

# 化州柚花挥发油的GC-MS分析及其对肺癌细胞A549增殖、迁移的影响研究<sup>Δ</sup>

李武国<sup>1\*</sup>, 苏乔<sup>1#</sup>, 魏洁书<sup>2</sup>, 朱焯妍<sup>2</sup>, 刘翠婷<sup>3</sup>, 李雯雯<sup>1</sup>, 赵广银<sup>1</sup>, 黄浩机<sup>1</sup>, 詹若挺<sup>4</sup>(1.中山大学附属第一医院动物实验中心, 广州 510080; 2.中山大学新华学院, 广州 510520; 3.南方医科大学中心实验室, 广州 510515; 4.广州中医药大学中药资源科学与工程研究中心/岭南中药资源教育部重点实验室, 广州 510006)

中图分类号 R284.1;R734.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)22-3093-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.22.15

**摘要** 目的:提取化州柚花挥发油,鉴定其成分,并评价其对肺癌细胞A549增殖、迁移的体外抑制作用。方法:采用水蒸气蒸馏法提取化州柚花挥发油;采用气质联用法(GC-MS)分析其化学组成,以峰面积归一化法计算各组分的相对百分含量;采用MTT法检测其对肺癌细胞A549增殖的抑制作用,计算细胞相对活力和增殖抑制率;采用细胞划痕实验评价其对肺癌细胞A549迁移能力的影响,计算相对迁移面积和迁移抑制率。结果:从100 g化州柚花中提取得到挥发油0.7 g,得率为0.7%。共从中分离得到了46个组分,鉴定了其中35个组分,占总峰面积的96.95%;相对百分含量较高的化合物包括D-柠檬烯(28.43%)、 $\gamma$ -萜品烯(20.74%)、 $\beta$ -月桂烯(11.97%)、芳樟醇(7.41%)等。与空白对照组比较,120 mg/L化州柚花挥发油可显著降低肺癌细胞A549的相对活力( $P<0.05$ ),增殖抑制率上升至21.72%;而1、5、10、20、40、60、80、100 mg/L化州柚花挥发油对肺癌细胞A549的相对活力均无显著影响( $P>0.05$ )。作用24、48 h时,60、120 mg/L化州柚花挥发油可显著缩小肺癌细胞A549的相对迁移面积( $P<0.05$ ),迁移抑制率分别为132.46%、125.08%(24 h)和124.54%、124.66%(48 h);而30 mg/L化州柚花挥发油对肺癌细胞A549的相对迁移面积均无显著影响( $P>0.05$ )。结论:GC-MS法可用于鉴定化州柚花挥发油的化学组成。化州柚花挥发油以D-柠檬烯、 $\gamma$ -萜品烯、 $\beta$ -月桂烯等成分为主,对肺癌细胞A549的增殖、迁移能力具有一定的体外抑制作用。

**关键词** 化州柚花;挥发油;气质联用法;增殖;迁移;肺癌细胞A549;体外抑制作用

## GC-MS Analysis of Volatile Oil from the Flowers of *Citrus grandis* and Study on Effects of It on the Proliferation and Migration of Lung Cancer A549 Cells

