

# 黄皮果果核挥发油对小鼠黑色素瘤B16-F10细胞增殖和凋亡的影响

廖雪华<sup>1</sup>, 甘育鸿<sup>2</sup>, 梅思<sup>1</sup>, 符伟玉<sup>3</sup>, 吴科锋<sup>1,4,\*</sup>, 李文德<sup>5</sup>

(1. 广东医科大学 广东天然药物研究与开发实验室, 广东 湛江 524023; 2. 梅州市人民医院, 广东 梅州 514000; 3. 广东医科大学 生物化学与分子生物学研究所, 广东 湛江 524023; 4. 广东医科大学 南海海洋医药研究院, 广东 湛江 524023; 5. 广东省实验动物监测所, 广东 广州 510000)

**摘要:** 探讨黄皮果果核挥发油(essential oil of kernel, EOK)对诱导小鼠黑色素瘤细胞 B16-F10 增殖和凋亡的影响。3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT] 法检测不同浓度的 EOK 处理 B16-F10 细胞 24、48、72 h 后的细胞存活率, 并用不同浓度 EOK 处理 B16-F10 细胞 24 h, 荧光法检测线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)的变化、磷脂酰丝氨酸蛋白抗体/碘化丙啶(Annexin V-FITC/propidium iodide, Annexin V-FITC/PI)染色检测细胞凋亡、蛋白免疫印迹法检测核转录因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B P65)及其磷酸化的蛋白(phosphorylate nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B P-P65)、Cleaved-caspase 3、Bax 及 Bcl-2 蛋白表达的水平。结果显示, EOK 各处理组均能明显抑制 B16-F10 细胞的增殖( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 其趋势呈浓度和时间依赖性。Annexin V-FITC/PI 检测发现 EOK 可诱导 B16-F10 细胞凋亡, 免疫印迹法也显示 EOK 可使 B16-F10 细胞 NF- $\kappa$ B P65 及其磷酸化的蛋白表达量明显降低, Cleaved-caspase 3 的蛋白表达量增加, Bax/Bcl-2 比值增大。结果表明, EOK 可诱导 B16-F10 细胞凋亡, 其机制与抑制胞内 NF- $\kappa$ B P65 蛋白表达, 降低其磷酸化水平, 激活 Bcl-2/Bax/caspase 3 信号通路有关。

**关键词:** 黄皮果; 果核挥发油; 黑色素瘤; 增殖; 凋亡

## Effect of Essential Oil from Wampee Kernel on Proliferation and Apoptosis in Melanoma B16-F10 Cells

LIAO Xue-hua<sup>1</sup>, GAN Yu-hong<sup>2</sup>, MEI Si<sup>1</sup>, FU Wei-yu<sup>3</sup>, WU Ke-feng<sup>1,4,\*</sup>, LI Wen-de<sup>5</sup>

(1. Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Natural Drugs, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, Guangdong, China; 2. The People's Hospital of Meizhou, Meizhou 514000, Guangdong, China; 3. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, Guangdong, China; 4. Marine Biomedical Research Institute, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, Guangdong, China; 5. Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangzhou 510000, Guangdong, China)

**Abstract:** The effect of the essential oil of kernel from wampee on proliferation and apoptosis in melanoma B16-F10 cells was investigated. The cell viability were detected by the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide(MTT) assay after treatment with various concentration EOK in 24 h, 48 h, 72 h. Then, the mitochondrial membrane potential (MMP), the apoptosis rate, and expression of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B P65), phosphorylate nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B P-P65), Cleaved-caspase 3, Bax and Bcl-2 were measured by fluorescence staining. Annexin V-FITC/propidium iodide (Annexin V-FITC/PI) staining, and western blot after the cells treated with EOK for 24 h, respectively. Results showed that EOK could inhibit the

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(2018A030307001); 湛江市财政资金科技专项竞争性分配项目(2017A06012、2016A03024、2017A03020)

作者简介: 廖雪华(1991—), 女(汉), 硕士研究生, 研究方向: 药理学。

\* 通信作者: 吴科锋(1980—), 男(汉), 副研究员, 硕士, 主要从事天然产物药理学研究。

proliferation activity of cells in a dose- and time dependent manner. The result of Annexin V-FITC/PI staining demonstrated that the apoptotic rate was significantly increase after treated with EOK. Western blot results demonstrated that EOK caused significantly decreased the expression of NF- $\kappa$ B P65 and NF- $\kappa$ B P-P65. However, the expression of Cleaved-caspase 3 and the ratio of Bax/Bcl-2 were significantly increased. In conclude, EOK induced B16-F10 cells apoptosis by down-regulating the expression of NF- $\kappa$ B, inhibiting its phosphorylation and the activation of Bcl-2/Bax/caspase 3 pathway.

