

Research progress of hinokitiol

Dong Liu Junyi Hu

University of Science and Technology Liaoning, Anshan, Liaoning, 114000, China

Abstract

Hinokitiol is a type of natural organic compound in nature, belonging to tropolone-type monoterpenoids. It exhibits strong biological activities, such as anticancer, antibacterial, anti-inflammatory, and neuroprotective effects, thus becoming a research hotspot in the field of natural drug development in recent years. With the advancement of research in recent years, the research progress of hinokitiol in various fields has also been frequently reported. This article reviews the recent research progress on the biological activities of hinokitiol, summarizes various experimental methods, results, and mechanisms of action. It is intended to facilitate the further research on hinokitiol and provide references and new ideas for its further application in the fields of cosmetics, food preservation, agriculture, and medicine.

Keywords

hinokitiol; Biological activity; research progress

扁柏醇研究进展

刘冬 胡君一

辽宁科技大学, 中国 · 辽宁 鞍山 114000

摘 要

扁柏醇是自然界中的一类天然有机化合物, 属于卓酚酮类单萜化合物。扁柏醇具有很强的生物活性, 如抗癌、抑菌、抗炎、以及神经保护等。因此也成为了近年来天然药物研发领域的热点。近年来, 随着研究的推进, 扁柏醇在各类领域的研究进展也被频繁报道, 本文章综述了近年来扁柏醇生物生物活性的研究进展, 总结了各类试验方法以及结果过和作用机制, 以便后续对扁柏醇的进一步研究, 也为扁柏醇在化妆品、食品保鲜、农业以及医药领域的进一步应用提供参考和新思路。

关键词

扁柏醇; 生物活性; 研究进展

1 引言

扁柏醇又称桉木醇、扁柏酚, 分子式为 $C_{10}H_{12}O_2$, 分子量为 164.20, 是一种集抗菌性、抗氧化性、可激活修复细胞, 同时又具有美白功效于一身的多功能生物活性化合物。高纯度扁柏醇为白色结粉末, 易溶于乙醇等有机溶剂, 难溶于水, 熔点 $50\sim 52^{\circ}\text{C}$ 最早是由日本的科学家 Anderson 于 1948 年从台湾扁柏的树干中提取的一种具有卓酚酮骨架的单萜类的天然化合物, 属托酚酮类化合物。扁柏醇作为台湾扁柏精油的主要成分, 是一种高安全性植物成分, 拥有丰富的生物活性。它不仅具备良好保湿性, 还能显著的驱避害虫, 是理想的天然抗菌与防虫剂。该成分杀菌能力突出, 对一般细菌的最小抑菌浓度达 $10\sim 100\text{ppm}$; 且气味芬芳、使用效果佳, 可有效杀灭空气中的细菌、阻挡害虫对人体的侵害, 并抑制人类病原菌活性。近年来, 随着研究发展, 扁柏醇的抗癌、抗炎、

神经保护等作用也被频繁报道。本文综述了扁柏醇在抑菌、抗癌、神经保护等领域的研究, 并汇总其作用机制, 为接下来对扁柏醇的进一步研究与应用提供一定的参考。

2 生物活性研究进展

2.1 抑菌作用

扁柏醇作为一种天然化合物, 对周围环境影响小且能有效防治多种真菌病害。Zhang 等^[1]探讨了扁柏醇对胶孢炭疽菌的抑制作用以及抑菌的机理。经扁柏醇处理后, 芒果炭疽病菌对采后芒果的毒性显著降低。经实验发现, 当扁柏醇浓度达到 8mg/L 时, 可完全抑制胶孢炭疽菌的菌丝生长, 当扁柏醇浓度达到 9mg/L 时, 培养 9h 后, 胶孢霉孢子萌发率降低至 2.43%。扁柏醇通过对细菌细胞膜产生影响, 降低细胞生存能力, 膜损伤后导致细胞质内容物如核酸、蛋白质和可溶性碳水化合物渗漏, 最终使细胞膜结构遭到破坏。此外, 扁柏醇还可抑制致病基因的表达, 降低其感染能力。这些结果表明, 扁柏醇可作为一种抑制芒果炭疽病的生物杀菌剂。

