

山苍子油对斜纹夜蛾细胞增殖和凋亡的影响

李湘洲^{1,2†}, 王力群¹, 黄露¹, 周军¹, 张胜¹, 李文生^{1,3}

(1. 中南林业科技大学 材料科学与工程学院, 湖南 长沙 410004;

2. 中南林业科技大学 南方林业生态应用技术国家工程实验室, 湖南 长沙 410004;

3. 湖南大学 化学化工学院, 湖南 长沙 410082)

摘要: 研究山苍子油对离体培养的斜纹夜蛾(*Spodoptera litura*, SL)细胞的增殖和凋亡的影响, 并初步确定山苍子油主要成分柠檬醛对细胞具有毒杀活性, 诱导细胞凋亡. 分别采用 CCK、MTT 法和流式细胞法研究不同浓度的山苍子油抑制 SL 细胞的活性, 利用流式细胞法验证不同浓度的柠檬醛对 SL 细胞凋亡的影响. 研究表明, 山苍子油具有抑制 SL 细胞的增殖的作用, 且随着山苍子油浓度的增大和处理时间的延长, SL 细胞的存活率降低, 当山苍子油浓度增大至 0.015% 时, SL 细胞的存活率显著降低($P < 0.01$); 当处理时间达到 72 h 后, SL 细胞的存活率同样呈现显著降低. 柠檬醛作为山苍子油的主要活性成分, 对 SL 细胞亦具有明显的抑制增殖的作用, 且成剂量正相关, 当柠檬醛浓度大于 0.015% 时, SL 细胞的存活率显著降低($P < 0.01$). 山苍子油和柠檬醛均具有明显的促进 SL 细胞凋亡的作用, 并呈剂量依赖关系, 初步确定了柠檬醛是山苍子油促进 SL 细胞凋亡的主要活性成分, 为山苍子油基新型植物源农药的开发与利用提供依据.

关键词: 山苍子油; 柠檬醛; 斜纹夜蛾; 细胞增殖; 细胞凋亡; 毒理性

中图分类号: S789; TQ453

文献标志码: A

Effect of Litsea Cubeba Essential Oil on Proliferation and Apoptosis of Spodoptera Litura Cell

LI Xiangzhou^{1,2†}, WANG Liqun¹, HUANG Lu¹, ZHOU Jun¹, ZHANG Sheng¹, LI Wensheng^{1,3}

(1. School of Material Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China;

2. National Engineering Laboratory for Applied Technology of Forestry & Ecology in South China, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China;

3. College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract: In order to investigate the effects of Litsea cubeba essential oil (LCEO) on the proliferation and apoptosis of *Spodoptera litura* (SL) cells cultured in vitro and preliminarily determine the main toxic activity component, the CCK, MTT assay and flow cytometry were used to study the inhibitory effects of different concentrations of LCEO on SL cells. The effect of different concentrations of citral on the apoptosis of SL cells was verified by flow cell method.

* 收稿日期: 2019-07-22

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFD0600704), National Key R & D Program of China(2017YFD0600704)

作者简介: 李湘洲(1965—), 女, 湖南郴州人, 中南林业科技大学教授, 博士生导师

† 通讯联系人, E-mail: rlxz@163.com

The results showed LCEO can inhibit the proliferation of SL cells, and with the increase of the concentration of LCEO and the prolongation of treatment time, the survival rate of SL cells decreased. When the concentration of LCEO was increased to 0.015%, the survival rate of SL cells was significantly lower ($P < 0.01$). And the treatment time reached 72 h, the survival rate of SL cells decreased significantly. As the main active component of LCEO, citral has obvious inhibitory effect on SL cells, and the dose is positively correlated. In addition, the citral concentration was greater than 0.015%, the survival rate of SL cells was significantly decreased ($P < 0.01$). It is indicated that LCEO and citral can effectively promote cell apoptosis and show dose dependence, and citral is the main active ingredient of LCEO to promote apoptosis of SL cells. So, it also provides a basis for the development and utilization of new plant-derived pesticides based on LCEO.

Key words: Litsea cubeba essential oil; citral; Spodoptera litura; proliferation; apoptosis; toxicity

山苍子 *Litsea cubeba* (Lour.) Pers., 又名山鸡椒、木姜子、黑木姜子、香叶等, 多年生落叶小乔木, 樟科木姜子属植物, 广泛分布于长江以南的各个省区, 是我国南方特有的香料植物资源之一。山苍子油是从山苍子果实的果皮中提取的主要由单萜和倍半萜类化合物组成的精油, 其主要成分为柠檬醛, 同时还含有柠檬烯、甲基庚烯酮、芳樟醇、 α -松油醇、香叶烯、 α -蒎烯、 β -蒎烯、桉萜和石竹烯等^[1-2]。研究发现山苍子油具有较好的生物活性, 如抑菌活性、抗炎活性、抗癌活性、抗氧化活性等^[3-7]。Liu 等^[8]研究了山苍子油对雌性埃及伊蚊具有良好的驱避活性; Park 和 Chen 等^[9-10]报道了山苍子油对赤拟谷盗、玉米象成虫、谷蠹成虫和长角扁谷盗成虫显示较强的驱避和触杀作用; Vong 等^[11]报道了山苍子油对伊蚊和库蚊均具有一定的驱避活性。