**Key words:** wampee; essential oil of fruit kernel; melanoma; proliferation; apoptosis

引文格式:

廖雪华,甘育鸿,梅思,等.黄皮果果核挥发油对小鼠黑色素瘤B16-F10细胞增殖和凋亡的影响[J].食品研究与开发,2019,40(5):35-41

LIAO Xuehua, GAN Yuhong, MEI Si, et al. Effect of Essential Oil from Wampee Kernel on Proliferation and Apoptosis in Melanoma B16-F10 Cells[J].Food Research and Development,2019,40(5):35-41

黑色素瘤又称恶性黑色素瘤,是由分布于神经嵴黑色素细胞所形成的痣或色素斑恶化而成,其恶性程度高,具有高度侵袭性,易发生转移,是目前为止导致死亡人数最多的皮肤肿瘤<sup>[1-2]</sup>。黑色素瘤主要发生在皮肤,但也可发生于眼睛、肠道及体内含有黑色素细胞的任何部分<sup>[3-4]</sup>。早期黑色素瘤可以通过手术切除达到有效治疗,但中晚期恶性黑色素瘤对常规的放疗、化疗不敏感,缺乏有效的治疗手段<sup>[5-6]</sup>,且常规的化疗药物存在不良反应大,患者依从性差等特点<sup>[7]</sup>。因此,从天然的中药材中寻找有效的抗黑色素瘤药物成为研究的热点。

黄皮果为芸香科植物黄皮 [*Clausena lansium* (Lour.) Skeels] 的成熟果实,是药食同源的民间药材,其肉、皮和核皆可入药<sup>[8]</sup>。黄皮果核具有行气止痛、健胃消肿等多方面的生物活性,常用于治疗胃痛、疝痛、痛经和风湿骨痛<sup>[9]</sup>。大量文献报道,黄皮果挥发油主要成分为萜类、醇类、酯类、酮类及醛类,进一步的研究也指出,该挥发油具有杀虫、抑菌、抗氧化等作用<sup>[10-11]</sup>。前期研究发现黄皮果核挥发油主要成分为烯醇类,占挥发油成分的 56.74% 以上,并可改善因紫外线引起的皮肤老化损伤<sup>[12]</sup>,而对于其抗肿瘤活性及其他生物活性的研究鲜见报道。因此希望进一步探究该挥发油抗黑色素瘤细胞增殖作用的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 细胞株

小鼠黑色素瘤 B16-F10 细胞:中国科学院细胞库。

### 1.2 试剂与仪器

黄皮果核挥发油 (essential oil of kernel, EOK): 广东医科大学天然药物研究与开发重点实验室保存<sup>[12]</sup>;

磷脂酰丝氨酸蛋白抗体/碘化丙啶 (Annexin V-FITC/propidium iodide, Annexin V-FITC/PI) 细胞凋亡检测试剂盒:北京庄盟国际生物基因科技有限公司;0.25% 胰酶溶液 (1x):吉诺生物医药技术有限公司;超敏 ECL (electro-chemi-luminescence) 化学发光试剂盒 (BeyoECL Plus)、罗丹明 123 (rhodamine 123, Rh 123)、放射免疫沉淀 (radio immunoprecipitation assay, RIPA) 裂解液、二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白浓度测定试剂盒:碧云天生物技术研究所;胎牛血清、高糖培养基 (dulbecco's modified eagle medium, DMEM)、磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS):美国 Gibco 公司;青霉素-链霉素双抗溶液:广州威佳科技有限公司;3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT]:Sigma 公司;二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO):美国 SANTA CRUZ 公司;十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 凝胶快速配置试剂盒:北京鼎国昌盛生物技术有限公司;预染蛋白标记:美国 Thermo 公司; $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin)、辣根过氧化物酶标记的二抗、P65、Bcl-2、Bax、Cleaved-caspase 3 等一抗:美国 SAB 公司;一抗稀释液、二抗稀释液: Biosharp 公司;0.22  $\mu$ m 聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF):美国 Millipore 公司。

