

# 萝卜硫素脂质体对 S-180 肉瘤细胞小鼠移植瘤的抑制作用

周徐雅<sup>1,2</sup>, 金涌<sup>1</sup>, 黄博<sup>1</sup>, 鲍婕<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨萝卜硫素(SFN)脂质体的体内抗肿瘤作用并讨论其可能机制。方法 首先体外观察 SFN 脂质体组及游离药物组对 S-180 肿瘤细胞株的抑制作用,进行细胞内药理学实验。然后建立 S-180 肉瘤细胞小鼠皮下移植瘤动物模型,观察 SFN 脂质体组及游离药物组对荷瘤小鼠肿瘤生长的抑制作用,检测肿瘤中药物含量。通过 Western blot 检测 SFN 脂质体对荷瘤小鼠金属蛋白酶(MMP)-2 的影响,采用一氧化氮合成酶检测试剂盒检测荷瘤小鼠的一氧化氮合成酶含量。结果 在体外实验中,SFN 脂质体抑制 S-180 细胞的半抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为 33.1 μmol/L,小于游离 SFN IC<sub>50</sub> 44.3 μmol/L。细胞内药理学参数提示,SFN 脂质体进入 S-180 细胞内的程度较游离 SFN 增加。SFN 脂质体低、中、高三个剂量组均能明显抑制荷 S-180 荷瘤小鼠的肿瘤生长,与相同剂量游离 SFN(50 mg/kg)比较,脂质体的抑瘤率(44.09%)增强近一倍(24.55%),生命延长率有所增加( $P < 0.01$ )。中、高剂量的 SFN 脂质体明显下调小鼠肿瘤部位中的一氧化氮合成酶的表达( $P < 0.01$ )。Western blot 检测结果表明,高剂量浓度的 SFN 脂质体用药后,明显下调小鼠肿瘤组织中的 MMP-2 蛋白的表达( $P < 0.01$ )。结论 SFN 脂质体具有较强的体内外抗肿瘤活性,作用强于游离 SFN。其机制可能与实体瘤的高通透性和滞留效应、抑制基质 MMP-2 活性来阻止肿瘤细胞的入侵,并使得一氧化氮合成酶浓度降低减少一氧化氮分泌,从而降低血管通透性,减少肿瘤组织供应,抑制肿瘤的生长等有关。

**关键词** SFN 脂质体; 抗肿瘤; MMP-2; EPR 效应

**中图分类号** R 944; R 966

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2017)11-1680-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.022

萝卜硫素(sulforaphane, SFN)是一种异硫氰酸盐,其广泛存在于十字花科植物中,尤其是西兰花和花椰菜芽里。近来研究<sup>[1]</sup>表明其具有抗癌、防治痛

风、控制代谢性疾病等功效。近来,随着社会的进步和医疗卫生事业的发展、老龄化加快、不健康的生活方式、社会竞争压力加大、环境污染等因素的影响,中国癌症总发病率和死亡率逐年上升<sup>[2]</sup>。目前药物保守治疗仍是主流,但普通剂型的抗肿瘤药因靶向性较差,体内呈全身性分布导致一系列不良反应,致使化疗出现一定困难。如今,临床上已经出现一些抗肿瘤靶向制剂的新剂型,可以实现抗癌药物的定位释放、减少毒副作用、从而提高抗癌效果,这其中就包括脂质体、白蛋白纳米粒、微乳等<sup>[3]</sup>。该研究将 SFN 与脂质体这种新剂型相结合,制备了 SFN 脂质体,在解决其有一定毒性、稳定性差等缺陷的前提下,探索其对小鼠 S-180 肉瘤的治疗作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 健康昆明种小鼠 140 只,雌雄各半,体重 18~22 g,由安徽医科大学实验动物中心提供,给予正常饮食,在标准环境饲养 1 周。

