

[文章编号] 1671-587X(2024)03-0647-11

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240308

D-柠檬烯对胶质母细胞瘤细胞增殖的抑制作用及其机制

王腾飞^{1,2}, 陈凤^{1,2}, 齐玲², 雷婷¹, 宋美慧²

(1. 大理大学药学院, 云南 大理 671000; 2. 广州医科大学附属清远医院 广东省清远市人民医院, 广东 清远 511500)

[摘要] **目的:** 探讨D-柠檬烯对胶质母细胞瘤(GBM)细胞增殖和凋亡的影响, 并阐明其可能的作用机制。**方法:** 将GBM细胞分为对照组(0 mmol·L⁻¹ D-柠檬烯)和0.2、0.4、0.6、0.8及1.0 mmol·L⁻¹ D-柠檬烯组。采用CCK-8法检测各组细胞增殖抑制率, 克隆形成法检测各组细胞克隆形成率, Annexin V-FITC/PI法检测各组细胞凋亡率, Western blotting法检测各组细胞中蛋白激酶B(AKT)、B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)和多聚二磷酸腺苷(ADP)核糖聚合酶(PARP)蛋白表达水平, 免疫荧光法检测各组细胞中裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(cleaved Caspase)-3蛋白表达水平。15只建立皮下移植瘤模型小鼠随机分为空白组(0 mg·kg⁻¹·d⁻¹ D-柠檬烯)、低剂量D-柠檬烯组(200 mg·kg⁻¹·d⁻¹ D-柠檬烯)和高剂量D-柠檬烯组(400 mg·kg⁻¹·d⁻¹ D-柠檬烯), 每组5只。计算各组小鼠体内肿瘤抑制率, HE染色和免疫组织化学染色观察各组小鼠皮下肿瘤组织形态表现, 并绘制肿瘤生长曲线, 免疫组织化学法检测各组小鼠皮下瘤组织中Ki67蛋白阳性表达率, TUNEL染色法检测各组小鼠肿瘤细胞凋亡情况。**结果:** 对照组细胞呈长梭形, 状态良好, 紧密且贴壁生长, 细胞器和细胞质正常; 给药48 h后, 0.6 mmol·L⁻¹ D-柠檬烯组细胞体积减小, 细胞膜虽完整但通透性增强, 细胞质皱缩, 细胞内部产生空泡结构, 部分呈碎片状漂浮在溶液表面; 0.8和1.0 mmol·L⁻¹ D-柠檬烯组细胞中有明显凋亡小体生成, 呈现凋亡状态。CCK-8法, 与对照组比较, 0.6、0.8和1.0 mmol·L⁻¹ D-柠檬烯组U87、LN229及GL261细胞增殖抑制率均明显升高($P < 0.01$), 0.4 mmol·L⁻¹ D-柠檬烯组U87和GL261细胞增殖抑制率均明显升高($P < 0.01$)。克隆形成法, 与对照组比较, 0.4、0.6和0.8 mmol·L⁻¹ D-柠檬烯组U87、LN229及GL261细胞克隆形成率均明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。Annexin V-FITC/PI法, 与对照组比较, D-柠檬烯处理48 h后, 0.6、0.8和1.0 mmol·L⁻¹ D-柠檬烯组LN229细胞凋亡率明显升高($P < 0.01$)。Western blotting法, 与对照组比较, 0.6、0.8和1.0 mmol·L⁻¹ D-柠檬烯组LN229细胞中Bax蛋白表达水平均明显升高($P < 0.01$), AKT和Bcl-2蛋白表达水平均明显降低($P < 0.01$); 0.8和1.0 mmol·L⁻¹ D-柠檬烯组LN229细胞中PARP蛋白表达水平均明显升高($P < 0.01$)。免疫荧光法, 与对照组比较, 0.6、0.8和1.0 mmol·L⁻¹ D-柠檬烯组LN229细胞中cleaved Caspase-3蛋白表达水平均明显升高($P < 0.01$)。与空白组比较, 低和高剂量D-柠檬烯组小鼠肿瘤体积均明显减小($P < 0.01$)。与空白组比较, 低和高剂量D-柠檬烯组小鼠肿瘤质量均明显降低($P < 0.05$), 肿瘤抑制率均明显升高($P < 0.05$)。空白组小鼠肿瘤细胞弥漫分布, 细胞核染色加深, 核浆比增大; 低和高剂量D-柠檬烯组小鼠肿瘤组织出现大量肿瘤细胞变性坏死。与空白组比较, 低和高剂量D-柠檬烯组小鼠肿瘤组织中Ki67蛋白阳性表达率均明显降低($P < 0.01$)。与空白组比较, 低和高剂量D-柠檬烯组小鼠肿瘤细胞凋亡率均明显升高($P < 0.01$)。**结论:** D-柠檬烯具有抑制GBM细胞增殖的作用, 其作用机制可能与调控AKT蛋白的表达并激活Caspase-3通路诱导凋亡有关。

[收稿日期] 2023-07-13

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82203351, 82160662); 广东省基础研究委员会基础与应用基础研究基金项目(2021A1515111095, 2021A1515010716); 广东省清远市人民医院医学科研基金(20220330)

[作者简介] 王腾飞(1998—), 男, 山东省烟台市人, 在读硕士研究生, 主要从事肿瘤与DNA损伤修复方面的研究。

[通信作者] 雷婷, 助理研究员, 硕士研究生导师(E-mail: leiting@dali.edu.cn);

宋美慧(E-mail: songmeihui.gzhmu@foxmail.com)

[关键词] D-柠檬烯; 胶质母细胞瘤; 细胞凋亡; 移植瘤; 蛋白激酶B

[中图分类号] R739.4 [文献标志码] A

Inhibitory effect of D-limonene on proliferation of glioblastoma cells and its mechanism

