

网络出版时间: 2018-1-8 11:43 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180104.1310.010.html>

丹皮酚逆转内质网应激诱导的 HepG2 细胞凋亡抵抗

范璐璐¹, 孙国平¹, 查丽霞², 马 泰¹

摘要 目的 探讨丹皮酚逆转内质网应激诱导的 HepG2 肝癌细胞凋亡抵抗的作用机制。**方法** 采用 MTT 及末端双脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口标记技术(TUNEL)观察内质网应激诱导剂衣霉素对正常人肝细胞株 HL-7702 及人肝癌细胞株 HepG2 细胞的增殖抑制及凋亡作用; Western blot 法测定内质网应激诱导剂衣霉素对正常肝细胞 HL-7702 及肝癌细胞 HepG2 的环氧合酶-2(COX-2)表达的影响; 采用 Western blot 法及 TUNEL 法观察 COX-2 的选择性抑制剂塞来昔布对内质网应激下的肝癌细胞 HepG2 COX-2 的表达及凋亡的影响; 采用 MTT 及 TUNEL 法观察丹皮酚对内质网应激下的 HepG2 肝癌细胞的增殖抑制及凋亡作用; Western

2017-09-06 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81402040、81572430); 安徽省自然科学基金(编号: 1408085QH151)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院肿瘤内科, 合肥 230022

²安徽医科大学第四附属医院肿瘤内科, 合肥 230022

作者简介: 范璐璐, 女, 主治医师;

孙国平, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: sungp@ahmu.edu.cn

blot 法观察丹皮酚对内质网应激诱导的 HepG2 肝癌细胞 COX-2 表达的影响。**结果** 与正常肝细胞 HL-7702 相比, 在 TM 诱导的内质网应激作用下肝癌细胞 HepG2 的增殖抑制率及凋亡率减少($P < 0.05$), 并且内质网应激可诱导肝癌细胞 HepG2 产生 COX-2 蛋白。而丹皮酚可下调内质网应激诱导的 HepG2 肝癌细胞中 COX-2 的表达, 并使内质网应激诱导的肝癌细胞的凋亡增加。**结论** 丹皮酚可通过下调 COX-2 的表达从而逆转内质网应激诱导的 HepG2 肝癌细胞凋亡抵抗。

关键词 肝癌; 内质网应激; 环氧合酶-2; 细胞凋亡; 丹皮酚

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)01-0045-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.01.010

肝癌是临幊上常见的恶性肿瘤, 据最新统计, 全世界新发肝癌患者每年约 60 万, 居恶性肿瘤的第 5 位, 肝癌因此被称为“肿瘤之王”^[1-2]。有文献^[3-4]报道内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)诱导的凋亡抵抗是肝癌化疔耐药的重要原因之一,

Expression and purification of multidrug resistance related membrane protein MmpL6 of *Mycobacterium tuberculosis*

Cui Kele¹, Li Jing², Sun Anyuan¹

(¹Dept of Clinical Laboratories, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001;

²Dept of Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To construct the prokaryotic expression vector carrying *Mycobacterium tuberculosis* gene mmpL6 (rv1557), overexpress and purify the recombinant MmpL6 (Rv1557) protein in *Escherichia coli* (*E. coli*). **Methods** The DNA fragment of MmpL6 was amplified by polymerase chain reaction using the genomic DNA of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain as a template. The target gene was cloned into pET21b vector to construct the pET21b-MmpL6 expression plasmid, and then transformed into *E. coli* for protein expression. Recombinant protein expression was induced by isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) and detected by SDS-PAGE combined with Western blot. The overexpressed MmpL6 protein was purified by Ni-affinity chromatography and gel filtration chromatography. **Results** The recombinant pET21b-MmpL6 plasmid was successfully constructed and the highest expression level was obtained at 25 °C in Rosetta strain induced by IPTG. **Conclusion** The successful expression and purification of MmpL6 in *E. coli* lays the foundation for the further structure and function studies of the protein, and also provides clues to the design of anti-tuberculosis drugs targeting efflux pump proteins.