**1.1.2 主要试剂** SFN(纯度 70%,批号: S140384)、5-氟尿嘧啶(纯度 99%,批号: F100149)购自上海晶纯生化股份有限公司; SFN 脂质体(包封率均在 52.11%,批号: 20160423),本单位自制; 甲醇(分析纯)购自上海化学试剂总厂; RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自杭州四季青公司; 一氧化氮合成酶检测试剂盒购自上海碧云天生物技术研究所; 苯甲基磺酰氟、十二烷基磺酸钠、过硫酸铵三羟甲基氨基甲烷、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、二甲基亚砷均购自美国 Sigma 公司; 兔多克隆基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)-2、β-actin 抗体和山羊抗兔 IgG 均购自北京博奥森科技有限公司。

**1.1.3 主要仪器** LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司); 全波长酶标仪(美国 Biotek 公司); 显影仪(上海欧翔科学仪器有限公司)。

**1.1.4 细胞株** S-180 小鼠肉瘤细胞株购自中国科学院上海细胞生物所。

### 1.2 方法

2017-07-06 接收

基金项目: 安徽高校省级自然科学基金项目(编号: KJ2013A153)

作者单位: <sup>1</sup>安徽医科大学药学院,合肥 230032

<sup>2</sup>中国人民武装警察部队安徽省总队医院药剂科,合肥 230032

作者简介: 周徐雅,女,硕士研究生;

金涌,男,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: jinyong@ahmu.edu.cn

**1.2.1 细胞培养** S-180 肉瘤细胞培养于含 10% 标准胎牛血清的 RPMI1640 培养液中,在 37 °C、含体积分数 5% 的 CO<sub>2</sub> 条件下培养,平均每 2 d 传代 1 次。

**1.2.2 SFN 脂质体的制备** 以 SFN 为模型药,在前期研究的基础上,采用现代参数组合设计法及有效成分药物动力学法,确定最佳制剂处方及制备工艺(有机相/水相比比例为 1:3,温度为 30 °C,水合时间为 5 min,类脂比 1:6)。SFN 脂质体为圆球状大单室脂质体,见图 1。平均粒径为 (176.733 ± 5.443) nm,包封率均在 52.11% 以上,体外释药结果表明脂质体具有一定的缓释效应,在 PBS 缓冲液中的释药情况符合 Higuchi 方程释放情况。

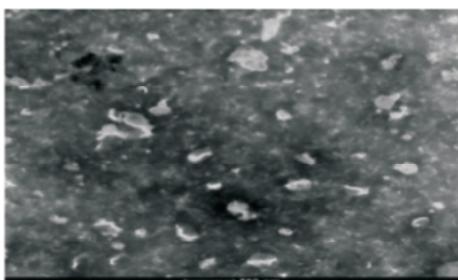


图 1 SFN 脂质体电镜照片

**1.2.3 SFN 脂质体体外对 S-180 细胞株的影响**

**1.2.3.1 检测细胞的增殖** 选择 S-180 小鼠肉瘤细胞株为实验对象,在 96 孔培养板中每孔加入 10<sup>7</sup> 个细胞,设未加药的正常组、SFN 脂质体组(6.25、12.5、25、50、100 μmol/L)、游离 SFN 组(6.25、12.5、25、50、100 μmol/L),每组设 6 个复孔,培养 24 h,采用 CCK-8 试剂盒测定 SFN 脂质体对细胞增殖的影响,计算半数抑制浓度(semi-inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)。

**1.2.3.2 检测细胞内药物含量** 制备 S-180 肉瘤细胞悬液,培养过夜,离心去上清液同前。分别加入含 SFN 脂质体(50 μmol/L)和游离 SFN(50 μmol/L)的 RPMI 1640 液 200 μl,在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。分别于 5、10、20、30、40、50、60、70、80 min 终止培养,1 000 r/min 离心 15 min,弃上清液, PBS 洗 1 次(倒置显微镜下观察各时间点两组间细胞数无明显差异),下层细胞加 200 μl 甲醇,震荡 30 s 破坏细胞膜,8 000 r/min 离心 15 min,取上清液 20 μl 进样,高效液相色谱法检测细胞内液药物浓度,计算药代动力学参数,每组设 6 个复孔。