山苍子油中主要成分柠檬醛的含量一般达到60%以上^[12]。柠檬醛^[13]是由顺、反两种几何异构体香叶醛(反式)和橙花醛(顺式)以混合的形式存在于自然界中。大量文献研究表明, 柠檬醛对昆虫具有趋避活性, 如柠檬醛对蚕蛾具有引诱作用, 能使埃及伊蚊卵不能正常孵化^[14]。柠檬醛对玉米象和绿豆象均具有较高的熏死率^[15]。在空气中, 当柠檬醛浓度达到 2.2 mg/mL 时, 两天内可以使白蚁全部死亡^[16]。

斜纹夜蛾, *Spodoptera litura*, 东南亚广泛分布的害虫之一, 可对大豆、棉花和蔬菜等作物产生极大的危害。目前防治这类虫害的主要手段依然为使用化学药剂, 但化学药剂使用过多不仅会对环境造成污染, 强化害虫的抗药性, 而且还会对农作物品质造成不良影响^[17]。

与传统化学农药^[18-19]相比, 植物源农药^[20-22]由于

有效成分为天然物质, 因此具有施用后较易分解、对环境影响小、组分多元化以及不容易使施用害虫产生抗药性、对有益生物(即害虫天敌)相对安全等优势, 是新型、高效、无残留、无公害的“绿色农药”。从植物源山苍子中提取得到的活性物质可以对一些害虫进行灭杀。

利用离体昆虫细胞代替活体进行毒力测定是一种直接反映化合物毒性作用的检测方法。本文通过 CCK、MTT 法研究山苍子油抑制 SL 细胞的活性, 利用流式细胞术研究山苍子油对离体 SL 细胞凋亡的影响。采用气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术对山苍子油的主要化学成分进行分析, 同时利用流式细胞术进一步研究了山苍子油中主要成分柠檬醛对 SL 细胞凋亡的作用。论文力图从细胞水平层面探究山苍子油对离体昆虫细胞的毒杀活性, 并初步确定山苍子油毒杀昆虫细胞的主要活性成分, 为山苍子油基新型植物源农药的开发与利用提供科学依据。

1 材料及方法

1.1 材料与仪器

供试细胞: 斜纹夜蛾细胞, 上海哈灵生物科技有限公司提供; 并添加昆虫细胞培养基, 于 28 °C 孵育箱中常规培养。

供试试剂及仪器: 山苍子油、柠檬醛, 产于湖南省永顺县, 其中山苍子油为水蒸气蒸馏法提取, 通过减压精馏法精制得到, 其柠檬醛含量大于 96%; 鱼藤酮、胎牛血清、青链霉素、胰酶消化液、CCK 试剂、MTT 试剂、Annexin V-FITC-PI 双染试剂盒, 均购自上海生物科技有限公司。

BC-J80S 型 CO₂ 细胞培养箱, 上海喆图生物有限公司; AE2000 型倒置显微镜, 上海光学生物仪器公司; TDL-5 型低速离心机, 沧州双营建筑仪器设备有限公司; HBS-1096C 型酶标仪, 上海沛欧分析仪器有限公司; 流式细胞仪, 上海仪检测科技有限公司.

1.2 方法

1.2.1 CCK 法检测山苍子油对 SL 细胞存活的影响

取对数生长期生长状态良好的 SL 细胞, 收集上层培养液, 培养瓶用 PBS 洗涤 1 次, 弃去 PBS, 加入 1 mL 胰蛋白酶-EDTA 静置消化 1 min, 于显微镜下观察消化完全后弃去胰酶, 加入含 10% 的胎牛血清的培养基终止消化, 吹打收集细胞. 1 200 r/min 离心 5 min 后, 计数, 调节细胞密度为 5×10⁴ 个/mL 分别接种于 96 孔每孔 100 μL, 恒温箱中于 28 ℃, 过夜. 用二甲基亚砜(DMSO)溶解山苍子油, 在实验前用培养基稀释至山苍子油浓度分别为 0、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5% 体积比, 按各分组加入不同浓度的山苍子油, 每孔终体积为 150 μL. 每 24 h 后取出 1 块 96 孔板, 每孔中避光加入 CCK 溶液 15 μL, 37 ℃ 继续孵育 4 h, 酶联检测仪检测波长为 450 nm 处吸光度(OD), 记录数据, 按式(1)计算细胞存活率.

$$\text{细胞存活率}(\%) = \frac{\text{加药组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.2 MTT 检测山苍子油对 SL 细胞增殖能力的影响

