

基于代谢组学的柠檬烯抗非小细胞肺癌作用机制研究

张华敏¹, 程龙慧¹, 董雪漫^{1,2}, 叶璐¹, 徐玉欣¹, 陈霖¹, 武璞^{1,2*}, 周建良^{1*} (1. 杭州师范大学, 杭州 311121; 2. 中南大学, 长沙 410083)

摘要: 目的 采用非靶向代谢组学等方法, 探究柠檬烯抑制非小细胞肺癌增殖的作用机制。方法 以肺癌 A549 细胞为研究对象, 通过 CCK-8 法测定柠檬烯抑制 A549 细胞活力及 IC₅₀; 通过集落形成、流式细胞检测、铁含量测定及线粒体染色等实验, 分别评价柠檬烯的体外抗肺癌及诱导铁死亡作用; 代谢组学分析发现柠檬烯的潜在作用通路; 最后采用 Western blotting 对相关通路主要蛋白进行验证。结果 与对照组相比, 柠檬烯给药组可以显著抑制 A549 细胞的增殖及集落的形成, 且呈剂量依赖性; 光学显微镜观察发现, 柠檬烯给药后 A549 细胞出现脱落现象, 并可显著改变其形态; 同时柠檬烯具有诱导 A549 细胞凋亡作用, 并阻滞在 G₀-G₁ 期; 共聚焦显微镜发现柠檬烯作用后, A549 细胞线粒体荧光减弱, 同时细胞内铁含量亦显著增加, 呈现典型的铁死亡表现; 代谢组学研究发现谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 代谢、精氨酸生物合成、D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢及半胱氨酸和蛋氨酸代谢等多条差异代谢通路, 这些通路与细胞内 GSH 合成密切相关; Western blotting 实验发现, 柠檬烯给药后细胞中 SLC40A1、SLC7A11(xCT) 及 GPX4 蛋白含量显著减少。结论 柠檬烯抗肺癌作用机制可能与降低肺癌细胞中 GSH 合成及增加 Fe²⁺ 含量诱导其铁死亡有关。

关键词: 柠檬烯; 非小细胞肺癌; 代谢组学; 铁死亡

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2024)02-0192-11

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20233146

引用本文: 张华敏, 程龙慧, 董雪漫, 等. 基于代谢组学的柠檬烯抗非小细胞肺癌作用机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(2): 192-202.

Investigating the Mechanistic Insights of Limonene's Anti-non-small Cell Lung Cancer Effect Through Metabolomics Analysis

ZHANG Huamin¹, CHENG Longhui¹, DONG Xueman^{1,2}, YE Lu¹, XU Yuxin¹, CHEN Lin¹, WU Pu^{1,2*}, ZHOU Jianliang^{1*} (1. Hangzhou Normal University, Hangzhou 311121, China; 2. Central South University, Changsha 410083, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To elucidate the mechanisms responsible for the inhibitory effects of limonene on the proliferation of non-small cell lung cancer (NSCLC) by non-targeted metabolomics and additional approaches. **METHODS** The CCK-8 assay was utilized to evaluate the inhibitory effects of limonene on NSCLC A549 cell viability and to ascertain the IC₅₀. *In vitro* experiments, encompassing colony formation, flow cytometry, iron content assessment, and mitochondrial staining, were conducted to assess the anti-lung cancer and iron-induced cell death effects of limonene. Metabolomic analysis was employed to identify potential pathways influenced by limonene, and Western blotting was carried out to validate pivotal proteins within these pathways. **RESULTS** In comparison to the control group, the limonene-treated group demonstrated a significant, dose-dependent reduction in A549 cell proliferation and colony formation. Optical microscopy revealed cellular detachment and pronounced changes in cellular morphology following exposure to limonene. Limonene induced apoptosis in A549 cells and arrested them in the G₀-G₁ phase of the cell cycle. Confocal microscopy unveiled diminished mitochondrial fluorescence and an augmented intracellular iron content, indicative of the classical phenomenon of ferroptosis. Metabolomic investigations unveiled divergent metabolic pathways, including glutathione (GSH) metabolism, arginine biosynthesis, D-glutamine and D-glutamate metabolism, as well as cysteine and methionine metabolism, with many of them intricately linked to intracellular GSH synthesis. Western blotting experiments underscored a marked reduction in the levels of SLC40A1, SLC7A11(xCT), and GPX4 proteins within the cells post-limonene treatment. **CONCLUSION** Limonene may induce ferroptosis in lung cancer cells by reducing GSH synthesis and increasing Fe²⁺ levels.

KEYWORDS: limonene; non-small cell lung cancer; metabolomics; ferroptosis

肺癌是最常见的癌症之一, 根据 2023 年美国癌症报告统计数据, 肺癌仍然以高达 21% 的死亡

率稳居癌症死亡率榜首^[1]。在中国, 肺癌的发病率和死亡率远高于其他癌症^[2]。研究表明, 八成以上

作者简介: 张华敏, 女, 硕士生 E-mail: 15268095628@163.com 共同第一作者: 程龙慧, 女, 硕士生 E-mail: 18470320788@163.com *通信作者: 武璞, 男, 博士, 讲师 E-mail: 15029302565@163.com 周建良, 男, 博士, 教授 E-mail: cpuzhou@163.com

的原发性肺癌为非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC), 其主要分为鳞状细胞癌、腺癌和大细胞癌 3 种亚型, 其中肺腺癌约占原发性肺癌病例的 40%^[3]。目前, 临床常用手术结合放化疗的方式治疗肺癌。但放化疗不良反应大, 在杀伤肿瘤细胞的同时也会对患者造成严重的负担。

柠檬烯广泛存在于天然植物中, 它是除蒽烯外分布最广的萜烯^[4]。柠檬烯有 2 种天然对映体, 它们可以单独存在, 也可以混合成消旋体^[5]。D-柠檬烯作为最常见的对映体, 主要存在于橙子、柠檬、葡萄柚等芸香科柑橘属植物的果皮中。而 L-柠檬烯则主要存在于松树、松节油和薄荷精油中。1994 年, 柠檬烯作为一种安全的调味剂被美国 FDA 通过 GRAS 认证^[6]。现代药理学研究表明, 柠檬烯具有多种药理作用, 包括抗氧化^[7-8]、抗炎^[9-10]、抗微生物^[11]、镇静^[12] 及抗肿瘤等^[5,13]。

Yu 等^[14] 研究发现柠檬烯可以通过促进自噬诱导肺癌细胞凋亡, 从而对肺癌有抑制作用。Zhu 等^[15] 通过临床肺腺癌 (LUAD) 患者的 TCGA-LUAD 生存分析, 发现受柠檬烯调控的 3 个基因。以上研究有利于柠檬烯的开发与利用, 但柠檬烯作为潜在的抗肺癌小分子化合物, 其作用机制仍有待进一步明确。因此, 本研究对柠檬烯抗肺癌细胞增殖作用进行研究, 并采用非靶向代谢组学等方法, 对其潜在作用机制进行探索。最后经分子生物学实验进行验证, 为柠檬烯在肺癌防治中的开发应用提供依据。

1 材料

TS100 倒置显微镜 (尼康); IX73 荧光倒置显微镜及 FV3000RS 激光扫描共聚焦显微镜 (Olympus); Synergy Neo2 酶标仪 (Bio-Tek); FACS Calibur 流式细胞仪 (Beckman Coulter); UltiMate 3000 液相串联 Thermo LTQ Orbitrap Elite 质谱仪 (Thermo); Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 化学发光成像系统 (Bio-Rad); Heraeus Multifuge X1R 型离心机 (Thermo, 离心半径 99 mm)。

