

· 论 著 ·

染料木黄酮脂质体的制备及其对肿瘤细胞体外增殖的抑制作用

杨春宝¹, 丁江华², 郑章清¹

[摘要] 目的 研究染料木黄酮脂质体的制备方法及其对肿瘤细胞体外增殖的影响。方法 采用超声薄膜法制备染料木黄酮脂质体;活细胞计数法和 MTT 法观察染料木黄酮脂质体对肿瘤细胞的增殖抑制作用。结果 染料木黄酮脂质体的平均粒径为 136.7 nm, 剂量依赖性抑制 A549 和 HepG₂ 细胞的增殖, IC₅₀ 分别为 10.46、12.34 μmol/L。结论 染料木黄酮脂质体对 A549 和 HepG₂ 肿瘤细胞有明显的增殖抑制作用, 且作用强于游离染料木黄酮。

[关键词] 肿瘤细胞;染料木黄酮脂质体;IC₅₀

中图分类号: R647;R622⁺.1 文献标志码: A 文章编号: 1672-271X(2010)01-0033-03

Preparation of Genistein liposomes and its effect on the proliferation of tumor cells in vitro

YANG Chun-bao¹, DING Jiang-hua², ZHENG Zhang-qing¹. 1. Department of Pharmacy, 2. Department of Neoplasm, Lushan Sanatorium, Nanjing Military Command, Jiujiang, Jiangxi 332000, China

[Abstract] **Objective** To study the method for preparation of liposomes embedding Genistein and the effect of Genistein liposomes on the proliferation of tumor cells in vitro. **Methods** The Genistein liposomes were prepared by using a ultrasonic film method. The effect of Genistein liposomes on proliferation of tumor cells was determined by the growth curves of tumor cells using live cell calculation and MTT method. **Results** The average diameter of Genistein liposomes was 136.7 nm. The liposomes inhibited the growth of A549 and HepG₂ cells in vitro in a dose - dependent manner and the IC₅₀ of Genistein liposomes on A549 and HepG₂ cells were 10.46×10^{-6} mol/L and 12.34×10^{-6} mol/L respectively. **Conclusion** The Genistein liposomes inhibited the proliferation of A549 and HepG₂ cells. It is more effective than free Genistein.

[Key words] tumor cells; Genistein liposomes; IC₅₀

染料木黄酮(genistein), 又名 5,7,4-三羟基异黄酮, 可通过多种机制发挥抗肿瘤作用。脂质体作为一种新型药物载体, 可有效降低毒副作用, 且免疫脂质体可将药物靶向释放到靶分子。本研究制备了染料木黄酮脂质体(GL), 并以肺腺癌细胞株 A549 细胞、肝癌细胞株 HepG₂ 为实验对象, 考察 GL 对肿瘤细胞体外增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 Waters 600 型高效液相色谱系统; DiamonsilTM C₁₈ ODS 分析柱; BIO-RAD 680 型酶

标仪; RE-52 旋转蒸发仪; LA-950 型激光粒度分析仪; VORTEX21K 高速冷冻离心机。染料木黄酮标准品; MEM 培养基; 胎牛血清(FBS); 非必需氨基酸; 胰蛋白酶; 乙二醇四乙酸; 胆固醇; 大豆卵磷脂; 甲醇; 四甲基偶氮唑蓝; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞培养 A549 肺腺癌细胞株和 HepG₂ 肝癌细胞株购于中国医学科学院肿瘤研究所(ATCC number 分别为 CCL-185 和 HB-8065TM)。分别常规培养于含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基和改良 MEM 培养基中。培养条件: 5% CO₂、湿度 95%、37℃。每周传代 2 次。待细胞基本长满后, 弃去旧培养基, 以适量 2.5 g/L 胰蛋白酶和 0.2 g/L 乙二醇四乙酸(体积比为 1:1)混合液将细胞消化约 1 min, 弃去消化液并加入适量含 10% FBS 的 MEM 培养基, 反复吹打后制备细胞悬液, 以 1:4 的比例传代。

作者简介: 杨春宝(1970-), 男, 江西南昌人, 本科, 主管药师, 从事药物基础与临床工作

作者单位: 332000 江西九江, 南京军区庐山疗养院, 1. 药剂科, 2. 肿瘤科

1.3 染料木黄酮脂质体(GL)的制备方法 超声薄膜法制备 GL^[1]。

1.4 GL 对肿瘤细胞生长的影响 分别将 A549 细胞和 HepG₂ 细胞接种于 6 孔细胞培养板中,每孔 20 000 个细胞。过夜贴壁后,实验组加入 GL(终浓度分别为 5、20、50 $\mu\text{mol/L}$),对照组补加等体积的培养基,分别于第 24、48、72、96 h 取样,台盼蓝活细胞拒染法计算各组活细胞数,绘制细胞生长曲线。于 96 孔板中采用常规 MTT 方法(作用 48 h),分别测定染料木黄酮及 GL 对 A549 和 HepG₂ 细胞的体外增殖抑制作用,并计算 IC₅₀。