【作者简介】刘冬 (2000—), 男, 中国辽宁大连人, 在读硕士, 从事生物工程研究。

大肠杆菌、枯草芽孢杆菌,是化脓感染中常见的病原菌,可引起局部化脓感染、当菌群在肠道中比例失衡拮抗情况下,还会引起一系列的肠道疾病,对我们的身体健康有着较大影响。周浓林等^[2]采用滤纸片扩散法测定了扁柏醇和托酚酮对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径、最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)。结果表明,扁柏醇和托酚酮均对供试菌种有抑制作用,扁柏醇对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的MIC分别为300和100 $\mu\text{g/mL}$,MBC均为300 $\mu\text{g/mL}$;托酚酮对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌的MIC分别为100和50 $\mu\text{g/mL}$,MBC分别为300和100 $\mu\text{g/mL}$ 。并通过不同浓度的扁柏醇和托酚酮对供试菌的抑制作用比较,推测其活性基团为羟基和酮基。由此可见,扁柏醇可作为一种抑菌剂来对大肠杆菌和枯草芽孢杆菌产生抑制。

念珠菌是一种真菌,通常存在于人体的口腔、肠道、和皮肤上,属于正常菌群的一部分。然而,当念珠菌数量过多或人体免疫力下降时,可能会过度生长并导致感染。Dae Jin Kim等^[3]的研究证明了扁柏醇具有抑制念珠菌生物膜形成的能力。通过XTT测定定量生物膜代谢活性来评估扁柏醇对念珠菌生物膜形成的抑制能力。实验结果表明,扁柏醇可有效地阻止念珠菌属氟康唑敏感菌株和氟康唑耐药菌株的生物膜形成。通过实时RT-PCR测定了与白色念珠菌细胞生物膜发育相关的特定基因的表达水平。经扁柏醇处理后,粘附过程相关的基因HWP1和ALS3的表达水平有所下降,并且负责长期菌丝维持的UME6和HGC1的转录水平也在扁柏醇处理过后有所下降。扁柏醇可抑制编码菌丝形成信号通路成分cAMP-PKA的CYR1的表达水平。其上游的调节因子RAS1也会被扁柏醇抑制。这些结果表明,扁柏醇在抑制白色念珠菌的生长繁殖具有潜力,具有成为抗念珠菌药物的研发前景。

2.2 抗癌作用

肺癌特别是肺腺癌,是当前导致癌症患者死亡的主要原因之一,传统的治疗肺腺癌的主要方式为手术、放疗和化疗,但有较高的复发率。越来越多的研究表明,草药化合物对于癌症的治疗具有极佳的发展前景,据报道天然扁柏醇对肺癌细胞系H1975有显著的治疗效果。杜敏娟等^[4]研究了扁柏醇联合氯喹对人肺腺癌细胞系H1975的影响。在毒性检测实验中,用MTT法检测扁柏醇和氯喹处理对H1975细胞活力的影响,并且通过蛋白质迁移实验,检测扁柏醇对细胞凋亡相关蛋白Cleaved PARP、Cleaved Caspase-3和Bax表达的影响。结果表明,经2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 的扁柏醇处理24 h后,H1975细胞活力以剂量依赖性的方式逐渐降低,经扁柏醇处理后,与凋亡相关蛋白Cleaved PARP、Cleaved Caspase-3和Bax的表达均有所提高。当经扁柏醇与氯喹共同处理后的H1975细胞的活力较扁柏醇单一处理组的细胞活力降低更为显著,并且凋亡相关蛋白Cleaved PAR和Caspase-3增加更为明显。最终得出结,扁柏醇可使H1975

细胞凋亡,并且氯喹可促进扁柏醇对H1975细胞的影响。

宫颈癌是全球最常见的癌症之一,也是导致女性癌症相关死亡的主要原因。Chih-Chun Wang等^[5]在探讨扁柏醇在人宫颈癌治疗中的抗肿瘤活性的研究中发现,扁柏醇以剂量依赖性方式降低细胞存活率。在细胞周期实验中,通过流式细胞仪检测,结果表明经扁柏醇处理导致细胞周期停滞在G1期,而G2/M期细胞数量减少。Western blot实验结果进一步表明,经扁柏醇处理后可提高p53和p21蛋白的表达水平,同时降低细胞周期调节蛋白的表达。此外,扁柏醇以剂量依赖性方式增加了自噬调节剂、beclin 1和微管相关蛋白1轻链3(LC3-II)的积累;然而,它不会诱导半胱天冬酶-3激活和聚ADP核糖聚合酶(PARP)裂解。此外,扁柏醇显著抑制表皮生长因子诱导的细胞迁移和c-Jun N末端激酶(JNK)和黏着斑激酶(FAK)磷酸化。最终研究结果表明,可有效抑制宫颈癌细胞的繁殖,具有成为抗宫颈癌药物的潜力。