LI Wuguo<sup>1</sup>, SU Qiao<sup>1</sup>, WEI Jieshu<sup>2</sup>, ZHU Yeyan<sup>2</sup>, LIU Cuiting<sup>3</sup>, LI Wenwen<sup>1</sup>, ZHAO Guangyin<sup>1</sup>, HUANG Haoji<sup>1</sup>, ZHAN Ruoting<sup>4</sup>(1. Animal Experiment Center, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Xinhua College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510520, China; 3. Central Laboratory, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 4. Research Center of Medicinal Plant Resource Science and Engineering, Guangzhou University of TCM/Key Lab of Chinese Medicinal Resource from Lingnan, Ministry of Education, Guangzhou 510006, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To extract and identify the volatile oil from the flowers of *Citrus grandis*, and evaluate inhibitory effects of it on the proliferation and migration of lung cancer A549 cells *in vitro*. **METHODS:** The volatile oil was extracted from the flowers of *C. grandis* by steam distillation. The chemical constituents were analyzed by GC-MS. Relative percentage of each component was calculated by peak area normalization. Inhibitory effect of volatile oil on the proliferation of lung cancer A549 cells was detected by MTT assay, and the relative activity and proliferation inhibitory rate were calculated. Inhibitory effect of volatile oil on the migration of lung cancer A549 cells was evaluated by cell scratch test, and the relative migration area and migration inhibitory rate were calculated. **RESULTS:** Totally 0.7 g volatile oil was obtained from 100 g flowers of *C. grandis* with a yield of 0.7%. A total of 46 chemical components were isolated from the volatile oil, among which there were 35 compounds identified, accounting for 96.95% of the total peak area. The compounds with relatively higher percentage content included D-limonene (28.43%),  $\gamma$ -terpinene (20.74%),  $\beta$ -myrcene (11.97%) and linalool (7.41%), etc. Compared with blank control group, 120 mg/L volatile oil from the flowers of *C. grandis* could significantly reduce the relative activity of lung cancer A549 cells ( $P<0.05$ ), and the proliferation inhibitory rate increased to 21.72%. The volatile oil from the flowers of *C. grandis* had no obvious inhibitory effects on the relative activity of lung cancer A549 cells at the concentration of 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 mg/L ( $P>0.05$ ). After treated for 24, 48 h, the volatile oil from the flowers of *C. grandis* could significantly reduce the relative migration area of lung cancer A549 cells at the concentration of 60, 120 mg/L ( $P<0.05$ ); and the migration inhibitory rate

<sup>Δ</sup> 基金项目:广东省科学技术厅科技计划项目(No. 2017A030303015)

\* 技术员, 硕士。研究方向:肿瘤模型与靶向药物。电话:020-87331399。E-mail:liwuguo999@163.com

# 通信作者:高级兽医师, 硕士。研究方向:实验动物学、比较医学。电话:020-87332172。E-mail:suweiwei2008@126.com

were 132.46%, 125.08% (24 h) and 124.54%, 124.66% (48 h), respectively. But 30 mg/L volatile oil from the flowers of *C. grandis* had no obvious inhibitory effects on the relative migration area of lung cancer A549 cells ( $P>0.05$ ). CONCLUSIONS: GC-MS can be used for identifying chemical compositions of volatile oil from the flowers of *C. grandis*. Volatile oil from the flowers of *C. grandis* are mainly *D*-limonene,  $\gamma$ -terpinene,  $\beta$ -myrcene, etc., which can inhibit the proliferation and migration of lung cancer A549 cells.

**KEYWORDS** *Citrus grandis*; Volatile oil; GC-MS; Proliferation; Migration; Lung cancer A549 cells; Inhibitory effect *in vitro*

化州柚花为芸香科植物化州柚(*Citrus grandis* 'tomentosa')的花。未成熟或近成熟化州柚的干燥外层果皮经加工后可制成广东省十大道地药材之一的化橘红,习称“毛橘红”,归肺、脾经,具有理气宽中、燥湿化痰之功效,可用于治疗咳嗽痰多、食积伤酒、呕恶痞闷<sup>[1]</sup>。而化州柚花在化州当地也被制成理气化痰的花茶作保健用<sup>[2]</sup>。目前,化州柚花中已发现的药用化学成分主要包括挥发油、黄酮类、柠檬苦素类和香豆素类等<sup>[2-5]</sup>,其中挥发油主要成分为萜类。在已报道的化州柚花挥发油成分中,*D*-柠檬烯能通过促进自噬而诱导细胞凋亡,从而发挥对肺癌细胞A549、H1299的抑制作用<sup>[6]</sup>;芳樟醇可通过诱导细胞凋亡和/或氧化应激反应而对白血病<sup>[7]</sup>、胃癌、肺癌、皮肤癌<sup>[8]</sup>、肝癌<sup>[9]</sup>、直肠癌<sup>[10]</sup>等肿瘤产生抑制作用;金合欢醇能够通过磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路诱导前列腺癌细胞DU14的凋亡<sup>[11]</sup>。由此可见,化州柚花挥发油单一有效成分对多种肿瘤细胞均具有较强的体外抑制活性。因此归肺经的化州柚花,其挥发油整体是否具有体外抗肺癌活性值得探究。为此,本研究采用气质联用法(GC-MS)对化州柚花挥发油成分进行分析,并初步探讨其对肺癌细胞A549增殖、迁移的体外抑制作用,以期对化州柚花的开发利用提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Class II BSC型生物安全柜(新加坡Esco公司); Biofuge Primo R型离心机、HERAcell 150i型细胞培养箱、Multiskan FC型酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);SUNNY-XD30型显微镜[舜宇光学科技(集团)有限公司];ZW-A型微量振荡器(江苏科析仪器有限公司);Voyager型GC-MS仪,配有标准质谱图库NIST 11、TG-WaxMS石英毛细管柱(30 m $\times$ 0.25 mm,0.25  $\mu$ m)(美国Finnigan公司);98-I-B型电子调温电热套(天津市泰斯特仪器有限公司);1 000 mL挥发油提取器(北京博美华科玻璃有限公司)。

