的消化道恶性肿瘤。相关统计数据显示, ESCC 在世界最常见肿瘤排名中居第 8 位, 在癌症死亡的主要原因排名中居第 6 位^[1-2], 且中国北方是亚洲高发区之一^[3-4]。探寻治疗 ESCC 行之有效的方案对延长患者生存期、提高患者生存质量有着重要的意义。中医药治疗肿瘤具有多方位抑制甚至杀死肿瘤细胞、全面提高机体自身免疫功能、增强机体对手术及放化疗的耐受等多重作用, 因此中医药联合手术、放化疗等常规治疗手段治疗食管癌凸显出重要优势。

肉桂为樟科植物肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl. 的干燥树皮, 始载于《神农本草经》, 传统复方右归丸、桂连丸和八味丸等均含有肉桂。肉桂醛作为肉桂挥发油的主要成分, 具有抗病毒、抗氧化、抗炎、降糖、抗肿瘤等多种药理作用。已有研究表明, 肉桂醛对多种肿瘤细胞系有明显的增殖抑制作用, 可通过线粒体凋亡途径诱导人白血病细胞 HL-60 凋亡, 并呈现时间和剂量依赖性^[5-6]。然而肉桂醛对 ESCC 细胞的作用鲜有报道, 其作用及机制尚不清楚。本课题组前期研究发现, 对羟基桂皮醛对 ESCC 细胞具有明显的抑制作用, 并能促进 ESCC 细胞的分化^[7]。对二者的化学结构进行分析, 发现肉桂醛是对羟基桂皮醛的同体异构形式, 推测其可能对 ESCC 细胞具有同样的作用。本研究以食管鳞状细胞癌 Eca109 细胞为研究对象, 通过观察肉桂醛对 Eca109 细胞增殖及凋亡的影响, 探讨其抗肿瘤的可能作用机制, 为肉桂醛作为可靠的临床用药提供依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

肉桂醛对照品购自美国 Sigma 公司, 质量分数 99% 以上 (批号 4-ZCA-177-1); 顺铂 (批号 H20073653) 购自齐鲁制药 (海南) 有限公司; RPMI 1640 培养粉 (批号 31800-022) 购自美国 GIBCO/BRL 公司; 胎牛血清 (批号 1616756) 购自杭州四季青生物有限公司; 胰蛋白酶购自北京索莱

宝科技有限公司; MTS 购自 Promega 公司; 兔抗人 Caspase-3 (批号 ab13585)、Caspase-9 (批号 ab184786) 等购自美国 Abcam 公司; IRDye 800 标记的羊抗兔 IgG (二抗) 购自美国 Rockland 公司; 硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的山羊抗兔 IgG (二抗) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 细胞

人食管鳞状细胞癌 Eca109 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心, 由河北医科大学第四医院科研中心保存。

2 方法

2.1 细胞培养

Eca109 细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养液常规培养于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱, 每 2~3 天用 0.25% 的胰蛋白酶消化细胞并传代, 取对数生长期细胞用于实验。

2.2 MTS 法检测肉桂醛对 Eca109 细胞增殖的影响

取对数生长期 Eca109 细胞, 制成 1×10^5 个/mL 细胞悬液, 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 4 h, 待细胞贴壁后, 分为肉桂醛组、对照组和顺铂阳性药对照组进行后续处理, 肉桂醛组加入肉桂醛 (经 DMSO 溶解后, 用无牛血清培养液稀释), 使其终质量浓度分别为 1.88、3.75、7.50、15.00、30.00 μg/mL, 对照组未加任何处理, 阳性对照组加入终质量浓度为 2、4、8、16、32 μg/mL 的顺铂处理的 Eca109 细胞悬液。每组设 3 个复孔。37 °C、5% CO₂ 条件下, 药物分别作用细胞 12、24、48 h 后, 每孔加入 10 μL MTS, 继续培养 2.5 h, 用酶标仪测 490 nm 波长时各孔吸光度 (A) 值。计算细胞增殖率 (细胞增殖率 = $A_{\text{药物}}/A_{\text{对照}}$), 用 Photo Gragh 5.0 计算半数抑制浓度 (IC₅₀), 后续实验取 24 h 的 IC₅₀ 值作为实验的最大药物终质量浓度。