结肠癌是世界上第三常见的癌症,饮食被认为是导致其发生最重要的因素。结肠癌的化疗药物疗效有限,常常产生不良副作用。Youn-Sun Lee等人^[6]探究了扁柏醇对人结肠癌细胞的生长抑制作用,并揭示了其抑制结肠癌细胞生长的作用机理。根据实验结果显示,在毒性检测实验中得出,人结肠癌细胞株HCT-116和SW-620对扁柏醇敏感度相近,半数抑制浓度(IC₅₀)分别为4.5 μM 和4.4 μM 。通过流式细胞仪分析,扁柏醇可诱导结肠癌细胞发生S期阻滞,并且显著降低细胞周期调控蛋白cyclin A、cyclin E和Cdk2的表达,同时上调Cdk抑制剂p21的表达。在凋亡相关机制方面,扁柏醇能下调抗凋亡蛋白Bcl-2的表达,上调促凋亡蛋白Bax以及切割型caspase-9和caspase-3的表达。动物实验中,对分别接种HCT-116和SW-620细胞的雄性BALB/c裸鼠口服给予100 mg/kg扁柏醇,与对照组相比,给药组小鼠的肿瘤体积和肿瘤重量均显著降低。根据实验结果表明,扁柏醇可通过诱导细胞周期阻滞和凋亡,从而抑制人结肠癌细胞生长及小鼠异种移植肿瘤形成。因此有成为结肠癌治疗候选药物潜力与发展前景。

2.3 抗炎作用

Takumi Hiyoshi等^[7]研究了扁柏醇对实验性牙周炎小鼠牙周骨质流失的影响,并评价了其体外抗炎活性。实验通过在小鼠上颌第二磨牙周围扎丝结扎诱导牙周炎8d。并在结扎磨牙的腭龈内每天注射一次扁柏醇,连续7d。然后对上颌第二磨牙的牙周骨损失进行形态测量,并对磨牙周围抗酒石酸酸性磷酸酶阳性的多核巨细胞数量进行量化。通过计数菌落数,计算结扎丝的细菌负荷,通过实时荧光定量PCR检测腭龈促炎细胞因子相关基因的转录水平。结果表明,局部应用扁柏醇可明显抑制牙结扎引起的牙槽骨丢失和破骨细胞分化。此外,在体外和体内实验中,经扁柏醇处理可降低细菌负荷,下调了炎症细胞因子相关基因的mRNA表达

水平。

2.4 神经保护作用

Thanasekaran Jayakumar 等^[8]研究了扁柏醇对大鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)诱导的血栓栓塞性脑卒中的神经保护作用 and 机制。在 MCAO 剂量前 30min 用扁柏醇治疗,以计量依赖性的方式减轻脑缺血并改善脑缺血大鼠的神经行为缺陷。与对照组大鼠相比,腹膜内施用扁柏醇,梗死面积显着减小。这项研究首次证明,扁柏醇不仅是最初的被认为是抑制微生物和各种癌症的药物外,还具有强大的神经保护活性。这种活性部分通过抑制炎症反应(即 HIF-1 α , iNOS 表达)和细胞凋亡(即 TNF- α , 活性 caspase-3)介导,导致脑缺血大鼠的梗死体积减少和神经行为改善。因此,扁柏醇在治疗或预防缺血再灌注损伤相关疾病方面有着美好的发展前景。

