

丁香花蕾乙醇提取物在39 °C条件下对口腔鳞状细胞癌体外增殖、迁移、凋亡的影响

许远红¹, 田 杰², 张 雪³, 冉黔川¹, 秦振伟¹, 王 梹⁴, 卢 涛⁴, 杨江林⁴, 张可银⁴, 高 霞⁴, 宋 玉², 廖德仲^{1, 3, 4*}

1. 贵州中医药大学 基础医学院, 贵州 贵阳 551500

2. 贵州中医药大学第一附属医院, 贵州 贵阳 550002

3. 贵州中医药大学第二附属医院, 贵州 贵阳 550001

4. 贵州医科大学 临床医学院, 贵州 贵阳 550000

摘 要: **目的** 探讨丁香花蕾乙醇提取物(AEC)在39 °C条件下对口腔鳞状细胞癌增殖、迁移、凋亡的影响。**方法** 设置空白对照组、溶剂对照组和0.05%、0.10%、0.20% AEC组, 分别于39 °C条件下作用于口腔鳞状细胞癌细胞培养72 h。采用CCK-8和克隆形成法检测口腔鳞状细胞癌的增殖能力; 划痕实验检测细胞的迁移能力; 流式细胞术和Hoechst 33342染色检测细胞的凋亡。**结果** 与对照组和模型组比较, 0.05%、0.10%、0.20%组口腔鳞状细胞增殖活性逐渐降低, 细胞克隆形成随着浓度增加集落形成降低, 细胞迁移能力和侵袭能力逐渐减弱; 细胞凋亡率逐渐增加, 均与AEC呈浓度相关性。在39 °C条件下, 口腔鳞状细胞癌增殖、迁移和侵袭的抑制作用更加明显, 细胞凋亡更加显著。**结论** AEC对口腔鳞状细胞癌的增殖、迁移具有抑制作用, 且能促进口腔鳞状细胞癌凋亡, 在39 °C条件下, 具有协同作用, 对口腔鳞状细胞癌增殖、迁移、凋亡的作用更明显。

关键词: 丁香花蕾乙醇提取物; 口腔鳞状细胞癌; 增殖; 迁移; 凋亡; 热疗

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 10-2369-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.10.017

Effects of alcohol extract of clove at 39 °C on proliferation, migration and apoptosis of oral squamous cell carcinoma

XU Yuanhong¹, TIAN Jie², ZHANG Xue³, RAN Qianchuan¹, QIN Zhenwei¹, WANG Zhi⁴, LU Tao⁴, YANG Jianglin⁴, ZHANG Keyin⁴, GAO Xia⁴, SONG Yu², LIAO Dezhong^{1, 3, 4}

1. College of Basic Medical Sciences, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 551500, China

2. The First Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China

3. The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China

4. School of Clinical Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550000, China

Abstract: Objective To investigate the effects of alcohol extract of clove (AEC) combined with 39 °C on the proliferation, migration and apoptosis of oral squamous cell carcinoma (OSCC). **Methods** Oral squamous cells (OSC) were cultured with 0, 0.05%, 0.10%, or 0.20% AEC at 39 °C for 72 h. CCK-8 and colony formation assays were used to detect the proliferation of OSC. The migration ability of cells was detected by scratch test. The apoptosis of the cells was detected by flow cytometry and Hoechst 33342 staining. **Results** Compared with the control and model group, the 0.05%, 0.10% and 0.20% groups showed a gradual decrease in the proliferation activity of OSC. With the increase of the concentration of 0.05%, 0.10%, and 0.20% groups, the colony formation decreased, and the cell migration and invasion ability gradually decreased. The apoptosis rate of OSC increased gradually, both in a concentration dependent manner with AEC. Combined with 39 °C treatment, the inhibition of proliferation, migration and invasion of OSC was more obvious, and cell apoptosis was more significant. **Conclusion** AEC can inhibit the proliferation and

收稿日期: 2024-05-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82060489); 贵州省科技技术厅资助项目(黔科合基础-ZK[2024]一般 404)

第一作者: 许远红, 中西医结合硕士研究生, 主要研究方向为病理学与病理生理学。E-mail: 1364006313@qq.com

*通信作者: 廖德仲, 博士后, 从事肿瘤病理生理学。E-mail: djliao@gzy.edu.cn

migration of OSCC, and promote the apoptosis of OSCC. When used in combination with 39 °C, it has a synergistic effect, so as to achieve the therapeutic effect of OSCC.