IX73 型倒置荧光显微镜:Olympus 公司;通用水套 CO<sub>2</sub> 培养箱:美国 Thermo 公司;SW-CJ-1D 单人单面垂直净化工作台:江苏苏净集团有限公司;HR/T16MM 微量高速冷冻离心机:湖南赫西仪器装备有限公司;SHA-B 数显恒温水浴震荡器:天津赛得利斯实验分析仪器制造厂;AUW120D 型电子分析天平:日本 SHI-

MADAU 公司;迷你双垂直电泳槽、转印系统:美国Bio-Rad 公司;Epoch 酶标仪:美国 Bio-Tek;EPICS XL-MCL 流式细胞仪:美国 BECKMAN COULTER 公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 黄皮果核挥发油(essential oil of kernel,EOK)的提取与分离

称取一定量黄皮果核,加水浸泡后采用水蒸气蒸馏法提取挥发油,冷却后收集挥发油。采用冷冻结晶法分离得到液态挥发油。通过气相色谱-质谱联用(gas chromatography-mass spectrometry,GC-MS)分析显示,在 EOK 中检测到 33 种化合物,其主要化合物是烯醇类,主要成分含量占 56.74%。

#### 1.3.2 细胞培养

B16-F10 细胞均培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,置 37℃、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。待细胞长至 80% 左右时,按 1:3 或 1:2 传代,取对数生长期细胞进行试验。

#### 1.3.3 MTT 法检测细胞存活率

取对数生长期的细胞以  $3.5 \times 10^3$  个/孔均匀接种于 96 孔板,置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱,待细胞贴壁后,加入不同浓度的 EOK(0.2、0.4、0.6、0.8 μL/mL),空白组加入等量生理盐水,每组 6 个复孔,分别孵育 24、48、72 h 后吸取上清液,每孔加入 MTT(5 g/L)20 μL,继续培养 4 h,随后小心吸出培养液,加入 DMSO 150 μL/孔溶解甲罂,振荡摇匀,结晶完全溶解后,酶标仪于波长 570 nm 处测量各孔的吸光度(OD 值),并计算细胞抑制率。

#### 1.3.4 观察细胞形态

取对数生长期的细胞以  $2 \times 10^4$  个/孔均匀接种于 12 孔板,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养至细胞贴壁,将培养基更换为不同浓度的含 EOK 培养基,在 37℃ 孵育 24 h 后,将培养液更换为适量的 PBS,在显微镜下观察并拍照。

#### 1.3.5 细胞凋亡检测

取对数生长期的细胞以  $5 \times 10^4$  个/孔均匀接种于 6 孔板,置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养至细胞贴壁。将培养基更换为不同浓度的含 EOK 培养基,37℃ 孵育 24 h 后,用胰酶消化收集细胞于 1.5 mL 试管中,在 4℃、2 000 r/min 条件下离心 5 min,弃去上清液,用 PBS 洗涤 2 遍。细胞悬浮于 500 μL 的缓冲液中,添加 5 μL 磷脂酰丝氨酸蛋白抗体并混匀,再加入碘化丙啶试剂 10 μL,室温避光反应 15 min,然后在 1 h 内进行流式细胞仪检测。

#### 1.3.6 线粒体膜电位的检测

取对数生长期的细胞以  $5 \times 10^4$  个/孔均匀接种 6 孔板,置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养至细胞贴壁。将培养基更换为不同浓度的 EOK 培养基,37℃ 孵育 24 h 后,用无血清培养基洗涤 1 次,加入稀释好的 Rh123 工作液(20 μmol/L)1 mL,置细胞培养箱内继续孵育 20 min,PBS 洗涤 3 次,倒置荧光显微镜下观察并拍照。