2.3 倒置相差显微镜观察肉桂醛对 Eca109 细胞形态的影响

取对数生长期 Eca109 细胞, 制成 1×10^5 个/mL

细胞悬液,接种于 96 孔板中,每孔 100 μL ,待细胞贴壁后,分为肉桂醛组和对照组进行后续处理,肉桂醛组加入肉桂醛,使其终质量浓度分别为 7.50、15.00、30.00 $\mu\text{g/mL}$;对照组未用 CA 处理。每组设 3 个复孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下,药物作用 Eca109 细胞 24 h 后,倒置相差显微镜观察各组细胞形态变化。

2.4 流式细胞术检测肉桂醛对 Eca109 细胞周期分布的影响

取对数生长期 Eca109 细胞,制成 2×10^5 个/mL 细胞悬液,接种于 6 孔板中,每孔 2.5 mL,待细胞贴壁后,分为肉桂醛组和对照组进行后续处理,肉桂醛组加入肉桂醛,使其终质量浓度分别为 4、8、16 $\mu\text{g/mL}$ (依据 IC_{50} 为最大终质量浓度);对照组未用 CA 处理。每组设 3 个复孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下,药物作用 Eca109 细胞 24 h 后,制备细胞密度为 1×10^6 个/mL 的单细胞悬液 100 μL ,加入 FITC 和 PI 染液,避光染色 30 min 后 300 目筛网滤过,流式细胞仪分析细胞周期分布。

2.5 流式细胞术检测肉桂醛对 Eca109 细胞凋亡的影响

细胞接种、分组及药物处理方法同“2.4”项,每组设 3 个复孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下,药物作用 Eca109 细胞 24 h 后,制备细胞密度为 1×10^6 个/mL 的单细胞悬液 100 μL ,加入 7-AAD 和 PE 染液,避光染色 15 min,流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.6 蛋白质印迹检测肉桂醛对 Eca109 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

细胞接种、分组及药物处理方法同“2.4”项,每组设 3 个复孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下,药物作

用 Eca109 细胞 24 h,提取总蛋白,BCA 试剂盒测定蛋白质量浓度。取 60 μg 蛋白进行 12% SDS-PAGE 电泳,湿转至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭 1 h,一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜(Caspase-3、Caspase-9、Bax、Mcl-1、Bcl-2 和 GAPDH 的稀释比例均为 1:1 000),洗膜,IRDye 800 标记的二抗室温孵育 1 h (稀释比例为 1:10 000),洗膜,用 Odyssey 双色红外荧光扫描系统进行检测分析。

2.7 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,所有实验均独立重复 3 次。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同指标在多组间的差异比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 SNK- q 检验。

3 结果

3.1 对 Eca109 细胞增殖的影响

MTS 法检测结果(表 1)表明,与对照组相比,肉桂醛处理 Eca109 细胞 12 h 时,在 1.88 $\mu\text{g/mL}$ 时增殖活性虽有降低,但无统计学意义,随时间延长至 24、48 h 细胞增殖活性逐渐降低;而在逐渐增高的 3.75~30.00 $\mu\text{g/mL}$ 均可不同程度抑制 Eca109 细胞增殖活性,且随着肉桂醛质量浓度的增加和处理时间的延长,抑制细胞增殖活性的作用也逐渐增强,呈质量浓度和时间依赖效应,差异均显著 ($P < 0.05$),且与顺铂抑制癌细胞增殖的效果相当。另外,经计算肉桂醛处理 Eca109 细胞 12、24、48 h 所对应的 IC_{50} 值分别为 32.02、16.95、8.88 $\mu\text{g/mL}$,取 24 h 的 IC_{50} 为最大用药终质量浓度,因此取 16 $\mu\text{g/mL}$ 作为后续机制研究的肉桂醛最大用药终质量浓度。