Key words: alcohol extract of clove; oral squamous cell carcinoma; proliferation; migration; apoptosis; thermotherapy

口腔鳞状细胞癌(OSCC)是世界常见的恶性肿瘤之一^[1],OSCC早期患者通常采用手术治疗,但晚期患者或不宜手术者则采用联合治疗^[2],尽管针对OSCC治疗已有新治疗进展,由于癌症转移、患者耐药及术后患者面部器官缺失等,使该疾病仍面临严峻挑战。20世纪晚期,热疗法(39~45 °C)被运用于临床肿瘤治疗,相关研究表明高温可以引起细胞生物学改变^[3],尤其在肿瘤细胞中改变明显,如通过抑制细胞S期及G₂期中的同源重组DNA修复途径^[4-5]等,从而达到抑制肿瘤细胞增殖的目的。在长期临床实践中,发现患者肿瘤局部温度虽与其内部温度不同,但仍能达到杀死肿瘤细胞的效果。一项热放疗研究表明以43 °C累积等效分钟数(CEM 43 °C)为基准的标准下,其T₉₀值(温度分布的第10百分位)均为39.0~40.5 °C^[6-8]。课题组前期研究为确定39 °C是否对肿瘤细胞的影响,以37 °C为对照,结果显示39 °C不仅能抑制肿瘤细胞的生长,还能增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[9]。同时多项研究证明热疗法对多种化疗药物具有增敏作用^[10-11]。然而化疗药物不良反应巨大,寻求无不良反应药物已成为必然。中草药已成为治疗恶性肿瘤的全新方法之一^[12-13]。丁香属桃金娘科干燥植物,在医学中具有多种药效^[14-15]。相关研究表明丁香对结肠癌^[16]、胰腺癌^[17]、食管癌^[18]等肿瘤细胞具有抑制效果,并且通过阻滞G₁/S期细胞周期诱导细胞凋亡。丁香在口腔疾病中多用于口腔炎症^[19],然而对OSCC是否有抑制作用尚未知,本研究将探索不同浓度丁香花蕾乙醇提取物(AEC)在39 °C条件下是否对OSCC的增殖、迁移、凋亡产生影响,从而为研究新型抗癌药物及治疗手段提供基础研发依据。

1 实验材料及仪器

1.1 细胞

人源性口腔鳞状细胞癌SCC-25、Cal-27均购于美国ATCC。

1.2 药物

干燥丁香花蕾(批号:C0362105001,提供方:贵州中医药大学第二附属医院,并由贵州中医药大学第二附属医院药学部张雪副教授进行鉴定,鉴定其拉丁名为*Eugenia caryophyllata* Thunb.)。

1.3 试剂

杜氏改良伊戈尔培养基DMEM、0.25%胰蛋白酶-EDTA溶液(批号:6123207、8123677,美国Gibco股份有限公司);磷酸盐(PBS)缓冲液(批号:J827FC0551,生工生物工程(上海)股份有限公司);细胞增殖与活性检测-8(CCK-8)试剂盒(批号:230815Z01-02,苏州优逸兰迪);结晶紫粉末、Hoechst 33342(批号:320Q044、C0031,北京索莱宝科技有限公司);细胞凋亡试剂盒(批号:2119964,BD公司)。

1.4 主要仪器

Forma3111 CO₂恒湿恒温培养箱(美国Thermo Fisher公司);JJ2017-07-1043超净工作台(苏州净化设备有限公司);3052431208多功能酶标仪(北京百乐科技公司);BD FACSVerse™ Flow Cytometer Cat No. 651154流式细胞仪(BD公司)。

2 实验方法

2.1 细胞培养

SCC-25和Cal-27细胞株培养在含10%胎牛血清和1%双抗的DMEM培养基中,置于5% CO₂, 37 °C和39 °C的恒温恒湿培养箱中培养,待细胞密度达到70%~80%时,进行后续实验。

2.2 AEC制备

精密称取1 g干燥丁香花蕾置于95%乙醇中,室温放置2周,以0.22 μm微孔滤膜滤过后除去杂质,并将其视为100%提取物^[9],作为工作液保存于-20 °C低温冰箱。后续实验采用DMEM培养基将100%AEC按照培养基与AEC的体积比进行浓度稀释。

2.3 AEC主要成分鉴定

课题组前期研究按照《中国药典》采用气相质谱以丁香酚为标准品,对AEC进行成分分析,详细方法见文献报道^[18]。

2.4 CCK-8实验

取对数生长期细胞以每孔1 500个细胞接种于96孔板,待细胞贴壁后,加入不同体积分数的AEC(0.05%、0.10%、0.20%),另设空白对照组、溶剂对照组(加入等体积的酒精)置于37 °C和39 °C培养箱中培养72 h后,加入CCK-8试剂,孵育1 h后,使用酶标仪在450 nm处测量吸光度(A)值。

2.5 克隆形成实验

取对数生长期细胞,用含5%胎牛血清重悬细

胞计数铺板,每孔500个细胞,并分别置于37℃和39℃培养箱中,待细胞贴壁后,按照100%提取物与DMEM培养基体积百分比,加入不同浓度(0、0.05%、0.10%、0.20%)AEC置于37℃和39℃培养箱中培养72 h后,弃掉含AEC的培养基,换5%新鲜培养基继续培养6 d。多聚甲醛固定细胞,加入0.1%结晶紫染色剂进行染色,计数并拍照。