**1.2.4 SFN 脂质体体内抗肿瘤活性研究**

**1.2.4.1 荷 S-180 肉瘤小鼠的制备** 如文献<sup>[4]</sup>所示取传代 8 d 的 S-180 腹水型种鼠,在无菌条件下抽取腹水,以无菌生理盐水按 1:3 稀释,计数并调整细胞浓度为 1 × 10<sup>7</sup>/ml。取小鼠 120 只,每鼠右腋下注射瘤液 0.2 ml。

**1.2.4.2 SFN 脂质体对 S-180 肉瘤生长及生命周期的影响** 取昆明种小鼠 140 只,雌雄各半,体重 18~22 g,随机分为 7 组,每组 20 只,分别为正常组、模型组、5-氟尿嘧啶阳性药组、SFN 脂质体组(25、50、100 mg/kg)、SFN 50 mg/kg 组,药物均采用皮下注射方法,于接种后 1、3、5、7、9、11 d 给药 1 次,于最后一次给药 2 h 后,各组处死 10 只小鼠,通过观察肿瘤生长情况,称量瘤块,计算抑瘤率来反映 SFN 脂质体对肿瘤生长的影响。肿瘤抑制率(%) = (对照组瘤重 - 治疗组瘤重) / 对照组瘤重 × 100%。各组剩余 10 只继续观察直至肿瘤小鼠死亡,记录小鼠生存天数,计算生命延长率。生命延长率(%) = (给药组平均生存天数 - 对照组平均生存天数) / 对照组平均生存天数 × 100%。

通过观察动物死亡情况来计算生命延长率,评价 SFN 脂质体对荷瘤小鼠的生命延长作用。通过高效液相色谱法计算 SFN 脂质体的含量。

**1.2.4.3 检测小鼠肿瘤组织的药物分布** 处死小鼠称瘤重后,取 20 mg 肿瘤组织,超声粉碎,加甲醇 20 μl,震荡 30 s,5 000 r/min 离心 15 min,取上清液 20 μl 进样,高效液相色谱法检测肿瘤组织药物含量。

**1.2.4.4 Western blot 检测肿瘤细胞因子的表达** 按照 1.2.4.1 制备荷瘤小鼠、分组和给药,停药后处死,剥取瘤块(正常组取相同部位的正常组织),匀浆后提取细胞总蛋白,BCA 法测蛋白含量,SDS-PAGE 胶电泳,转膜后将 PVDF 膜进行封闭 2 h,一抗(MMP-2 和 β-actin 1:500 稀释)孵育 1 h 后,加入稀释辣根过氧化物酶标记的二抗室温或 4 °C 孵 1 h,用 Thermo 显影液对膜进行预染,后在 Bio-Rad 凝胶成像系统内曝光显影,Quantity One 软件分析相对表达量。

**1.2.4.5 一氧化氮合成酶的检测** 采用一氧化氮合成酶检测试剂盒检测荷瘤小鼠瘤块中一氧化氮合成酶含量,详见说明书。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,统计实验数据,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,同组间两样本均数的比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。P < 0.05 表示差异有

统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 体外实验结果

**2.1.1 SFN 脂质体对细胞增殖的影响** 如图 2 所示, SFN 脂质体( 6. 25、12. 5、25、50、100  $\mu\text{mol/L}$ ) 和相同浓度游离 SFN 相比较对细胞株有明显的抑制作用; SFN 脂质体的  $\text{IC}_{50}$  为 33. 1  $\mu\text{mol/L}$ , 小于游离 SFN 的  $\text{IC}_{50}$  ( 44. 3  $\mu\text{mol/L}$ ) (  $P < 0. 05$  ), 提示 SFN 脂质体对 S-180 细胞的抑制作用强于游离 SFN。