Key words *Mycobacterium tuberculosis*; efflux pump protein; prokaryotic expression; purification; affinity chromatography

因此阐明肝癌凋亡抵抗的机制,进而发现新的干预手段提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,最终达到延长患者生存期的作用。丹皮酚具有如解热、镇痛、抗炎等广泛的药理作用^[5-6]。许多文献^[7-9]报道了丹皮酚有抗肿瘤作用,其杀伤肿瘤细胞的主要机制是诱导凋亡,为了探讨丹皮酚在 ERS 诱导 HepG2 肝癌细胞凋亡抵抗中的作用及机制,该研究首先通过观察 ERS 诱导剂衣霉素(tunicamycin, TM) 对人肝细胞(HL-7702) 及肝癌细胞 HepG2 细胞的增殖抑制、凋亡差异及环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2) 蛋白表达的影响探讨 ERS 凋亡抵抗的机制,通过使用丹皮酚观察 ERS 下的 HepG2 肝癌细胞的增殖抑制、凋亡及 COX-2 蛋白表达影响,进而探讨丹皮酚逆转 ERS 诱导的 HepG2 肝癌细胞凋亡抵抗的机制。

1 材料与方法

1.1 试剂及药物 塞来昔布、MTT 购自美国 Sigma 公司; 丹皮酚注射剂购自上海第一制药厂; DMEM 培养基购自美国 Hyclone 生物公司; 新生牛血清购自杭州四季青生物工程公司; 原位末端凋亡检测试剂盒(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL) 剂盒购自美国罗氏公司; 免抗人 COX-2、葡萄糖调节蛋白(78 kD glucose regulated protein, GRP78) 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 鼠抗人 β -actin 抗体、山羊抗兔、抗小鼠二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 主要仪器 EL301 Strip reader 酶标仪(美国 Bio-Tek 公司); YJ-1450 型医学净化工作台(苏州净化设备公司); Image QuantTM LAS-4000 型发光成像系统(日本通用电气医疗集团生命科学部); DYY-40 (ECP3000) 电泳仪(北京六一仪器厂); 倒置式显微镜(日本 Olympus 光学工业株式会社); Nacpo-6100 CO₂ 培养箱(美国杜邦公司)。

1.3 细胞系 HL-7702 人肝细胞株和 HepG2 人肝癌细胞株购自中国科学院细胞库。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养方法 使用含 10% 血清的 DMEM 培养基培养细胞,将细胞放置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

1.4.2 细胞增殖抑制实验 将 1×10^4 /L 细胞接种于 96 孔板上,设置空白对照组和细胞对照组、不同药物组,每组设 6 个复孔,每孔接种 200 μ L 细胞,置 96 孔板于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱 24 h 后,弃上清液,药物组中每个孔加入使用 200 μ L DMEM 稀释

的不同浓度的药物,空白对照组和细胞对照组只加入 200 μ L 的 DMEM 培养,在结束培养前 4 h 每孔加入 20 μ L MTT 5 g/L,继续培养 4 h 后弃上清液,每个孔加入 150 μ L 的 DMSO,使用 EL301 Strip reader 酶标仪设定 570 nm 测定吸光值。按以下公式计算药物对细胞的增殖抑制率: 细胞的增殖抑制率(%) = (1 - 实验组吸光值 / 细胞组吸光值) × 100%。

1.4.3 TUNEL 将 1×10^5 /L 细胞接种于含有盖玻片的 6 孔板中,置 6 孔板于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h,弃上清液,加入不同浓度的药物作用细胞 24 h,取出 6 孔板中的盖玻片,实验同时设置阳性对照组和阴性对照组,使用 4% 多聚甲醛固定 30 min 后,按照 TUNEL 试剂盒说明书操作,使用 DAB 显色及苏木精染色后封片。在普通光镜下观察 TUNEL 染色标本,随机选取 6 个高倍视野,计算凋亡细胞占肿瘤细胞的比例即为凋亡指数。