WANG Tengfei^{1,2}, CHEN Feng^{1,2}, QI Ling², LEI Ting¹, SONG Meihui²

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Dali University, Dali 671000, China; 2. Institute of Digestive Disease, People's Hospital, Qingyuan City, Guangdong Province, Qingyuan 511500, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of D-limonene on the proliferation and apoptosis of the glioblastoma (GBM) cells, and to clarify its possible mechanism. **Methods:** The GBM cells were divided into control group (0 mmol·L⁻¹ D-limonene) and 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, and 1.0 mmol·L⁻¹ D-limonene groups. CCK-8 method was used to detect the inhibitory rates of proliferation of the cells in various groups; clone formation assay was used to detect the clone formation rates of the cells in various groups; Annexin V-FITC/PI method was used to detect the apoptotic rates of the cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of protein kinase B (AKT), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), and poly adenosine diphosphate (ADP)-ribose polymerase (PARP) proteins in the cells in various groups; immunofluorescence method was used to detect the expression levels of cleaved Caspase-3 protein in the cells in various groups. Fifteen model mice with subcutaneous tumor xenografts were randomly divided into blank group (0 mg·kg⁻¹·d⁻¹ D-limonene), low dose of D-limonene group (200 mg·kg⁻¹·d⁻¹ D-limonene), and high dose of D-limonene group (400 mg·kg⁻¹·d⁻¹ D-limonene), and there were 5 mice in each group. The inhibitory rates of the tumor *in vitro* in various groups were calculated; HE staining and immunohistochemical staining were used to observe the morphology of subcutaneous tumor tissue of the mice in various groups and the growth curves of the tumor were drawn; immunohistochemical assay was used to detect the positive expression rates of Ki67 protein in subcutaneous tumor tissue of the mice in various groups; TUNEL staining was used to detect the apoptosis of the tumor cells in various groups. **Results:** In control group, the cells were spindle-shaped, in good condition, growing closely and adherently, with normal organelles and cytoplasm. After treated for 48 h, the cells in 0.6 mmol·L⁻¹ D-limonene group showed reduced volume, intact but more permeable cell membranes, shrunken cytoplasm, internal vacuole structures, and some fragments floating in the solution. The cells in 0.8 and 1.0 mmol·L⁻¹ D-limonene groups exhibited significant apoptotic bodies and were in an apoptotic state. The CCK-8 results showed that compared with control group, the inhibitory rates of proliferation of the U87, LN229, and GL261 cells in 0.6, 0.8, and 1.0 mmol·L⁻¹ D-limonene groups were significantly increased ($P < 0.01$), the inhibitory rates of proliferation of the U87 and GL261 cells were significantly increased ($P < 0.01$). The clone formation assay results showed that compared with control group, the clone formation rates of the U87, LN229, and GL261 cells in 0.4, 0.6, and 0.8 mmol·L⁻¹ D-limonene groups were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The Annexin V-FITC/PI results showed that compared with control group, after treated with D-limonene for 48 h, the apoptotic rates of the LN229 cells in 0.6, 0.8, and 1.0 mmol·L⁻¹ D-limonene groups were significantly increased ($P < 0.01$). The Western blotting results showed that compared with control group, the expression levels of Bax proteins in the LN229 cells in 0.6, 0.8, and 1.0 mmol·L⁻¹ D-limonene groups were significantly increased ($P < 0.01$), while the expression levels of AKT and Bcl-2 proteins were significantly decreased ($P < 0.01$), the expression level of PARP protein in the LN229 cells in 0.8 and

1.0 mmol·L⁻¹ D-limonene group was significantly increased ($P < 0.01$). The immunofluorescence results showed that compared with control group, the expression levels of cleaved Caspase-3 protein in the LN229 cells in 0.6, 0.8, and 1.0 mmol·L⁻¹ D-limonene groups were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with blank group, the tumor volumes of the mice in low and high doses of D-limonene groups were significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with blank group, the tumor weights of the mice in low and high doses of D-limonene groups were significantly decreased ($P < 0.05$), and the inhibitory rates of tumor were significantly increased ($P < 0.05$). The tumor cells in blank group were diffusely distributed, with deepened nuclear staining and increased nucleocytoplasmic ratio; a large number of degenerated and necrotic tumor cells were observed in tumor tissue of the mice in low and high doses of D-limonene groups. Compared with blank group, the positive expression rates of Ki67 protein in tumor tissue of the mice in low and high doses of D-limonene groups were significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with blank group, the apoptotic rates of tumor cells of the mice in low and high doses of D-limonene groups were significantly increased ($P < 0.01$). **Conclusion:** D-limonene has the inhibitory effect on the proliferation of the GBM cells; its mechanism may be related to the regulation of AKT protein expression and the activation of the Caspase-3 pathway to induce the apoptosis.

KEYWORDS D-limonene; Glioblastoma; Apoptosis; Transplantation tumor; Protein kinase B

胶质母细胞瘤 (glioblastoma, GBM) 是一种常见的脑内原发性肿瘤, 是脑肿瘤分类的最高等级, 具有恶性程度高、侵袭性强、增殖速度快、治疗耐药、预后差和易复发等特点^[1]。目前临床主要治疗方式为手术切除, 并辅助放疗和化疗, 但治疗效果较差, 且患者不良反应明显, 患者术后3年生存率不足5%, 因此提高GBM患者生存时间是目前研究的热点^[2-3]。蛋白激酶B (protein kinase B, AKT) 参与细胞的多种过程, 包括细胞凋亡和细胞增殖, AKT蛋白的异常活化在人类癌症中较为常见。PAGE等^[4]研究显示: AKT蛋白的异常激活使肿瘤细胞对凋亡刺激的敏感性降低, 抑制该信号通路可能为癌症治疗提供参考。JIA等^[5]研究发现: D-柠檬烯具有抑制结直肠癌细胞中AKT蛋白表达的作用, 可通过抑制AKT蛋白表达有效抑制结直肠癌细胞增殖, 并促进细胞凋亡发生。D-柠檬烯是柑橘精油中富含的一种天然单萜, 具有镇咳、祛痰和抑菌等多种生物活性^[6-7]。研究^[8-11]显示: D-柠檬烯具有抑制胃癌、肺癌和结肠癌细胞增殖的作用。但D-柠檬烯对GBM细胞增殖的抑制作用目前尚未见报道。本研究以LN229、U87和GL261细胞为研究对象, 探讨D-柠檬烯对GBM细胞增殖和凋亡的影响及其对GBM皮下移植瘤小鼠的治疗作用, 阐明D-柠檬烯抑制GBM的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物、细胞、药物、主要试剂和仪器 15只C57BL/6小鼠 (广东药康生物科技有限公司),

5周龄, 体质量18~26 g, 实验动物生产许可证号: SCXK (粤) 2022-0002, 动物实验通过广东省清远市人民医院动物伦理委员会审批, 伦理审批号: LAEC-2023-029。人源GBM细胞U87 (美国ATCC细胞库), LN229细胞 (中山大学动物实验中心细胞库), 鼠源GBM细胞GL261 [润盈生物工程 (上海) 有限公司]。D-柠檬烯 (美国Sigma公司)。玉米油 (上海源叶试剂有限公司), 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) (美国Sigma公司), DMEM高糖培养基、1%青-链霉素和胰蛋白酶 (美国Gibco公司), 胎牛血清 (澳大利亚ExCell Bio公司), 12%凝胶电泳蛋白预制胶 (南京艾思易生物科技有限公司), BCA试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司), RIPA裂解液 (江苏康为世纪生物科技有限公司), Super ECL Plus超敏发光液 (北京普利莱基因技术有限公司), CCK-8试剂盒 (美国GLPBIO公司), 裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase, cleaved Caspase)-3、多聚二磷酸腺苷 (adenosine diphosphate, ADP) 核糖聚合酶 (poly ADP-ribose polymerase, PARP)、AKT、B细胞淋巴瘤2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白 (Bcl-2-associated X, Bax)、 β -actin抗体和HRP标记二抗 (美国Cell Signaling公司), Ki67抗体 (北京中杉金桥生物技术有限公司), Annexin V/PI凋亡试剂盒 (武汉Elabscience公司)。CO₂恒温培养箱 (型号: CLM-170B-8-CN, 新加坡ESCO公司), 倒置荧