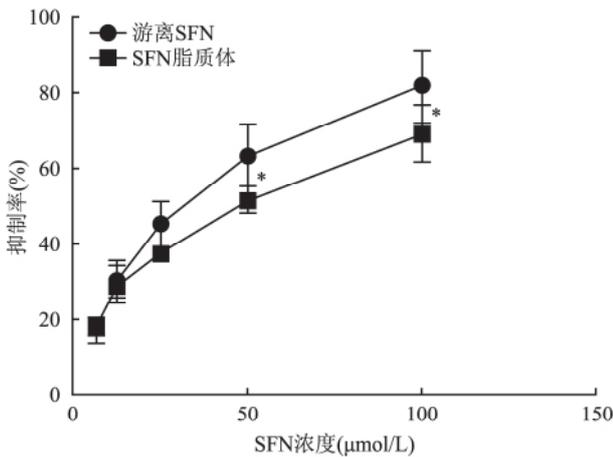


图 2 SFN 脂质体和游离 SFN 对 S-180 细胞生长抑制作用的比较  
与游离 SFN 比较: \*  $P < 0. 05$

**2.1.2 SFN 脂质体在细胞内含量** 如图 3 所示, SFN 脂质体与相同浓度的游离 SFN 比较, 在 S-180 肉瘤细胞内液的峰值时间  $T_{\text{max}}$  明显延长(  $20. 60 \pm 1. 83$  vs  $12. 51 \pm 2. 14$ ) (  $P < 0. 01$  ), 药时曲线下面积 AUC 明显增大(  $22. 25 \pm 3. 60$  vs  $8. 34 \pm 2. 84$ ) (  $P < 0. 01$  ), 反应半衰期  $T_{1/2}$  明显延长(  $31. 52 \pm 5. 70$  vs  $14. 61 \pm 3. 59$ ) (  $P < 0. 01$  )。提示 SFN 脂质体进入 S-180 细胞内液的程度增加, 起到增加和延长疗效的作用。

### 2.2 体内实验结果

**2.2.1 S-180 肉瘤细胞小鼠模型的建立** 与正常组相比, 模型组小鼠右腋下已经成瘤, 见图 4, 表明已成功建立了 S-180 肉瘤细胞小鼠模型。

**2.2.2 SFN 脂质体对小鼠体重和 S-180 肉瘤生长的抑制作用** 表 1 显示 SFN 脂质体低、中、高三个剂量组均能明显抑制肿瘤的生长(  $F = 63. 11$ ,  $P < 0. 05$ ,  $P < 0. 01$  ); 与相同剂量游离 SFN( 50  $\text{mg/kg}$ ) 比较, 脂质体的抑瘤率( 44. 09%) 增强近一倍

( 24. 55%) (  $P < 0. 01$  )。SFN 脂质体各剂量组给药后动物体重均有不同程度的增加。

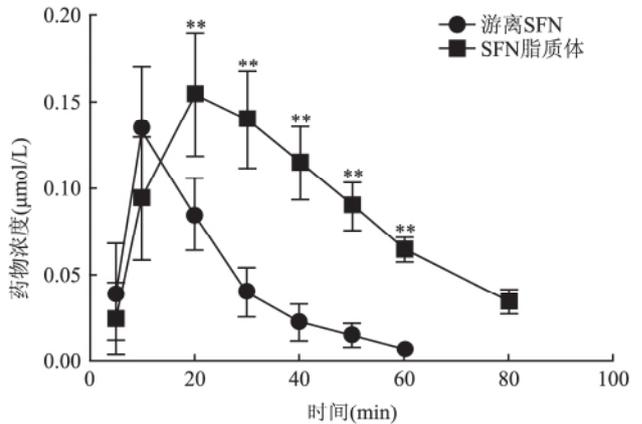


图 3 SFN 脂质体和游离 SFN 在 S-180 细胞内液的药物浓度 - 时间过程  
与游离 SFN 比较: \*\*  $P < 0. 01$

**2.2.3 脂质体对荷瘤小鼠生命周期的影响** 如表 2 所示, 低、中、高剂量的 SFN 脂质体均能明显延长小鼠的存活时间, 存活时间随剂量的增加而延长(  $F = 17. 26$ ,  $P < 0. 05$ ,  $P < 0. 01$  )。与相同剂量游离 SFN( 50  $\text{mg/kg}$ ) 比较, 皮下注射脂质体组荷瘤小鼠的生命延长率差异无统计学意义。