用胰酶消化收集对数期 SL 细胞, 调整各组细胞悬液浓度至 5×10⁵ cell/mL; 取 1 块 96 孔板, 每孔加入 100 μL 细胞悬液, 铺板使待测细胞为 2×10⁴ cell/孔(边缘孔用无菌 PBS 填充以消除边缘效应), 每组设置 5 个复孔; 5% CO₂, 37 ℃ 培养箱继续培养过夜后, 用 DMSO 分别溶解山苍子油和鱼藤酮, 实验前用培养基溶液分别将山苍子油浓度稀释至 0%、0.005%、0.01%、0.015%、0.02%、0.025% 体积比, 鱼藤酮质量浓度稀释至 30、60、100 μg/mL, 按分组加入所需试剂至每孔终体积为 150 μL. 每 24 h 后取出 96 孔板检测, 移除培养基, 每孔加入 100 μL 含 10% MTT 溶液培养基, 继续培养 4 h, 小心吸去孔内培养液, 每孔加入 100 μL 的 DMSO, 使结晶物充分溶解; 加 DMSO 后 10 min 内, 用酶标仪检测各孔波长 570 nm 的吸光值.

1.2.3 细胞流式法检测山苍子油对 SL 细胞凋亡的影响

细胞准备及药物处理, 培养 SL 细胞至 80%~

90% 满瓶, 收集细胞, 以 5×10⁵ 个/瓶的细胞密度接种 T25 细胞培养瓶, 28 ℃ 恒温培养箱培养过夜, 待细胞密度达 80% 后, 换液, 加入不同浓度的山苍子油和鱼藤酮, 处理 48 h. 流式检测用 PBS 洗涤各组细胞 2 次(1 000 r/min, 离心 5 min) 收集细胞; 再加入 500 μL 的 Binding Buffer 悬浮细胞.

1.2.4 山苍子油化学成分的分析

山苍子油经水蒸气蒸馏法提取获得, 利用气相色谱-质谱联用对山苍子油的主要化学成分进行分析.

GC 条件: Elite-5MS 分析色谱柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm); 高纯 He 为载气; 流速 1 mL/min; 进样口温度 260 ℃; 进样量 0.5 μL; 分流比 20:1.

MS 条件: EI 离子源; 电离电压 70 eV; 离子源温度 250 ℃; 传输线温度 280 ℃; *m/z* 扫描范围 30~600. 山苍子油升温程序: 初温 80 ℃, 保持 3 min, 5 ℃/min 升温, 至 100 ℃, 保持 1 min, 10 ℃/min 升温速率升至 130 ℃, 保持 3 min, 20 ℃/min 升温速率升至 230 ℃, 保持 6 min; 溶剂延迟 5 min.

1.2.5 细胞流式法检测柠檬醛对 SL 细胞凋亡的影响

按 1.2.3 中所述方法验证不同浓度的柠檬醛处理 SL 细胞对其的凋亡作用.

1.2.6 数据统计与分析

采用 SPSS22.0 软件对试验数据进行统计分析, 试验数据以均值±标准差表示, 采用 *P* 检验进行显著性分析, **P*<0.05 表示差异显著, ***P*<0.01 表示差异极显著.

2 结果与分析

2.1 CCK 法检测山苍子油对 SL 细胞存活的影响

CCK 法所用试剂中含有 WST-8 [其化学名称为 2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5(2,4-二磺酸苯)-2H-四唑单钠盐], 它在电子载体 1-甲氧基-5-甲基吩嗪硫酸二(1-Merhoxy PMS) 的作用下被细胞线粒体中的脱氢酶还原为具有高度水溶性的黄色甲染料 (Formazandye). 生成的产物的数量与活细胞的数量成正比, 因此可利用这一特性直接进行细胞增殖和毒性分析.

按 1.2.1 中所述方法以不同浓度的山苍子油(0%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%) 分别处理 SL 细胞, 得到不同浓度的山苍子油对 SL 细胞存活率的影响, 结果见图 1.

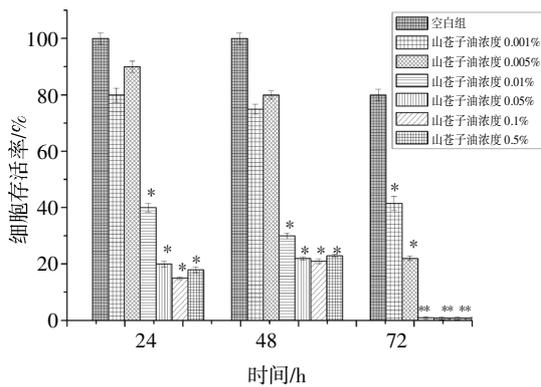


图1 CCK法检测山苍子油对SL细胞存活率的影响

Fig.1 Effect of SL cell survival rate on LCEO by CCK method

由图1可知,山苍子油抑制SL细胞存活与其处理时间和山苍子油的浓度有关.当处理时间为24h时,随着山苍子油浓度的增大,SL细胞的存活率明显降低($P < 0.05$);当山苍子油浓度增大至0.01%时,SL细胞的存活率下降至40%;继续增大山苍子油的浓度,SL细胞的存活率略有降低($P > 0.05$).当山苍子油浓度一定时,延长处理时间,SL细胞的存活率也呈下降趋势;山苍子油浓度为0.01%时,其处理SL细胞24h和48h的细胞存活率分别为40%和30%;而处理72h后,SL细胞的存活率仅为0.9%,呈显著降低的趋势($P < 0.01$).