柠檬烯消旋体 (中国食品药品检定研究院, 批号: 100470-201503; 含量: 96.0%); 榄香烯 (大连华立金港药业有限公司, 批号: 1909251; 纯度: β-elemene 83.78%, β-caryophyllene 7.88%, γ-elemene 2.47%, δ-elemene 1.86%, 其他成分

3.99%); 顺铂注射液 (江苏豪森药业集团有限公司, 批号: 601230802); RPMI 1640 培养基 (Gibco, 批号: 8123101); 胎牛血清 (Excell Bio, 批号: 12B269); CCK-8 试剂盒 [艾普拜生物科技 (苏州) 有限公司, 批号: K101837133EF5E]; Calcein-AM/PI 活细胞/死细胞双染试剂盒 (批号: 2307100)、细胞铁含量检测试剂盒 (批号: 2306001) 均购自北京索莱宝科技有限公司; 细胞凋亡检测试剂盒 (BD pharmingen, 批号: 2119964); 细胞周期试剂盒 (杭州联科生物技术股份有限公司, 批号: 70-CCS012); Mito-Tracker Red CMXRos 线粒体红色荧光探针 (碧云天试剂有限公司, 批号: 081821220114); SLC40A1/FPN1 抗体 (批号: 00128442)、Beta Actin 抗体 (批号: 10025487) 均购自 Proteintech Group 公司; 谷胱甘肽过氧化物酶 4 (Glutathione Peroxidase 4, GPX4) 抗体 (批号: 1000287-22)、胱氨酸-谷氨酸-逆转运蛋白 (Cystine-glutamate antiporter, xCT) 抗体 (批号: GR3337924-14) 均购自 Abcam 公司; 甲醇、乙腈均为色谱纯 (Merck), 其他试剂均为分析纯, 水为新制多效纯化水。

A549 细胞购自中国科学院细胞库。

2 方法

2.1 细胞培养

A549 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养基培养于 37 °C 的 CO₂ 培养箱中。

2.2 药物配制

柠檬烯与榄香烯用 10 倍体积的完全培养基超声后配成 100 mg·mL⁻¹ 母液。顺铂注射液 (30 mg, 6 mL) 用完全培养基直接稀释成 1 mg·mL⁻¹ 母液。使用时, 用完全培养基梯度稀释成相应工作浓度。

2.3 CCK-8 检测

将 A549 细胞接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL, 含 5×10³ 个细胞, 置于二氧化碳培养箱中常规培养。24 h 后弃去原培养基, 加入含不同浓度柠檬烯及阳性药的培养基后继续培养 24 h, 最后加入 CCK-8 试剂孵育 30 min, 于酶标仪上测定 450 nm 处吸光度 (A) 值。抑制率计算公式:

抑制率(%) =

$$[1 - (A_{\text{给药孔}} - A_{\text{空白孔}}) / (A_{\text{对照孔}} - A_{\text{空白孔}})] \times 100\%。$$

2.4 A549 细胞形态学观察

将 A549 细胞按每孔 3×10⁴ 个·mL⁻¹ 细胞浓度

接种于 12 孔板中,待细胞贴壁后,弃去原培养基,加入不同浓度 (0, 35, 70 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 柠檬烯孵育 24 h,于光学显微镜下放大 100 倍和 400 倍观察细胞形态变化。

2.5 Calcein-AM/PI 活细胞/死细胞双染检测

细胞培养及给药同“2.4”项下。达到给药时间后经 0.25% 胰酶消化离心 (1000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min) 收集细胞,加入 1 mL 1×Assay Buffer 洗涤细胞 2~3 次。取 2 μL Calcein-AM 和 10 μL PI 加入 2 mL 1×Assay Buffer 制备染色工作液。取 100 μL 染色工作液重悬细胞,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。取 10 μL 细胞悬液滴在干净的载玻片上,用盖玻片压片后,用荧光显微镜进行荧光镜检。分别于 490 nm 与 545 nm 处检测活细胞 (绿色荧光) 与死细胞 (红色荧光)。

2.6 细胞克隆形成实验

按每孔 500 个细胞浓度,接种 A549 细胞于 12 孔板中,期间 37 $^{\circ}\text{C}$ 二氧化碳培养箱正常培养。待细胞初步呈现团聚后,将细胞分别与含药培养基 (0, 8, 16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 柠檬烯, 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 顺铂) 共培养。实时观察细胞集落形成,期间每 48 h 更换含药培养基,待各给药组与对照组比较出现明显差异后,加 4% 多聚甲醛固定 5 min, 0.02% 结晶紫染色 5 min 后光镜下拍照。

2.7 细胞凋亡检测

将 A549 细胞按每孔 1×10^5 个接种于 6 孔板中,待细胞贴壁后加入柠檬烯 (0, 35, 70 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 与榄香烯 (40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 处理 24 h,消化后,离心收集细胞。并用 200 μL 的 1×Binding Buffer 重悬细胞于 1.5 mL 离心管中,依次加入 5 μL FITC-Annexin V 和 5 μL PI,室温避光孵育 15 min 后,用 1×Binding Buffer 调节体系至 500 μL ,混匀后于流式细胞仪上进行细胞凋亡检测。

2.8 细胞周期检测

细胞分组及给药同“2.7”项下。将收集的细胞用 PBS 清洗 2 次,离心弃上清。根据说明书要求加入 1 mL DNA Staining solution 与 10 μL Permeabilization solution,涡旋振荡 5~10 s。室温避光孵育 30 min 后于流式细胞仪上进行细胞周期检测。

2.9 细胞内铁含量检测

将 A549 细胞与柠檬烯 (0, 35, 70 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 共孵育 24 h。将细胞收集后计数。各组取用相同

数量的细胞,按照细胞数量 (10^4): 提取液体积 (mL)=1 000: 1 的比例加入提取液,冰浴超声破碎细胞,4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min,收集上清,并在 96 孔板中按照说明书加样,25 $^{\circ}\text{C}$ 静置显色 10 min,于 490 nm 处测定吸光度 (A) 值。细胞内铁含量计算公式:

细胞铁含量 [$\text{ng}\cdot(10^4 \text{ cell})^{-1}$] =

$(C_{\text{标准液}} \times \Delta A_{\text{测定}} \div \Delta A_{\text{标准}}) \times V_{\text{提取}} \times 10^3 \times 55.845 \div N_{\text{细胞数目}}$

其中: $\Delta A_{\text{测定}} = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$; $\Delta A_{\text{标准}} = A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}$;

$C_{\text{标准液}}$: 0.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ Fe^{3+} 标准液; $V_{\text{提取}}$ 为加入提取液体积; $N_{\text{细胞数目}}$ 为细胞数目。

2.10 线粒体红色荧光探针

在 6 孔板中放入细胞爬片,将 A549 细胞按每孔 1×10^5 个的浓度接种于 6 孔板中。待细胞贴壁后,给予不同浓度柠檬烯 (0, 35, 70 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 处理 24 h。100 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Mito-Tracker Red CMXRos 工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min。最后经 4% 多聚甲醛固定及 DAPI 染色后,取出细胞爬片,使用抗荧光淬灭封片液封片,于激光共聚焦显微镜下观察细胞线粒体形态。