光显微镜(型号: Axio Observer 7, 德国 Zeiss 公司), 光学显微镜(型号: ICX41, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司), 电泳系统(型号: PowerPac HC, 美国 Bio-Rad 公司), 酶标仪(型号: 601-0356, 德国 SPECTOR Star 公司)。

1.2 细胞培养和分组 U87、LN229 和 GL261 细胞培养于含 10% 胎牛血清及 1% 青-链霉素的 DMEM 高糖培养基中。待细胞融合度达到 80% 时, 采用胰蛋白酶消化, 制备成单细胞悬液备用。D-柠檬烯溶解于 DMSO 中, 初始浓度为 $1\ 028\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。细胞实验分为对照组 ($0\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ D-柠檬烯) 和不同浓度 (0.2 、 0.4 、 0.6 、 0.8 和 $1.0\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) D-柠檬烯组。

1.3 光学显微镜观察各组 LN229 细胞形态表现

取对数生长期 LN229 细胞, 按照每孔 1×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔细胞培养板。培养 24 h 后, 加入含 0 、 0.6 、 0.8 和 $1.0\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ D-柠檬烯的无血清培养基。继续培养 48 h 后, 采用光学显微镜观察各组 LN229 细胞形态表现。

1.4 CCK-8 法检测各组细胞增殖抑制率 采用 CCK-8 法检测细胞增殖抑制率, 并筛选出后续实验的给药浓度。将对数生长期的 GBM 细胞消化重悬, 以每孔 8×10^3 个细胞的密度接种于 96 孔细胞培养板。于 $37\ ^\circ\text{C}$ 、 $5\%\ \text{CO}_2$ 和饱和湿度条件下培养, 待细胞贴壁后, 加入含不同浓度 D-柠檬烯的完全培养基, D-柠檬烯最终浓度为 0 、 0.2 、 0.4 、 0.6 、 0.8 和 $1.0\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 每个浓度设 3 个复孔。培养 48 h 后, 每孔更换为含 $10\ \mu\text{L}$ CCK-8 染液的完全培养基, 孵箱培养 2 h 后, 采用酶标仪于波长 $450\ \text{nm}$ 处检测各孔吸光度 (A) 值, 计算各组细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率 = $[1 - (\text{加药组 A 值} - \text{空白组 A 值}) / (\text{未加药组 A 值} - \text{空白组 A 值})] \times 100\%$ 。

1.5 克隆形成法检测各组细胞克隆形成率 取对数生长期的 U87、LN229 和 GL261 细胞, 以每孔 500 个细胞的密度接种于 6 孔细胞培养板, 待细胞贴壁后, 分别加入 0 、 0.4 、 0.6 和 $0.8\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ D-柠檬烯处理 48 h。继续于恒温培养箱中培养 14 d, 并每隔 3 d 更换完全培养基。将细胞用 4% 多聚甲醛固定, 采用 0.5% 结晶紫染液染色, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 冲洗多余和结合不牢固的结晶紫染液, 待自然晾干后, 显微镜下观察并拍照, 计数细胞克隆形成数, 计算各组细

胞克隆形成率。克隆形成率 = 克隆形成数 / 总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.6 Annexin V-FITC/PI 法检测各组细胞凋亡率

取对数生长期 LN229 细胞, 按照每孔 2×10^4 个细胞的密度接种于 8 孔腔室盖玻片中, 每孔添加 $200\ \mu\text{L}$ 完全培养基, 待细胞贴壁后, 分别用终浓度为 0 、 0.6 、 0.8 和 $1.0\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 D-柠檬烯处理 48 h。每孔加入 $2\ \mu\text{L}$ 的 Annexin V 和 $2\ \mu\text{L}$ 的 PI 染液, 室温避光孵育 15 min。采用荧光显微镜分别于 FITC 和 PI 通道拍摄图片, Image J 软件计数凋亡细胞, 采用 Graphad prism 8.0.2 软件计算各组细胞凋亡率。细胞凋亡率 = (早期凋亡细胞数 + 晚期凋亡细胞数) / 细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.7 Western blotting 法检测各组细胞中 AKT、Bcl-2、Bax 和 PARP 蛋白表达水平

取对数生长期的 LN229 细胞, 按每孔 2×10^5 个细胞的密度接种于 6 孔细胞培养板, 待细胞生长至 $70\%\sim 80\%$ 密度时, 分别采用终浓度为 0 、 0.6 、 0.8 和 $1.0\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ D-柠檬烯处理 48 h。收集细胞至 $1.5\ \text{mL}$ 离心管中, 离心弃上清, 加入 $120\ \mu\text{L}$ 的 RIPA 裂解液裂解细胞, 并提取细胞总蛋白, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒对蛋白浓度进行定量, 加入 Loading Buffer, $95\ ^\circ\text{C}$ 金属浴使蛋白变性。每孔上样量为 $80\ \mu\text{g}$ 蛋白, 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE), 将蛋白转移至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜。 5% 脱脂奶粉封闭, 加入一抗 ($1:1\ 000$) $4\ ^\circ\text{C}$ 摇床孵育过夜, TBST 溶液洗涤 3 次, 每次 5 min, 加入相应的二抗 ($1:2\ 000$) 室温摇床孵育 1.5 h, 凝胶成像系统拍照, 采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 以 β -actin 为内参, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平 = 目的蛋白条带灰度值 / 内参蛋白条带灰度值。

1.8 免疫荧光法检测各组细胞中 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平

取对数生长期 LN229 细胞, 按照每孔 2×10^4 个细胞的密度接种于 8 孔腔室盖玻片中, 每孔添加 $200\ \mu\text{L}$ 完全培养基, 待细胞贴壁后, 分别用终浓度为 0 、 0.6 、 0.8 和 $1.0\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 D-柠檬烯处理 48 h。 4% 多聚甲醛固定细胞, cleaved Caspase-3 ($1:400$) 抗体 $4\ ^\circ\text{C}$ 孵育过夜, PBS 缓冲液洗涤 3 次, 每次 5 min, 加入对应荧光二抗 ($1:500$), 室温避光孵育 1 h 后, 加入 DAPI 染液复染细胞核。采用荧光显微镜在 FITC 通道下拍

照, Image J软件计算各组细胞中cleaved Caspase-3蛋白荧光强度, 采用Graphad prism 8.0.2软件计算各组细胞中cleaved Caspase-3蛋白平均荧光强度, 代表其蛋白表达水平。