2.2 MTT法检测山苍子油抑制SL细胞增殖能力的影响

MTT法是利用活细胞代谢产生琥珀脱氢酶将MTT还原,且形成不溶于水的蓝紫色甲臞(Formazan)结晶,通过颜色反应观察细胞代谢的活化程度,从而直接检测细胞的活性.

按1.2.2中所述方法以不同浓度(0%、0.005%、0.01%、0.015%、0.02%、0.025%)的山苍子油分别处理SL细胞24h、48h后,得到不同浓度的山苍子油对SL细胞存活率的影响见图2,不同浓度(30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的鱼藤酮对照组处理SL细胞24h、48h后,SL细胞存活率的影响见图3.

由图2可知,利用MTT法检测山苍子油对SL细胞存活率的影响与CCK法的结果类似.当作用时间均为24h时,随着山苍子油浓度的增大,SL细胞的存活率呈下降趋势;当山苍子油浓度为0.015%时,SL细胞的存活率显著降低($P < 0.05$);继续增大山苍子油浓度,SL细胞存活率略有降低($P > 0.05$).当作用时间延长至48h时,随着山苍子油浓度的提高,SL细胞的存活率也呈下降趋势,当山苍子油浓度为0.01%时,SL细胞的存活率仅为10%;继续增大山苍

子油浓度,SL细胞的存活率略有下降.

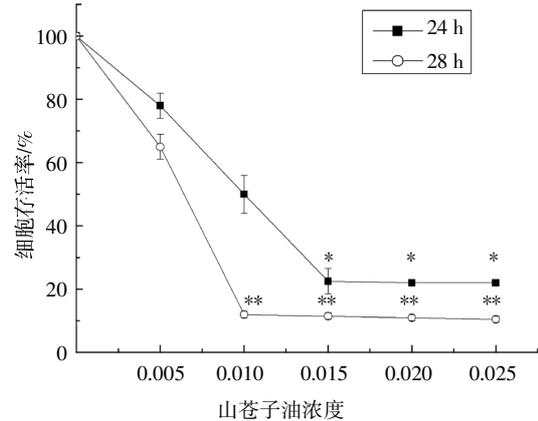


图2 MTT法检测山苍子油对SL细胞存活率的影响

Fig.2 Effect of SL cell survival rate on LCEO by MTT method

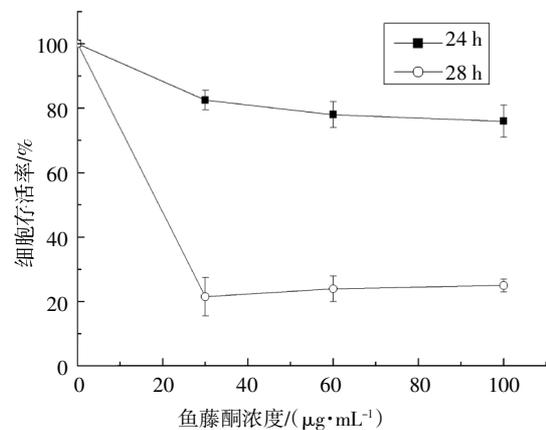


图3 MTT法检测鱼藤酮对SL细胞存活率的影响

Fig.3 Effect of SL cell survival rate on rotenone by MTT method

鱼藤酮是从豆科植物的根和茎中提取的一种天然毒素,对螨虫、线虫等均具有较好的杀虫活性^[23].由图3可知,鱼藤酮对SL细胞的增殖也具有抑制作用,抑制效果与其浓度和处理时间有关.对比鱼藤酮和山苍子油抑制SL细胞的效果可知,0.01%的山苍子油处理SL细胞后,其抑制SL细胞的效果优于30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的鱼藤酮,说明山苍子油对SL细胞的抑制作用较好,研究结果与WEN等^[24]的基本一致.

2.3 流式细胞法检测山苍子油对离体SL细胞的凋亡作用

在细胞凋亡的早期,细胞膜表面将发生破损,同时细胞内膜的磷脂腺丝氨酸(PS)出现外翻暴露. Annexin V是相对分子质量为35 000的 Ca^{2+} 依赖的磷脂结合蛋白,对PS具有很高的亲和性,可以与凋亡早期暴露于细胞外的PS相结合.因此,可以将标记荧光染料的Annexin V来识别早期的细胞凋亡.通常利用Annexin V-FITC和碘化丙啶(PI)双染色来区分凋亡和坏死细胞.PI的膜通透性很差,因而只能标

记晚期凋亡和坏死的细胞. 在流式细胞仪的结果中可见 Annexin V-FITC(+),PI(-)细胞为凋亡细胞,而 Annexin V-FITC(+),PI(+)为坏死细胞.

