

大蒜素二烯丙基三硫醚微乳的制备及其对肿瘤细胞增殖与迁移的影响

傅荣萍^{1,2}, 刘玉萍^{1,2*}, 张毕桥¹, 陈云艳^{1,2}, 蒋祥亮², 陈彦^{1,2*}

1. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏 南京 210028

2. 江苏省中医药研究院, 中药组分与微生态研究中心, 江苏 南京 210028

摘要: 目的 制备大蒜素二烯丙基三硫醚(DATS)微乳(DATS-MEs), 评价该微乳载药系统对肿瘤细胞增殖和迁移能力的影响。方法 以HS15为乳化剂, PEG400为助乳化剂, DATS作为油相, 水滴定法制备DATS水包油微乳; 采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法, 评价DATS-MEs对小鼠Lewis肺癌(LLC)细胞及小鼠黑色素瘤B16BL6细胞体外增殖的影响; 采用划痕实验评价DATS-MEs对LLC细胞及B16BL6细胞体外水平移行能力的影响。结果 制备的DATS-MEs稳定, 外观澄清透明, 分散良好; 粒径为 (16.72 ± 0.22) nm, 多分散系数为 0.03 ± 0.01 , Zeta电位为 (-4.98 ± 0.11) mV, DATS在微乳中的包封率为82.89%, 载药量为6.28%, 在水中的溶解度与裸药组相比增加了约2 367倍。10、30、50 $\mu\text{mol/L}$ 的DATS-MEs与大蒜素裸药均能有效抑制LLC细胞和B16BL6细胞的增殖及迁移, 并且具有剂量依赖性, 其中DATS-MEs的药效强于DATS裸药。结论 将DATS制成微乳, 可提高其稳定性, 可以有效解决DATS在水中溶解性差的问题, 对LLC细胞及小鼠黑色素瘤B16BL6细胞具有较好的增殖抑制能力及迁移抑制能力, 具有更好的抗肿瘤增殖及转移的潜力。

关键词: 大蒜素二烯丙基三硫醚; 微乳; 细胞增殖; 细胞迁移; 肺癌; 黑色素瘤

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)23-5541-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.23.009

Preparation of diallyl trisulfide microemulsion and its effect on proliferation and migration of tumor cells

FU Rong-ping^{1,2}, LIU Yu-ping^{1,2}, ZHANG Bi-qiao¹, CHEN Yun-yan^{1,2}, JIANG Xiang-liang², CHEN-Yan^{1,2}

1. Affiliated Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

2. Multi-component of Traditional Chinese Medicine and Microecology Research Center, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China

Abstract: **Objective** To prepare diallyl trisulfide microemulsion (DATS-MEs) and evaluate its effect on the proliferation and migration of tumor cells. **Methods** Using HS15 as emulsifier, PEG400 as co-emulsifier and DATS as the oil phase, water titration method was used to prepare DATS-MEs. The influence of DATS-MEs on the proliferation of mouse Lewis cancer LLC cells and mouse melanoma B16BL6 cells *in vitro* was evaluated by the tetramethyl azoline blue (MTT) method; Wound healing assay was used to evaluate the effect of DATS-MEs on the migration of LLC and B16BL6 cells *in vitro*. **Results** The DATS-MEs obtained was stable, clear, transparent, and well dispersed. The particle size of DATS-MEs was (16.72 ± 0.22) nm, the polydispersity index was 0.03 ± 0.01 and the Zeta potential was (-4.98 ± 0.11) mV. The encapsulation efficiency (EE) of DATS in microemulsion was 82.89%, the drug loading (DL) was 6.28%. The solubility in water increased by about 2 367 fold compared with the free DATS. DATS-MEs and free DATS at concentration of 10, 30, and 50 $\mu\text{mol/L}$ all can effectively inhibit the migration and proliferation of LLC cells and B16BL6 cells in a dose-dependent manner. DATS microemulsion was proved to be more effective than free DATS. **Conclusion** After assembly into DATS microemulsion, the stability and solubility in water of DATS was enhanced. The anti-proliferation and anti-migration on mouse Lewis LLC cells and mouse melanoma B16BL6 cells were significantly enhanced.