2.6 划痕实验

取生长对数期的细胞,按照每孔 1.5×10^5 个细胞进行铺板,待细胞贴壁后,用200 μ L枪头进行划痕,在倒置显微镜下拍照记录0 h划痕及细胞的状态并加入不同体积分数的AEC(0、0.05%、0.10%、0.20%),置于37℃和39℃培养箱中培养72 h后再次对细胞进行拍照。用Image J计算划痕宽度。

细胞迁移率=(初始面积-72 h划痕面积)/初始面积

2.7 Hoechst 33342 染色实验

取生长对数期的细胞进行实验,每孔 1×10^4 个细胞进行铺板,待细胞贴壁后,加入不同体积分数(0、0.05%、0.10%、0.20%)AEC置于37℃和39℃培养箱中培养72 h后,用PBS清洗2遍,并用预冷的甲醇固定后加入Hoechst 33342染色试剂,显微镜下拍照。

2.8 Annexin V/FITC 染色实验

取生长对数期的细胞进行实验,以每孔 1×10^5 个细胞进行铺皿,待细胞贴壁后,加入不同体积分数(0、0.05%、0.10%、0.20%)置于37℃和39℃培养箱中培养72 h后,每孔加入400 μ L $1 \times$ Annexin V结合缓冲液,以及5 μ L PI和5 μ L FITC Annexin V避光孵育15 min,流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.9 统计学分析

采用SPSS 26.0进行数据分析,Prism 10.2.1制图。ShaPiro-Wilk检验(S-W)检验数据是否满足正态分布,组间均值差异采用独立样本 t 检验,组间比较采用方差分析。

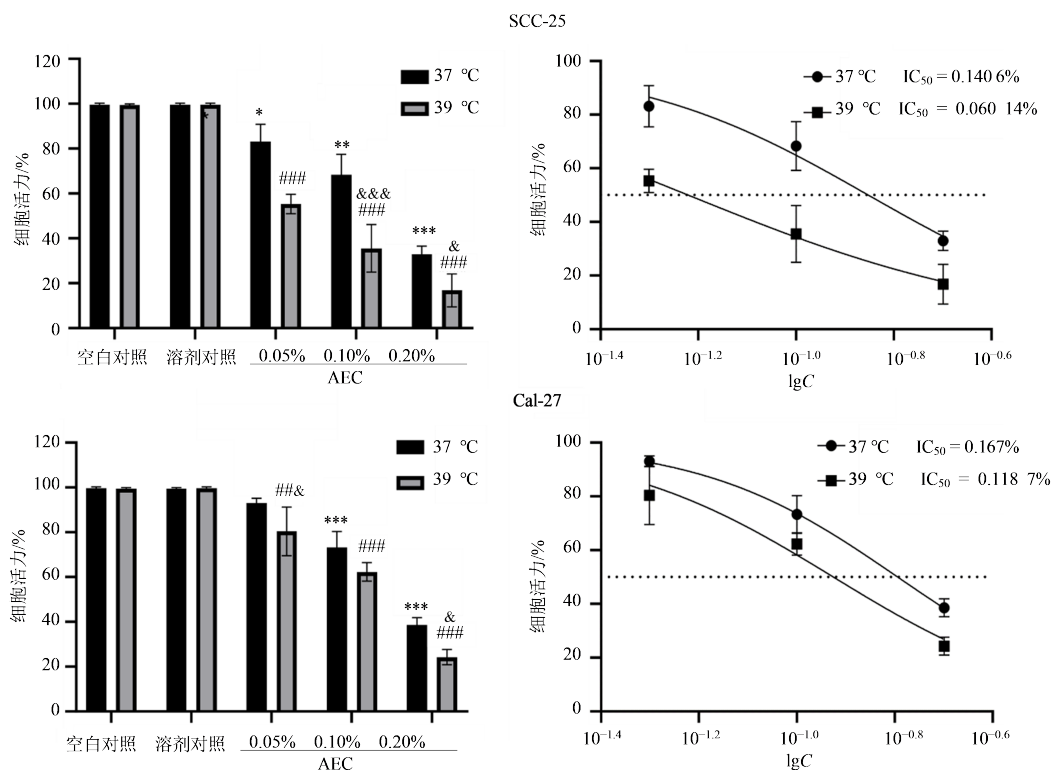
3 结果

3.1 AEC主要成分鉴定结果

前期气相色谱结果及(MassHunterAEC/Library/NIST14.L)数据库显示AEC的主要成分为丁香酚、其次为丁香油烯和乙酸丁香酚酯,其中丁香酚的占比为2.3%^[18]。