按 1.2.3 中所述方法以不同浓度的 (0、0.005%、0.01%、0.015%、0.02%、0.025%) 山苍子油、鱼藤酮 (10 μg/mL)处理 SL 细胞,得到不同浓度山苍子油、鱼藤酮对 SL 细胞的凋亡效果,结果见图 4 和图 5.

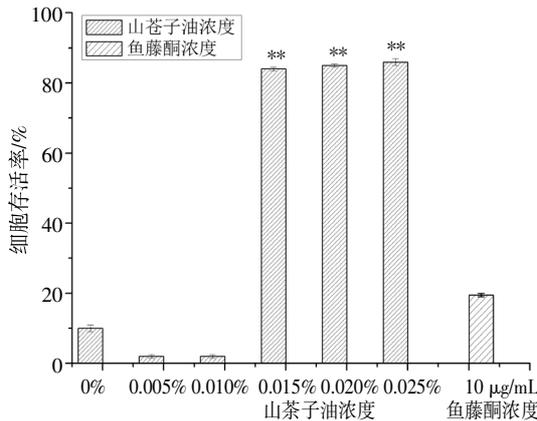


图 4 流式细胞法检测山苍子油对 SL 细胞凋亡的影响

Fig.4 Effect of SL cell apoptosis rate on LCEO by flow cytometry

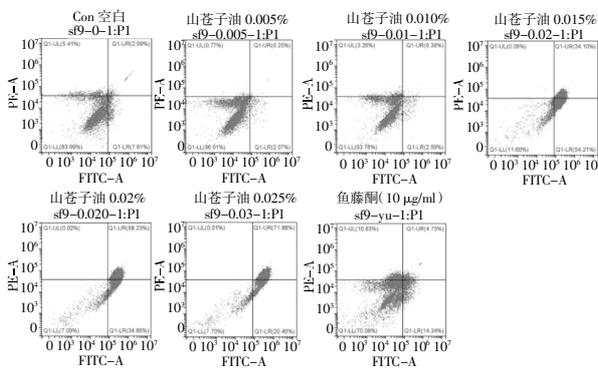


图 5 山苍子油处理 SL 细胞的流式细胞凋亡图

Fig.5 Apoptosis of SL cells treated with LCEO

由流式细胞检测结果图 4 可知,不同浓度的山苍子油 (0.005%、0.01%、0.015%、0.02%、0.025%) 处理 SL 细胞 48 h 后,SL 细胞的凋亡率分别为 2.36%、2.38%、88.08%、91.50%、93.33%,表明山苍子油具有促进 SL 细胞凋亡的作用,且呈剂量正相关,即当山苍子油浓度增大时,SL 细胞的凋亡率亦增大,当山苍子油的浓度从 0.01%增大至 0.015%时,SL 细胞的凋亡率明显增大 ($P<0.01$). 10 μg/mL 的鱼藤酮处理 SL 细胞 48 h 后,SL 细胞凋亡率仅为 18.89%.

2.4 山苍子油的化学成分分析

通过 CKK 法、MTT 法和流式细胞法确定了山苍

子油对 SL 细胞具有促进凋亡的作用,且呈剂量正相关,为确定山苍子油对 SL 细胞凋亡的主要活性成分,首先按 1.2.4 中所述方法研究了水蒸气蒸馏法提取的山苍子油的化学成分,结果见图 6 和表 1.