1.4.4 Western blot 法 将细胞加入裂解液裂解 30 min 后离心,吸取上清液并使用 Lorry 法定量后加入蛋白上样缓冲液,将样本放入沸水煮 10 min 后将标本置于 -20 °C 冰箱保存; 实验经过电泳分离蛋白、转膜、封闭等步骤后将标本孵育一抗并放置于 4 °C 冰箱过夜。次日,将标本孵育二抗 2 h 再加入 ECL 化学发光试剂,利用发光成像系统显像,以目标蛋白/ β -actin 值反映目标蛋白的相对表达量。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计学软件对实验数据进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析或 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ERS 诱导剂 TM 对 HepG2 肝癌细胞和 HL-7702 肝细胞的增殖抑制及凋亡作用 使用 MTT 法观察不同浓度 TM(1.5、3、6、9、12 μ mol/L) 分别作用于 HepG2 肝癌细胞和 HL-7702 肝细胞 24 h 的增殖抑制率(图 1),结果显示在 TM 诱导的 ERS 作用下肝癌细胞 HepG2 的增殖抑制率并无明显增加,3 μ mol/L TM 作用 24 h 增殖抑制率仅达到($22.7 \pm 4.1\%$),而 HL-7702 正常肝细胞在相同浓度 TM 的作用下抑制率为($61.1 \pm 3.5\%$),差异有统计学意义($t = -12.444, P < 0.01$)。采用 TUNEL 染色法观察 3 μ mol/L TM 分别作用于 HepG2 和 HL-7702 细胞 24 h 后细胞形态学变化(图 2A、B),结果显示 HepG2 肝癌细胞组中,未使用 TM 处理的肝癌细胞组细胞增殖旺盛,仅见少许的凋亡细胞; 而使用 TM

作用24 h的HepG2肝癌细胞,仅见细胞密度稍减少和少量的凋亡细胞,凋亡率(15.2 ± 2.3)%;而在HL-7702细胞组中,TM处理组的HL-7702细胞密度增加,胞凋亡细胞数明显增加,凋亡率(57.2 ± 5.6),差异有