#### 1.3.7 蛋白免疫印迹试验

RIPA 裂解液按试剂盒说明书要求裂解细胞,分离上清液,即细胞总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度,10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,转膜。将印迹的聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride,PVDF)依次进行封闭、加入对应的一抗、二抗、抗体结合区带加入电化学发光显色液,扫描后保存。以 β-actin 为内参,分析各组细胞目的蛋白相对表达量。

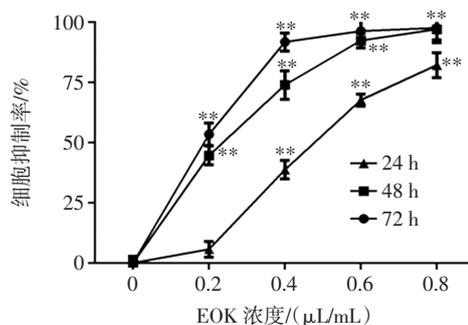
#### 1.3.8 统计学方法

试验数据均采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,SPSS22.0 统计软件,采用单因素方差分析进行统计学处理, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 黄皮果核挥发油对小鼠黑色素瘤 B16-F10 细胞增殖抑制的影响

通过 MTT 法检测 EOK 对小鼠黑色素瘤细胞 B16-F10 细胞的抗增殖活性,结果如图 1 所示。



与对照组比较,\*\* $P < 0.01$  为差异极显著。

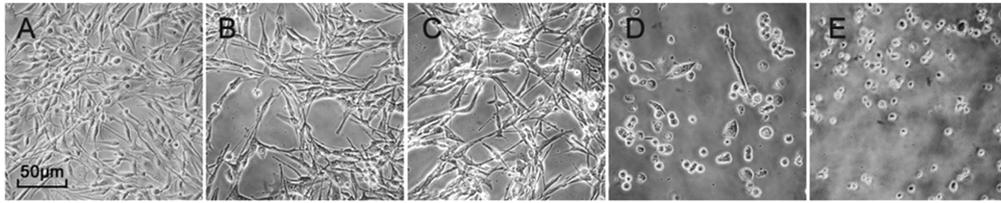
图 1 EOK 对 B16-F10 细胞增殖的影响  
Fig.1 Effect of EOK on the growth of B16-F10 cells

当挥发油浓度为 0.2 μL/mL,作用 24 h 后,对小鼠黑色素瘤 B16-F10 细胞的抑制率为(5.67±3.25)%,但差异无统计学意义;当作用 48、72 h 后,抑制率分别为(44.65±3.96)%、(53.39±4.70)%( $P < 0.01$ )。当药物浓度分别为 0.4、0.6、0.8 μL/mL 时,随着作用时间的增加,细胞增殖抑制率明显升高,且呈现浓度依赖性和时间依赖性。由此可见,EOK 对小鼠黑色素瘤 B16-F10 细胞具有明显的增殖抑制作用。

2.2 黄皮果果核挥发油对细胞形态影响

EOK 处理 24 h 对 B16-F10 细胞形态变化的影响结果见图 2。

图 2 显示,对照组细胞贴壁状态良好,紧密排列,呈不规则梭形(图 2A);与对照组相比,EOK 作用 24 h 后,0.2  $\mu\text{L/mL}$ 、0.4  $\mu\text{L/mL}$  组细胞变长,细胞间隙增大,



A.对照组;B. 0.2  $\mu\text{L/mL}$ ;C. 0.4  $\mu\text{L/mL}$ ;D. 0.6  $\mu\text{L/mL}$ ;E. 0.8  $\mu\text{L/mL}$ 。