3.2 AEC在39℃下对OSCC细胞增殖的影响

CCK-8结果显示AEC对OSCC具有抑制作用,呈浓度相关性(图1)。通过CCK-8结果得出药物浓



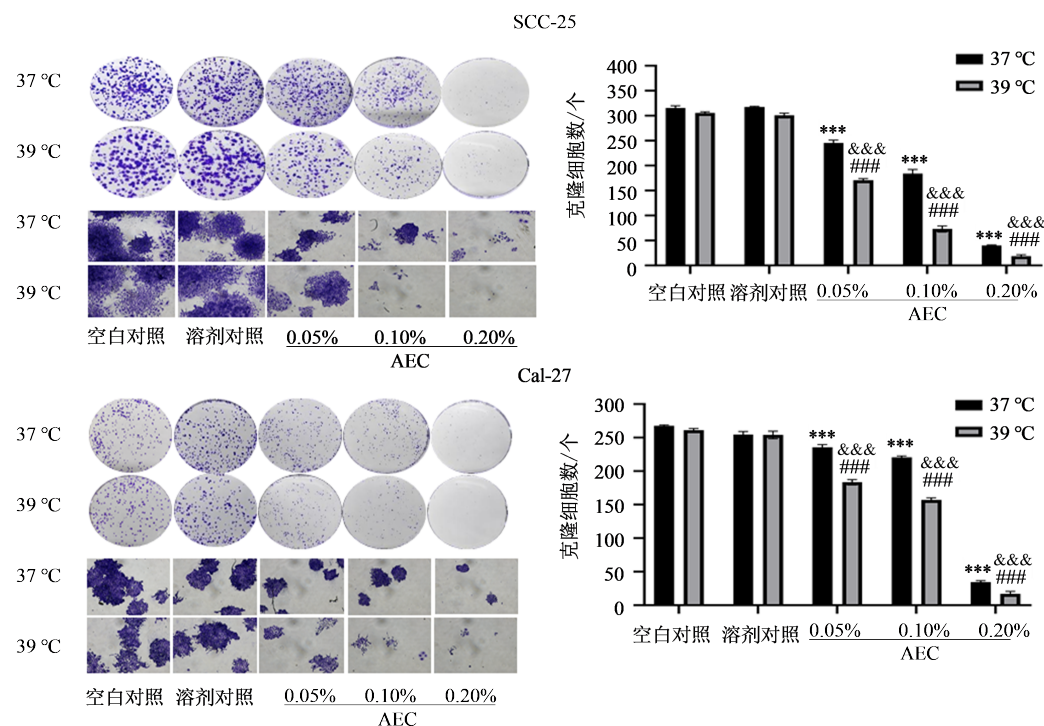
与37℃溶剂对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与39℃溶剂对照组比较: ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与39℃下同组比较: & $P < 0.05$ && $P < 0.001$.
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs 37℃ solvent control group; ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs 39℃ solvent control group; & $P < 0.05$ && $P < 0.001$ vs same group at 39℃.

图1 CCK-8法检测AEC对OSCC细胞增殖活性的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 1 Effect of AEC on proliferative activity of OSCC cell lines detected by CCK-8 assay ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

度-响应曲线,在37℃时半数抑制浓度(IC_{50})值在0.140 6%~0.167 0%,而在39℃时 IC_{50} 值在0.060 14%~0.118 7%,说明AEC在39℃条件下具有协同作用($P<0.01$)。

克隆形成实验结果显示如图2,随着AEC浓度的增加,SCC-25及Cal-27的聚团能力明显减弱,细胞团明显变小,进一步验证图1结果,提示AEC能抑制OSCC细胞系的增殖($P<0.001$)。



与37℃溶剂对照组比较:*** $P<0.001$;与39℃溶剂对照组比较:### $P<0.001$;与39℃下同组比较:&### $P<0.001$ 。
*** $P<0.001$ vs 37℃ solvent control group; ### $P<0.001$ vs 39℃ solvent control group; &### $P<0.001$ vs same group at 39℃.

图2 平板克隆实验检测AEC对OSCC细胞系克隆形成的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6, \times 10$)

Fig. 2 Effect of AEC on clone formation in OSCC cell lines detected by plate cloning assay ($\bar{x}\pm s$, $n=6, \times 10$)

3.3 AEC联合39℃对OSCC细胞系SCC-25、Cal-27迁移的影响

随着AEC浓度增加,与0 h相比,72 h后在不同温度下SCC-25、Cal-27细胞系的细胞迁移率在0.02%时均无明显变化,说明AEC对OSCC细胞系的迁移有抑制作用,呈浓度相关性($P<0.001$)。当37℃与39℃在72 h后的划痕愈合率相比显著差异($P<0.001$)。AEC联合39℃时对SCC-25、Cal-27细胞系的迁移能力抑制更明显。说明AEC与39℃联合使用时,具有协同作用,如图3。