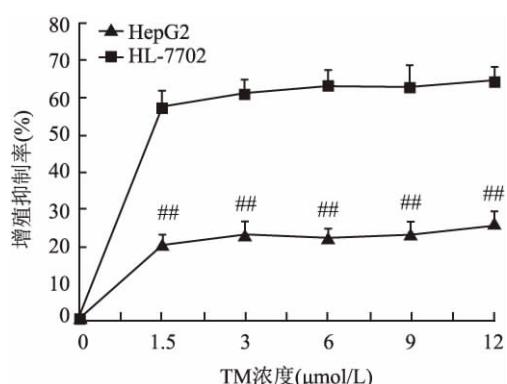


图1 TM诱导的ERS对HepG2和HL-7702细胞的增殖抑制率的影响
与同等浓度的TM处理的HL-7702组比较: ** $P < 0.01$

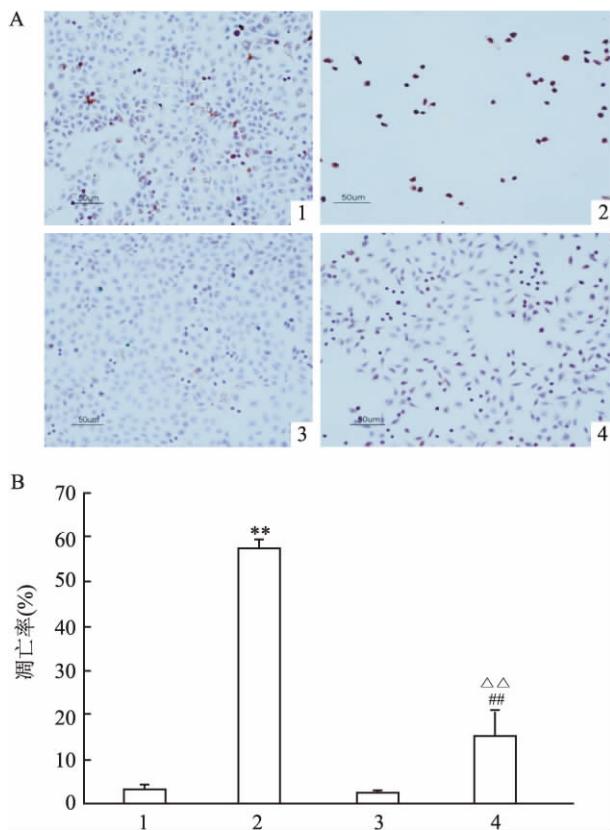


图2 TM诱导的ERS对HepG2和HL-7702细胞凋亡的影响

A: TM作用于HepG2和HL-7702细胞的凋亡的形态学变化(TUNEL法 $\times 400$);B: TM作用于HepG2和HL-7702细胞的凋亡率;1:未处理HL-7702组;2:TM处理的HL-7702组;3:未处理HepG2组;4:TM处理的HepG2组;与未处理组HL-7702组比较: ** $P < 0.01$;与未处理HepG2组比较: ## $P < 0.01$;与TM处理的HL-7702组比较: △△ $P < 0.01$

统计学意义($t = -12.201, P < 0.01$),提示与正常HL-7702肝细胞相比,肝癌细胞HepG2对ERS诱导的细胞凋亡相对耐受。

2.2 ERS诱导剂TM对HL-7702肝细胞和HepG2肝癌细胞的COX-2蛋白和GRP78蛋白表达的影响

使用Western blot观察3 μmol/L TM作用于HL-7702肝细胞和HepG2肝癌细胞24 h后COX-2蛋白和GRP78蛋白表达的影响(图3),结果显示在HL-7702肝细胞和HepG2肝癌细胞中ERS标志性蛋白GRP78的表达均随着TM作用时间的延长而其表达逐渐增多,表明ERS的产生。同时显示,肝癌细胞HepG2在TM的作用下COX-2蛋白的表达随着时间的延长而表达逐渐增加($P < 0.05$),而在HL-7702细胞中,COX-2的表达并没有相应增多,表明ERS可诱导HepG2肝癌细胞COX-2的表达,而不诱导正常肝细胞HL-7702 COX-2的表达。

2.3 COX-2选择性抑制剂塞来昔布对TM诱导的HepG2肝癌细胞的COX-2表达的及凋亡作用

Western blot法观察10 μmol/L COX-2选择性抑制剂塞来昔布加入TM处理的HepG2细胞24 h后COX-2表达的变化(图4A),结果显示TM诱导HepG2肝癌细胞产生的COX-2可被塞来昔布抑制,采用TUNEL染色法观察10 μmol/L COX-2选择性抑制剂塞来昔布加入TM处理的HepG2肝癌细胞24 h后细胞凋亡的变化(图4B,C),结果显示,与单独使用TM组相比,塞来昔布加入TM处理的HepG2肝癌细胞后,细胞密度明显减少,细胞凋亡率为(67.6 ± 7.6)($t = -11.418, P < 0.01$)。提示COX-2可能在ERS诱导的HepG2肝癌细胞凋亡抵抗中起重要作用。

2.4 丹皮酚对ERS下的HepG2肝癌细胞的凋亡作用

采用TUNEL染色法观察31.25 mg/L丹皮酚加入TM处理的HepG2肝癌细胞24 h后细胞凋亡的变化(图5A,B),结果显示,与单独使用TM组相比,丹皮酚加入TM处理的HepG2肝癌细胞后,细胞密度减少,细胞凋亡率为(41.6 ± 6.9)($t = -4.647, P < 0.01$),表明了丹皮酚可以逆转ERS诱导的HepG2肝癌细胞的凋亡抵抗。

2.5 丹皮酚对TM诱导的HepG2肝癌细胞COX-2表达的影响

使用Western blot法检测丹皮酚对TM诱导的HepG2肝癌细胞COX-2蛋白表达变化的影响(图6)。结果显示与未处理组相比, TM处理的肝癌细胞系HepG2 COX-2的表达明显增高($P < 0.01$),与TM组相比,使用丹皮酚明显下调了ERS