2.11 代谢组学分析

2.11.1 代谢物提取 与不同浓度柠檬烯 (0, 35, 70 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 共孵育 24 h 后的 A549 细胞用预冷的 PBS 清洗 2~3 次。向培养皿中加入 1 mL 预冷的 80% 甲醇,用细胞刮刀将细胞刮下,收集于 1.5 mL 离心管中,再取 200 μL 的 80% 甲醇润洗培养皿,合并洗液,涡旋、离心,分别收集上清液及沉淀。上清真空干燥,用于后续代谢物测定。沉淀则用 BCA 试剂进行蛋白浓度测定,该浓度用于后续数据归一化。

2.11.2 代谢物检测 将各组干燥后的代谢物样品用 50% 乙腈复溶,超声 5 min 后离心 (4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 10 min),取上清置于带内衬管的液相进样小瓶中。从各组样品取等量混合制备质控样品 (QC) 用于后续数据归一化。样品通过 UHPLC-LTQ Orbitrap Elite MS 检测代谢物。色谱柱: Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μm); 流速: 0.2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 2 μL 。色谱洗脱条件: 乙腈 (A)-0.1% 甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱 (0~5 min, 98% $\rightarrow$ 95%B; 5~10 min, 95% $\rightarrow$ 50%B; 10~25 min, 50% $\rightarrow$ 5%B; 25~35 min, 5%B; 35~35.1 min,

5%→98%B; 35.1~45 min, 98%B)。质谱条件: 电喷雾离子源, 正离子模式, 离子源温度 350 ℃, 离子扫描范围 m/z 60~1 000, 轰击电压 35 V。

2.11.3 代谢物鉴定及分析 所得结果通过 Compound Discoverer(Thermo) 软件检索 mzCloud、mzVault、ChemSpider 及 Mass Lists 等数据库, 对检测所得代谢物进行结构解析与鉴定。后续多元统计分析采用 SIMCA-P 14.1 软件处理, 通过建立 PCA、PLS-DA 及 OPLS-DA 等分析模型, 寻找柠檬烯给药后 A549 细胞的差异代谢物。其中 R^2 代表模型的稳定性, Q^2 代表模型的预测能力, 当 $R^2>0.5$ 与 $Q^2Y>0.5$ 时, 表示模型可以接受。在其后的两两比较中, 通过 Shaoiro-Wilk 检验和 t 检验 (Student's t -test), 所得 $P<0.05$ 则表示代谢物差异具有统计学意义, 最后结合多元统计分析得到的各代谢物 VIP 值对差异代谢进行筛选。

2.12 Western blotting 检测

收集不同浓度柠檬烯 (0, 35, 70 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 处理 24 h 后的 A549 细胞。采用 RIPA 强裂解液提取蛋白, 并用 BCA 定量。将样品依次通过 SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭后, 孵育一抗及二抗, 显影成像后, 用 Image J 软件计算目的蛋白相应表达量。

2.13 统计学分析

所得数据用 SPSS 25.0 软件进行统计分析, 首先进行 Shaoiro-Wilk 检验正态性。多组间比较用单因素方差分析 (ANOVA), 并用 LSD 和 Tamuhein 进行事后多组比较, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。同时 IC_{50} 也采用 SPSS 25.0 软件进行计算得到。

3 结果与讨论

3.1 增殖抑制测定

为了评价柠檬烯对肺癌的抑制作用, 通过 CCK-8 法测定了其对 A549 细胞的生长抑制曲线。柠檬烯可以显著抑制 A549 的增殖, 其 IC_{50} 为 70 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。阳性药榄香烯 IC_{50} 为 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 顺铂 IC_{50} 为 7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 结果见图 1。

根据以上结果, 进一步选取 35, 70 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 柠檬烯给药, 在光学显微镜下观察发现, 与对照组相比, 35 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 柠檬烯能明显抑制肺癌 A549 细胞数量。同时, 在 70 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下, A549 细胞形态发生显著变化, 呈现细胞萎缩、坏死和脱落等现象, 结果表明柠檬烯具有较好的抗肺癌作用, 结果见图 2。

3.2 Calcein-AM/PI 活细胞/死细胞双染

为了更清晰地表现柠檬烯杀伤肺癌细胞的作用

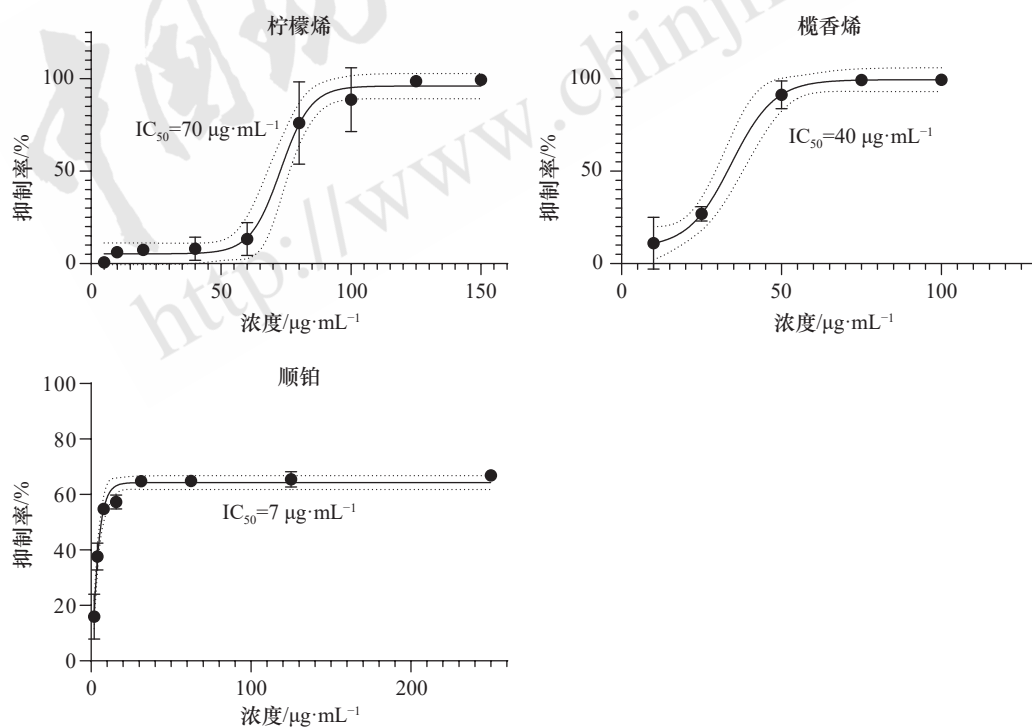


图 1 药物对肺癌 A549 细胞的生长抑制曲线

Fig. 1 Growth inhibition curve of lung cancer A549 cells treated with drug

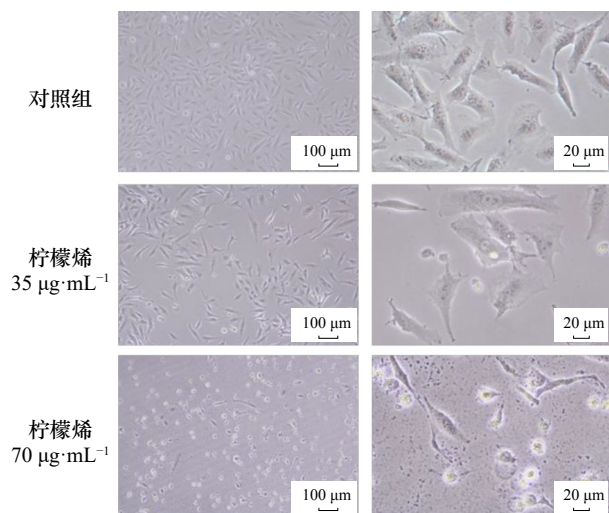


图2 柠檬烯对肺癌 A549 细胞的光学显微镜观察 (10×, 40×)
Fig. 2 Optical microscope observation of limonene on lung cancer A549 cells(10×, 40×)