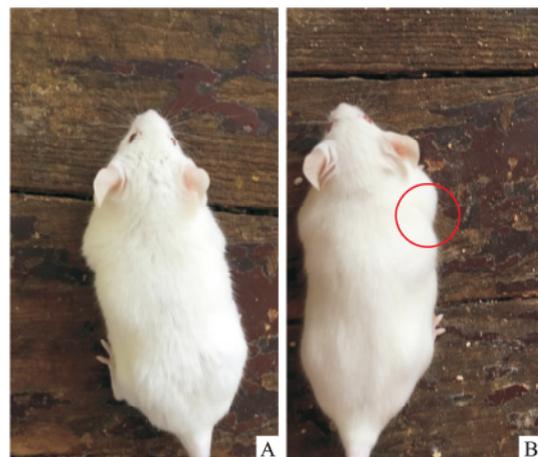


图 4 S-180 肉瘤细胞小鼠模型的建立  
A: 正常组; B: 模型组

**2.2.4 脂质体在荷瘤小鼠实体瘤中含量** 检测结果表明, 相同剂量下, SFN 脂质体(  $24. 81 \pm 4. 24$ )  $\text{mg/g}$  在实体瘤中的含量高于游离 SFN 组(  $18. 42 \pm 3. 15$ )  $\text{mg/g}$  (  $t = 3. 02$ ,  $P < 0. 01$  )。

**2.2.5 小鼠实体瘤中细胞因子的表达** 检测结果表明, 与正常组一氧化氮合成酶量为  $4. 63 \pm 1. 62$

表1 SFN 脂质体对体重和肿瘤生长的抑制作用( $n = 10 \bar{x} \pm s$ )

组别	体重(g)		瘤重(g)	抑瘤率(%)
	给药前	给药后		
模型	29.63 ± 2.07	24.75 ± 1.75	2.20 ± 0.73	-
SFN 脂质体(mg/kg)				
25	30.16 ± 1.03	36.93 ± 3.87	1.48 ± 0.31 <sup>#</sup>	32.72
50	29.92 ± 3.02	37.42 ± 3.63	1.23 ± 0.58 <sup>#</sup>	44.09
100	30.24 ± 1.34	37.15 ± 1.53	1.14 ± 0.25 <sup>##</sup>	48.18
游离 SFN(50 mg/kg)	28.54 ± 1.23	33.23 ± 4.59	1.51 ± 0.47 <sup>#</sup>	24.55
5-氟尿嘧啶(20 mg/kg)	28.97 ± 3.49	23.77 ± 2.62	0.63 ± 0.57 <sup>##</sup>	71.36

与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$

表2 SFN 脂质体对荷瘤小鼠生命周期的影响( $n = 10 \bar{x} \pm s$ )

组别	平均存活天数(d)	生命延长率(%)
模型	20.52 ± 2.41	-
SFN 脂质体(mg/kg)		
25	23.13 ± 1.33 <sup>#</sup>	12.72
50	26.91 ± 1.11 <sup>##</sup>	31.14
100	29.78 ± 5.62 <sup>##</sup>	45.13
游离 SFN(50 mg/kg)	24.69 ± 4.12 <sup>#</sup>	20.32
5-氟尿嘧啶(20 mg/kg)	28.82 ± 1.86 <sup>##</sup>	40.45

与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$

U/ml 相比 模型组(血清中含一氧化氮合成酶量为  $27.82 \pm 2.34$  U/ml) 含量明显升高( $F = 36.14$ ,  $P < 0.01$ )。与模型组相比,低、中、高剂量的 SFN 脂质体明显下调小鼠血清中的一氧化氮合成酶的表达(血清中含量分别为  $20.49 \pm 2.73$ 、 $15.42 \pm 1.36$ 、 $13.82 \pm 3.65$  U/ml)( $F = 49.62$ ,  $P < 0.01$ )。