诱导的 COX-2 的表达($P < 0.01$)，表明丹皮酚可通过抑制 COX-2 逆转 ERS 诱导的凋亡抵抗。

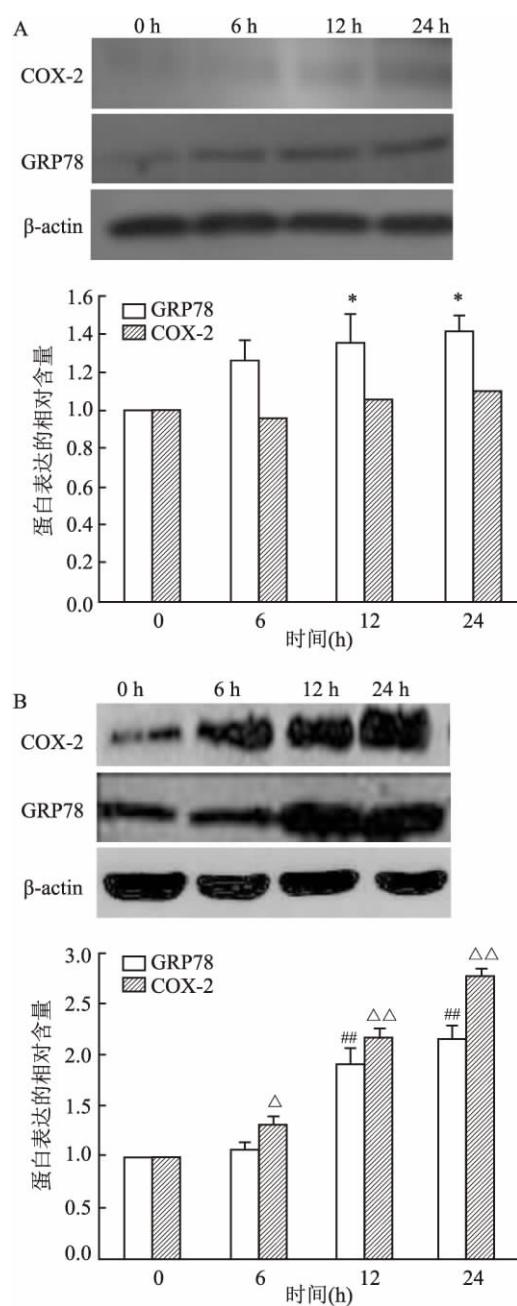


图3 TM诱导的ERS对HL-7702肝细胞和HepG2肝癌细胞的COX-2蛋白和GRP78蛋白表达的影响

A: TM对HL-7702肝细胞的COX-2蛋白和GRP78蛋白表达的影响；B: TM对HepG2肝癌细胞的COX-2蛋白和GRP78蛋白表达的影响；与未处理HL-7702组GRP78蛋白的比较： $* P < 0.05$ ；与未处理HepG2组GRP78蛋白的比较： $^{##} P < 0.01$ ；与未处理HepG2组COX-2蛋白的比较： $^{\triangle} P < 0.05$ ， $^{\triangle\triangle} P < 0.01$