### 1.2 药材与试剂

化州柚花由本课题组于2017年4月采摘自广东省化州市文楼镇某化州柚种植场,经广州中医药大学中药资源科学与工程研究中心詹若挺研究员鉴定为芸香科柑橘属植物化州柚(*C. grandis* 'tomentosa')的花,阴干后备用;其样本(编号:YY10101)保存于中山大学附属第一医院动物实验中心。

胎牛血清(FBS,批号:42G5550K)、DMEM培养基

(批号:8117108)、青链霉素(批号:1881450)、0.25%胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(0.25% Trypsin-EDTA)溶液(批号:1676922)、磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4,批号:8117157)均购于美国Gibco公司;四甲基偶氮唑盐(MTT,批号:3580GR001,临用前以PBS配制成质量浓度为5 g/L的溶液)、二甲基亚砜(DMSO,细胞培养级,批号:EZ1609C224)均购于德国BioFroxx公司;其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

### 1.3 细胞

人肺癌细胞A549由广东省实验动物监测所李文德研究员赠送。

## 2 方法

### 2.1 化州柚花挥发油的提取

采用水蒸气蒸馏法提取。称取干燥化州柚花100 g,置于挥发油提取器中,加5倍质量的蒸馏水浸泡1 h后,蒸馏提取6 h,收集挥发油,经无水硫酸钠干燥后,称重,计算得率[得率(%)=挥发油质量/化州柚花质量 $\times$ 100%]。

### 2.2 化州柚花挥发油样品的处理

取上述挥发油样品适量,用乙醚稀释,配制成质量浓度为50 g/L(以挥发油质量计)的溶液,用无水硫酸钠干燥后,经0.22  $\mu$ m微孔滤膜滤过,取续滤液适量进行GC-MS法分析。

取上述挥发油样品适量,用DMSO稀释,配制成质量浓度为30 g/L(以挥发油质量计)的溶液,作为体外试验的样品贮备液。

### 2.3 GC-MS条件

2.3.1 GC条件 色谱柱: TG-WaxMS石英毛细管柱;升温程序:初始温度40  $^{\circ}$ C,保持3 min,以6  $^{\circ}$ C/min升至130  $^{\circ}$ C,以2  $^{\circ}$ C/min升至210  $^{\circ}$ C,以20  $^{\circ}$ C/min升至300  $^{\circ}$ C;进样口温度:270  $^{\circ}$ C;载气:高纯氦气;载气流量:1 mL/min(恒流模式);分流比:20:1;进样量:0.1  $\mu$ L。

2.3.2 MS条件 电离源:电子轰击(EI)电离源;电子轰击能量:70 eV;离子源温度:230  $^{\circ}$ C;扫描方式:全谱图扫描(Full scan);扫描速度:2 200.19 amu/s;扫描范围: $m/z$  33~450;溶剂延迟时间:3 min。