**2.2.6 SFN 脂质体对荷瘤小鼠体内 MMP-2 蛋白表达的影响** Western blot 检测结果表明,与模型组相比,高剂量的 SFN 脂质体明显下调小鼠瘤组织中 MMP-2 蛋白的表达( $P < 0.01$ ),见图 5。

### 3 讨论

十字花科植物含有的异硫氰酸盐具有很强的抗癌活性, SFN 是异硫氰酸盐中最主要的有效成分,其能调节致癌路径中的多种目标来实现对癌症的抵抗<sup>[5]</sup>, SFN 是异硫氰酸盐中抗癌活性最强的一种单体。脂质体具有定位释放、缓释和与生物膜亲和性好的优点,本研究成功的将其制备成脂质体,国内文献鲜有报道。通过体内外抗肿瘤实验显示其作用明显,且疗效强于游离 SFN。其机制可能有以下几个方面:利用肿瘤的滞留效应<sup>[6]</sup> 浓集于肿瘤组织。滞留效应,即癌细胞会分泌比正常细胞更多的血管透过性因子,造成肿瘤组织附近血管比正常血管渗透性高,因此分子体积大的高分子化合物(脂质体等)更能渗透,滞留在癌组织。脂质体利用脂质双分子

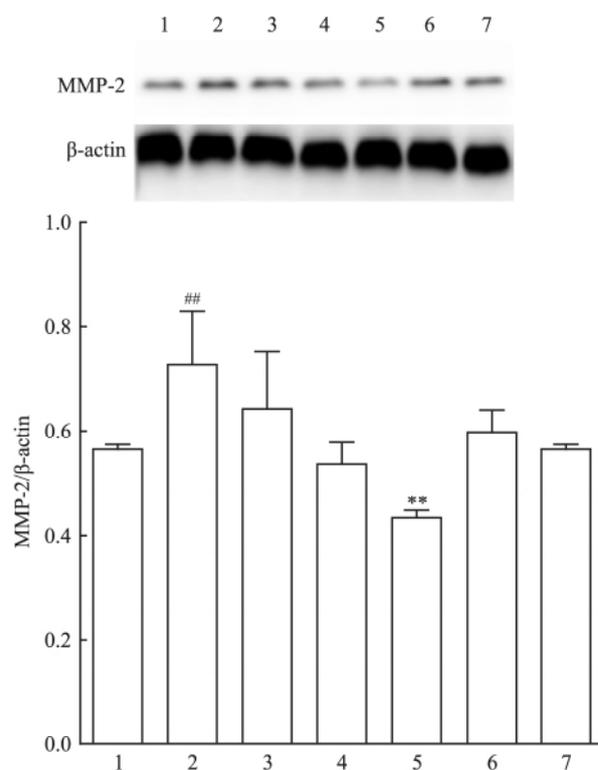


图5 SFN 脂质体对荷瘤小鼠 MMP-2 蛋白表达的影响

1: 正常组; 2: 模型组; 3: SFN 脂质体 25 mg/kg; 4: SFN 脂质体 50 mg/kg; 5: SFN 脂质体 100 mg/kg; 6: 游离 SFN 50 mg/kg; 7: 5-氟尿嘧啶(20 mg/kg); 与正常组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

与细胞生物膜类似的特性,和肿瘤细胞进行脂质交换,更多的药物进入细胞内发挥后续作用。

MMP 作为锌依赖的蛋白内切酶,可以降解大部分的细胞外基质组分,从而调节外界物质的侵袭和转移。研究<sup>[7]</sup>表明 MMP-2 在正常组织或良性肿瘤中无表达或表达量较少,而在癌组织及转移灶中表达和活性都增强。SFN 脂质体可通过抑制 MMP-2 活性来阻止肿瘤细胞的入侵,从而抑制肿瘤细胞的转移。

一氧化氮合成酶可以催化产生大量的一氧化

氮,一氧化氮合成酶生成的一氧化氮可促进肿瘤组织血管的生成,提高肿瘤细胞的侵袭性,维持肿瘤组织中血管扩张,增加血管通透性。动物实验已证实,肿瘤细胞的高生长率有赖于一氧化氮合成酶的生成,应用一氧化氮合成酶抑制剂时血管的形成明显减少,肿瘤的生长和转移受到抑制<sup>[8]</sup>。SFN 脂质体与同剂量 SFN 相比可使得瘤体中一氧化氮合成酶浓度降低更明显,抑制一氧化氮的生成,可降低血管通透性,减少肿瘤组织供应,从而抑制肿瘤的生长。