Key words: diallyl trisulfide; microemulsion; cell proliferation; cell migration; lung cancer; melanoma

收稿日期: 2018-07-09

基金项目: 江苏省自然科学基金青年基金项目资助(BK20171097); 江苏省中医药局科技项目(YB2017033); 江苏省科教强卫医学重点人才项目(ZDRCA2016036)

作者简介: 傅荣萍(1992—), 女, 硕士在读, 中药学专业。Tel: 17625920054 E-mail: 2448172367@qq.com

*通信作者 陈彦, 女, 研究员, 博士生导师, 主要从事中药新型给药系统研究。Tel: (025)52362155 E-mail: ychen202@hotmail.com

刘玉萍, 女, 博士, 助理研究员, 主要从事中药抗肿瘤药理及新药研究。Tel: (025)52362155 E-mail: liu-yuping@hotmail.com

大蒜素二烯丙基三硫醚 (diallyl trisulfide, DATS) 是大蒜中含有的一种有效成分^[1-3]。新鲜的大蒜中, 并没有 DATS, 只有它的前体物质蒜氨酸 (alliin), 蒜氨酸约占大蒜总鲜质量的 0.25%, 以稳定无臭的形式存在于大蒜中, 当大蒜加工或受到物理机械破碎后, 大蒜中的蒜酶 (allinase) 被激活, 催化分解蒜氨酸为 DATS 等^[4-5]。DATS 分子式为 $C_6H_{10}S_3$, 相对分子质量为 178.33。近年来文献研究表明, DATS 对胃癌、结肠癌、肝癌、肺癌等多种肿瘤具有明显的抑制作用^[5-6], DATS 的抗肿瘤作用是多途径、多方面的, 如 DATS 可以特异性阻滞细胞周期, 调节癌基因和抑癌基因的表达, 影响端粒酶活性等途径直接作用于肿瘤细胞, 诱导细胞凋亡; 通过提高机体免疫力, 改善机体耐药性等发挥间接抗肿瘤作用; 通过减少转录因子激活蛋白 1 (AP-1)、转录因子特化蛋白 1 (Sp-1) 和核转录因子- κ B (NF- κ B) 的激活, 下调基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 的表达, 有效抑制肿瘤细胞的转移^[7-14]。与传统抗肿瘤药物相比, DATS 在体内几乎无残留, 毒副作用小已经得到证实, 值得在临床上推广应用^[15]。但由于 DATS 存在易挥发、不稳定、具有较强的刺激性气味以及难溶于水等问题, 限制了其在临床的应用。

微乳 (microemulsion, ME) 是将油相、水相、乳化剂和助乳化剂按适当比例混合, 自发形成的各向同性、透明、热力学稳定的分散体系, 粒径在 10~100 nm。微乳可以提高难溶性药物的溶解度, 促进药物在体内的吸收, 从而达到提高药物疗效的目的^[16-20]。因此本研究在测定 DATS 水中溶解度的基础上, 将 DATS 制备成微乳, 以提高 DATS 的溶解性与稳定性, 本研究将通过对 DATS 微乳 (DATS-MEs) 理化性质的表征, 包封率、载药量的测定, 揭示微乳制剂提高 DATS 的稳定性和水溶解性、降低刺激性气味的可行性; 同时考察 DATS-MEs 对小鼠 Lewis 肺癌 (LLC) 细胞及小鼠黑色素瘤 B16BL6 细胞的增殖抑制作用及迁移能力的影响, 为 DATS-MEs 制剂的研发及其抗肿瘤作用的进一步研究提供实验参考。

1 仪器与材料

1.1 试剂与药物

高糖 DMEM 培养基、胰蛋白酶, 上海源培生物科技股份有限公司; 胎牛血清 (FBS), 以色列 BI 公司; 四甲基偶氮唑盐 (MTT), 江苏凯基生物

技术股份有限公司; 丝裂霉素 C, 美国 Sigma 公司; DATS 对照品, 批号 100384-201403, 质量分数 94%, 供含量测定用, 中国食品药品检定研究院; DATS, 质量分数 98%, 上海菲越医药科技有限公司; 15-羟基硬脂酸聚乙二醇酯 (HS15), 德国 BASF 公司; 聚乙二醇 400 (PEG400), 国药集团化学试剂有限公司; 二甲亚砜 (DMSO), 美国 Sigma 公司; 水为纯净水; 其他试剂均为分析纯。