### 2.4 化州柚花挥发油成分相对含量的计算

使用标准质谱图库NIST 11进行检索匹配,通过人工质谱图解析并确证各化学成分的结构,采用峰面积归一化法计算其相对百分含量。

### 2.5 化州柚花挥发油对肺癌细胞A549增殖能力的影响

采用MTT法<sup>[12]</sup>检测化州柚花挥发油对肺癌细胞

A549增殖能力的影响。体外培养肺癌细胞A549,待其生长至约80%融合时,收集对数生长期细胞适量,经0.25% Trypsin-EDTA溶液消化后计数,按3 000个/孔接种至96孔板中,置于5% CO<sub>2</sub>、37℃细胞培养箱中孵育24 h后,将细胞随机分为空白对照组和化州柚花挥发油不同剂量组,每组设置3个复孔。吸弃各孔上清液,空白对照组加入含0.4% DMSO和10% FBS的DMEM培养基100 μL,各给药组分别加入含10% FBS和不同质量浓度(1、5、10、20、40、60、80、100、120 mg/L,以挥发油质量计;取“2.2”项下样品贮备液各适量至DMEM培养基中即得,剂量设置参考文献[13-14])化州柚花挥发油的DMEM培养基各100 μL,于5% CO<sub>2</sub>、37℃细胞培养箱中孵育24 h,每孔加入5 g/L MTT溶液20 μL,于5% CO<sub>2</sub>、37℃细胞培养箱中继续孵育4 h,吸弃各孔上清液,加入DMSO 150 μL,振荡10 min,使用酶标仪于490 nm波长处测定各孔的光密度(OD)值,计算细胞相对活力(细胞相对活力=各组平均OD值/空白对照组平均OD值),并依据细胞相对活力计算增殖抑制率[增殖抑制率(%)=(1-各组平均细胞相对活力/空白对照组平均细胞相对活力)×100%]<sup>[13,15]</sup>。

### 2.6 化州柚花挥发油对肺癌细胞A549迁移能力的影响

采用细胞划痕实验<sup>[14]</sup>考察化州柚花挥发油对肺癌细胞A549迁移能力的影响。体外培养肺癌细胞A549,待其生长至约80%融合时,收集对数生长期细胞适量,经0.25% Trypsin-EDTA溶液消化后计数,按5×10<sup>5</sup>个/孔接种至6孔板中,置于5% CO<sub>2</sub>、37℃细胞培养箱中孵育24 h后,将细胞随机分为空白对照组和化州柚花挥发油不同剂量组,每组设置3个复孔。吸弃各孔上清液,用200 μL移液枪头垂直于6孔板背后提前画好的横线划痕,制备体外伤口愈合模型<sup>[14]</sup>。用PBS清洗3次以除去各孔中的细胞残骸或碎片。空白对照组加入含0.4% DMSO的DMEM培养基2 mL,各给药组分别加入含不同质量浓度(30、60、120 mg/L,以挥发油质量计;按“2.5”项下剂量倍数递减)化州柚花挥发油的DMEM培养基2 mL,置于5% CO<sub>2</sub>、37℃细胞培养箱中孵育。分别在孵育0、24、48 h时,置于倒置显微镜下拍照,并采用Image J 1.45软件考察迁移面积,同时计算24、48 h时的相对迁移面积(迁移后无细胞区面积与0 h时无细胞区面积的差值)和迁移抑制率[迁移抑制率(%)=(1-各组平均相对迁移面积/空白对照组平均相对迁移面积)×100%]<sup>[16]</sup>。

### 2.7 统计学方法

采用SPSS 19.0软件对数据进行统计分析。采用Shapiro-Wilk检验和方差同质性检验分别考察数据的正态性和方差齐性。符合正态分布的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,其中方差齐的采用最小显著性差异(LSD)检验,方差不齐的采用Dunnett's T3检验;不符合正态分布的数据以M(P25, P75)表示,采用Mann-Whitney检验。P<0.05为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 化州柚花挥发油的得率及GC-MS分析

共提取得到化州柚花挥发油0.7 g,得率为0.7%。对挥发油进行GC-MS分析,其总离子流图见图1。

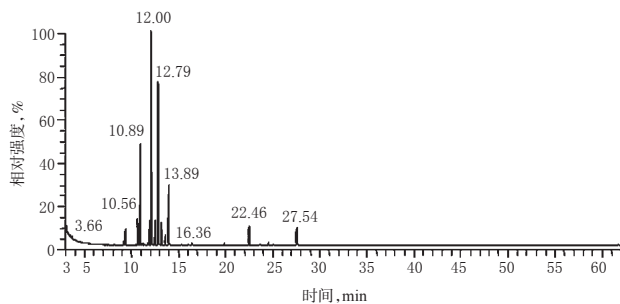


图1 化州柚花挥发油总离子流图

Fig 1 Total ion current chromatogram of the volatile oil from the flowers of *C. grandis*