### 参考文献

- [1] de Souza C G, Sattler J A, de Assis A M, et al. Metabolic effects of sulforaphane oral treatment in streptozotocin-diabetic rats [J]. J Med Food 2012, 15( 9): 795 - 801.
- [2] 常 鹤, 昌盛, 龙东波, 等. 医院健康科普教育对癌症防治的作用及探讨 [J]. 中国肿瘤 2016, 25( 11): 870 - 3.
- [3] 黄 雄, 林敏超, 余柏村, 等. 鬼臼毒素及其衍生物新型制剂抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志 2012, 18( 13): 296 - 9.
- [4] 邹品文, 赵春景, 李 攀, 等. 黄芪多糖抗 S180 肉瘤作用及其免疫调节的影响 [J]. 遵义医学院学报 2012, 35( 1): 17 - 20.
- [5] 李小东, 郭贝贝, 杨英士, 等. 萝卜硫素抗癌机理研究进展 [J]. 中药材 2015, 38( 8): 1768 - 71.
- [6] 郝爱军, 张 宁, 郭兴家, 等. EPR 作用及其在抗肿瘤大分子药物研究中的应用 [J]. 中国新药杂志 2012, 21( 21): 2516 - 20.
- [7] 邓路婵, 周黎明. 基质金属蛋白酶与恶性肿瘤转移的关系 [J]. 四川生理科学杂志 2014, 36( 2): 80 - 2.
- [8] 王菊勇, 郭 净, 郝 展. iNOS/COX-2 与恶性肿瘤 [J]. 现代肿瘤医学 2012, 20( 1): 183 - 6.

## The inhibiting effect of sulforaphane liposomes in S-180 sarcoma mice

Zhou Xuya<sup>1, 2</sup>, Jin Yong<sup>1</sup>, Huang Bo<sup>1</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of School of Pharmacy Anhui Medical University Hefei 230032;

<sup>2</sup>Dept of Pharmacy Chinese People's Armed Police Force Anhui Provincial Corps Hospital Hefei 230032)

**Abstract Objective** To study the anti-tumor effect and possible mechanism of sulforaphane (SFN) liposomes *in vitro* and *in vivo*. **Methods** The inhibitory effect of the SFN liposome group and the free drug group on S-180 tumor cell line was observed and intracellular pharmacokinetics experiments were performed. Then the animal model of S-180 sarcoma mice was successfully established. The inhibitory effect, the drug content in the tumor and the free drug on metalloproteinase (MMP)-2 in tumor-bearing mice was detected by Western blot. The content of nitric oxide synthase in tumor-bearing mice was detected by nitric oxide synthase detection kit. **Results** *In vitro* experiments, the half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of S-180 cells was 33.1 μmol/L, which was less than that of free sulforaphane 44.3 μmol/L. Pharmacokinetic parameters suggested that the concentration of SFN liposomes in intracellularly was more than the free drug under the same dose. Low, middle and high dosage group of SFN liposome significantly inhibited the growth of tumor in S-180 sarcoma mice, compared with the same dose of free drug group (50 mg/kg), the tumor inhibitory rate of sulforaphane liposomes was 44.09%, which nearly doubled the free drug group (24.55%). By comparing with the same dose of the free drug group (50 mg/kg), the sulforaphane liposomes was prolong the life extension rate ( $P < 0.01$ ). Medium and high dose of SFN liposomes significantly down-regulated the expression of iNOS in the tumor site of S-180 sarcoma mice ( $P < 0.01$ ). Western blot analysis showed that the expression of MMP-2 in tumor tissue of S-180 sarcoma mice of the high dose of SFN liposomes group was significantly decreased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** SFN liposomes have strong anti-tumor activity *in vitro* and *in vivo*, and the effect is stronger than that of free sulforaphane. The mechanism may be related to the enhanced permeability and retention effect, the inhibit effect of MMP-2's activity which prevent the invasion of tumor cells. In addition, the decreased concentration of nitric oxide synthase which reduced the secretion of NO, thereby reducing the vascular permeability, decreased the supply of tumor tissue, thus to inhibit the growth of tumor and so on.

**Key words** sulforaphane liposomes; antitumor; MMP-2; EPR effect