1.9 小鼠皮下移植瘤模型建立 收集GL261细胞, PBS缓冲液重悬至细胞密度为 $1.5 \times 10^7 \text{ mL}^{-1}$ 。15只小鼠建立皮下移植瘤模型, 每只小鼠皮下注射 $200 \mu\text{L}$ 细胞悬液至小鼠左侧腋下区域。1周后将造模小鼠随机分为空白组、低和高剂量D-柠檬烯组, 每组5只。低和高剂量D-柠檬烯组小鼠用玉米油溶解的D-柠檬烯灌胃, D-柠檬烯浓度分别为200和 $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 空白组小鼠仅用玉米油灌胃。每4 d用游标卡尺测量各组小鼠肿瘤直径(mm)。肿瘤体积(V)= $1/2 \times a \times b^2$, a为小鼠肿瘤最大直径(mm), b为小鼠肿瘤最小直径(mm)。治疗3周后, 对小鼠进行安乐死, 收集肿瘤并称质量, 计算各组小鼠体内肿瘤抑制率。肿瘤抑制率=(对照组小鼠肿瘤质量-治疗组小鼠肿瘤质量)/对照组小鼠肿瘤质量 $\times 100\%$ 。各组小鼠肿瘤组织石蜡包埋切片, HE染色和免疫组织化学染色观察各组小鼠皮下肿瘤组织形态表现, 并绘制肿瘤生长曲线。

1.10 免疫组织化学法检测各组小鼠皮下瘤组织中Ki67蛋白阳性表达率 取出小鼠肿瘤, 固定和脱水后, 制成3 mm石蜡切片, 脱蜡, 水化, 使用柠檬酸钠缓冲液进行高温抗原修复15 min, 0.5% Triton X-100处理15 min, 采用3% H_2O_2 处理20 min, 5% BSA封闭30 min, 加入Ki67抗体, 4°C 孵育过夜后, PBS缓冲液清洗后使用对应二抗室温孵育30 min, 显色封片, 计数Ki67阳性细胞数。Ki67蛋白阳性表达率=Ki67阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.11 TUNEL染色法检测各组小鼠皮下肿瘤细胞凋亡情况

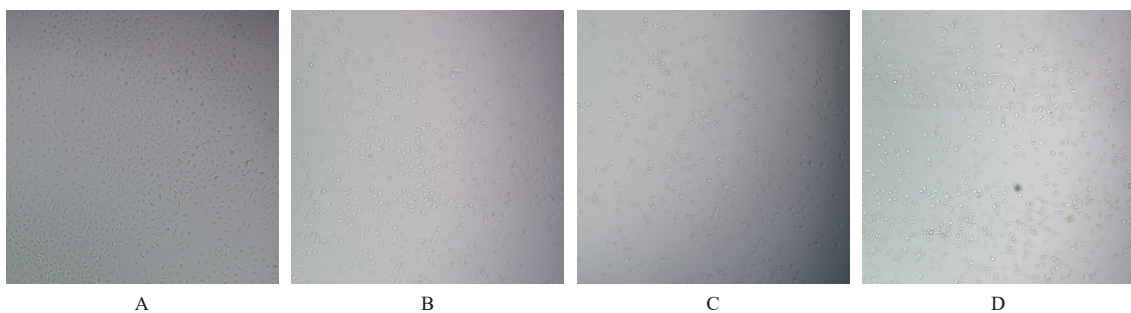
将肿瘤制成3 mm的石蜡切片, 于二甲苯和乙醇中进行脱蜡及脱水, PBS缓冲液洗涤2次, 每次5 min, 于 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 蛋白酶K溶液中孵育15 min, PBS缓冲液洗涤3次, 每次5 min, 加入配置好的TUNEL染色液中, 室温避光孵育2 h, PBS缓冲液洗涤3次, 每次5 min, 采用DAPI孵育10 min复染细胞核, 荧光显微镜于FITC通道下观察并拍照, 计数TUNEL阳性细胞数, 计算各组小鼠皮下肿瘤细胞凋亡率。皮下肿瘤细胞凋亡率=TUNEL阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.12 统计学分析 采用GraphPad Prism 8统计软件进行统计学分析和绘制图像。各组GBM细胞增殖抑制率、克隆形成率和细胞凋亡率, 细胞中Bax、Bcl-2、PARP、AKT和cleaved Caspase-3蛋白表达水平, 小鼠肿瘤体积、肿瘤质量、肿瘤抑制率和Ki67蛋白阳性表达率均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用Dunnett's *t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组LN229细胞形态表现 对照组细胞呈长梭形, 状态良好, 紧密且贴壁生长, 细胞器和细胞质正常; 给药48 h后, $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ D-柠檬烯组细胞体积减小, 细胞膜虽完整但通透性增强, 细胞质皱缩, 细胞内部产生空泡结构, 部分呈碎片状漂浮在溶液表面; 0.8 和 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ D-柠檬烯组细胞中有明显凋亡小体生成, 呈现凋亡状态。见图1。

2.2 各组细胞增殖抑制率和克隆形成率 与对照组比较, 0.6 、 0.8 和 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ D-柠檬烯组U87、LN229及GL261细胞增殖抑制率均明显升高



A: Control group; B: $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ D-limonene group; C: $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ D-limonene group; D: $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ D-limonene group.

图1 光学显微镜观察各组LN229细胞形态表现($\times 10$)

Fig. 1 Morphology of LN229 cells in various groups observed by light microscope ($\times 10$)

($P < 0.01$), 0.4 mmol·L⁻¹ D-柠檬烯组 U87 和 GL261 细胞增殖抑制率均明显升高 ($P < 0.01$)。与对照组比较, 0.4、0.6 和 0.8 mmol·L⁻¹ D-柠檬烯组 U87、LN229 及 GL261 细胞克隆形成率均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 1、图 2 和表 2。

表 1 CCK-8法检测各组细胞增殖抑制率

Tab. 1 Inhibitory rates of proliferation of cells in various groups detected by CCK-8 method ($n=3, \bar{x} \pm s, \eta/\%$)

Group	Inhibitory rate of proliferation		
	LN229 cells	U87 cells	GL261 cells
Control	0	0	0
0.2 mmol·L ⁻¹ D-limonene	8.77 ± 2.36	13.30 ± 1.89	5.18 ± 0.89
0.4 mmol·L ⁻¹ D-limonene	7.10 ± 5.79	36.15 ± 4.11*	12.02 ± 4.55*
0.6 mmol·L ⁻¹ D-limonene	23.80 ± 2.20*	52.43 ± 10.06*	43.91 ± 7.31*
0.8 mmol·L ⁻¹ D-limonene	29.24 ± 2.63*	49.91 ± 4.45*	52.68 ± 1.95*
1.0 mmol·L ⁻¹ D-limonene	64.80 ± 0.49*	60.69 ± 3.15*	61.12 ± 7.51*

* $P < 0.01$ vs control group.