图 2 EOK 处理 24 h 对 B16-F10 细胞形态变化的影响

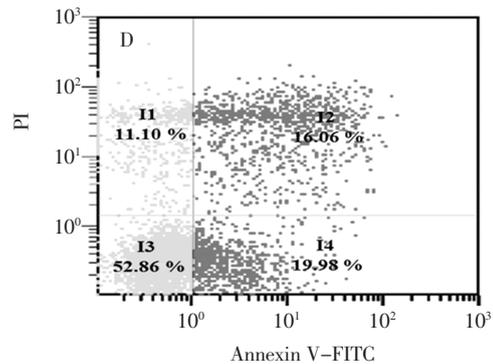
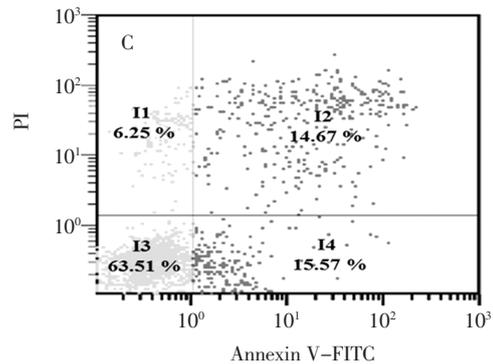
Fig.2 EOK deal with the effect of 24 h on the morphological changes of B16-F10 cells

呈现树突网状结构,且有黑色颗粒物;随着药物浓度的增加,细胞数量逐渐减少,细胞形态也骤变,0.8  $\mu\text{L/mL}$  细胞体积明显缩小,呈现固缩的圆形结构,黑色颗粒物不明显,漂浮在细胞培养液中的细胞增多。从形态方面预示着 B16-F10 细胞处于凋亡状态。

2.3 黄皮果果核挥发油对 B16-F10 细胞凋亡的影响

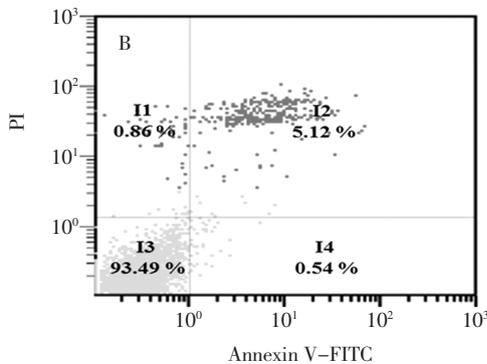
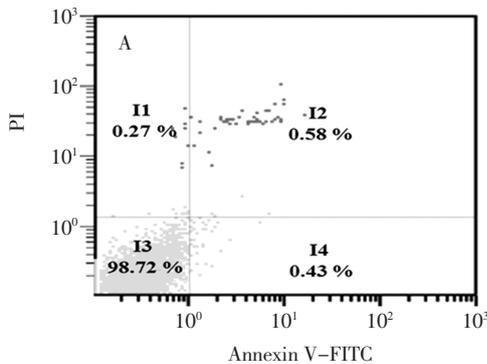
Annexin V-FITC 染色观察 B16-F10 细胞凋亡情况见图 3。

细胞凋亡的检测方法有很多中,各有其特点。流式细胞术检测细胞凋亡,具有快速、灵敏度高、可以定量等优点。其中 Annexin V-FITC/PI 双标记染色最为常用。磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)正常位于细胞膜的内侧,但在细胞凋亡的早期,由于细胞膜失去



A.对照组;B. 0.2  $\mu\text{L/mL}$ ;C. 0.4  $\mu\text{L/mL}$ ; D. 0.8  $\mu\text{L/mL}$ 。

图 3 Annexin V-FITC/PI 双染的流式细胞术检测细胞凋亡率  
Fig.3 Apoptosis rate of B16-F10 cells detected by flow cytometric analysis