3.4 AEC对OSCC细胞系形态及凋亡影响

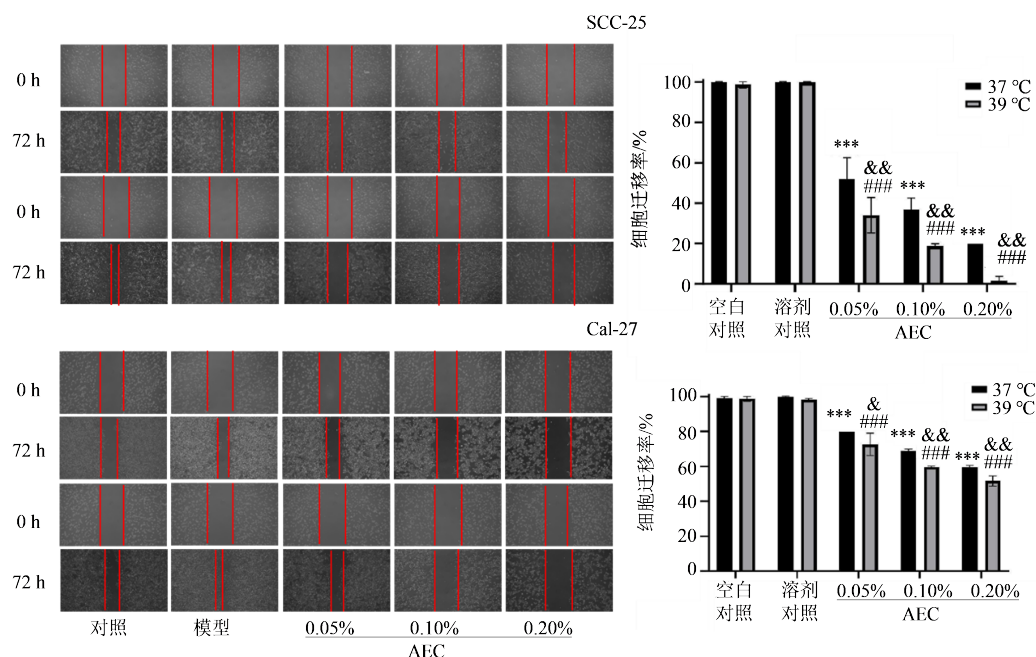
为研究AEC对SCC-25、Cal-27癌细胞系凋亡是否有影响,使用不同浓度AEC对SCC-25、Cal-27处理72 h后,如图4所示,与对照组相比,随着浓度的增加SCC-25、Cal-27细胞系的细胞数量及形态发生变化,由上皮状菱形细胞变小变圆或不规则梭形。使用Hoechst 33342进一步检测时,发现细胞核出现亮蓝色凋亡小体及核碎裂等现象。Annexin V/FITC

染色实验也进一步验证了Hoechst 33342的结果,提示AEC可诱导SCC-25、Cal-27细胞系凋亡,见图5。

4 讨论

口腔癌是头颈部常见的恶性肿瘤之一,不仅影响外观,而且影响饮食,甚至危及生命。口腔癌的临床治疗主要包括手术、放疗和化疗。然而,治疗效果和不良反应仍然是临床治疗中需要继续研究和解决的主要问题^[20]。

肿瘤细胞在无限增殖中进行程序性死亡^[21-22],因此维持细胞增殖是肿瘤细胞的基本特征之一^[23-24]。相关研究表明抑制肿瘤细胞的增殖及迁移可能促进细胞凋亡进而抑制其生长^[25-27]。近年来,多个研究表明中药联合化疗药物抗肿瘤已成为一种新型治疗方式,其优点如显著抑制肿瘤细胞生长,促进细胞凋亡^[28],降低化疗药物耐药性^[29]等。丁香作为传统香料及中药之一,具有温中降逆、可缓解胃部疼痛的效果。现代药理学研究表明丁香富含多种活性成分^[30-31],具有抗菌抗炎^[9,15]、降糖、抗



与37℃溶剂对照组比较:*** $P < 0.001$;与39℃溶剂对照组比较:### $P < 0.001$;与39℃下同组比较:& $P < 0.05$ && $P < 0.01$ 。

*** $P < 0.001$ vs 37 °C solvent control group; ### $P < 0.001$ vs 39 °C solvent control group; & $P < 0.05$ && $P < 0.01$ vs same group at 39 °C.

图3 划痕实验检测AEC对OSCC细胞系迁移能力的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 3 Effect of AEC on tmigratory ability of OSCC cell lines detected by scratch assay ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