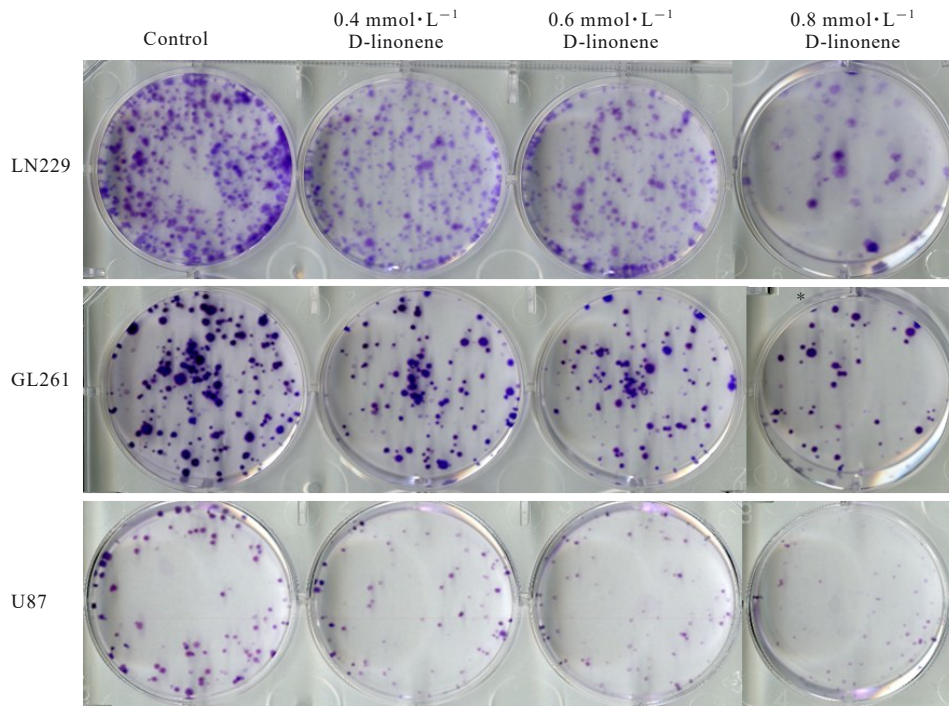


图 2 克隆形成法检测各组细胞克隆形成情况(结晶紫)

Fig. 2 Clone formation of cells in various groups detected by clone formation assay(Cnystal violet)

表 2 各组细胞克隆形成率

Tab. 2 Clone formation rates of cells in various groups

($n=3, \bar{x} \pm s, \eta/\%$)

Group	Clone formation rate		
	LN229 cells	U87 cells	GL261 cells
Control	100.00 ± 5.99	100.00 ± 3.96	100.00 ± 12.63
0.4 mmol·L ⁻¹ D-limonene	64.23 ± 8.64**	71.62 ± 9.52*	67.05 ± 5.62**
0.6 mmol·L ⁻¹ D-limonene	57.93 ± 6.79**	58.85 ± 7.78**	49.43 ± 3.68**
0.8 mmol·L ⁻¹ D-limonene	21.41 ± 4.33**	47.21 ± 8.22**	42.05 ± 3.50**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

2.3 各组细胞凋亡率 与对照组 ($0.02\% \pm 0.01\%$) 比较, D-柠檬烯处理 48 h 后, $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ D-柠檬烯组 ($0.34\% \pm 0.02\%$)、 $0.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ D-柠檬烯组 ($0.69\% \pm 0.12\%$) 和 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ D-柠檬烯组 ($0.83\% \pm 0.09\%$) LN229 细胞凋亡率均明显升高 ($P < 0.01$)。见图 3。

2.4 各组细胞凋亡相关蛋白和 AKT 蛋白表达水平 与对照组比较, 0.6 、 0.8 和 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ D-柠檬烯组 LN229 细胞中 Bax 蛋白表达水平均明

显升高 ($P < 0.01$), AKT 和 Bcl-2 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.01$); 0.8 和 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ D-柠檬烯组 LN229 细胞中 PARP 蛋白表达水平均明显升高 ($P < 0.01$)。见图 4。与对照组 (75.33 ± 35.61) 比较, 0.6 、 0.8 和 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ D-柠檬烯组 LN229 细胞中 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平 ($10\ 993.41 \pm 715.07$, $27\ 322.37 \pm 1\ 902.90$ 和 $35\ 354.68 \pm 17\ 738.01$) 均明显升高 ($P < 0.01$)。见图 5。

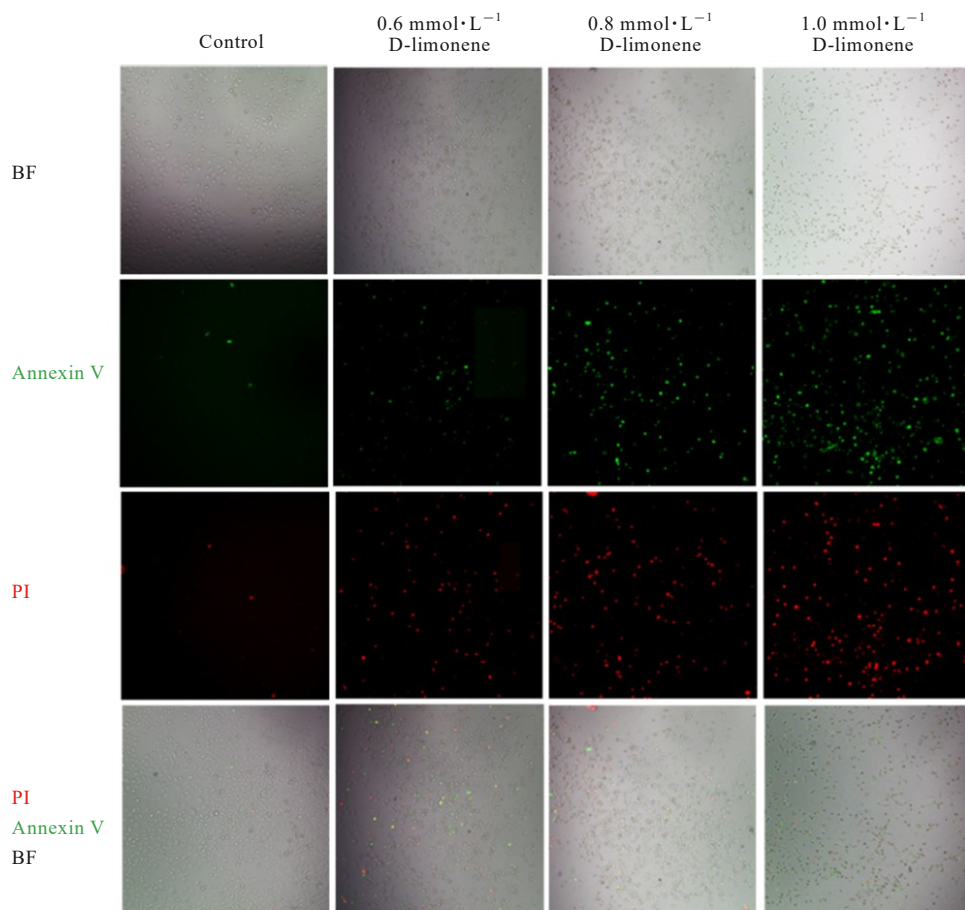
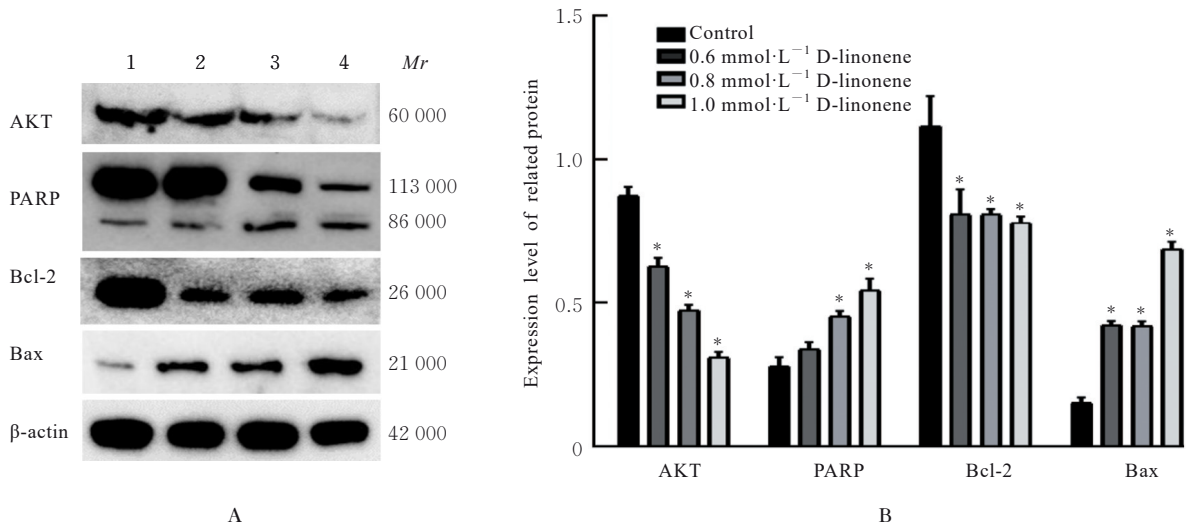