用, 采用 Calcein-AM/PI 探针对给药后的 A549 细胞进行染色。结果在荧光显微镜下发现, 柠檬烯给药后, A549 细胞死亡明显增多, 在 $70 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下, 红色标记的死亡细胞成片出现, 该实验进一步验证了柠檬烯对肺癌细胞的抑制作用, 结果见图 3。

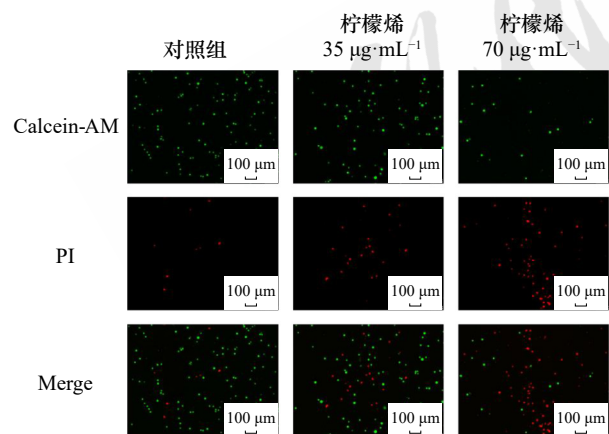


图3 柠檬烯对肺癌 A549 细胞的荧光显微镜观察 (10×)
Fig. 3 Fluorescence microscopy of lung cancer A549 cells treated with limonene(10×)

3.3 集落形成试验

集落形成试验用于考察柠檬烯对肺癌细胞的最低有效抑制浓度。通过前期实验结果及浓度探索, 选取低浓度的柠檬烯 ($8, 16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 及顺铂 ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 开展研究。在连续培养细胞 14 d 后, 发现柠檬烯在 $8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 剂量下亦能显著抑制 A549 细胞集落的形成, 在 $16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下, 抑制效果与 $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 顺铂组相当, 结果见图 4。

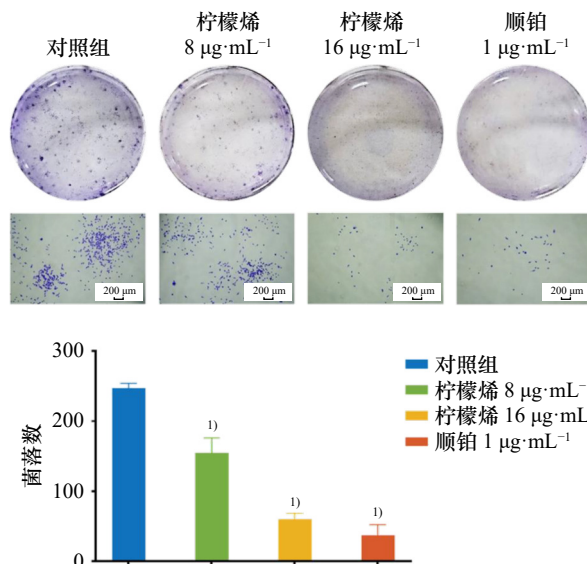


图4 柠檬烯对肺癌 A549 细胞集落形成的影响 (4×)
与对照组比较, ¹⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 4 Effect of limonene on colony formation of lung cancer A549 cells(4×)
Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.001$.

3.4 周期与凋亡测定

周期与凋亡测定是评价药物处理后细胞的生存和死亡情况的重要参考指标。可以用于评价柠檬烯对肺癌细胞的干预效果。考虑到柠檬烯来源于天然植物, 本研究采用同样来源于天然植物并已成功上市多年的抗肿瘤植物成分药榄香烯乳注射液的原料药榄香烯作为阳性对照。榄香烯是从浙江道地药材温莪术中提取制备的倍半萜烯类活性部位, 主要包括 β -、 γ -和 δ -榄香烯 3 种同分异构体, 具有抗肺癌、食管癌、肝癌、鼻咽癌等多种癌症的作用。在此, 选取榄香烯的 IC_{50} 值 ($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 作为给药剂量。通过流式细胞术技术检测发现, 对照组的晚期凋亡细胞为 2.34%, 早期凋亡细胞为 3.28%。柠檬烯低剂量组的晚凋细胞与早凋细胞分别为 17.72% 与 16.24%, 高剂量组的晚凋与早凋细胞分别为 25.07% 与 29.48%。榄香烯组的晚凋细胞与早凋细胞则为 9.99% 与 24.10%, 结果见图 5。因此, 与榄香烯阳性对照相比, 柠檬烯表现出更好的诱导肺癌细胞凋亡的作用。

同时, 细胞周期测定显示, 与对照组相比, 低、高剂量的柠檬烯组均明显阻滞细胞在 G_0 - G_1 期, 结果见图 6。

3.5 细胞铁含量检测

铁死亡是铁依赖性的细胞死亡方式, 因此,

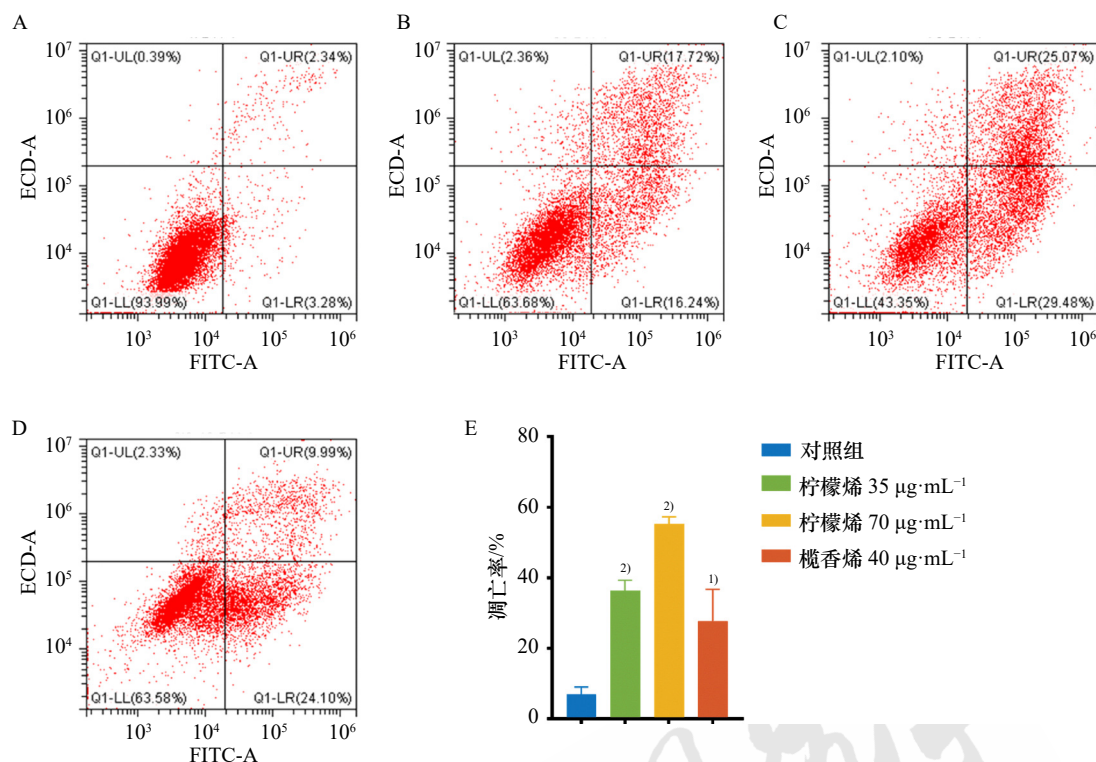


图5 柠檬烯对肺癌 A549 细胞凋亡的影响

A-对照组; B-柠檬烯组 (35 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); C-柠檬烯组 (70 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); D-榄香烯组 (40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); E-凋亡率统计图。与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 5 Effect of limonene on apoptosis of lung cancer A549 cells

A-control group; B-limonene group (35 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); C-limonene group (70 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); D-elemene group (40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); E-apoptosis rate statistical chart. Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.001$.