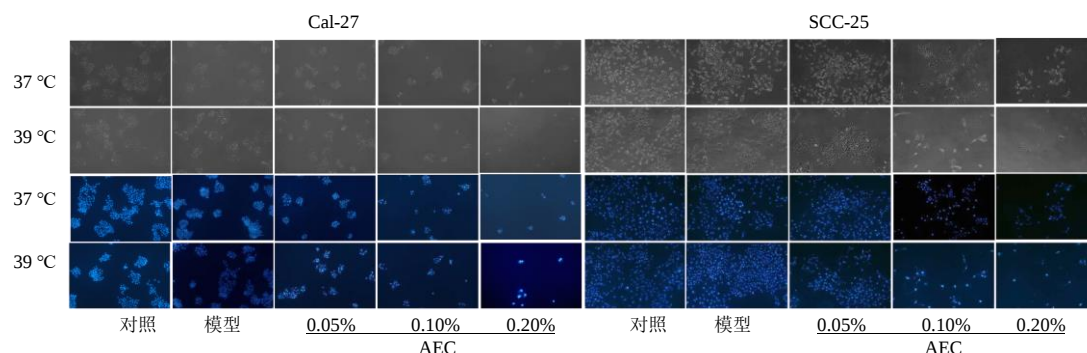
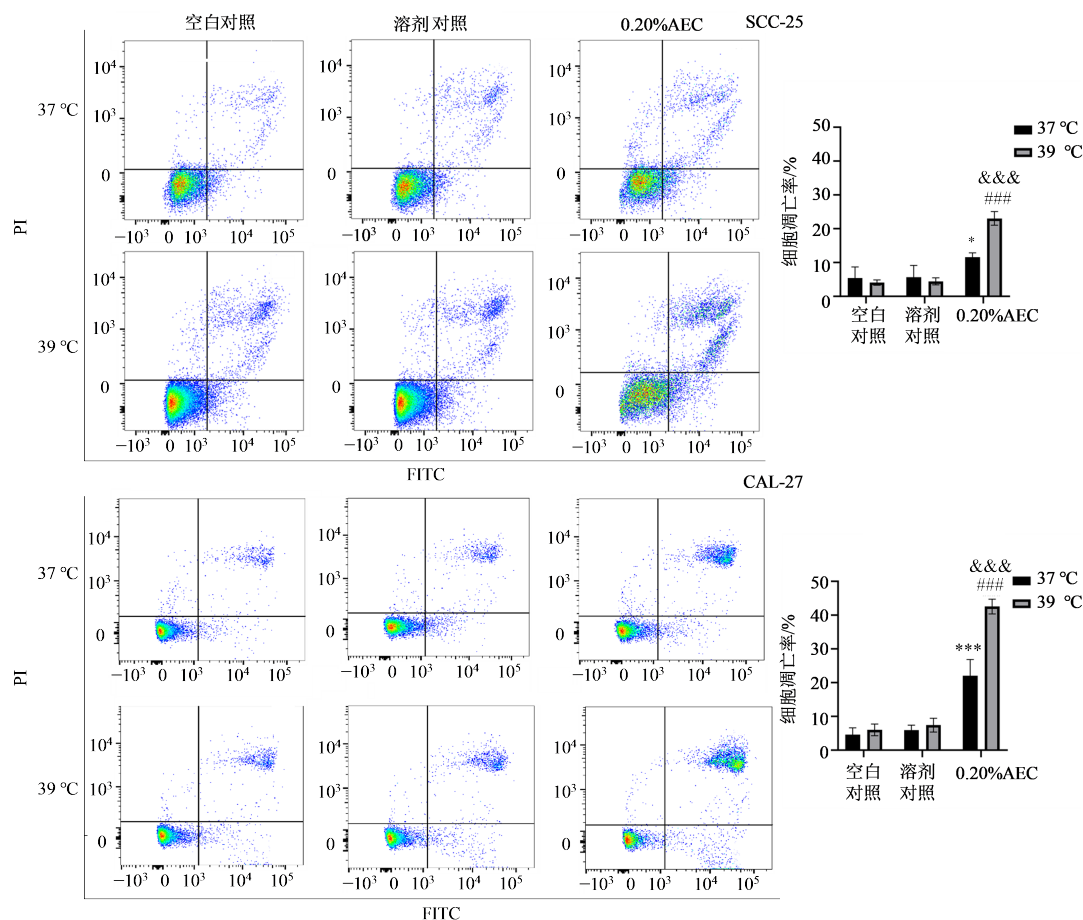


图4 Hoechst 33342染色对OSCC细胞系凋亡的影响($\times 10$)

Fig. 4 Effect of Hoechst 33342 staining on apoptosis in OSCC cell lines ($\times 10$)

肿瘤^[14,32-33]等作用。本研究利用不同浓度AEC对OSCC细胞系SCC-25和Cal-27进行72 h处理,并观察其对细胞增殖、克隆形成和迁移的影响。实验结果显示,AEC对这2种癌细胞系的增殖能力有明显抑制作用,且呈浓度相关性。此外还观察到AEC对OSCC细胞系的克隆形成能力产生影响,随着AEC浓度的增加,细胞团的大小逐渐减小,说明AEC可能影响癌细胞的增殖和聚集能力。然而本研究对相关调控细胞增殖信号通路验证待进一步完善,但有报道称AEC可能通过PI3K/Akt/mTOR等通路抑制肿瘤细胞的增殖^[16],本研究后续将对相关调控肿瘤细胞增殖信号进行验证及开发,为AEC治疗肿瘤提供相关实验依据。

细胞凋亡在生物体内起重要调控作用,当肿瘤细胞凋亡与肿瘤增殖失衡会导致肿瘤细胞无限增殖,促进肿瘤细胞的形成与发展^[24]。研究表明促进肿瘤细胞凋亡可抑制肿瘤细胞的生长^[25]。本研究通过Hoechst染色验证AEC对OSCC细胞系的影响,发现SCC-25及Cal-27细胞系细胞核出现亮蓝色凋亡小体及核碎裂等特征,采用流式细胞术进一步验证了AEC对OSCC细胞系凋亡的影响。表明AEC可能通过诱导细胞凋亡来抑制OSCC的生长和转移,这为AEC作为OSCC治疗的潜在机制提供了重要实验支持。但本研究缺乏相关分子验证,将在后续实验中验证凋亡相关基因及蛋白,如B淋巴细胞瘤-2基因(Bcl-2)、兔抗人单克隆抗体(BAX)、



与37 °C溶剂对照组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$; 与39 °C溶剂对照组比较: ### $P < 0.001$; 与39 °C下同组比较: &&& $P < 0.001$ 。
* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs 37 °C solvent control group; ### $P < 0.001$ vs 39 °C solvent control group; &&& $P < 0.001$ vs same group at 39 °C.