图3 Annexin V-FITC/PI法检测各组 LN229 细胞凋亡情况($\times 10$)

Fig. 3 Apoptosis of LN229 cells in various groups detected by Annexin V-FITC/PI method($\times 10$)

2.5 各组小鼠体内肿瘤抑制率 与空白组比较, 低和高剂量 D-柠檬烯组小鼠肿瘤体积均明显减小 ($P < 0.01$)。与低剂量 D-柠檬烯组比较, 高剂量 D-柠檬烯组小鼠肿瘤体积减小, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 6 和图 7。与空白组比较, 低和高剂量 D-柠檬烯组小鼠肿瘤质量均明显降低 ($P < 0.05$), 体内肿瘤抑制率均明显升高 ($P < 0.05$)。见表 3。

2.6 各组小鼠移植瘤肿瘤组织病理形态表现、Ki67 蛋白阳性表达率和细胞凋亡率 空白组小鼠肿瘤细胞弥漫分布, 细胞核染色加深, 核浆比增大; 低和高剂量 D-柠檬烯组小鼠肿瘤组织出现大量肿瘤细胞变性坏死。与空白组 ($47.53\% \pm 3.22\%$) 比较, 低和高剂量 D-柠檬烯组小鼠肿瘤组织中 Ki67 蛋白阳性表达率 ($26.97\% \pm 3.68\%$ 和 $21.50\% \pm 1.53\%$) 均明显降低 ($P < 0.01$)。与空白组 ($2.37\% \pm$



Lane 1: Control group; Lane 2: 0.6 mmol·L⁻¹ D-limonene group; Lane 3: 0.8 mmol·L⁻¹ D-limonene group; Lane 4: 1.0 mmol·L⁻¹ D-limonene group. * $P < 0.01$ vs control group.

图4 Western blotting法检测各组细胞中AKT、Bcl-2、Bax和PARP蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)

Fig. 4 Electrophoregram (A) and histogram (B) of expressions of AKT, Bcl-2, Bax, and PARP proteins in cells in various groups detected by Western blotting method

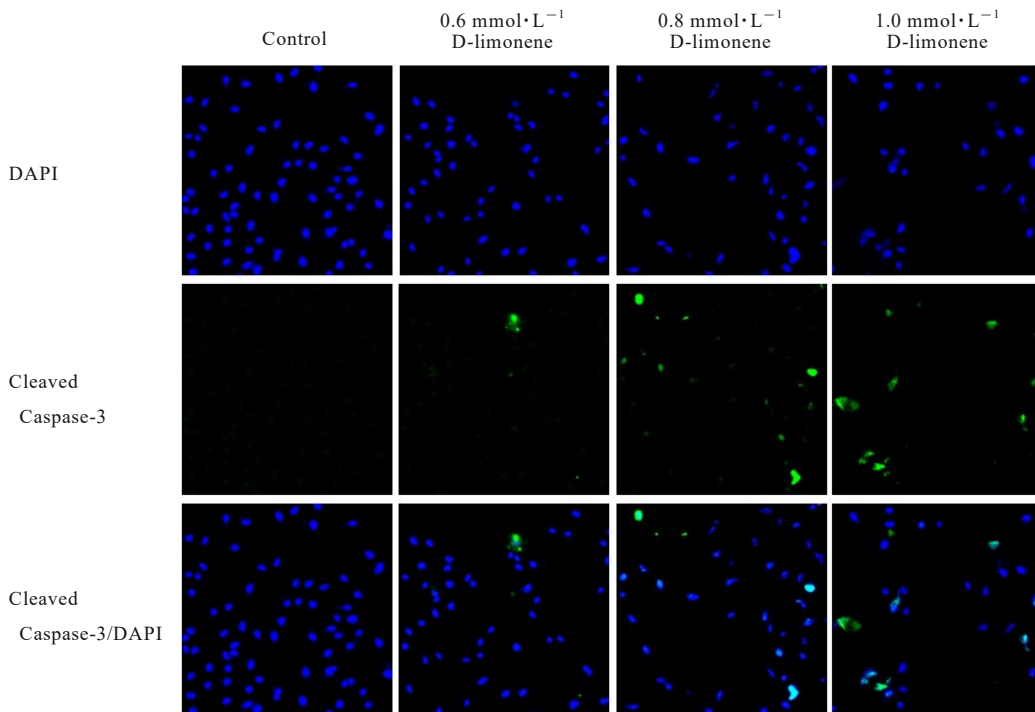


图5 免疫荧光法检测各组LN229细胞中cleaved Caspase-3蛋白表达情况($\times 20$)

Fig. 5 Expressions of cleaved Caspase-3 protein in LN229 cells in various groups detected by immunofluorescence method($\times 20$)

0.46%) 比较, 低和高剂量D-柠檬烯组小鼠肿瘤细胞凋亡率 ($20.47\% \pm 2.39\%$ 和 $31.42\% \pm 1.79\%$) 均明显升高 ($P < 0.01$)。见图8和9。

3 讨论

D-柠檬烯是一种具有芳香气味的单环单萜化合物, 在肿瘤细胞和动物模型中具有化学预防及化疗

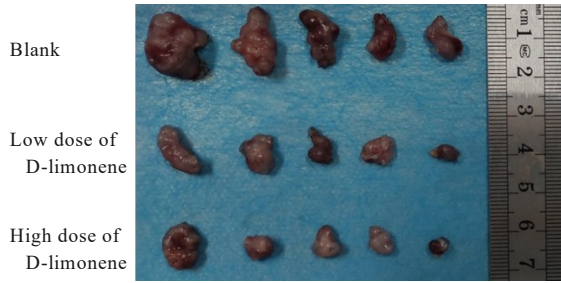
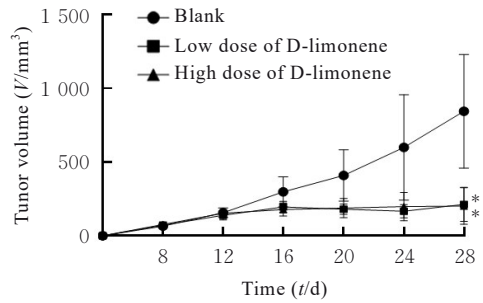


图6 各组小鼠移植瘤形态

Fig. 6 Morphology of transplantation tumor of mice in various groups



*P<0.01 vs control group.