1.2 细胞

LLC 细胞、B16BL6 细胞, 和园生物有限公司。

1.3 仪器

CO₂ 恒温培养箱, 赛默飞世尔科技有限公司; 洁净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; 倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; HJ-3 控温磁力搅拌器, 江苏金坛市金城国胜实验仪器厂; Nano-ZS 型马尔文粒径测定仪, 英国马尔文公司; Agilent1260 高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司; FA2104 分析电子天平, 上海良平仪器仪表有限公司; JEM-2100 型透射电子显微镜, 日本 JEOL 公司; 全波长酶标仪, 赛默飞世尔仪器有限公司。

2 方法与结果

2.1 HPLC 法测定 DATS 在水中溶解度^[21]

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent SB-C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈-水 (73:27); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25.0 $^{\circ}$ C; 进样量 20 μ L; 检测波长 250 nm, 理论塔板数大于 5 000。

2.1.2 线性关系考察 精密称取 DATS 对照品 12.58 mg, 置于 25 mL 棕色量瓶中, 加甲醇溶解至刻度, 摇匀, 作为储备液。精密量取 DATS 储备液 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 mL 于 25 mL 量瓶中, 甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得到质量浓度分别为 2.01、4.03、10.06、20.13、50.32、100.64 μ g/mL 的系列对照品溶液, 分别取 20 μ L 按色谱条件进样测定。结果在 2.01~100.64 μ g/mL, 峰面积 (A) 与 DATS 质量浓度 (C) 线性关系良好, 回归方程为 $A=11.953 C-1.446 8$, $r=0.999 9$ 。

2.1.3 DATS 在水中的溶解度测定 采用饱和法测定 DATS 的溶解度, 取 DATS 足量, 精密称定, 平行制备 6 份, 加入到含有 1 mL 蒸馏水的试管中, 密封后涡旋震荡 1 min, 再置于 25 $^{\circ}$ C 下振摇 72 h, 然后将混合物于 6 000 r/min 下离心 5 min, 精密吸取上清液 100 μ L, 甲醇稀释 100 倍, HPLC 法检测 DATS 质量浓度, 计算溶解度, 为 $(7.0 \pm 0.5) \mu$ g/mL。

2.2 DATS-MEs 处方研究

2.2.1 伪三元相图的绘制 称取不同组成比例的 HS15 (乳化剂)、PEG400 (助乳化剂) 和 DATS, 于室温下磁力搅拌均匀; 缓慢滴加蒸馏水至形成澄清透明液体, 记录形成微乳时各组分和水的用量。以 HS15 和 PEG400 的混合物作为相图的总表面活性

剂物质顶点 (HS15+PEG400), DATS 作为油相顶点, 水作为水相顶点, 绘制该系统 K_m 值 (乳化剂与助乳化剂的质量比值) 分别为 1:1、2:1、3:1 时的伪三元相图。结果如图 1 所示, $K_m=3:1$ 时微乳区的面积最大, 故选用 $K_m=3:1$ 进行下一步研究。

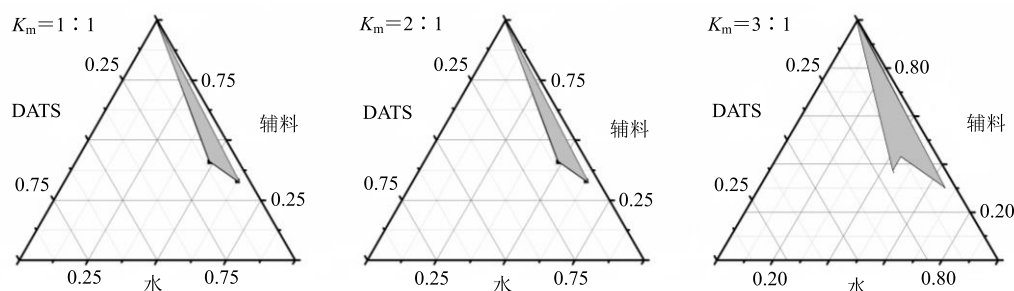


图 1 DATS-MEs 在不同 K_m 值下的伪三元相图

Fig. 1 Ternary phase diagrams of DATS-MEs at different K_m values

2.2.2 处方的确定 选用最佳 K_m 值 ($K_m=3:1$), 设定乳化剂和助乳化剂与 DATS 的质量比值分别为 9:1、8:2、7:3 制备微乳, 结果表明当其比值在 9:1 时, 微乳粒径较小, 用水稀释能无限增溶, 因此, 确定 $K_m=3:1$, 乳化剂和助乳化剂与 DATS 的质量比为 9:1 时为制备微乳的最佳处方。