图5 流式细胞术检测AEC对口腔鳞状细胞癌细胞系凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Effect of AEC on apoptosis in OSCC cell lines detected by flow cytometry ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(Caspase)等,为AEC治疗肿瘤提供相关分子依据。

热治疗是一种利用高温对肿瘤细胞进行杀伤的治疗方法,高温可以直接破坏肿瘤细胞的结构和功能^[34-35],导致细胞凋亡或坏死,从而达到治疗肿瘤的目的。近年来,热治疗在治疗肿瘤上取得新的治疗进展,如增加化疗药物敏感^[36]等作用。如本研究图1~4所示,发现AEC与39 °C联合作用时,表现出更强的抗癌效果,说明39 °C与AEC具有协同作用,进一步验证了热治疗对药物的增敏作用,然而大部分化疗药物具有耐药性及毒副作用^[37]。丁香作为一种安全无毒的药物,与热治疗的联合应用为临床治疗提供了新的治疗思路。

本研究结果表明AEC联合39 °C对OSCC细胞系的增殖、克隆形成和迁移均具有抑制协同作用,可能通过调控细胞增殖、迁移和凋亡相关信号通路来发挥其抗癌作用。然而,尚需进一步研究其具体

的分子机制和临床应用前景,以更好地开发AEC作为OSCC治疗的潜力。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] César R. Essentials of oral cancer [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(9): 11884-11894.
- [2] Day T A, Davis B K, Gillespie M B, et al. Oral cancer treatment[J]. Current treatment options in oncology, 2003, 4: 27-41.
- [3] Dewey W C. Arrhenius relationships from the molecule and cell to the clinic [J]. Int J Hyperthermia, 1994, 10(4): 457-483.
- [4] Genet S C, Fujii Y, Maeda J, et al. Hyperthermia inhibits homologous recombination repair and sensitizes cells to ionizing radiation in a time- and temperature-dependent manner [J]. J Cell Physiol, 2013, 228(7): 1473-1481.
- [5] Krawczyk P M, Eppink B, Essers J, et al. Mild hyperthermia inhibits homologous recombination, induces BRCA2 degradation, and sensitizes cancer cells