细胞内的游离铁离子 (Fe^{2+}) 是评价肿瘤细胞的铁死亡的重要评价指标, 本研究通过盐酸羟胺将样本中的 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} , 利用 Fe^{2+} 在弱酸条件下与邻菲罗啉形成橙红色配合物, 检测并计算肺癌细胞中铁的含量。检测发现, 与对照组相比, 在 35 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 与 70 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下, 柠檬烯可以显著增加 A549 细胞中游离铁离子含量, 结果见图 7。该结果表明柠檬烯可能通过诱导 A549 细胞铁死亡, 产生抗肺癌作用。

3.6 线粒体形态观测

铁死亡的一个特征是脂质过氧化, 这是由于脂质受到氧化损伤而导致细胞膜的破裂。线粒体的内外膜富含脂质, 而脂质过氧化可能会影响线粒体膜的完整性。损坏的线粒体膜可能导致线粒体功能的障碍, 影响能量产生和其他线粒体功能。因此, 通过选用红色荧光探针 Mito-Tracker Red CMXRos 对活细胞线粒体进行染色。结果显示不同浓度柠檬烯给药后, A549 细胞的线粒体荧光显著减弱, 表现出线粒体功能受损的状态, 结果见图 8。

3.7 代谢组学分析

为探究柠檬烯抗肺癌的作用机制, 采用基于高分辨质谱的非靶向代谢组学方法对不同浓度柠檬烯给药后的差异代谢物进行分析, 为发现柠檬烯干预肺癌作用机制提供线索。

3.7.1 稳定性评价 通过质控样品 (QC) 对仪器的稳定性进行评价, 根据提取不同时间段的 6 种离子的保留时间与峰面积, 计算其 RSD 值, 发现 6 种离子保留时间的 RSD 为 0.028%~2.81%, 峰面积的 RSD 为 7.57%~10.31%, 均 $<15\%$, 表明仪器稳定。

3.7.2 差异代谢物及通路分析 将各组样本代谢组学数据用 QC 样品及蛋白浓度进行归一化后通过 Simca 14.1 软件进行多元统计分析。由图 9A 可知, 在 PCA 分析模式下, 对照组、柠檬烯 (35, 70 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组样本均能在一定程度上进行区分, 但相应内部检验参数显示 R^2X 为 0.724, Q^2 为 0.358 < 0.5 。为了使拟合效果更好, 3 组数据在有监督的 PLS-DA 模式下再次进行了分析 (图 9B), 结果细胞代谢物分离效果均有较大提高, 内部检验参数显示 R^2X 为 0.678, R^2Y 为 0.893, Q^2 为 0.719,

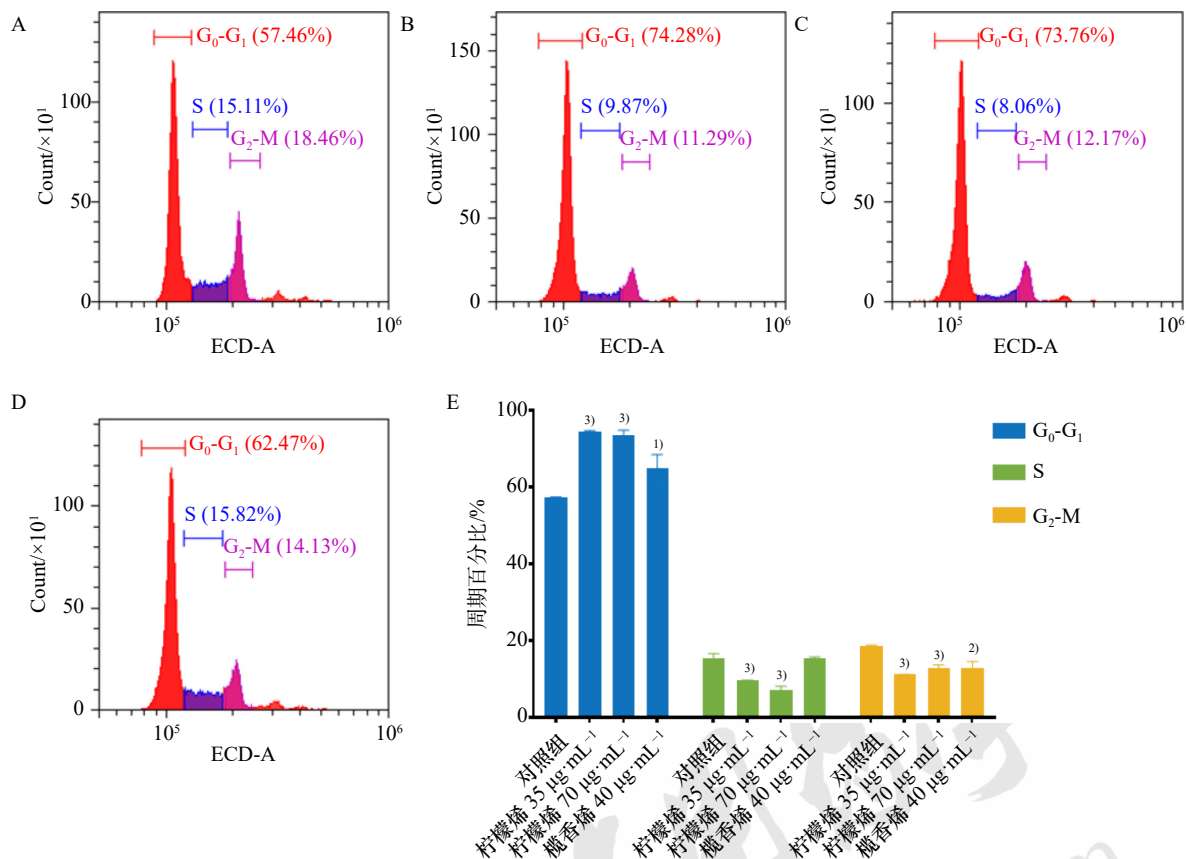


图6 柠檬烯对肺癌 A549 细胞周期的影响

A-对照组; B-柠檬烯组(35 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); C-柠檬烯组(70 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); D-榄香烯组(40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); E-周期百分比。与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 6 Effect of limonene on cell cycle of lung cancer A549 cells

A-control group; B-limonene group(35 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); C-limonene group(70 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); D-elemen group(40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); E-cycle percentage. Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$.

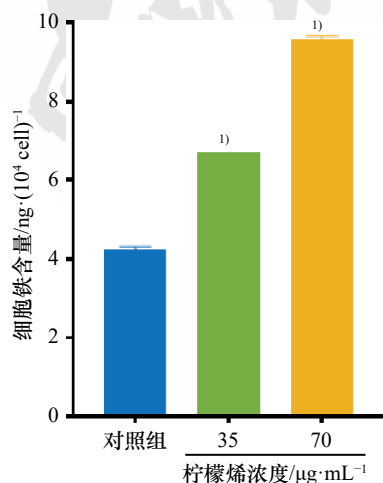


图7 柠檬烯对肺癌 A549 细胞内铁含量的影响
与对照组比较, ¹⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 7 Effect of limonene on intracellular iron content in lung cancer A549 cells

Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.001$.