2 结果

2.1 GL 粒度分布 将 GL 适当稀释后在激光粒度

分析仪上进行测定。结果表明,脂质体平均粒径为 136.7 nm,粒径分布范围窄,基本符合正态分布规律。

2.2 GL 对 A549 和 HepG₂ 细胞生长的影响 GL 作用较长时间后,细胞生长明显受到抑制,且呈剂量依赖性。作用 24 h 后,20 $\mu\text{mol/L}$ GL 对 A549 和 HepG₂ 细胞的生长抑制率分别达 37% 和 35%,50 $\mu\text{mol/L}$ GL 处理时生长抑制率可达 55% 和 57%。结果见图 1。

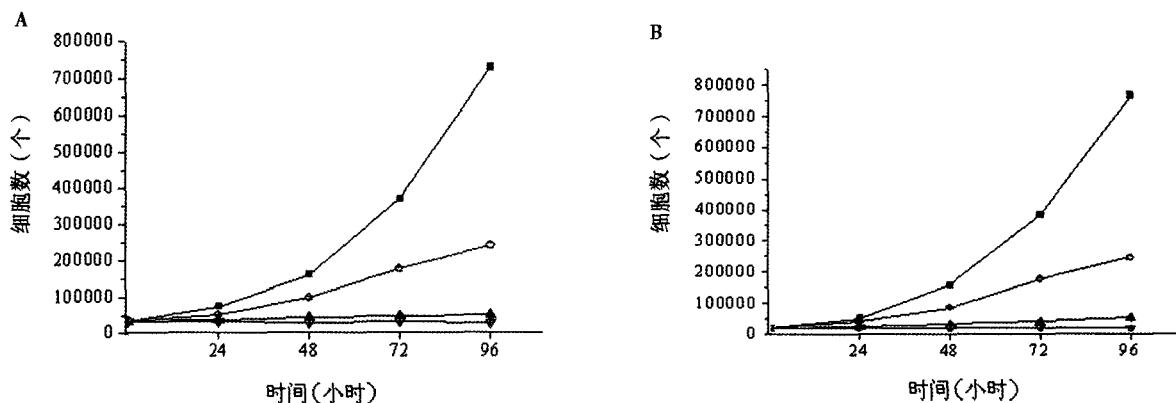


图 1 不同浓度 GL 处理时 A549 细胞(A)和 HepG₂ 细胞(B)的生长曲线

■ 对照组; ○ 5 $\mu\text{mol/L}$ GL 处理组; ▲ 20 $\mu\text{mol/L}$ GL 处理组; ▽ 50 $\mu\text{mol/L}$ GL 处理组

2.3 染料木黄酮及 GL 对 A549 和 HepG₂ 细胞的体外增殖抑制作用 MTT 实验结果显示,染料木黄酮和 GL 均呈剂量依赖性抑制 A549 和 HepG₂ 细胞的体外增殖;且 GL 对细胞的增殖抑制作用强于游离

染料木黄酮。GL 对 A549 和 HepG₂ 细胞的 IC₅₀ 分别为 10.46、12.34 $\mu\text{mol/L}$,而游离染料木黄酮对 A549 和 HepG₂ 细胞的 IC₅₀ 分别为 32.35、30.87 $\mu\text{mol/L}$ 。结果见图 2。

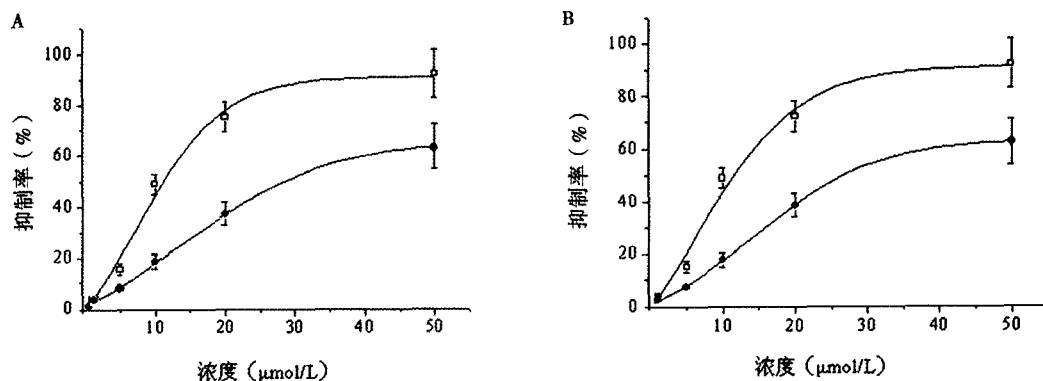


图 2 不同浓度 GL 和游离染料木黄酮对 A549 细胞(A)和 HepG₂ 细胞(B)增殖作用的影响($n=3$)