表 1 不同质量浓度肉桂醛处理 12、24、48 h 时 Eca109 细胞增殖率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Eca109 cell proliferation rate at 12, 24, 48 h treated with different concentrations of cinnamaldehyde ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	细胞增殖率/%		
		12 h	24 h	48 h
对照	—	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00
肉桂醛	1.88	99.42 $\pm$ 5.25	93.10 $\pm$ 2.25*	86.68 $\pm$ 3.00*
	3.75	97.28 $\pm$ 2.71*	86.10 $\pm$ 4.38*	77.80 $\pm$ 4.90*
	7.50	95.16 $\pm$ 3.10*	79.97 $\pm$ 1.44*	59.79 $\pm$ 4.62*
	15.00	89.29 $\pm$ 5.58*	42.91 $\pm$ 2.15*	41.95 $\pm$ 3.96*
	30.00	42.43 $\pm$ 0.34*	36.04 $\pm$ 2.97*	32.55 $\pm$ 2.11*
顺铂	2.00		80.04 $\pm$ 11.60*	
	4.00		74.40 $\pm$ 3.94*	
	8.00		62.05 $\pm$ 3.86*	
	16.00		32.21 $\pm$ 2.63*	
	32.00		22.32 $\pm$ 1.03*	

与对照组比较: * $P < 0.05$,下同

* $P < 0.05$ vs control group, same as below

3.2 对 Eca109 细胞形态的影响

7.50 $\mu\text{g/mL}$ 肉桂醛作用于 Eca109 细胞 24 h, 大部分细胞的形态未发生明显变化; 15.00 $\mu\text{g/mL}$ 肉桂醛作用于 Eca109 细胞 24 h, 部分细胞呈现凋亡特征性改变: 细胞核固缩, 染色质浓缩、深染, 核碎裂成块状, 凋亡小体形成且呈漂浮状态, 细胞变圆, 内部结构被破坏, 细胞碎片增多, 活细胞显著减少等; 30.00 $\mu\text{g/mL}$ 肉桂醛作用于 Eca109 细胞 24 h, 细胞呈现细胞碎片或死细胞状态。结果见图 1。

3.3 对 Eca109 细胞周期分布的影响

流式细胞术检测结果 (图 2) 显示, Eca109 细胞经质量浓度为 4、8、16 $\mu\text{g/mL}$ 的肉桂醛作用 24 h, G_0/G_1 期细胞比例分别为 57.26%、53.98%、47.08%, G_2/M 期细胞比例分别为 16.5%、19.1%、22.92%; 对照组 G_0/G_1 期细胞比例为 64.16%, G_2/M 期细胞比例为 6.23%。与对照组比较, 肉桂醛各组 G_0/G_1 期细胞比例明显降低 ($P<0.05$), G_2/M 期细胞比例

明显增加 ($P<0.05$)。

3.4 对 Eca109 细胞凋亡的影响

流式细胞术检测结果 (图 3) 显示, Eca109 细胞经质量浓度为 4、8、16 $\mu\text{g/mL}$ 的 CA 作用 24 h, 细胞凋亡率分别为 $(4.30\pm 0.11)\%$ 、 $(4.80\pm 0.07)\%$ 、 $(9.10\pm 0.13)\%$, 对照组细胞凋亡率为 $(1.00\pm 0.03)\%$ 。与对照组相比, 肉桂醛各组细胞凋亡率显著上升, 差异显著 ($P<0.05$), 并且 Eca109 细胞凋亡率随肉桂醛质量浓度增加呈上升趋势。