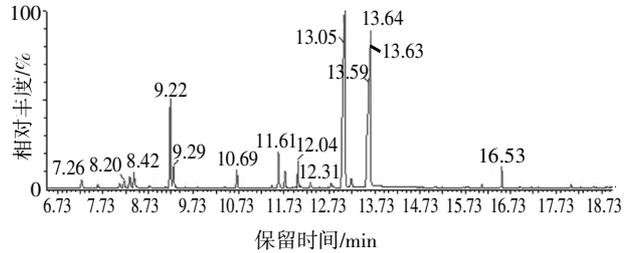


图 6 山苍子精油的总离子流图

Fig.6 Total ion flow diagram of LCEO

表 1 山苍子精油成分分析

Tab.1 Composition analysis of LCEO

NO	化合物名称	分子式	相对分子质量	体积分数/%
1	α-蒎烯(α-Terpene)	C ₁₀ H ₁₆	136	1.22
2	莰烯(Camphene)	C ₁₀ H ₁₆	136	0.41
3	桉烯(Sabinene)	C ₁₀ H ₁₆	136	0.48
4	β-蒎烯(β-pinene)	C ₁₀ H ₁₆	136	0.83
5	6-甲基-5-庚烯-2-酮(6-methyl-5-hepten-2-one)	C ₈ H ₁₄ O	126	1.04
6	β-月桂烯(β-myrcene)	C ₁₀ H ₁₆	136	1.69
7	柠檬烯(Limonene)	C ₁₀ H ₁₆	136	9.05
8	桉树脑(Cineole)	C ₁₀ H ₁₈ O	154	1.84
9	芳樟醇(Linalool)	C ₁₀ H ₁₈ O	154	1.80
10	5-甲基-2-异丙烯基-4-己烯醛(5-methyl-2-isopropenyl-4-hexenal)	C ₁₀ H ₁₆ O	152	0.27
11	香茅醛(Citronellal)	C ₁₀ H ₁₈ O	154	3.14
12	龙脑(Borneol)	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.07
13	1,3,4-三甲基-3-环己烯基甲醛(1,3,4-trimethyl-3-cyclohexenylformaldehyde)	C ₁₀ H ₁₆ O	152	2.23
14	α-松油醇(α-Terpineol)	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.61
15	橙花醇(Nerol)	C ₁₀ H ₁₈ O	154	0.81
16	橙花醛(Nerolitic aldehyde)	C ₁₀ H ₁₆ O	152	33.63
17	香叶醇(Geraniol)	C ₁₀ H ₁₈ O	154	1.10
18	香叶醛(Geraniol)	C ₁₀ H ₁₆ O	152	35.24
19	3,7-二甲基-2,3-环氧基-6-辛烯醇(3,7-Dimethyl-2,3-epoxy-6-octenol)	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	170	0.16
20	β-榄香烯(β-Elementene)	C ₁₅ H ₂₄	152	0.27
21	1-石竹烯(1-Caryophyllene)	C ₁₅ H ₂₄	204	1.64
22	α-丁子香烯(α-Caryophyllene)	C ₁₅ H ₂₄	204	0.16
23	氧化石竹烯(Caryophyllene oxide)	C ₁₅ H ₂₄ O	220	0.29

由检测结果可知,水蒸气蒸馏法提取的山苍子油共分离出43个组分,经与Nist标准谱库对照,鉴定出23个主要的化学成分,占精油中化合物总量的97.98%,其中主要包括单萜、倍半萜及其含氧衍生物,含量较高的组分有香叶醛(35.24%)、橙花醛(33.63%)、柠檬烯(9.05%)、香茅醛(3.14%)、桉树脑(1.84%)、芳樟醇(1.80%)和1-石竹烯(1.64%)等,柠檬醛的含量(香叶醛和橙花醛之和)高达68.87%。

2.5 流式细胞法检测柠檬醛对SL细胞凋亡的影响

柠檬醛作为山苍子油的主要活性成分,其对昆虫具有趋避活性的研究已有报道^[14-16]。为验证柠檬醛对SL细胞的影响,利用1.2.5中所述的流式细胞法研究了柠檬醛对离体SL细胞的凋亡作用,结果见图7和图8。

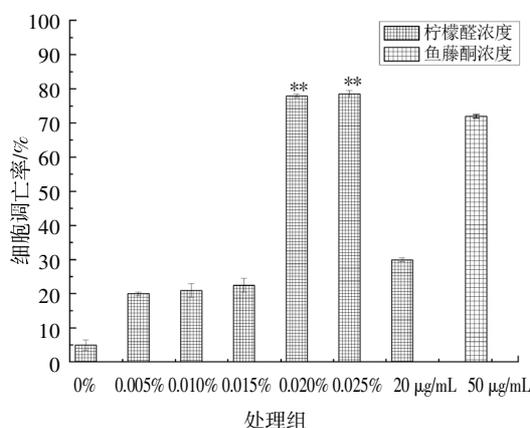


图7 流式细胞法检测柠檬醛对SL细胞凋亡的影响

Fig.7 Effect of SL cell apoptosis rate on LCEO by flow cytometry

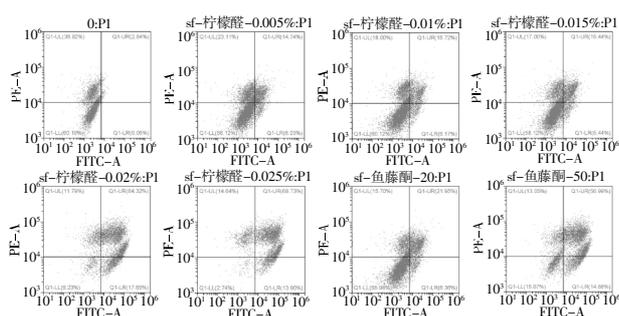


图8 柠檬醛处理SL细胞的流式细胞凋亡图

Fig.8 Flow cytometry of SL cells treated with citral

由图7、8可知,SL细胞的凋亡率与柠檬醛浓度呈正相关,不同浓度的柠檬醛(0、0.005%、0.01%、0.015%、0.02%、0.025%)处理SL细胞48h后,SL细胞的凋亡率分别为2.89%、20.77%、21.89%、24.88%、81.97%、82.63%。当柠檬醛浓度大于0.015%时,SL细胞的凋亡率显著增大($P < 0.01$),说明柠檬醛作为