2.2.3 DATS-MEs 的制备 称取 HS15 675 mg、PEG400 225 mg 和 DATS 100 mg, 磁力搅拌均匀, 搅拌下缓慢滴加纯水至 5 mL, 得到澄清透明的溶液, 即得 DATS-MEs。制得的 DATS-MEs 较稳定, 外观澄清透明, 见图 2-A。同时 DATS 的刺激气味明显减弱。

2.3 DATS-MEs 的表征与质量评价

2.3.1 粒径及粒度分布的研究 取 DATS-MEs 1 mL, 用马尔文激光粒径仪测定微乳的平均粒径、多分散系数 (PDI) 及 Zeta 电位, 结果如图 2-B 所示, 测得的 DATS-MEs 粒径较小, 平均粒径为 (16.72 ± 0.22) nm, 分散均匀, PDI 为 0.03 ± 0.01 , Zeta 电

位为 (-4.98 ± 0.11) mV。

2.3.2 微乳显微形态的观察^[9] 将载有 Formvar 支持膜的铜网置于蜡板上, 在膜上滴加 1 滴微乳液, 红外灯下照射 5 min, 滴加 1 滴 1% 的磷钨酸, 室温下风干 10 min, 置于透射电镜下观察微乳的外观形态, 如图 2-C 所示, DATS-MEs 呈类球形, 外观较为圆整, 分散较均匀。

2.3.3 包封率、载药量及溶解度的测定 包封率及载药量测定: 取 DATS-MEs, 加 25 倍甲醇破乳, $0.22 \mu\text{m}$ 混合滤膜滤过, 根据“2.1”项下方法, HPLC 测定 DATS 含量, 色谱图见图 3, 计算包封率; 取 DATS-MEs 5 mL, 冷冻干燥, 称取干燥后样品 5 mg, 用甲醇定容至 10 mL, 根据“2.1”项下方法, HPLC 测定 DATS 含量, 计算载药量。

包封率 = DATS 测得总量 / 称取的 DATS 总量

载药量 = DATS 测得总量 / 冷冻干燥样品总量

图 3 色谱图显示, 在该色谱条件下, 微乳中辅料对 DATS 的测定无干扰。计算得到 DATS 在微乳

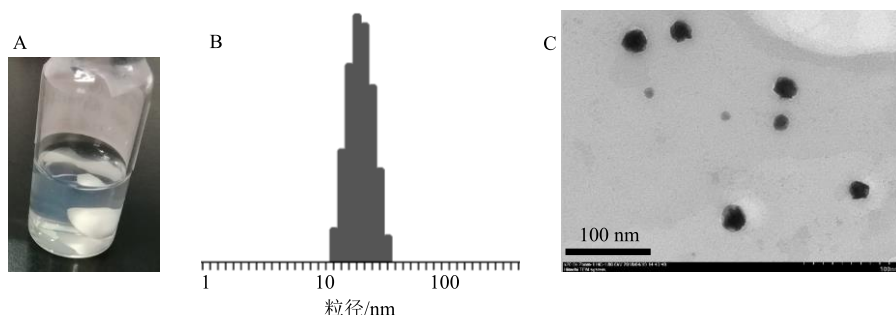


图 2 DATS-MEs 的外观 (A)、粒径 (B) 及显微形态 (C)

Fig. 2 Appearance (A), particle size (B), and microscopic morphology (C) of DATS-MEs