□ GL 组; ● 游离染料木黄酮对照组

3 讨论

目前认为染料木黄酮具有抗肿瘤作用机制有:①染料木黄酮可与雌激素竞争结合雌激素受体,从而减轻雌激素的促细胞增殖作用,降低与雌激素有关的肿瘤发病危险性^[2];②染料木黄酮是酪氨酸蛋白激酶(PTK)的强抑制剂,对 PTK 的抑制作用是其抗癌效应的重要分子机制^[2];③染料木黄酮可抑制拓扑异构酶 II 活性,引起肿瘤细胞的 G₂/M 期阻滞,诱导肿瘤细胞凋亡^[3];④还可诱导谷胱甘肽过氧化物酶基因表达上调^[4]。染料木黄酮是一种很有潜力的肿瘤化疗药物,具有广泛的应用前景,但其难溶于水,且具生殖内分泌毒性^[5]、免疫毒性^[6]、神经毒性^[7]及遗传毒性^[8]等多种毒副作用,限制了该化合物的进一步开发利用。

本研究制备了染料木黄酮脂质体,并对该制剂的稳定性及对肿瘤细胞的增殖抑制作用进行了观察,为该化合物制备成免疫脂质体提供了实验依据。MTT 实验结果显示,染料木黄酮脂质体对 A549 和 HepG₂ 细胞的体外增殖抑制作用明显强于游离染料木黄酮,其 IC₅₀ 大约是游离药物的 1/3。其机制可能与肿瘤细胞摄取脂质体中药物的方式有关。脂质体主要通过细胞膜融合作用而被肿瘤细胞内吞,因而肿瘤细胞能有效摄取脂质体中药物,与游离药物进入细胞的方式相比,该方式能使肿瘤细胞内药物摄取量增加许多倍。

为进行染料木黄酮脂质体对肿瘤细胞的体外增殖抑制作用研究,本研究中首先将制备的染料木黄酮脂质体用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,不可避免的造成了药物的损失。分析认为,可能与粒径较大的

脂质体颗粒所能包裹的药物分子较多有关。需进一步改善脂质体的制备工艺,以减少粒径较大的脂质体的比例及因此造成的药物损失。

【参考文献】

- [1] 蒋天智,刘少友. 新型长循环紫杉醇脂质体的制备及其细胞毒性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(26): 5113-5116.
- [2] Chatzinikolaou G, Nikitovic D, Stathopoulos EN, et al. Protein tyrosine kinase and estrogen receptor-dependent pathways regulate the synthesis and distribution of glycosaminoglycans/proteoglycans produced by two human colon cancer cell lines[J]. Anticancer Res, 2007, 27(6): 4101-4106.
- [3] Schmidt F, Knobbe CB, Frank B, et al. The topoisomerase II inhibitor, genistein, induces G₂/M arrest and apoptosis in human malignant glioma cell lines[J]. Oncol Rep, 2008, 19(4): 1061-1066.
- [4] Wiegand H, Wagner AE, Boesch-Saadatmandi C, et al. Effect of Dietary Genistein on Phase II and Antioxidant Enzymes in Rat Liver[J]. Cancer Genomics Proteomics, 2009, 6(1): 85-92.
- [5] Ford JA, Clark SG, Walters EM, et al. Estrogenic effects of genistein on reproductive tissues of ovariectomized gilts[J]. J Anim Sci, 2006, 84(4): 834-842.
- [6] Cave NJ, Backus RC, Marks SL, et al. Modulation of innate and acquired immunity by an estrogenic dose of genistein in gonadectomized cats[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2007, 117(1-2): 42-54.
- [7] Jin Y, Wu H, Cohen EM, et al. Genistein and daidzein induce neurotoxicity at high concentrations in primary rat neuronal cultures[J]. J Biomed Sci, 2007, 14(2): 275-284.
- [8] Klein CB, King AA. Genistein genotoxicity: critical considerations of in vitro exposure dose[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2007, 224(1): 1-11.

(收稿日期: 2009-09-25; 修回日期: 2009-12-15)

(本文编辑: 潘雪飞; 英文编辑: 王建东)

关于引用参考文献的说明

作为学术研究论文,虽然论述的是作者本人的研究成果,但在阐述和论证过程中不可避免地要引用、参考、借鉴他人的已有成果,即参考文献,它是学术论文的重要组成部分。参考文献不仅增加论文的学术性,而且表明论文的科学依据,也是对他人劳动成果的尊重。

本刊对参考文献的要求是论著类 8~10 条,综述讲座类 15~40 条,一般论文 6~8 条,短篇个案类视情况而定。参考文献宜选用近 3~5 年内公开发表(出版)的权威性学术期刊、报纸及专著等,内部资料、未公开发表的论文不能作为参考文献使用,尽量不引用文献综述等二、三次文献。文后参考文献著录格式请参照稿约,按书写要求书写完整,且依引文先后顺序用阿拉伯数字连续编码,并加方括号标注于文中相应处右上角。