3.5 对 Eca109 细胞凋亡相关蛋白 Caspase-3、Caspase-9、Bax、Mcl-1、Bcl-2 表达的影响

Western blotting 结果 (图 4) 显示, 与对照组相比, 肉桂醛组细胞凋亡蛋白 Caspase-3 和 Caspase-9 出现明显的裂解片段, 且表达水平明显升高 ($P<0.05$); 促凋亡蛋白 Bax 表达水平明显升高 ($P<0.05$); 而抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Mcl-1 表达水平明显降低 ($P<0.05$)。

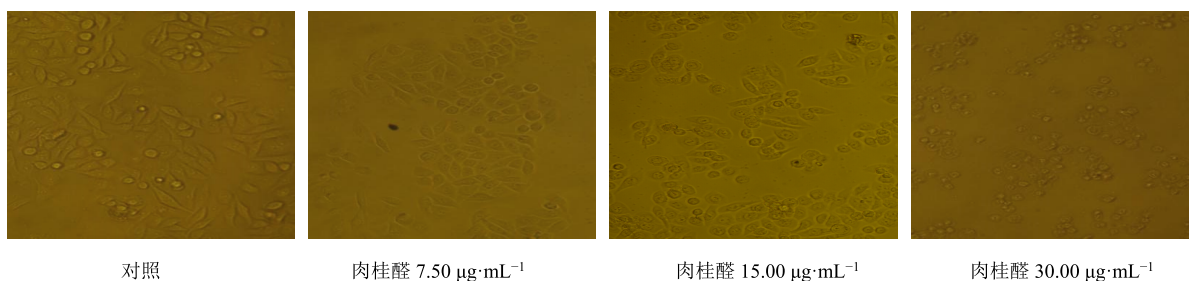


图 1 不同质量浓度肉桂醛作用 Eca109 细胞 24 h 后细胞形态的改变

Fig. 1 Morphological changes of Eca109 cells treated with different concentrations of cinnamaldehyde for 24 h