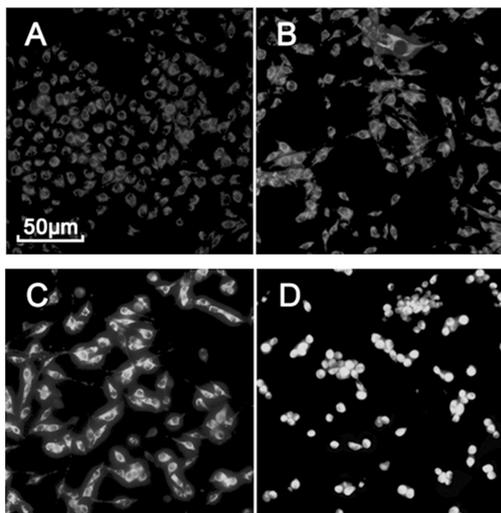


对称性,PS 可从细胞膜的内侧翻转至细胞膜的表面,暴露在细胞外环境中。磷脂结合蛋白 V(Annexin V)是一种钙依赖的磷脂结合蛋白,它与 PS 高亲和力特异性结合。荧光素 FITC 标记的 Annexin V 可作为探针检测暴露在细胞膜外侧的 PS,指示凋亡细胞,但坏死细胞 PS 也会显露在外表使 Annexin V-FITC 结合成阴性,必须加入碘化丙啶(propidium iodide,PI)才能区分坏死细胞<sup>[13-14]</sup>。碘化丙啶是一种核酸染料,它不能透过完整的细胞膜,但在凋亡中晚期的细胞和死细胞,PI

能通过细胞膜而使细胞核着色。流式细胞仪分析结果显示,与对照组(图 3A)比较,随着 EOK 浓度的增加,凋亡比例也随着增加,其诱导 B16-F10 细胞凋亡率分别为 5.66%、30.34%、36.04%。这表明 EOK 能诱导 B16-F10 细胞凋亡。

#### 2.4 黄皮果果核挥发油对 B16-F10 细胞线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)的影响

罗丹明 123(rhodamine 123)是一种可透过细胞膜的阳离子荧光染料,是一种线粒体跨膜电位的指示剂。其在正常细胞中能够依赖线粒体跨膜电位进入线粒体基质,荧光强度减弱或消失。而在凋亡发生时,线粒体膜完整性破坏,线粒体膜通透性转运孔开放,引起线粒体跨膜电位( $\Delta\Psi_m$ )的崩溃, Rh123 重新释放出线粒体,从而发出强黄绿色荧光,因此可以根据相对荧光信号的强度来衡量 MMP 的变化<sup>[15]</sup>。荧光染色法检测 B16-F10 细胞线粒体膜电位水平见图 4。



A.对照组;B. 0.2  $\mu\text{L/mL}$ ;C. 0.4  $\mu\text{L/mL}$ ;D. 0.8  $\mu\text{L/mL}$ 。

图 4 荧光染色法检测 B16-F10 细胞线粒体膜电位水平

Fig.4 Detection of mitochondrial membrane potential level of B16-F10 cells by fluorescent staining

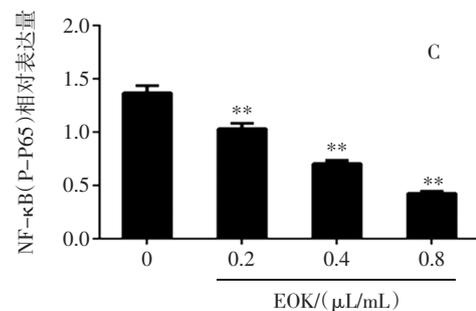
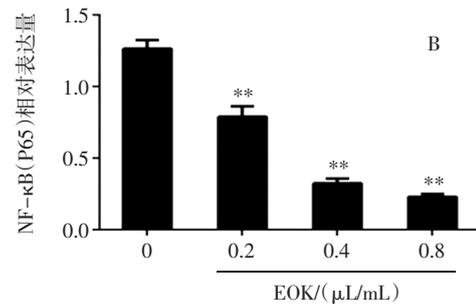
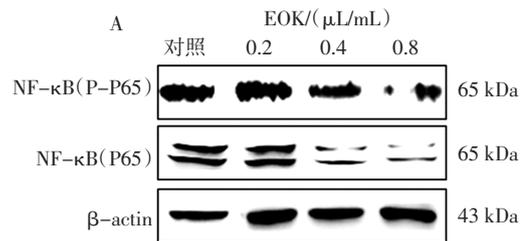
从图 4 中可以看出, EOK 处理 24 h 后,与对照组比较,药物处理组细胞内的荧光明显增强,而且随着浓度增大而增强,高浓度组所发荧光非常显著,说明线粒体膜完整性可能已破坏,引起  $\Delta\Psi_m$  的崩溃,并随药物浓度的不同而使 MMP 出现不同程度的受损。结果表明 EOK 诱导细胞凋亡与抑制线粒体膜电位密切相关。