3 讨论

内质网是真核细胞重要的膜性细胞器，其是细

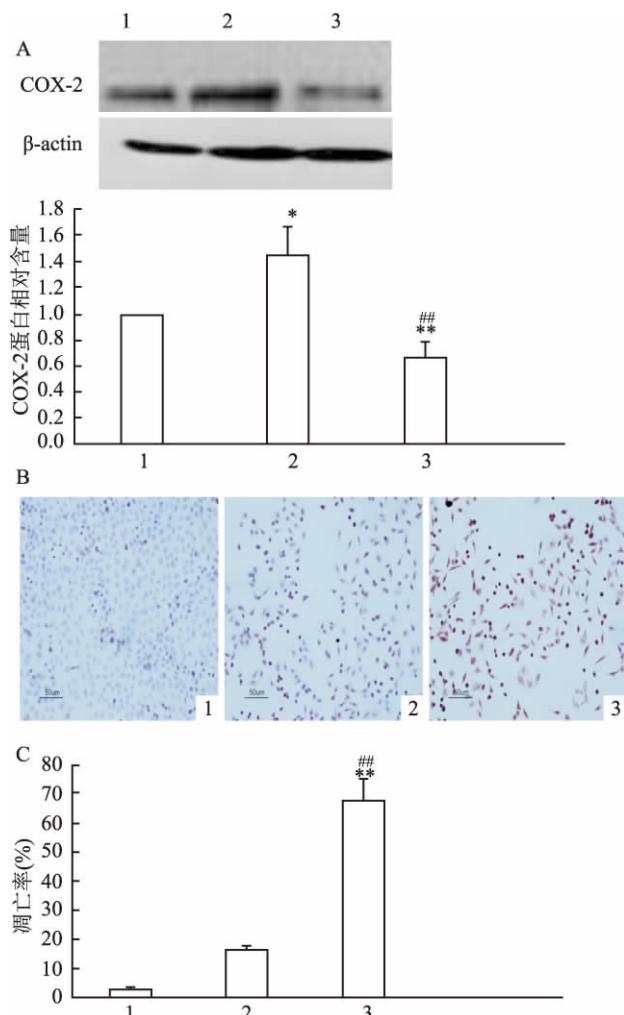


图4 塞来昔布对TM诱导的HepG2肝癌细胞的COX-2表达的影响及凋亡作用

A: 塞来昔布对TM诱导的HepG2细胞的COX-2表达的影响；B: 塞来昔布作用于TM诱导的HepG2细胞的凋亡形态学变化(TUNEL法 $\times 400$)；C塞来昔布作用于TM诱导的HepG2细胞的凋亡率；1: 空白对照组；2: TM处理组；3: TM联合塞来昔布处理组；与空白对照组比较： $* P < 0.05$ ， $^{##} P < 0.01$ ；与TM处理组比较： $^{\#} P < 0.01$

胞内糖类、脂类和蛋白质合成及修饰的场所。当各种生理和病理因素造成内质网稳态失衡，可使内质网腔内错误折叠蛋白和未折叠蛋白增加、钙离子浓度改变，从而诱导ERS的发生^[10]。对于实体瘤，由于营养条件和血液供应不足等因素的影响，可导致实体瘤内存在低糖及低氧等应激环境，从而损伤内质网的正常生理功能，继而诱发肿瘤细胞产生ERS^[11]。ERS可激活未折叠蛋白反应，未折叠蛋白反应一方面其在一定程度上能够缓解ERS带来的相关损害；另一方面如果ERS持续并且过度，那么未折叠蛋白反应也可以诱导细胞凋亡。如果这种

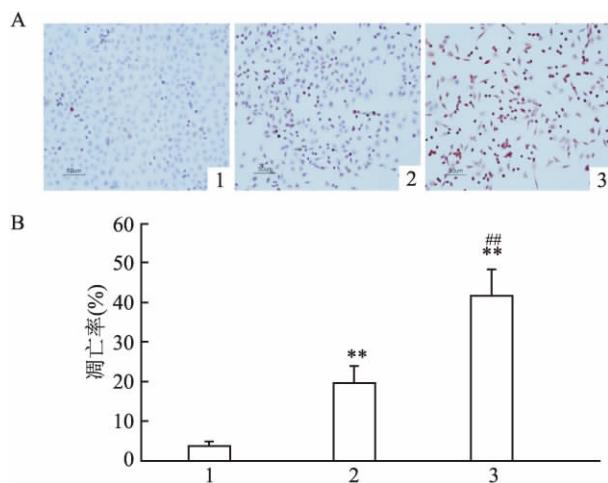


图5 丹皮酚对ERS下的HepG2肝癌细胞的增殖抑制及凋亡作用

A: 丹皮酚作用于TM诱导的HepG2肝癌细胞的凋亡形态学变化(TUNEL法×400);B: 塞来昔布作用于TM诱导的HepG2肝癌细胞的凋亡率;1:空白对照组;2:TM处理组;3:TM联合Paeonol组;与空白对照组比较: ** $P < 0.01$; 与TM处理组比较: ## $P < 0.01$