- to poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibition [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(24): 9851-9856.
- [6] Thrall D E, LaRue S M, Yu D H, et al. Thermal dose is related to duration of local control in canine sarcomas treated with thermoradiotherapy [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(14): 5206-5214.
- [7] Jones E L, Oleson J R, Prosnitz L R, et al. Randomized trial of hyperthermia and radiation for superficial tumors [J]. J Clin Oncol, 2005, 23(13): 3079-3085.
- [8] Dewhirst M W, Vujaskovic Z, Jones E, et al. Re-setting the biologic rationale for thermal therapy [J]. Int J Hyperthermia, 2005, 21(8): 779-790.
- [9] Zhu S M, Wang J G, Xie B K, et al. Culture at a higher temperature mildly inhibits cancer cell growth but enhances chemotherapeutic effects by inhibiting cell-cell collaboration [J]. PLoS One, 2015, 10(10): e0137042.
- [10] Gao X, Zhang K Y, Zhou H Y, et al. at elevated temperatures, heat shock protein genes show altered ratios of different RNAs and expression of new RNAs, including several novel *HSPB1* mRNAs encoding HSP27 protein isoforms [J]. Exp Ther Med, 2021, 22(2): 900.
- [11] Falk M H, Issels R D. Hyperthermia in oncology [J]. Int J Hyperthermia, 2001, 17(1): 1-18.
- [12] Akhtar M F, Saleem A, Rasul A, et al. Anticancer natural medicines: An overview of cell signaling and other targets of anticancer phytochemicals [J]. Eur J Pharmacol, 2020, 888: 173488.
- [13] Lee T Y, Tseng Y H. The potential of phytochemicals in oral cancer prevention and therapy: A review of the evidence [J]. Biomolecules, 2020, 10(8): 1150.
- [14] Liu H Z, Schmitz J C, Wei J T, et al. Clove extract inhibits tumor growth and promotes cell cycle arrest and apoptosis [J]. Oncol Res, 2014, 21(5): 247-259.
- [15] Tu Z, Moss-Pierce T, Ford P, et al. *Syzygium aromaticum* L. (Clove) extract regulates energy metabolism in myocytes [J]. J Med Food, 2014, 17(9): 1003-1010.
- [16] Liu M H, Zhao G, Zhang D, et al. Active fraction of clove induces apoptosis via PI3K/Akt/mTOR-mediated autophagy in human colorectal cancer HCT-116 cells [J]. Int J Oncol, 2018, 53(3): 1363-1373.
- [17] 秦振伟, 廖德仲. 丁香酒精粗提取物在 39°C 条件下对 PANC-1 细胞生物学行为的影响 [J]. 生物医学, 2023, 13(2): 273-281.
- Qin Z W. Effect of crude extract of clove alcohol on the biological behaviour of PANC-1 cells at 39°C [J]. Hans Journal of Biomedicine, 2023, 13(2): 273-281.
- [18] 龚盈盈, 谢玲, 朱圣明, 等. 丁香提取物对放射抗拒食管癌细胞的体外抗肿瘤作用及机制研究 [J]. 华西医学, 2021, 36(1): 66-75.
- Gong Y Y, Xie L, Zhu S M, et al. *In vitro* anti-tumor effect and mechanism of clove extracts against radioresistant esophagus cancer cell [J]. West China Med J, 2021, 36(1): 66-75.
- [19] Martínez-Herrera A, Pozos-Guillén A, Ruiz-Rodríguez S, et al. Effect of 4-allyl-1-hydroxy-2-methoxybenzene (eugenol) on inflammatory and apoptosis processes in dental pulp fibroblasts [J]. Mediators Inflamm, 2016, 2016: 9371403.
- [20] Liu C, Wang M, Zhang H Y, et al. Tumor microenvironment and immunotherapy of oral cancer [J]. Eur J Med Res, 2022, 27(1): 198.
- [21] Lauber K, Herrmann M. Tumor biology: With a little help from my dying friends [J]. Curr Biol, 2015, 25(5): R198-R201.
- [22] Ford C A, Petrova S, Pound J D, et al. Oncogenic properties of apoptotic tumor cells in aggressive B cell lymphoma [J]. Curr Biol, 2015, 25(5): 577-588.
- [23] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: The next generation [J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.
- [24] Evan G I, Vousden K H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer [J]. Nature, 2001, 411(6835): 342-348.
- [25] Wang W T, Zhu M Y, Xu Z X, et al. Ropivacaine promotes apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through damaging mitochondria and activating caspase-3 activity [J]. Biol Res, 2019, 52(1): 36.
- [26] 华敏, 张伟丽. 虎杖苷对 AML 细胞增殖、迁移、侵袭及肿瘤生长的影响 [J]. 中国药房, 2024, 35(6): 701-706.
- Hua M, Zhang W L. Effects of polydatin on the cell proliferation, migration, invasion and tumor growth of AML [J]. China Pharm, 2024, 35(6): 701-706.
- [27] Wan G Q, Liu Y H, Zhu J, et al. SLFN5 suppresses cancer cell migration and invasion by inhibiting MT1-MMP expression via AKT/GSK-3 β / β -catenin pathway [J]. Cell Signal, 2019, 59: 1-12.
- [28] Yang Y T, Yuan L, Wang K L, et al. The role and mechanism of *Paeoniae Radix alba* in tumor therapy [J]. Molecules, 2024, 29(7): 1424.
- [29] Huang S Q, Peng W J, Mao D, et al. Kangai injection, a traditional Chinese medicine, improves efficacy and reduces toxicity of chemotherapy in advanced colorectal cancer patients: A systematic review and meta-analysis [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 2019: 8423037.
- [30] Batiha G E, Alkazmi L M, Wasef L G, et al. *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae): Traditional uses, bioactive chemical constituents, pharmacological and toxicological activities [J]. Biomolecules, 2020, 10(2): 202.

- [31] Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, et al. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (Syzigium Aromaticum L. Myrtaceae): A short review [J]. *Phytother Res*, 2007, 21 (6): 501-506.
- [32] Li C, Xu H L, Chen X L, et al. Aqueous extract of clove inhibits tumor growth by inducing autophagy through AMPK/ULK pathway [J]. *Phytother Res*, 2019, 33(7): 1794-1804.
- [33] Zari A T, Zari T A, Hakeem K R. Anticancer properties of eugenol: A review [J]. *Molecules*, 2021, 26(23): 7407.
- [34] Dietzel F. *Basic principles in hyperthermic tumor therapy* [M]//Recent Results in Cancer Research. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1983: 177-190.
- [35] Overgaard J. The current and potential role of hyperthermia in radiotherapy [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1989, 16(3): 535-549.
- [36] Arjona-Sánchez A, Espinosa-Redondo E, Gutiérrez-Calvo A, et al. Efficacy and safety of intraoperative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy for locally advanced colon cancer: A phase 3 randomized clinical trial [J]. *JAMA Surg*, 2023, 158(7): 683-691.
- [37] Barabas K, Milner R, Lurie D, et al. Cisplatin: A review of toxicities and therapeutic applications [J]. *Vet Comp Oncol*, 2008, 6(1): 1-18.

[责任编辑 齐静雯]