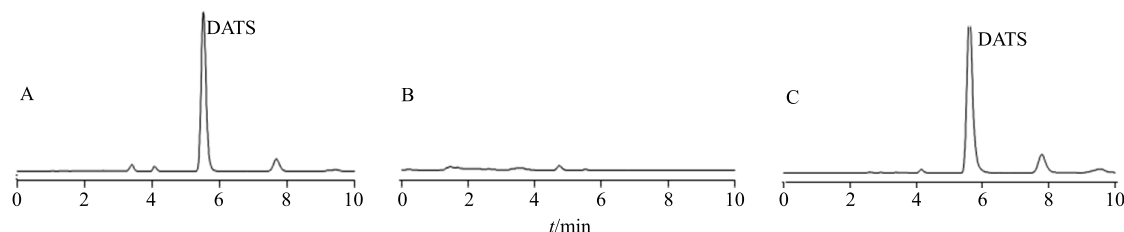


图 3 DATS 对照品 (A)、空白微乳 (B)、含药微乳 (C) 的 HPLC 图谱

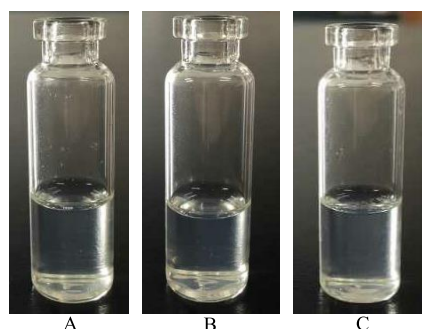
Fig. 3 HPLC chromatograms of DATS reference substance (A), blank microemulsion (B), and DATS-MEs (C)

中的包封率为 82.89%，载药量为 6.28%。根据测得的包封率，可计算出微乳中 DATS 的质量浓度为 16.58 mg/mL，与 DATS 在水中的溶解度 $[(7.0 \pm 0.5) \mu\text{g/mL}]$ 相比，制成微乳后，DATS 在水中的溶解能力提高了近 2 367 倍。

2.3.4 稳定性考察 取 DATS-MEs，在 $6\,700 \times g$ 条件下离心 30 min，微乳仍澄清透明，未产生沉淀，不出现分层、浑浊等现象，按照“2.3.1”项下的方法测量粒径为 $(16.32 \pm 0.05) \text{ nm}$ ，PDI 为 0.03 ± 0.01 ，几乎无变化，见图 4-A。置于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 条件下放置 3 个月，微乳仍澄清透明，未产生沉淀，不出现分层、浑浊等现象，按照“2.3.1”项下的方法测定粒径为 $(16.96 \pm 0.27) \text{ nm}$ ，PDI 为 0.03 ± 0.01 ，几乎无变化，见图 4-B。取 DATS-MEs 与 DATS 裸药，常温下 ($25\text{ }^\circ\text{C}$) 放置 48 h，根据“2.1”项下方法，HPLC 测定两者 DATS 质量浓度，DATS 裸药质量浓度下降为原质量浓度的 68.75%，DATS-MEs 中 DATS 质量浓度下降为原质量浓度的 87.93%，说明其物理稳定性良好，在离心及自然静置较长时间后仍可保持较好的物理稳定性，见图 5，将 DATS 制成微乳，可提高其稳定性。

2.4 DATS-MEs 体外抗肿瘤活性研究^[10]

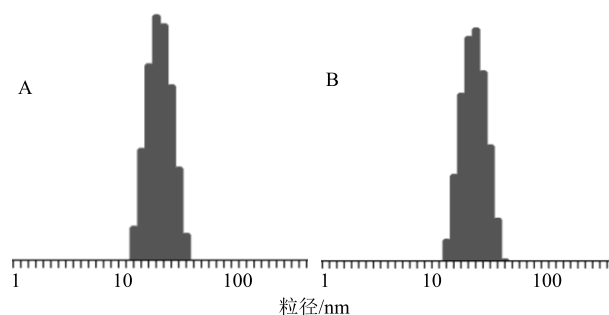
2.4.1 MTT 实验评价 DATS-MEs 对 LLC 细胞及



A-制备完成后 B-离心后 C- $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存 3 个月后
A-after preparation B-after centrifugation C-three months after being stored at $4\text{ }^\circ\text{C}$

图 4 DATS-MEs 的稳定性考察

Fig. 4 Stability of DATS-MEs



A-离心后 B- $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存 3 个月后
A-after centrifugation B-three months after being stored at $4\text{ }^\circ\text{C}$