#### 2.5 黄皮果果核挥发油对 B16-F10 细胞凋亡相关蛋白的影响

NF- $\kappa\text{B}$  是一类具有多向转录调节作用的核蛋白因子,在细胞胞浆内是以无活性形式存在,通过 I-B 激

酶(IK)激活后,受抑制的 NF- $\kappa\text{B}$  得以释放,发生核移位,在核内积累并与特异性的 B 序列相结合启动转录。核转录因子 NF- $\kappa\text{B}$  的下调,可促使与抗凋亡相关的 NF- $\kappa\text{B}$  靶基因如 TNF 受体相关因子 1 等表达减弱,从而促进凋亡。NF- $\kappa\text{B}$  也可调控 Bcl-2 家族中两个抗凋亡蛋白:Bcl-1/A1、Bcl-X1 的表达,也诱导 Bcl-2 和抑制 Bax 基因表达<sup>[16-17]</sup>。而 Bcl-2 与 Bax 这两种蛋白参与构成线粒体通路,分别具有抑制和促进细胞凋亡的作用,Bax/Bcl-2 蛋白比值决定了细胞的生存和死亡。凋亡通路相关蛋白 Bcl-2/Bax/caspase 3 被激活, Bax/Cleaved-caspase 3 蛋白表达增加,而 Bcl-2 蛋白被抑制,是经典的线粒体凋亡途径<sup>[18]</sup>。

EOK 对 B16-F10 细胞 NF- $\kappa\text{B}$  (P-P65)、NF- $\kappa\text{B}$  (P65)蛋白表达的影响结果见图 5。



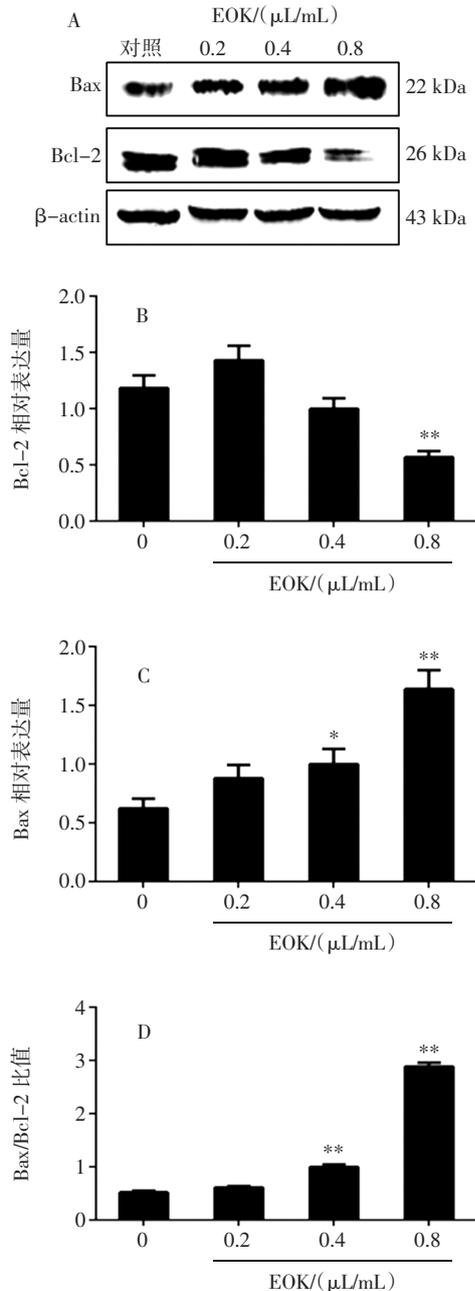
与对照组相比, \*\* $p < 0.01$ , 差异极显著。

图 5 EOK 对 B16-F10 细胞 NF- $\kappa\text{B}$  (P-P65)、NF- $\kappa\text{B}$  (P65) 蛋白表达的影响

Fig.5 Effect of EOK on NF- $\kappa\text{B}$  (P-P65) and NF- $\kappa\text{B}$  (P65) protein expression in B16-F10 cells

从图 5 中可以看出,与对照组相比,随着黄皮果果核挥发油浓度的增加, NF- $\kappa\text{B}$  (P-P65) 与 NF- $\kappa\text{B}$  (P65)