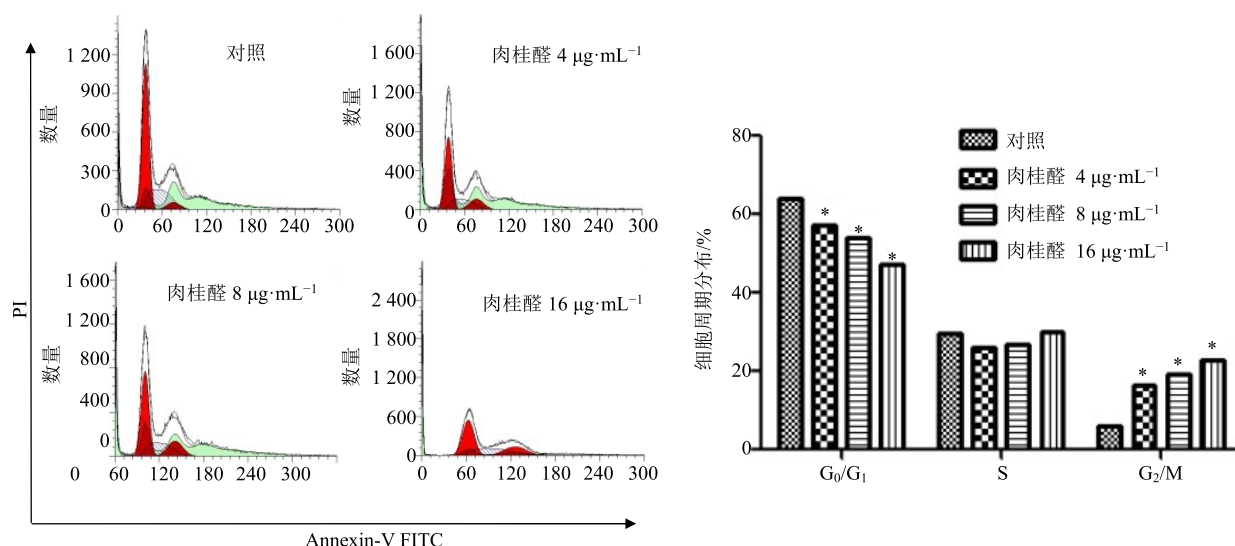
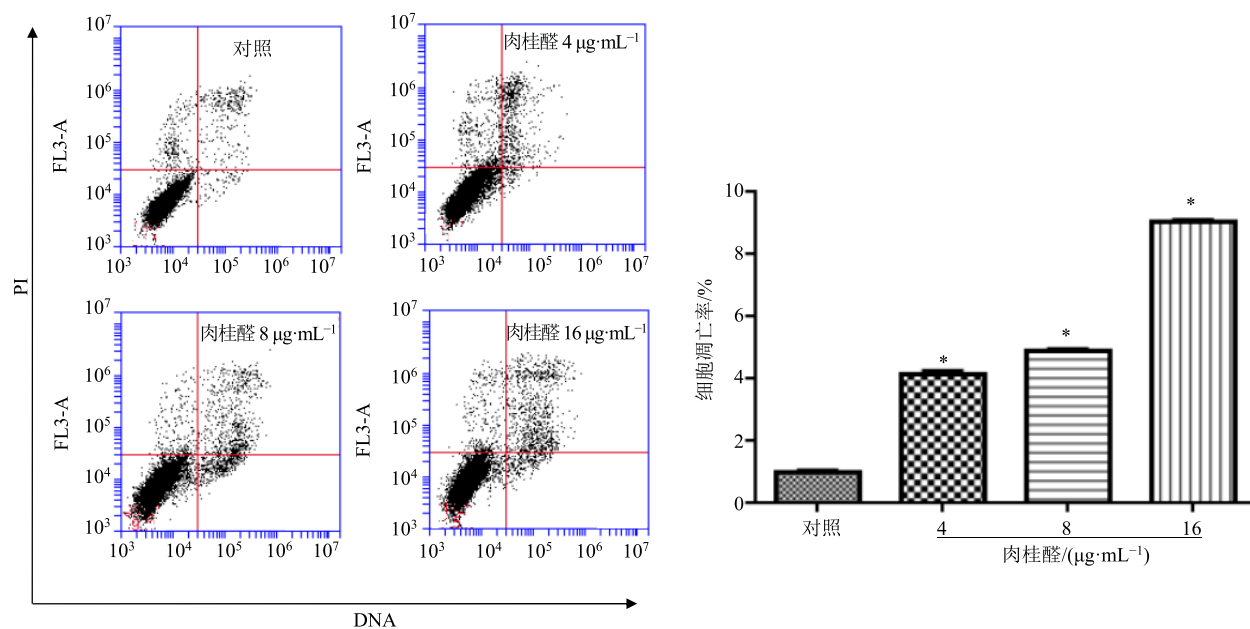
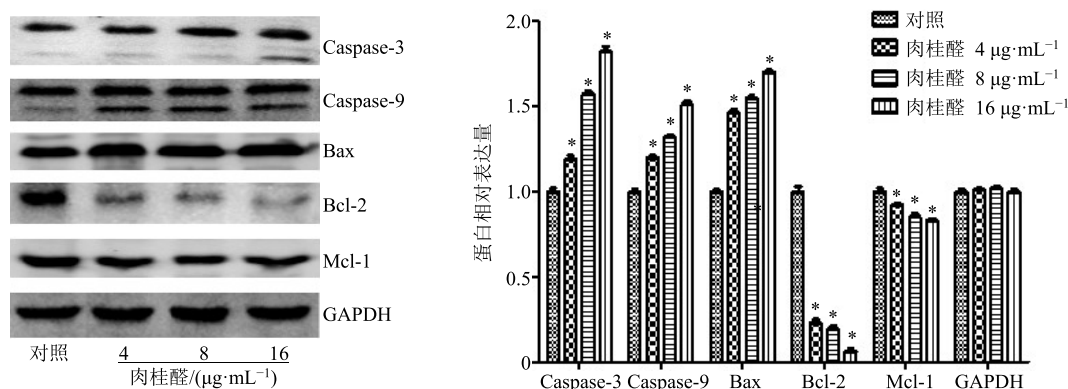