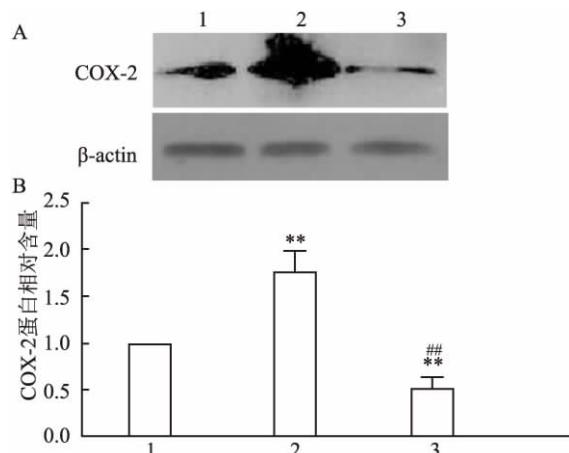


图6 丹皮酚对TM诱导的HepG2肝癌细胞COX-2表达的影响

1:空白对照组;2:TM处理组;3:TM联合Paeonol组;与空白对照组比较: ** $P < 0.01$;与TM处理组比较: ## $P < 0.01$

强ERS效应发生在肿瘤细胞身上,则可以诱导肿瘤细胞凋亡,进而达到抑制肿瘤的效应。因此,提高肿瘤细胞对ERS介导的凋亡的敏感性,是一种治疗肿瘤的新策略。但有研究^[12-13]指出,即使使用了ERS诱导剂,肿瘤细胞凋亡也并未有明显的增多,这表明肿瘤细胞可对ERS产生适应从而逃避凋亡。本研究也显示与正常人肝细胞株HL-7702相比,人肝癌细胞株HepG2在TM诱导的ERS作用下细胞的增殖抑制作用及凋亡作用并不明显,这一结果显示肝癌细胞HepG2对ERS诱导的细胞凋亡相对耐受。目前关于其机制尚不清楚,因此阐明肝癌细胞ERS性凋亡抵抗的机制,通过新的干预手段提高肝癌对

化疗药物的敏感性,最终达到延长患者生存时间的作用。

COX-2是前列腺素合成中的重要的限速酶,其在正常生理状态下的多数组织中并不表达,但在细胞内外刺激物(如内毒素、细胞因子等)广泛刺激下COX-2会迅速产生。研究^[14-15]显示COX-2可以促进肿瘤转移、参与血管形成以及抵抗肿瘤细胞凋亡等,在肝癌的发生发展中起着重要的作用。本研究显示使用ERS诱导剂TM作用于HL-7702正常肝细胞株和HepG2肝癌细胞株,分别于0、6、12、24 h观察COX-2的表达变化,表明COX-2蛋白在肝癌细胞中明显增多,而在正常肝细胞中未见COX-2的表达明显增加,当加入COX-2选择性抑制剂塞来昔布后肝癌细胞凋亡率上升,表明ERS可以诱导肝癌细胞COX-2的表达,进而逃避了ERS介导的凋亡,抑制COX-2蛋白的表达可提高肝癌细胞HepG2对ERS性凋亡的敏感性,提示COX-2可能在ERS诱导的HepG2肝癌细胞凋亡抵抗中扮演着重要角色。

丹皮酚又称为牡丹酚,是萝藦科植物徐长卿全草和中药芍药科植物牡丹根皮的主要成分^[5-6]。许多文献^[7-8]报道丹皮酚具有解热、镇痛、抗氧化、免疫调节等多种药理作用。不仅如此,不断有研究表明丹皮酚有诱导肿瘤细胞凋亡的作用。本研究显示丹皮酚加入TM处理的HepG2肝癌细胞后,增殖抑制及凋亡均明显增加,表明丹皮酚可逆转ERS诱导HepG2肝癌细胞凋亡抵抗。为明确丹皮酚是否通过抑制COX-2逆转肝癌细胞对ERS诱导的抵抗,利用Western blot技术显示丹皮酚可下调ERS诱导的HepG2肝癌细胞的COX-2的表达,其结果与使用塞来昔布结果相似,表明丹皮酚可通过抑制COX-2蛋白的表达继而逆转ERS诱导的肝癌细胞HepG2的凋亡抵抗。

综上所述,ERS诱导COX-2的产生可能是肝癌细胞HepG2抵抗细胞凋亡的原因之一,而丹皮酚可通过下调COX-2逆转ERS诱导的HepG2肝癌细胞凋亡抵抗,从而深化了肝癌细胞对ERS性凋亡抵抗机制的认识,并为肝癌的治疗提供新思路。

参考文献

- [1] Waller L P, Deshpande V, Pyrsopoulos N. Hepatocellular carcinoma: a comprehensive review [J]. World J Hepatol, 2015, 7(26): 2648-63.
- [2] Waghray A, Murali A R, Menon K N. Hepatocellular carcinoma: from diagnosis to treatment [J]. World J Hepatol, 2015, 7(8): 1020-9.