以上检验数值均 >0.5 , 说明模型良好。200 次的置换检验结果见图 9D, 左侧 Q^2 各点均不高于右侧

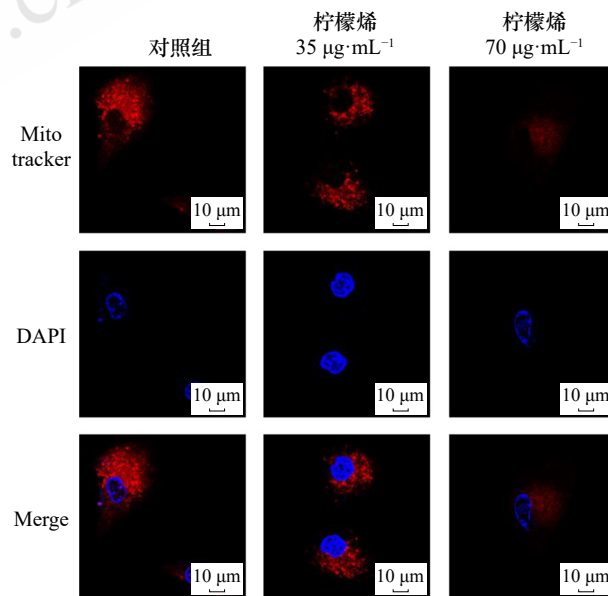


图8 柠檬烯对肺癌 A549 细胞内线粒体的影像(100 $\times$)

Fig. 8 Imaging of mitochondria in lung cancer A549 cells treated with limonene(100 $\times$)

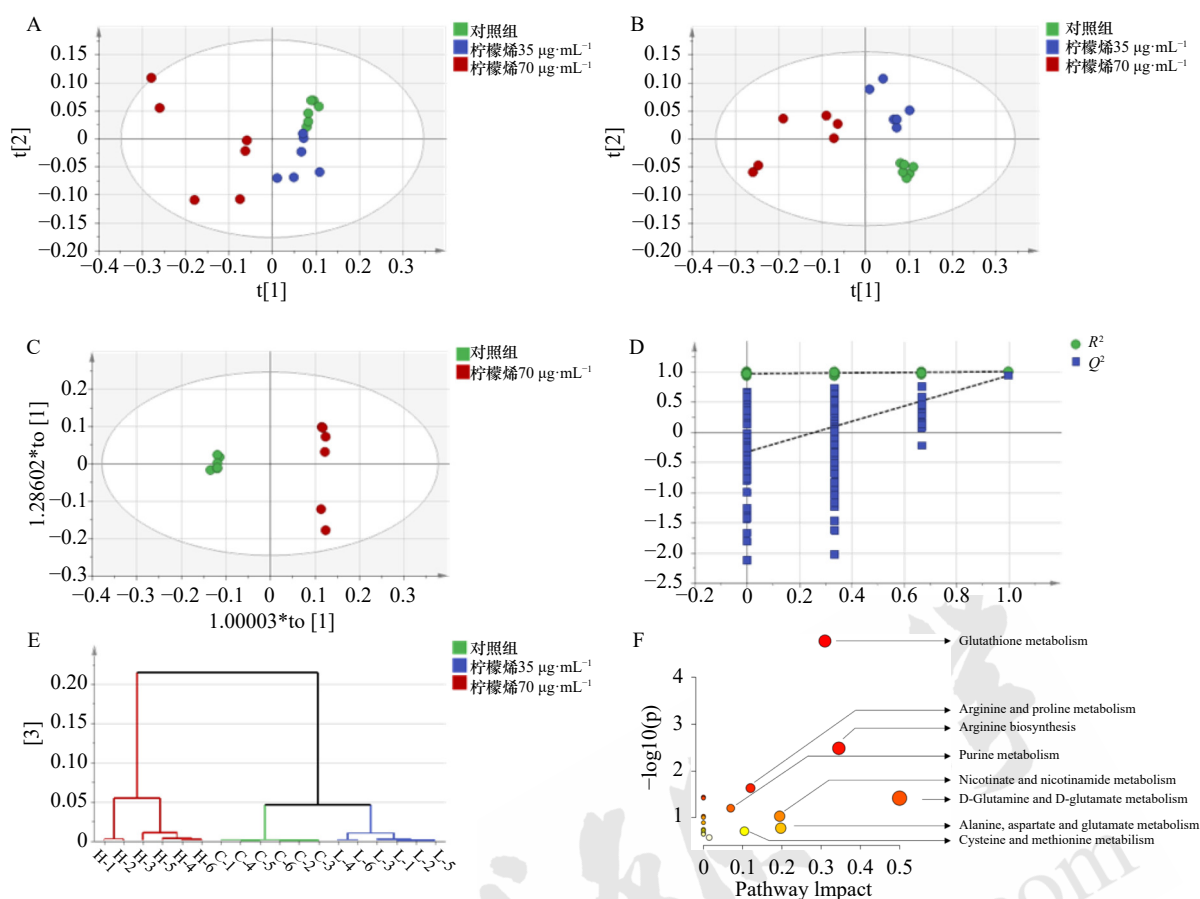


图9 柠檬烯对肺癌 A549 细胞内代谢物的多元统计分析

A-PCA 分析; B-PLS-DA 分析; C-OPLS-DA 分析的交叉检验; D-PLS-DA 分析的置换检验; E-HCA 树状图; F-差异代谢通路分析。

Fig. 9 Metabolite analysis of intracellular metabolites in lung cancer A549 cells by limonene

A-PCA analysis; B-PLS-DA analysis; C-cross test for OPLS-DA analysis; D-permutation test for PLS-DA analysis; E-HCA dendrogram; F-differential metabolic pathway analysis.

原始值, 且 Q^2 回归线的纵截距 <0 , 因此, PLS-DA 模型能够较好地分析本组数据。同时根据 PLS-DA 散点图可知, 对照组与高低剂量柠檬烯组存在显著差异, 各组之间聚类明显。在此基础上, 进行了层次聚类分析 (HCA), 由图 9E 可知, 对照组首先与低剂量柠檬烯给药组聚类, 再与高剂量柠檬烯组聚类, A549 细胞的代谢物的变化程度与柠檬烯给药剂量存在剂量依赖性。

根据以上聚类分析结果, 为了筛选出具有代表性的内源差异代谢产物, 使代谢物分离最大化, 选择了差异最大的 $70 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 柠檬烯组与对照组进行正交偏最小二乘法分析 (OPLS-DA), 结果见图 9C, 内部检测参数为 $R^2X=0.822$, $R^2Y=0.998$, $Q^2=0.933$ 。 R^2Y 与 Q^2 均 >0.5 , 且 R^2Y 、 Q^2 差值 <0.3 , 因此该分析模式具有较好的拟合与解释样本的能力。在该模式下, 根据 VIP 值 (>1)、 t 检验 ($P<0.05$) 及 2 组样本代谢物差异倍数 (Fold

change >1.5 或 Fold change <0.66), 筛选差异代谢物。最终得到在正离子模式下的 13 种差异代谢物, 见表 1。

将以上筛选得到的差异代谢物导入在线分析软件 Metabo Analyst 进行通路分析, 见图 9F, 其中 Pathway impact >0.1 的代谢通路共发现 9 条, 包括①D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢; ②精氨酸生物合成; ③谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 代谢; ④丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢; ⑤烟酸和烟酰胺代谢; ⑥精氨酸和脯氨酸代谢; ⑦半胱氨酸和蛋氨酸代谢; ⑧嘌呤代谢; ⑨脂肪酸生物合成。