图 2 肉桂醛对 Eca109 细胞周期分布的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 2 Effects of cinnamaldehyde on cell cycle distribution of Eca109 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

图 3 肉桂醛对 Eca109 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 3 Effects of cinnamaldehyde on apoptosis of Eca109 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)图 4 肉桂醛对 Eca109 细胞凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 4 Effects of cinnamaldehyde on expressions of apoptosis-related protein in Eca109 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

中药治疗可部分弥补传统的手术、放化疗手段治疗肿瘤的弊端, 已经成为当今人类对抗肿瘤的重要辅助治疗方式, 越来越多的中药或单体被发掘具有抗肿瘤作用^[8-10]。本课题组前期研究表明, 对羟基桂皮醛能诱导 B16 黑色素瘤和食管癌 Kyse30 细胞发生分化, 并探讨了对羟基桂皮醛诱导分化的作用机制^[11-12]。肉桂醛为对羟基桂皮醛的同分异构体, 本课题组已对其对 ESCC 细胞的作用进行了初步研究, 结果表明肉桂醛可诱导 ESCC 细胞发生凋亡。既往研究发现, 肉桂醛可抑制人宫颈癌细胞和 CML 细胞系 K562 细胞增殖, 并诱导其发生凋亡^[13-14]。

本研究发现质量浓度 4、8、16 μg/mL 肉桂醛均可有效抑制 Eca109 细胞的增殖活性, 并且随着药物质量浓度的增加和作用时间的延长, 细胞增殖率不断降低, 细胞凋亡率不断增加, 同时细胞周期阻滞在 G₂/M 期, 提示肉桂醛可能是通过诱导细胞凋亡而发挥抗肿瘤作用, 首次阐释了肉桂醛是可促进 ESCC 细胞凋亡的有效药物。

本研究通过检测细胞凋亡过程中凋亡相关蛋白的表达水平变化反映了肉桂醛可能通过线粒体凋亡途径诱导 Eca109 细胞凋亡并抑制其增殖活性。目前已发现多种肿瘤抑制剂可能通过线粒体凋亡途径及半胱氨酸蛋白酶级联反应等方式诱导肿

瘤细胞凋亡^[15-17]。线粒体凋亡途径指依赖于 Bcl-2 家族的促凋亡蛋白与抗凋亡蛋白相互作用形成调控细胞命运的复杂网络,并在凋亡刺激因子作用下,大量裂解激活 Caspases,促进下游的半胱氨酸蛋白酶级联反应,诱导细胞凋亡^[18]。

本研究发现,经质量浓度 4、8、16 $\mu\text{g/mL}$ 肉桂醛处理 24 h, Eca109 细胞中凋亡蛋白酶 Caspase-3 和 Caspase-9 出现明显的裂解片段,且表达水平明显升高;促凋亡蛋白 Bax 表达水平明显升高;而 Bcl-2 家族成员抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Mcl-1 表达水平明显降低。Lin 等^[17]和 Ahn 等^[19]均证实,肉桂醛可通过线粒体凋亡途径诱导人头颈部癌细胞 SGT 和 YD-10B 及人肝癌 PLC/PRF/5 细胞发生凋亡,并以时间依赖的方式下调抗凋亡因子 Bcl-2 蛋白表达水平并伴随促凋亡蛋白 Bax 的积累。而本研究结果显示,肉桂醛作为一种凋亡诱导剂作用于 Eca109 细胞导致同样的蛋白表达水平变化,提示线粒体凋亡途径是肉桂醛诱导 ESCC 细胞凋亡的可能机制之一。

综上所述,肉桂醛可能通过线粒体凋亡途径诱导食管鳞状细胞癌 Eca109 细胞凋亡并抑制其增殖活性。然而要将肉桂醛作为肿瘤细胞抑制剂有效应用于临床,其凋亡信号通路尚需深入研究。