创伤性脑损伤(TBI)是一个严重的公共健康问题,具有高发病率、高致残率和高死亡率等特点。Hongxing Tang 等^[9]研究了扁柏醇对创伤性脑损伤后神经元铁死亡的影响并对作用机制进行探究。实验使用受控皮质撞击(CCI)小鼠模型和过量谷氨酸处理的 HT-22 细胞为研究对象。实验结果表明,扁柏醇可减轻 TBI 脑组织病变,并可显着改善神经功能。经扁柏醇给药后神经元丢失和铁沉积的现象得到改善。扁柏醇还可减小过量的谷氨酸诱导的细胞内活性氧(ROS)、脂质过氧化和 HT-22 中 Fe²⁺ 积累。从机制上讲,扁柏醇上调血红素加氧酶-1(HO-1)的表达,促进核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)核易位。这些结果表明,扁柏醇可拯救 TBI 诱导的神经元铁死亡中的细胞,具有神经保护作用,因此扁柏醇具有成为神经保护类药物的潜力。

3 结语

近年来,无论是在抑菌剂的研制,还是在药物的开发领域,均向着低毒性、低毒副作用的方向发展,大量的研究证明了天然药物的治疗效果,毒性更低,副作用更少。如今,随着研究的推进,扁柏醇的获取不再是通过提取的方式获取,大量的合成方法的出现也大大降低了扁柏醇的获取的难度,在不断的对合成方法改进的过程中,获得的产物产量大,纯度更高,相信在不久的将来,扁柏醇的会投入到工业生产中。随着扁柏醇获取难度的降低,对扁柏醇的研究将更加深入,并且应用的领域也会更加的广泛,也将大力推动抑菌制剂的研发,以及抗癌、神经保护类药物的研制。

参考文献

- [1] Zhang, S., Wang, J., Sun, H. et al. Inhibitory effects of hinokitiol on the development and pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides*. *World J Microbiol Biotechnol* 39, 356 (2023).
- [2] 周浓林,于泉林,武宝悦,等.扁柏醇与托酚酮抑菌活性的初步研究[J].湖北农业科学,2012,51(11):2230-2232+2273.DOI:10.14088/j.cnki.issn0439-8114.2012.11.039.
- [3] Kim DJ, Lee MW, Choi JS, Lee SG, Park JY, et al. (2017) Inhibitory activity of hinokitiol against biofilm formation in fluconazole-resistant *Candida* species. *PLOS ONE* 12(2): e0171244.
- [4] 杜敏娟,徐晓光,刘瑞琦,等.扁柏醇联合氯喹对人肺腺癌细胞凋亡的影响[J].肿瘤防治研究,2015,42(10):970-973.
- [5] Wang CC, Chen BK, Chen PH, et al. Hinokitiol induces cell death and inhibits epidermal growth factor-induced cell migration and signaling pathways in human cervical adenocarcinoma. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2020 Sep;59(5):698-705. doi: 10.1016/j.tjog.2020.07.013. PMID: 32917321.
- [6] Lee YS, Choi KM, Kim W, Jeon YS, Lee YM, Hong JT, Yun YP, Yoo HS. Hinokitiol inhibits cell growth through induction of S-phase arrest and apoptosis in human colon cancer cells and suppresses tumor growth in a mouse xenograft experiment. *J Nat Prod.* 2013 Dec 27;76(12):2195-202. doi: 10.1021/np4005135. Epub 2013 Dec 5. PMID: 24308647.
- [7] Hiyoshi T, Domon H, Maekawa T, et al. Protective effect of hinokitiol against periodontal bone loss in ligature-induced experimental periodontitis in mice. *Arch Oral Biol.* 2020 Apr;112:104679. doi: 10.1016/j.archoralbio.2020.104679. Epub 2020 Feb 7. PMID: 32062102.
- [8] Jayakumar T, Hsu WH, Yen TL, et al. Hinokitiol, a natural tropolone derivative, offers neuroprotection from thromboembolic stroke in vivo. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:840487. doi: 10.1155/2013/840487. Epub 2013 Oct 27. PMID: 24285977; PMCID: PMC3826376.
- [9] Tang H, He K, Zhao K, et al. Protective Effects of Hinokitiol on Neuronal Ferroptosis by Activating the Keap1/Nrf2/HO-1 Pathway in Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma.* 2024 Mar;41(5-6):734-750. doi: 10.1089/neu.2023.0150. Epub 2023 Dec 28. PMID: 37962273.