分析发现, D-谷氨酰胺、D-谷氨酸可以作为 GSH 生物合成的前体。精氨酸生物合成可为 GSH 生物合成提供关键中间产物半胱氨酸。丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢则参与了半胱氨酸的合成以及 GSH 前体形成, 直接参与了 GSH 的生物合成途径。而半胱氨酸是 GSH 的中间产物, 蛋

表 1 柠檬烯给药后 A549 细胞的差异物代谢物汇总

Tab. 1 Summary of differential metabolites in A549 cells after limonene administration

编号	名称	保留时间/min	分子量	变化趋势	Fold change	P	VIP	相关通路
1	Spermidine	1.152	145.1565	↑	0.594788	2.71×10^{-3}	1.34038	谷胱甘肽代谢; 精氨酸和脯氨酸代谢; β -丙氨酸代谢
2	L-Glutamic acid	1.319	147.0518	↑	0.233371	9.40×10^{-5}	1.83426	谷胱甘肽代谢; 精氨酸生物合成; D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢; 精氨酸和脯氨酸代谢; 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢; 氨酰-tRNA 生物合成; 氮代谢; 组氨酸代谢; 丁酸代谢
3	L-Citrulline	1.320	175.0939	↑	0.185521	9.88×10^{-6}	1.05812	精氨酸生物合成
4	GSH	1.844	307.0812	↓	1.539417	1.21×10^{-2}	2.38782	谷胱甘肽代谢
5	AMP	2.090	347.0598	↑	0.184608	1.00×10^{-3}	1.70893	嘌呤代谢
6	L-Methionine	2.211	149.0496	↑	0.15	3.51×10^{-4}	1.45275	半胱氨酸和蛋氨酸代谢; 氨酰-tRNA 生物合成
7	Nicotinamide	2.217	122.0468	↑	0.312816	7.42×10^{-3}	1.03787	烟酸和烟酰胺代谢
8	GSSG	3.311	612.1462	↑	0.504854	1.67×10^{-2}	1.22589	谷胱甘肽代谢
9	Adenine	9.524	135.0532	↑	0.294638	1.84×10^{-4}	1.03079	嘌呤代谢
10	Palmitic Acid	14.042	273.2645	↑	0.608660	3.93×10^{-3}	3.68303	—
11	Linoleamide	23.466	279.2535	↑	0.120850	2.20×10^{-3}	2.85660	—
12	Hexadecanoic acid	24.875	255.2536	↑	0.216351	9.26×10^{-3}	2.71997	不饱和脂肪酸的生物合成; 脂肪酸生物合成
13	1-Palmitoylglycerol	25.698	330.2735	↑	0.213878	2.31×10^{-3}	1.08654	—

氨酸则是半胱氨酸的前体。因此, 综合分析发现以上 9 条通路中多数与 GSH 相关。结合表 1 中差异代谢物变化趋势发现, 除 GSH 外, 其余 12 种代谢物与对照组相比均呈现上调趋势。这一结果表明柠檬烯给药后, 干扰 GSH 合成与转化。随着细胞内 GSH 含量的减少, 细胞面对铁死亡的风险也随之增加。为验证这一推论, 进一步采用 Western blotting 对相关通路中的蛋白进行验证。

3.8 Western blotting 测定

GSH 作为一种重要的内源性抗氧化分子, 其有助于维护细胞内的氧化还原平衡。而铁死亡与氧化应激关系密切, 其中氧自由基的产生和铁的积累在细胞损伤中起关键作用^[16]。GSH 可以与氧自由基反应, 减少氧化应激, 从而有望降低铁死亡的风险。同时, GSH 还可以直接与铁离子结合, 对细胞内铁的分配和代谢产生影响^[17]。而细胞内铁的过度积累是细胞出现铁死亡的重要标志之一, 因此通过研究 GSH 的合成与转化是研究细胞内铁的平衡的重要切入点。

为此, 挑选在 GSH 合成及转化中起关键作用的酶 SLC7A11 与 GPX4 进行验证^[16]。其中 SLC7A11, 又被称为 xCT, 是一种膜蛋白, 属于 L-型氨基酸转运蛋白家族。它在细胞膜上定位, 并在多种细胞类型中广泛表达, 包括肿瘤细胞、神经元、肾脏细胞等^[18]。xCT 主要调节半胱氨酸

在细胞内的进出, 以此影响 GSH 的合成, 进而干预细胞内氧化还原平衡。GPX4 则是一类抗氧化酶, 其通过调节 GSH 与 GSSG 之间的转化, 维持细胞的氧化还原平衡, 为细胞抗氧化提供了一种保护, 减轻氧化应激对细胞的损害。柠檬烯给药后, 与对照组相比 xCT 与 GPX4 蛋白的表达均呈显著下调趋势, 结果见图 10。由此可见, 柠檬烯给药后降低了肺癌细胞抵抗铁死亡的能力。

尽管维持细胞内氧化还原平衡对于抵抗铁死亡具有重要意义, 但铁死亡通常涉及多种因素, 包括细胞内铁的积累、线粒体功能、DNA 损伤等。虽然 xCT 与 GPX4 通过维持细胞内 GSH 含量, 有助于减轻氧化应激, 但不能直接解决铁死亡的核心问题, 即细胞内铁的异常积累。为此, 进一步选取了 SLC40A1 蛋白进行研究。该蛋白是细胞膜上的一种铁转运蛋白, 主要负责将铁从细胞内释放到循环中, 以维持内铁平衡^[19]。本研究通过 Western blotting 测定发现, 柠檬烯给药后 SLC40A1 蛋白呈下调趋势, 表明柠檬烯通过抑制 SLC40A1 蛋白表达, 使得细胞内铁含量集聚, 以此增加细胞铁死亡的风险, 结果见图 10。

4 结论

综上所述, 本实验研究了柠檬烯对肺癌 A549 细胞的抑制作用, 并通过代谢组学等方法, 发现了柠檬烯抑制 A549 细胞与诱导细胞铁死亡有

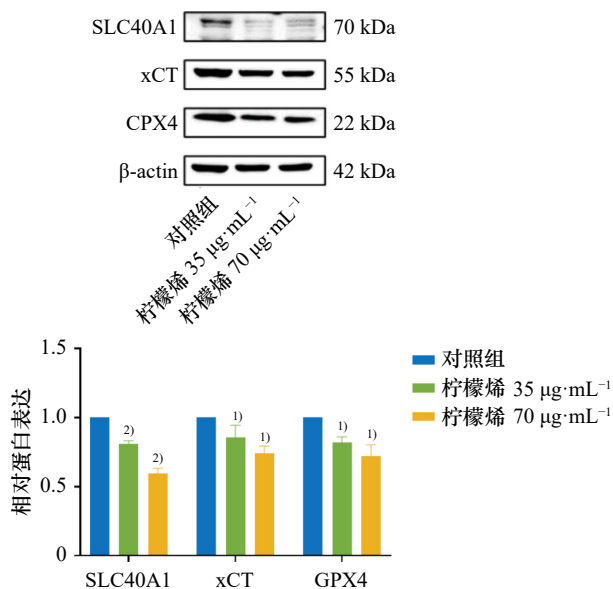


图 10 柠檬烯对 A549 细胞相关蛋白表达的影响与对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$ 。

Fig. 10 Effect of limonene on the expression of related proteins in A549 cells

Compared with the control group, ¹⁾ $P<0.01$, ²⁾ $P<0.001$.