图7 各组小鼠移植瘤生长曲线

Fig. 7 Growth curves of transplantation tumor of mice in various groups

活性^[12-14]。研究^[15]显示：D-柠檬烯参与诱导肿瘤细胞凋亡，具有抑制肿瘤细胞增殖的作用。ZHANG等^[16]发现：D-柠檬烯通过细胞周期阻滞、活性氧产生和线粒体介导产生较好的抗胃癌作用。D-柠檬烯通过诱导细胞自噬和凋亡，抑制肺癌细胞增殖^[17]。D-柠檬烯通过抑制AKT磷酸化诱导细胞凋亡，抑制结肠癌细胞的恶性增殖。然而，D-柠檬

烯对GBM细胞的影响及其作用机制尚未完全阐明。

本研究结果显示：D-柠檬烯在体内和体外均可抑制GBM细胞的生长或增殖，并能够明显促进细胞凋亡；不同浓度的D-柠檬烯能够明显降低GBM细胞存活率，从而抑制其增殖。小鼠体内实验进一步证实：D-柠檬烯抑制小鼠皮下移植瘤的生长。

表3 各组小鼠肿瘤质量和体内肿瘤抑制率

Tab. 3 Tumor weights and inhibitory rates of tumor *in vitro* of mice in various groups (n=3, $\bar{x} \pm s$)

Group	Tumor weight (m/g)	Inhibitory rate of tumor (η /%)
Blank	0.45±0.23	0
Low dose of D-limonene	0.16±0.07*	65.52±15.51*
High dose of D-limonene	0.16±0.08*	67.46±17.57*

*P<0.05 vs blank group.

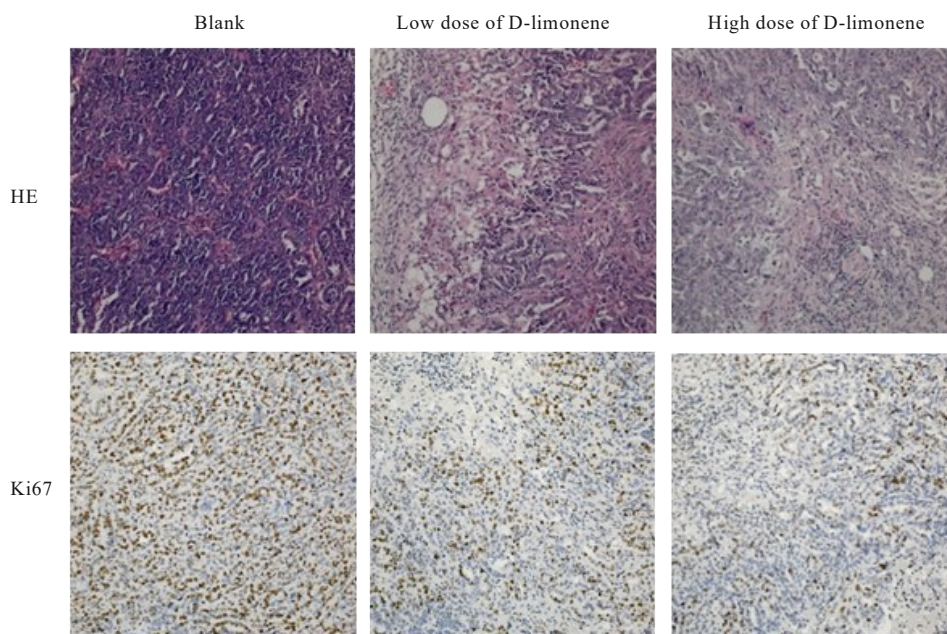


图8 各组小鼠皮下肿瘤组织病理形态表现(免疫组织化学, ×20)

Fig. 8 Morphology of subcutaneous tumor tissue of mice in various groups(Immunohistochemistry, ×20)

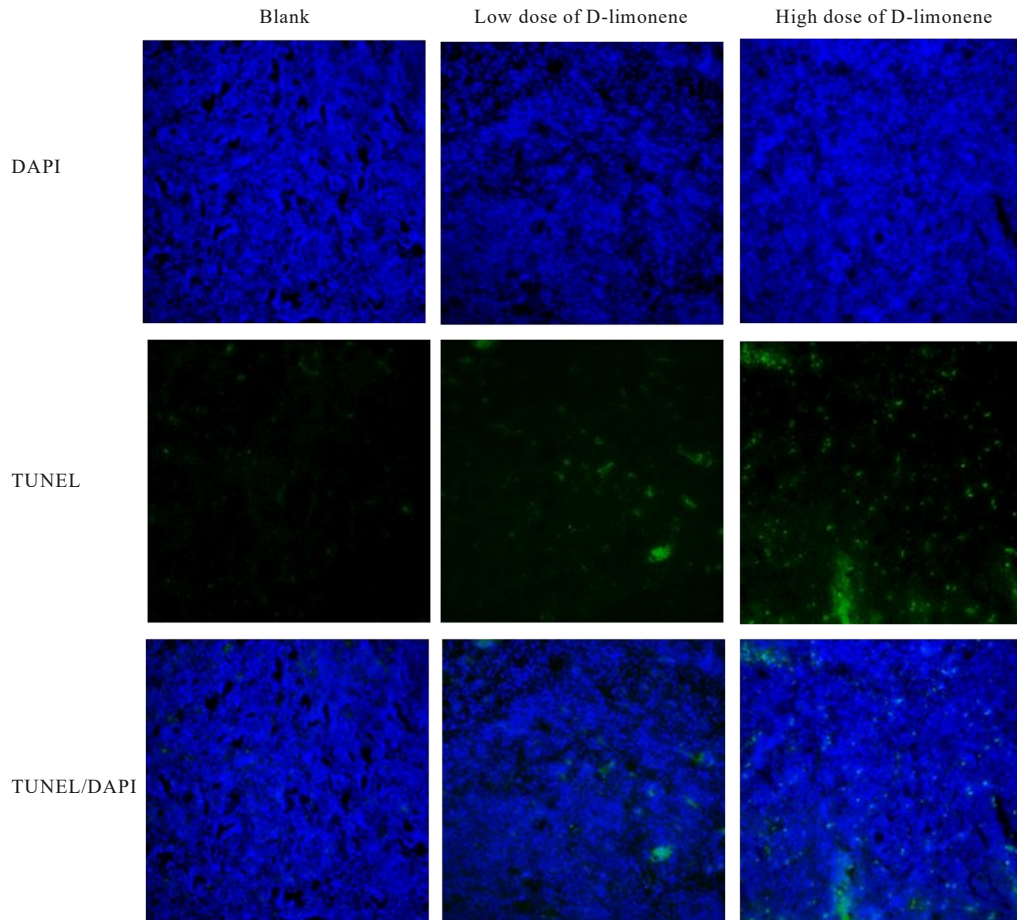


图9 TUNEL染色检测各组小鼠皮下肿瘤细胞凋亡情况($\times 20$)