采用标准质谱图库NIST 11检索图1中的各色谱峰,并逐一核对、解析质谱图以确定各组名称和分子式;采用峰面积归一化法计算各组分的相对百分含量,结果见表1。由表1可见,本研究共分离得46个挥发油组分,共鉴定了其中35个组分,占总峰面积的96.95%,相对百分含量较高的化合物是D-柠檬烯、γ-蒎品烯、β-月桂烯、芳樟醇、反-橙花叔醇,分别占28.43%、20.74%、11.97%、7.41%、5.00%,其中D-柠檬烯含量最高,是化州柚花挥发油最主要的化学成分。

表1 化州柚花挥发油GC-MS分析结果

Tab 1 GC-MS analysis results of the volatile oil from the flowers of *C. grandis*

峰号	保留时间, min	化合物名称	分子式	相对分子质量	匹配度, %	相对百分含量, %
1	9.10	4-甲基-1-(1-甲基乙基)二环[3.1.0]己烷二脱氢衍生物	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	87.8	0.56
2	9.30	α-蒎烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	91.1	1.99
3	10.43	桉烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	80.6	0.18
4	10.56	β-蒎烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	91.2	3.22
5	10.89	β-月桂烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	89.2	11.97
6	11.19	癸烷	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub>	142	84.3	0.26
7	11.66	α-异松油烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	84.9	0.29
8	11.87	1-甲基-2-(1-甲基乙基)-苯	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>	134	92.3	2.96
9	12.00	D-柠檬烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	91.5	28.43
10	12.18	(Z)-3,7-二甲基-1,3,6-十八烷三烯	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub>	252	77.8	0.36
11	12.46	罗勒烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	92.4	2.93
12	12.79	γ-蒎品烯	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136	92.8	20.74
13	13.13	反-α,α-5-三甲基-5-乙炔基四氢化-2-呋喃甲醇	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	170	88.4	3.03
14	13.89	芳樟醇	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154	93.7	7.41
15	14.24	2,7-二甲基-2,6-辛二烯-1-醇	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154	71.3	0.10
16	15.24	香茅醛	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154	83.9	0.19
17	16.00	(-)-4-蒎品醇	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154	85.5	0.23
18	16.36	α-松油醇	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154	87.7	0.40
19	16.95	柠檬烯环氧化物	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	152	70.8	0.08
20	19.88	δ-榄香烯	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204	84.9	0.44
21	20.02	2-氨基苯甲酸甲酯	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	151	81.2	0.17
22	20.44	甲酸芳樟酯	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	182	70.5	0.06

续表 1

Continued tab 1

峰号	保留时间, min	化合物名称	分子式	相对分子质量	匹配度, %	相对百分含量, %
23	21.47	1-乙基-1-甲基-1,4-双(1-甲基乙基)-环己烷	C <sub>15</sub> H <sub>31</sub>	204	82.2	0.15
24	22.46	石竹烯	C <sub>15</sub> H <sub>31</sub>	204	92.6	3.60
25	23.27	香叶基丙酮	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	194	72.9	0.10
26	23.65	$\alpha$ -石竹烯	C <sub>15</sub> H <sub>31</sub>	204	85.2	0.36
27	24.54	大根香叶酮D	C <sub>15</sub> H <sub>31</sub>	204	89.5	0.82
28	24.83	硬脂酸甲酯	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	290	71.5	0.07
29	25.08	$\gamma$ -榄香烯	C <sub>15</sub> H <sub>31</sub>	204	81.9	0.34
30	25.33	(Z,E)- $\alpha$ -金合欢烯	C <sub>15</sub> H <sub>31</sub>	204	78.4	0.15
31	25.90	$\delta$ -杜松烯	C <sub>15</sub> H <sub>31</sub>	204	72.0	0.11
32	27.54	反-橙花叔醇	C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222	93.6	5.00
33	27.94	反-Z- $\alpha$ -红没药烯环氧化物	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	71.4	0.07
34	28.40	顺-Z- $\alpha$ -红没药烯环氧化物	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220	74.6	0.13
35	29.70	(Z,E)-金合欢醇	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O	222	71.0	0.05

### 3.2 化州柚花挥发油对肺癌细胞 A549 增殖能力影响的检测结果

与空白对照组比较,化州柚花挥发油 120 mg/L 组肺癌细胞 A549 的相对活力显著下降,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),增殖抑制率升至 21.72%;而其他剂量组细胞相对活力与空白对照组比较,差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),详见表 2。