山苍子油的主要成分,具有促进SL细胞凋亡的作用,且随柠檬醛浓度的增大,SL细胞的凋亡率也随之增大。这与Oliveira等^[25]对麦冬草精油及其主成分柠檬醛对草地贪夜蛾的毒理研究结果一致,同时也从细胞水平层面验证了Zhang等^[26]利用柠檬醛熏蒸昆虫的趋避效果。研究初步表明,柠檬醛是山苍子油抑制SL细胞凋亡的主要活性成分。

3 结论

本文利用CCK、MTT和流式细胞法分别研究了不同浓度的山苍子油对SL细胞增殖与凋亡的作用,研究结果表明:不同检测方法得到的结果一致,表明山苍子油具有抑制SL细胞增殖、诱导细胞凋亡的作用,且呈一定浓度和作用时间的依赖关系。同时进一步采用流式细胞凋亡法检测山苍子油中主要活性成分柠檬醛对SL细胞增殖与凋亡的作用,初步确定了柠檬醛是山苍子油中诱导SL细胞凋亡的主要活性成分。

据文献报道鱼藤酮是一种普遍使用的杀虫剂,其分子式为 $C_{23}H_{22}O_6$ ^[27]。鱼藤酮是一个典型的作用于昆虫的植物源杀虫剂,其进入细胞后会阻断NADH与辅酶Q之间的电子传导,影响ATP的生成^[28-29]。山苍子油对离体细胞的毒杀活性与鱼藤酮的毒杀效果基本一致,但目前关于山苍子油及柠檬醛对离体昆虫细胞毒杀活性的机制尚不明确,有待进一步深入研究。

将诸如山苍子油等传统的林产化工产品应用于害虫防治并开发高效低毒的绿色新农药,为林业资源高效利用和林业产业高质量发展提供了新思路,值得关注并深入研究。

参考文献

- [1] LUO M, JIANG L K, ZOU G L. Acute and genetic toxicity of essential oil extracted from *Litsea cubeba* (Lour.) Pers [J]. *Journal of Food Protection*, 2005, 68(3): 581—588.
- [2] 付红军. 山苍子油的提取效果及其防腐保鲜研究 [D]. 长沙: 中南林业科技大学食品科学与工程学院, 2017.
FU H J. Study on extraction effect and antiseptic preservation of *Listea cubeba* oil [D]. Changsha: College of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, 2017. (In Chinese)
- [3] WANG H, LIU Y. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from different parts of *Litsea cubeba* [J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2010, 7(1): 229—235.