参考文献

- [1] Pennathur A, Gibson M K, Jobe B A, *et al.* Oesophageal carcinoma [J]. *Lancet*, 2013, 381(9864): 400-412.
- [2] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(5): 5-29.
- [3] Asombang A W, Kayamba V, Lisulo M M, *et al.* Esophageal squamous cell cancer in a highly endemic region [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(9): 2811-2817.
- [4] Mansour-Ghanaei F, Heidarzadeh A, Naghipour M R, *et al.* A 10-year registrystudy of esophageal cancer in Guilan province, Iran: the Guilan Cancer Registry Study (GCRS) [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(12): 6277-6283.
- [5] 陈立平, 张慧萍, 陈光, 等. 肉桂油成分分析及肉桂醛体外抗肿瘤活性研究 [J]. 中国微生态学杂志, 2012, 24(4): 327-330.
- [6] Ka H, Park H J, Jung H J, *et al.* Canamaldehyde induces apoptosis by ROS-mediatedmitochondrial permeability transition in human promyelocytic leukemia HL-60 cells [J]. *Cancer Lett*, 2003, 196(2): 143-152.
- [7] Ma M, Zhao L M, Yang X X, *et al.* p-Hydroxycinnamaldehyde induces the differentiation of oesophageal carcinoma cells via the cAMP-RhoA-MAPK signalling pathway [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 313-315.
- [8] 张静, 杨光, 单保恩, 等. 杠柳苷对 H22 荷瘤小鼠的抑瘤作用及其机制研究 [J]. 中草药, 2010, 41(8): 1307-1311.
- [9] 颜晰, 赵连梅, 孙佳玮, 等. 连翘提取物体外抗肿瘤活性的初步研究 [J]. 癌变·畸变·突变, 2012, 24(1): 20-24.
- [10] 杨扬, 郭举. 具有抗肿瘤活性的槲皮素衍生物研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49(6): 1468-1475.
- [11] Zhao L M, Sun G G, Han L N, *et al.* P-Hydroxycannamaldehyde induces B16-F1 melanoma cell differentiation via the RhoA-MAPK signaling pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38(6): 2247-2260.
- [12] 戴素丽, 吴昊, 赵日吻, 等. 对羟基桂皮醛诱导食管癌 Kyse30 细胞分化及其作用机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(3): 610-618.
- [13] Koppikar S J, Choudhari A S, Suryavanshi A S, *et al.* Aqueous canamon extract (ACE-c) from the bark of *Canamomum cassia* causes apoptosis in human cervical cancer cell line (SiHa) through loss of mitochondrial membrane potential [J]. *BMC Cancer*, 2010, doi: 10.1186/1471-2407-10-210.
- [14] Zhang J H, Liu L Q, He Y L, *et al.* Cytotoxic effect of trans-canamal-dehyde on human leukemia K562 cells [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(7): 861-866.
- [15] Kim T M, Shin S K, Kim T W, *et al.* Elm tree bark extract inhibits HepG2 hepatic cancer cell growth via pro-apoptotic activity [J]. *J Vet Sci*, 2012, 13(1): 7-13.
- [16] Le T D, Jin D, Jin C, *et al.* Capsaicin-induced apoptosis of FaDu human pharyngeal squamous carcinoma cells [J]. *Yonsei Med J*, 2012, 53(4): 834-841.
- [17] Lin L T, Tai C J, Chang S P, *et al.* Canamaldehyde-induced apoptosis in human hepatoma PLC/PRF/5 cells involves the mitochondrial death pathway and is sensitive to inhibition by cyclosporin A and z-VAD-fmk [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2013, 13(10): 1565-1574.
- [18] Zhang T, Saghatelian A. Emerging roles of lipids in BCL-2 family-regulated apoptosis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1831(10): 1542-1554.
- [19] Ahn S G, Jin Y H, Yoon J H, *et al.* The anticancer mechanism of 2'-hydroxy canamaldehyde in human head and neck cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2015, 47(5): 1793-1800.