表 2 化州柚花挥发油对肺癌细胞 A549 相对活力和增殖抑制率的影响

Tab 2 Effects of the volatile oil from the flowers of *C. grandis* against the relative activity and proliferation inhibitory rate of lung cancer A549 cells

组别	细胞相对活力 ( $\bar{x} \pm s$ )	增殖抑制率, %	组别	细胞相对活力 ( $\bar{x} \pm s$ )	增殖抑制率, %
空白对照组	1.00 ± 0.01	0	化州柚花挥发油 40 mg/L 组	1.12 ± 0.03	-11.75
化州柚花挥发油 1 mg/L 组	1.02 ± 0.09	-1.70	化州柚花挥发油 60 mg/L 组	1.15 ± 0.08	-14.82
化州柚花挥发油 5 mg/L 组	1.09 ± 0.07	-9.45	化州柚花挥发油 80 mg/L 组	0.94 ± 0.07	6.22
化州柚花挥发油 10 mg/L 组	1.09 ± 0.01	-9.45	化州柚花挥发油 100 mg/L 组	0.95 ± 0.03	5.45
化州柚花挥发油 20 mg/L 组	1.09 ± 0.06	-9.11	化州柚花挥发油 120 mg/L 组	0.78 ± 0.03*	21.72

注:与空白对照组比较, \* $P < 0.05$

Note: vs. blank control group, \* $P < 0.05$

### 3.3 化州柚花挥发油对肺癌细胞 A549 迁移能力影响的检测结果

与空白对照组比较,作用 24、48 h 时,30 mg/L 化州柚花挥发油对肺癌细胞 A549 的相对迁移面积均无明显的抑制作用,相对迁移面积组间比较,差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ );60、120 mg/L 的化州柚花挥发油均能显著抑制肺癌细胞 A549 的迁移能力,相对迁移面积组间比较,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),迁移抑制率分别为 132.46%、125.08% (24 h) 和 124.54%、124.66% (48 h),详见图 2、表 3。

## 4 讨论

本研究通过 GC-MS 法分析并鉴定了化州柚花挥发油的化学组成,共分离获得 46 个化学组分峰,鉴定了其

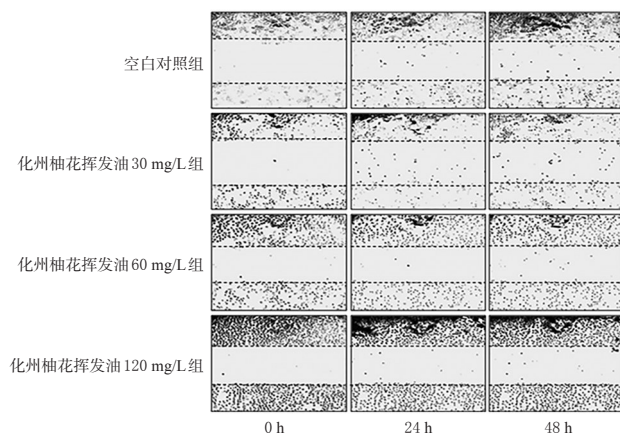


图 2 化州柚花挥发油对肺癌细胞 A549 迁移能力影响的显微图

Fig 2 Micrographs of the effects of the volatile oil from the flowers of *C. grandis* against the migration of lung cancer A549 cells

表 3 化州柚花挥发油对肺癌细胞 A549 相对迁移面积和迁移抑制率的影响

Tab 3 Effects of the volatile oil from the flowers of *C. grandis* against relative migration area and migration inhibitory rate of lung cancer A549 cells

组别	24 h		48 h	
	相对迁移面积 ( $\bar{x} \pm s$ )	迁移抑制率, %	相对迁移面积 ( $\bar{x} \pm s$ )	迁移抑制率, %
空白对照组	20 754 ± 9 793	0	50 192 ± 19 467	0
化州柚花挥发油 30 mg/L 组	22 281 ± 8 898	16.72	40 090 ± 16 852	20.13
化州柚花挥发油 60 mg/L 组	-8 685 ± 4 544*	132.46	-12 317 ± 8 713*	124.54
化州柚花挥发油 120 mg/L 组	-6 709 ± 3 387*	125.08	-12 380 ± 7 005*	124.66