Fig. 9 Apoptosis of subcutaneous tumor cells of mice in various groups detected by TUNEL staining($\times 20$)

Caspases在细胞凋亡中发挥核心作用,其可裂解并激活下游Caspase-3蛋白,导致PARP裂解并最终导致细胞凋亡。Bcl-2和Bax是Bcl-2家族成员,通过控制线粒体的完整性调节细胞凋亡。本研究结果显示:D-柠檬烯能够抑制Bcl-2蛋白表达,并上调Bax、PARP和cleaved Caspase-3蛋白表达水平,提示D-柠檬烯能够有效诱导GBM细胞凋亡。

D-柠檬烯可通过调节AKT蛋白表达水平抑制GBM细胞增殖。AKT通路是细胞内重要的信号通路,在调控细胞存活和凋亡中起关键作用。研究^[18-21]显示:部分抗癌药物可通过阻断AKT信号传导诱导细胞凋亡,在多种类型的癌症中,AKT促进细胞活性和细胞增殖。AKT不仅在GBM细胞增殖、凋亡和耐药等方面均具有生物学活性,还直接影响GBM患者的预后。本研究结果显示:D-柠檬烯干预后,AKT蛋白表达水平明显降低,提示D-柠檬烯可能通过抑制GBM细胞AKT蛋白表达,激活下游凋亡相关蛋白抑制细胞增殖并促进细胞凋

亡,与以往研究^[5]结果一致。

综上所述,D-柠檬烯具有抑制GBM细胞增殖的作用,其机制可能与调控AKT蛋白的表达并激活Caspase-3通路诱导凋亡有关。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

王腾飞参与研究实施过程、数据采集和论文撰写,陈凤参与数据统计学分析,齐玲参与研究方案制定,雷婷参与文献整理和分析,宋美慧参与论文修订和审核。

[参考文献]

- [1] MA R C, TAPHOORN M J B, PLAHA P. Advances in the management of glioblastoma [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2021, 92(10): 1103-1111.
- [2] LOUIS D N, GIANNINI C, CAPPER D, et al. cIMPACT-NOW update 2: diagnostic clarifications for diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant and diffuse

- astrocytoma/anaplastic astrocytoma, IDH-mutant [J]. *Acta Neuropathol*, 2018, 135(4): 639-642.
- [3] SCHAFF L R, MELLINGHOFF I K. Glioblastoma and other primary brain malignancies in adults: a review[J]. *JAMA*, 2023, 329(7): 574-587.
- [4] PAGE C, LIN H J, JIN Y, et al. Overexpression of akt/AKT can modulate chemotherapy-induced apoptosis[J]. *Anticancer Res*, 2000, 20(1A): 407-416.
- [5] JIA S S, XI G P, ZHANG M, et al. Induction of apoptosis by D-limonene is mediated by inactivation of Akt in LS174T human colon cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(1): 349-354.
- [6] LEITE-ANDRADE M C, DE ARAÚJO NETO L N, BUONAFINA-PAZ M D S, et al. Antifungal effect and inhibition of the virulence mechanism of D-limonene against *Candida parapsilosis*[J]. *Molecules*, 2022, 27(24): 8884.
- [7] LI Y, LIU S T, ZHAO C, et al. The chemical composition and antibacterial and antioxidant activities of five citrus essential oils[J]. *Molecules*, 2022, 27(20): 7044.
- [8] JUSTINO DE ARAÚJO A C, FREITAS P R, RODRIGUES DOS SANTOS BARBOSA C, et al. GC-MS-FID characterization and antibacterial activity of the *Mikania cordifolia* essential oil and limonene against MDR strains [J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 136: 111023.
- [9] BERLIOCCHI L, CHIAPPINI C, ADORNETTO A, et al. Early LC3 lipidation induced by d-limonene does not rely on mTOR inhibition, ERK activation and ROS production and it is associated with reduced clonogenic capacity of SH-SY5Y neuroblastoma cells [J]. *Phytomedicine*, 2018, 40: 98-105.
- [10] AFHORDEL S, KERN B, CLASOHN J, et al. Lovastatin and perillyl alcohol inhibit glioma cell invasion, migration, and proliferation: impact of Ras-/Rho-prenylation[J]. *Pharmacol Res*, 2015, 91: 69-77.
- [11] MA Y, BIAN J M, ZHANG F. Inhibition of perillyl alcohol on cell invasion and migration depends on the Notch signaling pathway in hepatoma cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 411(1/2): 307-315.
- [12] KAJI I, TATSUTA M, IISHI H, et al. Inhibition by d-limonene of experimental hepatocarcinogenesis in Sprague-Dawley rats does not involve p21 (ras) plasma membrane association[J]. *Int J Cancer*, 2001, 93(3): 441-444.
- [13] CHAUDHARY S C, SIDDIQUI M S, ATHAR M, et al. D-Limonene modulates inflammation, oxidative stress and Ras-ERK pathway to inhibit murine skin tumorigenesis[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2012, 31(8): 798-811.
- [14] LU X G, ZHAN L B, FENG B G, et al. Inhibition of growth and metastasis of human gastric cancer implanted in nude mice by d-limonene[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(14): 2140-2144.
- [15] SONG X G, XIE L, WANG X W, et al. Temozolomide-perillyl alcohol conjugate induced reactive oxygen species accumulation contributes to its cytotoxicity against non-small cell lung cancer[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22762.
- [16] ZHANG X Z, WANG L, LIU D W, et al. Synergistic inhibitory effect of berberine and d-limonene on human gastric carcinoma cell line MGC803 [J]. *J Med Food*, 2014, 17(9): 955-962.
- [17] 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.
- [18] TSAI P J, LAI Y H, MANNE R K, et al. Akt: a key transducer in cancer[J]. *J Biomed Sci*, 2022, 29(1): 76.
- [19] CUI B B, TAO J, YANG Y M. Studies on the expression patterns of class I PI3K catalytic subunits and its prognostic significance in colorectal cancer [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2012, 62(1): 47-54.
- [20] YU L, WEI J, LIU P D. Attacking the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway for targeted therapeutic treatment in human cancer [J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 85: 69-94.
- [21] CAGGIA S, CHUNDURI H, MILLENA A C, et al. Novel role of $G_{i\alpha 2}$ in cell migration: downstream of PI3-kinase-AKT and Rac1 in prostate cancer cells[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 234(1): 802-815.