- [4] LIAO P C, YANG T S, CHOU J C, *et al.* Anti-inflammatory activity of neral and geranial isolated from fruits of *Litsea cubeba* Lour [J]. *Journal of Functional Foods*, 2015, 19: 248—258.
- [5] HO C L, JIEPING O, LIU Y C, *et al.* Compositions and in vitro anticancer activities of the leaf and fruit oils of *Litsea cubeba* from Taiwan [J]. *Natural Product Communications*, 2010, 5(4): 617—620.
- [6] 李芳, SONG Y, HOLNESS H, *et al.* 不同提取方法山苍子油的化学成分与抗氧化活性分析 [J]. *林业科学*, 2015, 51(3): 124—131.
- LI F, SONG Y, HOLNESS H, *et al.* Chemical component and activity analysis of *Litsea cubeba* extracts obtained by different extraction methods [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2015, 51(3): 124—131. (In Chinese)
- [7] CHEN H C, CHANG W T, HSEU Y C, *et al.* Immuno suppressive effect of *Litsea cubeba* L. essential oil on dendritic cell and contact hypersensitivity responses [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(8): 1319—1329.
- [8] LIU Z L, GOH S H, HO S H. Screening of Chinese medicinal herbs for bioactivity against *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst) [J]. *Journal of Stored Products Research*, 2007, 43(3): 290—296.
- [9] PARK I K, KIM J, LEE S G, *et al.* Nematicidal activity of plant essential oils and components from Ajowan (*Trachyspermum ammi*), Allspice (*Pimenta dioica*) and *Litsea* (*Litsea cubeba*) essential oils against pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) [J]. *Journal of Nematology*, 2007, 39(3): 275—284.
- [10] CHEN C J, TSENG Y H, CHU F H, *et al.* Neuropharmacological activities of fruit essential oil from *Litsea cubeba* Persoon [J]. *Journal of Wood Science*, 2012, 58(6): 538—543.
- [11] VONG SOMBATH C, PÄLSSON K K, BJÖRK L, *et al.* Mosquito (Diptera: Culicidae) repellency field tests of essential oils from plants traditionally used in Laos [J]. *Journal of Medical Entomology*, 2012, 49(6): 1398—1404.
- [12] 陈学恒. 我国山苍子资源利用现状和产业化前景评述 [J]. *林业科学*, 2003, 39(4): 134—139.
- CHEN X H. Commented on utilization status and industrialization prospects of natural resources from *Litsea cubeba* in China [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2003, 39(4): 134—139. (In Chinese)
- [13] 黄致喜, 王慧辰. 萜类香料化学 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- HUANG Z X, WANG H C. *Aromatic spice chemistry* [M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999. (In Chinese)
- [14] SAXENA B P, KOUL O, TIKKU K, *et al.* A new insect chemosterilant isolated from *Acorus calamus* L [J]. *Nature*, 1977, 270(5637): 512—513.
- [15] 徐莉. 生姜精油对黑腹果蝇生存及选择行为的影响 [D]. 杭州: 浙江大学农业与生物技术学院, 2006.
- XU L. Effects of ginger essential oil on the survival and choice behavior in *Drosophila melanogaster* [D]. Hangzhou: College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, 2006. (In Chinese)
- [16] CORNELIUS M L, GRACE K J, YATES J R. Toxicity of monoterpenoids and other natural products to the formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae) [J]. *Journal of Economic Entomology*, 1997, 90(2): 320—325.
- [17] 童松. 辣椒碱对斜纹夜蛾 SL 细胞的影响及其体外代谢 [D]. 广州: 华南农业大学农学院, 2010.
- TONG S. Effect of capsaicin on SL cells of *Spodoptera litura* and its metabolism in vitro [D]. Guangzhou: Agricultural College, South China Agricultural University, 2010. (In Chinese)
- [18] 王玉枝, 童玲, 崔翎, 等. 微波萃取气相色谱法测定大米中的有机磷农药 [J]. *湖南大学学报 (自然科学版)*, 2007, 34(2): 64—66.
- WANG Y Z, TONG L, CUI Y, *et al.* Determination of organophosphorus pesticides in rice by microwave-assisted extraction/gas chromatography [J]. *Journal of Hunan University (Natural Sciences)*, 2007, 34(2): 64—66. (In Chinese)
- [19] 吴朝阳, 刘引, 栾崇林, 等. 丙烯菊酯和胺菊酯与 DNA 相互作用的光谱研究 [J]. *湖南大学学报 (自然科学版)*, 2010, 37(6): 61—66.
- WU C Y, LIU Y, LUAN C L, *et al.* Studies on the interaction of allethrin and tetramethrin with DNA by means of spectrometry [J]. *Journal of Hunan University (Natural Sciences)*, 2010, 37(6): 61—66. (In Chinese)
- [20] CHO J Y, CHOI G J, SON S W, *et al.* Isolation and antifungal activity of lignans from *Myristica fragrans* against various plant pathogenic fungi [J]. *Pest Management Science*, 2010, 63(9): 935—940.
- [21] LUCIA A, JUAN L W, ZERBA E N, *et al.* Validation of models to estimate the fumigant and larvicidal activity of *Eucalyptus* essential oils against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) [J]. *Parasitology Research*, 2012, 110(5): 1675—1686.
- [22] 张兴, 马志卿, 冯俊涛, 等. 植物源农药研究进展 [J]. *中国生物防治学报*, 2015, 31(5): 685—698.
- ZHANG X, MA Z Q, FENG J T, *et al.* Review on research and development of botanical pesticides [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2015, 31(5): 685—698. (In Chinese)
- [23] LI Z H, HUANG R L, LI W S, *et al.* Addition of cinnamon oil improves toxicity of rotenone to *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae [J]. *Florida Entomologist*, 2017, 100(3): 515—521.
- [24] WEN H J, ZHANG Q P, CHENG D M, *et al.* Cassia oil as a substitute solvent for xylene for rotenone EC and its synergistic activities [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2013, 105: 189—196.
- [25] OLIVERIA E R D, ALVES D S, CAEVALHO G A, *et al.* Toxicity of *Cymbopogon flexuosus* essential oil and citral for *Spodoptera frugiperda* [J]. *Ciência e Agrotecnologia*, 2018, 42(4): 408—419.
- [26] ZHANG Z, XIE Y, WANG Y. Toxicities of monoterpenes against housefly, *Musca domestica* L (Diptera: Muscidae) [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, 24(31): 24708—24713.
- [27] 韦星船, 雷雨. 鱼藤酮、拟除虫菊酯复配杀虫剂 [J]. *广州大学学报 (综合版)*, 1999, 13(4): 61—63.
- WEI X C, LEI Y. Rotenone, pyrethroid compound insecticide [J]. *Journal of Guangzhou University (Comprehensive Version)*, 1999, 13(4): 61—63. (In Chinese)
- [28] CUMMINS J M. Mitochondria: potential roles in embryogenesis and nucleocytoplasmic transfer [J]. *Human Reproduction Update*, 2001, 7(2): 217—228.
- [29] CASTEDO M, FERRI K, ROUMIER T, *et al.* Quantitation of mitochondrial alterations associated with apoptosis [J]. *Journal of Immunological Methods*, 2002, 265(1-2): 39—47.