注:与空白对照组比较, \* $P < 0.05$

Note: vs. blank control group, \* $P < 0.05$

中 35 个组分,占总峰面积的 96.95%;而其余组分由于含量太少或质谱匹配度过低而无法进行确证。黄兰珍等<sup>[2]</sup>同样采用水蒸气蒸馏法提取了化州柚花的挥发油,并进行了 GC-MS 分析,从中分离并鉴定了 15 个化合物,占总峰面积的 82.318%,含量较高的化合物是橙花叔醇 (19.27%)、松油烯 (12.78%)、芳樟醇 (9.87%)、蒎烯 (8.54%)、金合欢烯 (6.67%)。与之相比,本研究从化州柚花挥发油中分离鉴定的化合物更多、检出率更高,且含量较高的 5 个化合物 [D-柠檬烯 (28.43%)、 $\gamma$ -蒎品烯 (20.74%)、 $\beta$ -月桂烯 (11.97%)、芳樟醇 (7.41%)、反-橙花叔醇 (5.00%)] 也不尽相同,这种差异可能与化州柚的种植环境不同、花的采集时间不同等因素有关<sup>[2,17]</sup>。韩寒冰等<sup>[18]</sup>通过无水乙醇超声辅助提取化州柚花的化学成分,并运用在线凝胶渗透色谱-气相色谱-质谱联用技术 (GPC-GC/MS) 对其挥发油成分进行分离鉴定,共分离出 75 个组分,鉴定出其中的 38 个,占总峰面积的 96.20%,含量较高的化合物是橙花叔醇 (19.57%)、 $\beta$ -月桂烯 (14.46%)、法尼醇 (13.99%)、 $\gamma$ -蒎品烯 (7.52%)、 $\beta$ -

蒎烯(6.27%)。与本研究相比,上述研究从化州柚花挥发油中分离鉴定的化合物更多,含量较高的5个化合物也不尽相同,提示挥发油提取方法的不同也是造成其化学组成差异的原因之一<sup>[19-20]</sup>。

本研究采用MTT法初步考察了不同剂量化州柚花挥发油对肺癌细胞A549增殖的体外抑制作用。结果显示,经120 mg/L化州柚花挥发油作用后,A549细胞的相对活力较空白对照组显著下降,差异有统计学意义,增殖抑制率升至21.72%;而其他剂量组细胞相对活力与空白对照组比较,差异均无统计学意义。这提示高剂量的化州柚花挥发油对肺癌细胞A549的增殖具有较好的体外抑制作用。此外本研究GC-MS分析结果显示,化州柚花挥发油中含量最高的化合物是D-柠檬烯。Yu X等<sup>[6]</sup>在研究中指出,D-柠檬烯(102 mg/L)作用24 h后,肺癌细胞A549的增殖受到了明显的抑制;同时该研究还指出,D-柠檬烯能够抑制肺癌细胞A549克隆形成,促进其细胞自噬,诱导其凋亡,具有显著的抗肺癌活性。由此可见,D-柠檬烯可能是化州柚花挥发油抑制肺癌细胞A549增殖的主要活性成分之一。

本研究采用细胞划痕实验初步评价了化州柚花挥发油对肺癌细胞A549迁移能力的影响。该模型是经典的细胞迁移能力评价方法。结果显示,与空白对照组比较,作用24、48 h时,30 mg/L化州柚花挥发油对肺癌细胞A549的迁移能力均无明显的抑制作用,相对迁移面积组间比较,差异均无统计学意义;60、120 mg/L化州柚花挥发油均能显著抑制肺癌细胞A549的迁移能力,相对迁移面积组间比较,差异均有统计学意义,迁移抑制率分别为132.46%、125.08%(24 h)和121.54%、124.66%(48 h)。在研究过程中笔者发现,经60、120 mg/L化州柚花挥发油作用后,A549细胞的轮廓不清晰,疑似处于凋亡状态,同时其迁移抑制率较空白对照组和化州柚花挥发油30 mg/L组均明显升高,提示这种抑制作用可能与细胞凋亡有关,但具体机制尚有待进一步研究。此外相关研究指出,D-柠檬烯能促进肺癌细胞A549发生自噬,并诱导其凋亡<sup>[6]</sup>,表明该化合物可能是化州柚花挥发油抑制细胞迁移的主要活性成分之一。