蛋白表达均下调,其中在浓度 0.2  $\mu\text{L/mL}$  作用下蛋白表达量有所减少( $P<0.01$ );且对 NF- $\kappa\text{B}$ (P65)蛋白表达的抑制作用比对 NF- $\kappa\text{B}$ (P-P65)蛋白表达的抑制作用更为明显。同时检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达情况,结果如图 6 所示。



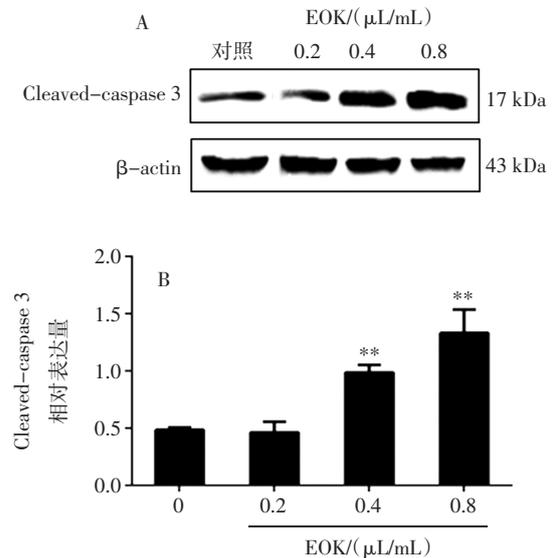
与对照组相比, \* $p<0.05$ , 差异显著; \*\* $p<0.01$ , 差异极显著。

图 6 EOK 对 B16-F10 细胞 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响  
Fig.6 Effect of EOK on Bax and Bcl-2 protein expression in B16-F10 cells

与对照组相比,随着果核挥发油浓度的增大,Bax 蛋白表达增多,其中 0.4、0.8  $\mu\text{L/mL}$  组尤为明显 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ );而 Bcl-2 蛋白表达在 0.8  $\mu\text{L/mL}$  组减

少尤为明显( $P<0.01$ )。通过统计,Bax/Bcl-2 的比值增大,0.4、0.8  $\mu\text{L/mL}$  组与对照组比较差异有统计学意义 ( $P<0.01$ )。

对 B16-F1 细胞 Cleaved-caspase 3 蛋白表达的影响结果见图 7。



与对照组相比, \*\* $p<0.01$ , 差异极显著。

图 7 EOK 对 B16-F10 细胞 Cleaved-caspase 3 蛋白表达的影响  
Fig.7 Effect of EOK on Cleaved-caspase 3 protein expression in B16-F10 cells

如图 7 所示,黄皮果核挥发油也能上调 Cleaved-caspase 3 蛋白的表达。与对照组相比,0.4、0.8  $\mu\text{L/mL}$  组差异有统计学意义( $P<0.01$ )。这些结果表明,线粒体途径参与黄皮果核挥发油诱导 B16-F10 细胞的凋亡,其机制可能与抑制胞内 NF- $\kappa\text{B}$  P65 蛋白表达,降低其磷酸化水平,激活 Bcl-2/Bax/caspase 3 信号通路有关。

### 3 结论

水蒸气蒸馏法提取的黄皮果核挥发油作用于小鼠黑色素瘤 B16-F10 细胞后,MTT 法测定药物浓度  $\geq 0.2 \mu\text{L/mL}$  时,黄皮果核挥发油对 B16-F10 细胞增殖有明显的抑制作用。Annexin V-FITC/PI 染色结果表明,在黄皮果核挥发油作用 24 h 后,0.8  $\mu\text{L/mL}$  组凋亡细胞的比例高达 36.06%。在罗丹明 123 染色检测黄皮果核挥发油对 B16-F10 细胞线粒体膜电位有显著影响,且随着药物浓度增大,荧光强度增强。蛋白免疫印迹结果表明,黄皮果核挥发油能下调 NF- $\kappa\text{B}$  (P-P65)、NF- $\kappa\text{B}$  (P65)、Bcl-2 的表达,同时上调 Bax、Cleaved-caspase 3 的表达。因此,试验结果表明:黄皮果核挥发油以诱导细胞凋亡的方式抑制小鼠黑色