- [3] Dicks N, Gutierrez K, Michalak M, et al. Endoplasmic reticulum stress, genome damage, and cancer [J]. *Front Oncol*, 2015, 5: 11.
- [4] Wang W A, Groenendyk J, Michalak M. Endoplasmic reticulum stress associated responses in cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(10): 2143–9.
- [5] Sun G P, Wan X A, Xu S P, et al. Synergistic effect of paeonol and cisplatin on oesophageal cancer cell lines [J]. *Dig Liver Dis*, 2008, 40: 531–9.
- [6] Sun G P, Wan X, Xu S, et al. Antiproliferation and apoptosis induction of paeonol in human esophageal cancer cell lines [J]. *Dis Esophagus*, 2008, 21(8): 723–9.
- [7] 孙言才, 沈玉先, 孙国平. 丹皮酚的主要药理活性研究进展 [J]. 中成药, 2004, 26(7): 579–82.
- [8] 孙国平, 沈玉先, 张玲玲, 等. 丹皮酚对 HepA 荷瘤小鼠免疫调节和抑瘤作用研究 [J]. 中国药理学通报, 2003, 19(2): 160–2.
- [9] Xu S P, Sun G P, Shen Y X, et al. Synergistic effect of combining paeonol and cisplatin on apoptotic induction of human hepatoma cell lines [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, 28(6): 869–78.
- [10] Nagelkerke A, Bussink J, Sweep F C, et al. The unfolded protein response as a target for cancer therapy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1846(2): 277–84.
- [11] Urra H, Dufey E, Lisbona F, et al. When ER stress reaches a dead end [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833(12): 3507–17.
- [12] Rasheva V I, Domingos P M. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2009, 14(8): 996–1007.
- [13] Zhang L J, Chen S, Wu P, et al. Inhibition of MEK blocks GRP78 up-regulation and enhances apoptosis induced by ER stress in gastric cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2009, 274(1): 40–6.
- [14] 范璐璐, 孙国平, 付卫争, 等. NS-398 诱导肝癌细胞 HepG2 液亡的作用机制 [J]. 安徽医科大学学报, 2010, 45(5): 655–9.
- [15] Misra S, Sharma K. COX-2 signaling and cancer: new players in old arena [J]. *Curr Drug Targets*, 2014, 15(3): 347–59.

Paeonol increases HepG2 cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis resistance

Fan Lulu¹, Sun Guoping¹, Zha Lixia², et al

(¹Dept of Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Oncology, The Fourth Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract **Objective** To investigate the mechanism of paeonol reversing apoptosis resistance in HepG2 cells induced by endoplasmic reticulum stress. **Methods** MTT and TUNEL were used to observe the inhibitory effect of endoplasmic reticulum stress inducer –tunicamycin or plus paeonol on human hepatocyte cell line HL-7702 and human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. Changes in protein expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and GRP78 (a hallmark of ER stress) in both HepG2 and HL-7702 cells were observed through Western blot. **Results**

Growth inhibition of tunicamycin on HL-7702 was dose dependent. But the growth inhibition of tunicamycin on HepG2 cells reached maximum inhibition in cells. Similar results were observed in TUNEL staining ($P < 0.05$). Furthermore, the expression of COX-2 was increased in HepG2 cells but not in HL-7702 cells. Down-regulation of COX-2 expression using the COX-2 inhibitor, celecoxib, increased tunicamycin-induced apoptosis. However, co-treatment with tunicamycin and paeonol significantly increased the rate of apoptosis. Co-treatment with tunicamycin and paeonol also decreased the expression of COX-2. **Conclusion** Paeonol increases HepG2 cells to ER stress –induced apoptosis by down-regulating COX-2 expression.

Key words hepatocellular carcinoma; endoplasmic reticulum stress; cyclooxygenase-2; apoptosis; paeonol