综上所述,本研究采用GC-MS法从化州柚花挥发油中分离鉴定了35个化合物,以D-柠檬烯、 $\gamma$ -蒎烯、 $\beta$ -月桂烯等成分为主。体外试验结果表明,120 mg/L化州柚花挥发油对肺癌细胞A549的增殖能力具有明显的抑制作用;60、120 mg/L化州柚花挥发油对其迁移能力亦具有明显的抑制作用,但其具体作用机制仍有待后续深入探讨。

## 参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社,2015:74-75.  
[2] 黄兰珍,林励. 化州柚果皮、花、叶有效成分的比较研究[J]. 中药新药与临床药理,2008,19(3):213-215.  
[3] 孙国玲. 毛橘红化学成分及其代谢研究[D]. 镇江:江苏大学,2010.  
[4] 伍柏坚,林励,陈康,等. 化州柚花不同花期黄酮类成分

含量的动态变化研究[J]. 中药新药与临床药理,2007,18(5):377-379.  
[5] 伍柏坚,林励,陈康,等. 化州柚成花过程总黄酮指纹图谱的动态变化研究[J]. 现代中药研究与实践,2008,22(5):15-18.  
[6] YU X, LIN H, WANG Y, et al. D-limonene exhibits antitumor activity by inducing autophagy and apoptosis in lung cancer[J]. *Onco Targets Ther*, 2018. DOI: 10.2147/OTT.S155716.  
[7] GU Y, ZHANG T, QIU X, et al. Linalool preferentially induces robust apoptosis of a variety of leukemia cells via upregulating p53 and cyclin-dependent kinase inhibitors[J]. *Toxicology*, 2010, 268(1/2):19-24.  
[8] CHERNG JM, SHIEH DE, CHIANG W, et al. Chemopreventive effects of minor dietary constituents in common foods on human cancer cells[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, 71(6):1500-1504.  
[9] USTA J, KREYDIYYEH S, KNIO K, et al. Linalool decreases HepG2 viability by inhibiting mitochondrial complexes I and II, increasing reactive oxygen species and decreasing ATP and GSH levels[J]. *Chem Biol Interact*, 2009, 180(1):39-46.  
[10] IWASAKI K, ZHENG Y, MURATA S, et al. Anticancer effect of linalool via cancer-specific hydroxyl radical generation in human colon cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(34):9765-9774.  
[11] PARK JS, KWON JK, KIM HR, et al. Farnesol induces apoptosis of DU145 prostate cancer cells through the PI3K/Akt and MAPK pathways[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(5):1169-1176.  
[12] 何紫凝,刘嘉伟,李武国,等. 两面针根和茎超临界CO<sub>2</sub>萃取物GC-MS比较分析及体外细胞毒活性评价[J]. 中国中药杂志,2014,39(4):710-714.  
[13] 盛萍,王飒,苗莉娟,等. 不同方法提取的多伞阿魏挥发油化学成分及其体外抗胃癌活性比较[J]. 中成药,2013,35(11):2442-2448.  
[14] 李武国,刘嘉伟,李庆国,等. 虎杖根茎超临界CO<sub>2</sub>萃取物GC/MS分析及抗细胞迁移活性评价[J]. 质谱学报,2014,35(5):420-426.  
[15] 黄冬苑,刘嘉伟,李武国,等. 陵水暗罗根超临界CO<sub>2</sub>萃取物的GC-MS分析及其体外生物活性评价[J]. 中国药房,2016,27(1):15-18.  
[16] 杜娜,李健,刘福生,等. 雷公藤红素对AGS细胞迁移的影响[J]. 世界中西医结合杂志,2015,10(5):623-626.  
[17] 刘慧燕,苏薇薇,彭维. 生态环境对化橘红道地性的影响研究[J]. 中国园艺文摘,2015,31(5):216-218.  
[18] 韩寒冰,张放,魏国程,等. 南药化橘红花果叶中挥发油成分比较分析[J]. 中医药导报,2018,24(7):33-36.  
[19] 施铮,陈仁寿,陈勇. 不同方法提取的柴胡挥发油化学成分比较[J]. 南京中医药大学学报,2015,31(6):576-578.  
[20] 张敏,赵梅,印酬,等. 3种不同提取方法对蜘蛛香挥发油化学成分的气相色谱-飞行时间质谱分析[J]. 中华中医药杂志,2016,31(8):3312-3317.

(收稿日期:2018-05-30 修回日期:2018-08-28)

(编辑:张元媛)