关。根据 Western blotting 验证结果, 初步发现柠檬烯通过抑制 SLC40A1 蛋白表达, 直接升高肺癌细胞中铁离子含量。同时通过干预 GSH 的合成与转化, 打破细胞本身氧化应激平衡, 进一步诱导细胞铁死亡 (图 11)。以上研究初步揭示了柠檬烯抑制肺癌细胞的作用机制, 为柠檬烯的开发及利用提供了研究基础。

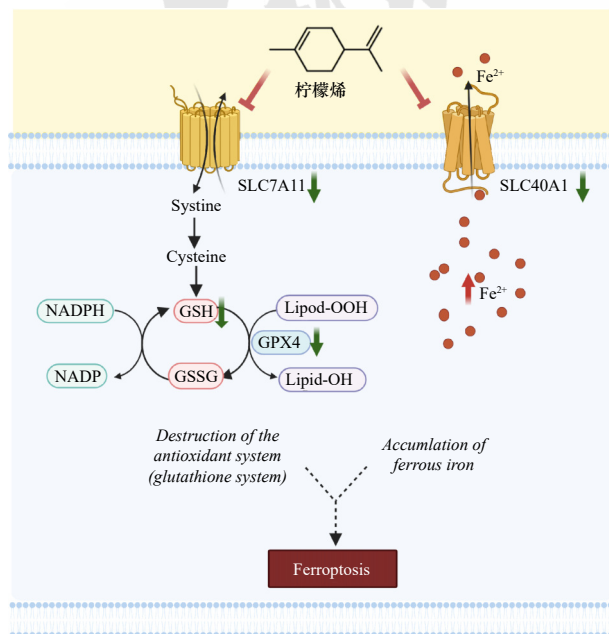


图 11 柠檬烯抗肺癌作用机制示例图

Fig. 11 Limonene anti-lung cancer mechanism example diagram

REFERENCES

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, WAGLE N S, et al. Cancer statistics, 2023[J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73(1): 17-48.
- [2] 朱小琼, 蒋栋铭, 沈佳莹, 等. 不同人类发展指数国家肺癌发病率和死亡率分析[J]. *上海预防医学*, 2023, 35(4): 305-313.
- [3] XIE X, CAI X, ZHOU F, et al. GPR37 promotes cancer growth by binding to CDK6 and represents a new theranostic target in lung adenocarcinoma[J]. *Pharmacol Res*, 2022(183): 1-16.
- [4] 王伟江. 天然活性单萜——柠檬烯的研究进展[J]. *中国食品添加剂*, 2005(1): 33-37.
- [5] ARAUJO-FILHO H G, DOS SANTOS J F, CARVALHO M T B, et al. Anticancer activity of limonene: A systematic review of target signaling pathways[J]. *Phytother Res*, 2021, 35(9): 4957-4970.
- [6] SUN J. D-Limonene: safety and clinical applications[J]. *Altern Med Rev*, 2007, 12(3): 259-264.
- [7] PETRETTO G L, VACCA G, ADDIS R, et al. Waste citrus limon leaves as source of essential oil rich in limonene and citral: chemical characterization, antimicrobial and antioxidant properties, and effects on cancer cell viability[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2023, 12(6): 1-21.
- [8] YANG Y, HONG Y, HAN J, et al. D-Limonene alleviates oxidative stress injury of the testis induced by arsenic in rat[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2023: 1-10.
- [9] D'ALESSIO P A, OSTAN R, BISSON J F, et al. Oral administration of d-limonene controls inflammation in rat colitis and displays anti-inflammatory properties as diet supplementation in humans[J]. *Life Sci*, 2013, 92(24-26): 1151-1156.
- [10] DE SOUZA M C, VIEIRA A J, BESERRA F P, et al. Gastroprotective effect of limonene in rats: Influence on oxidative stress, inflammation and gene expression[J]. *Phytomedicine*, 2019, 53: 37-42.
- [11] UMAGILIYAGE A L, BECERRA-MORA N, KOHLI P, et al. Antimicrobial efficacy of liposomes containing D-limonene and its effect on the storage life of blueberries[J]. *Postharvest Biol Tec*, 2017, 128: 130-137.
- [12] YUN J. Limonene inhibits methamphetamine -induced locomotor activity regulation of 5-HT neuronal function and dopamine release[J]. *Phytomedicine*, 2014, 21(6): 883-887.
- [13] BRAZ J D C, DE CARVALHO F O, MENESES D D C, et al. Mechanism of action of limonene in tumor cells: a systematic review and meta-analysis[J]. *Curr Pharm Design*, 2021, 27(26): 2956-2965.
- [14] YU X, LIN H Y, WANG Y, et al. D-limonene exhibits antitumor activity by inducing autophagy and apoptosis in lung cancer[J]. *Oncotargets Ther*, 2018, 11: 1833-1847.
- [15] ZHU T T, LI Q, XU L M, et al. Stratification of lung adenocarcinoma patients for d-limonene intervention based on the expression signature genes[J]. *Food Funct*, 2021, 12(16): 7214-7226.
- [16] TANG D, KROEMER G. Ferroptosis[J]. *Curr Biol*, 2020, 30(21): R1292-R7.
- [17] GALY B, CONRAD M, MUCKENTHALER M. Mechanisms controlling cellular and systemic iron homeostasis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023: 1-23.
- [18] SUN L L, DONG H L, ZHANG W Q, et al. Lipid peroxidation,

gsh depletion, and inhibition are common causes of emt and ferroptosis in a549 cells, but different in specific mechanisms[J]. *DNA Cell Biol*, 2021, 40(2): 172-183.

[19] CHEN F, CAI X, KANG R, et al. Autophagy-dependent

ferroptosis in cancer[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2023, 39(1-3): 79-101.

收稿日期: 2023-10-27

(本文责编: 沈倩)

青年编委: 周建良



周建良, 2010 年获中国药科大学药学博士学位, 2010—2018 年在浙江省食品药品检验研究院从事中药分析与质量评价研究, 2016—2017 年在美国约翰霍普金斯大学医学院开展博士后项目。现任杭州师范大学药学院教授、博导、中药分析药理实验室负责人、药物分析省一流课程负责人、药物分析教研室主任、浙产中药材资源开发与应用浙江省工程研究中心副主任等。兼任中国中西医结合学会中药专业委员会常务委员, 国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室学术委员, 浙江省标准创新贡献奖评审专家, 浙江省科技项目评审专家, 浙江省药学会中药与天然药物专委会委员, 浙江省药学会科技开发工作委员会委员, *Chinese Herbal Medicines*、《中国现代应用药学》青年编委等。曾任浙江省药学会中药与天然药物专委会青年委员会副主任委员。主持国家自然科学基金、浙江省自然科学基金等项目 9 项。以第一起草人制定国家标准 2 个、境外标准 1 个。在 *TrAC-Trend Anal Chem*、*Anal Chem*、*Anal Chim Acta*、*Phytomedicine* 等期刊上发表学术论文 50 余篇, 以副主编出版著作 6 部。获全国百篇优秀博士论文提名奖、杭州市高层次人才、杭州市教育局优秀教师等。作为主要完成人获国家科技进步二等奖、教育部科技进步一等奖、浙江省标准创新贡献奖优秀贡献奖、浙江省科技进步三等奖、浙江省教学成果二等奖等。研究方向为中药分析与中药抗肿瘤药效物质。