图 5 DATS-MEs 的稳定性考察粒径图

Fig. 5 Particle size for stability of DATS-MEs

B16BL6 细胞增殖的影响 分别取对数生长期 LLC 细胞及 B16BL6 细胞，加入 DMEM 培养液，调整细胞浓度为 $1 \times 10^4/\text{mL}$ ，接种于 96 孔板，于 $5\% \text{ CO}_2$ 、 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 细胞培养箱中培养，待细胞贴壁后，加药，分别为对照组，等剂量辅料组，DATS 裸药组 (10 、 30 、 $50\text{ }\mu\text{mol/L}$)，DATS-MEs 组 (以含 DATS 10 、 30 、 $50\text{ }\mu\text{mol/L}$ 计)，DATS 裸药先用 DMSO 配成高浓度母液，再用培养基配制成相应给药浓度，以增加 DATS 的溶解度，DATS-MEs 用培养基配制成相应给药浓度，每组设 6 个复孔，给药 24 h 后，更换新鲜培养基，并于每孔加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ 的 MTT 溶液，于 $5\% \text{ CO}_2$ 、 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 细胞培养箱中培养 4 h，弃上清液，每孔加入 DMSO $100\text{ }\mu\text{L}$ ，置于微孔板振荡器避光震荡 10 min，使用酶标仪于 570 nm 处测定各孔吸光度 (A) 值，计算细胞增殖抑制率。

$$\text{增殖抑制率} = 1 - A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

MTT 检测结果如表 1 所示，辅料组的 LLC 及 B16BL6 细胞的存活率在 90% 以上，表明制剂所用的辅料对该 2 种细胞的增殖几乎无影响；DATS-MEs 和 DATS 作用 24 h 后，可以浓度依赖性地抑制 LLC 细胞及 B16BL6 细胞的增殖，与辅料组相比差异均显著 ($P < 0.01$)。同时，DATS-MEs 对肿瘤细胞的增殖抑制能力与 DATS 裸药相比较强，尤其是对于

表 1 DATS 及 DATS-MEs 对 LLC 和 B16BL6 细胞的增殖抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Inhibition rate of proliferation of DATS and DATS-MEs on LLC and B16BL6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

样品	LLC 细胞增殖抑制率/%			B16BL6 细胞增殖抑制率/%		
	10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	30 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
辅料	10.21 $\pm$ 9.89	8.58 $\pm$ 12.34	9.77 $\pm$ 3.98	8.72 $\pm$ 12.59	10.83 $\pm$ 10.34	9.51 $\pm$ 14.98
DATS	29.20 $\pm$ 14.30**	30.64 $\pm$ 10.76**	45.24 $\pm$ 5.27**	23.18 $\pm$ 14.78**	38.44 $\pm$ 9.91**	53.61 $\pm$ 11.44**
DATS-MEs	34.20 $\pm$ 5.65**	42.24 $\pm$ 3.32**	49.99 $\pm$ 4.15**	33.20 $\pm$ 10.59**	50.34 $\pm$ 9.83**	69.76 $\pm$ 4.98**#

与辅料组比较: ** $P < 0.01$; 与 DATS 组比较: # $P < 0.05$

** $P < 0.01$ vs excipient group; # $P < 0.05$ vs DATS group

B16BL6 细胞的增殖, DATS-MEs 在 50 $\mu\text{mol/L}$ 时展现出更好的抑制作用, 且相较于 DATS 裸药 50 $\mu\text{mol/L}$ 显著 ($P < 0.05$), 而其他组别虽未见显著差异, 但抑制率也均有一定程度的提高。

2.4.2 划痕实验考察 DATS-MEs 对 LLC 和 B16BL6 细胞水平迁移能力的影响 LLC 细胞和 B16BL6 细胞均用含 10% FBS、1%青霉素-链霉素双抗的 DMEM 培养液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下的细胞培养箱中培养。接种细胞之前在 12 孔板背面画横线标记。细胞消化后接种于 12 孔板, 待细胞铺满 12 孔板板底, 用 10 $\mu\text{g/mL}$ 的丝裂霉素 C 处理 2 h 后, 在 12 孔板板底垂直于背面横线划痕, 吸去细胞培养

液, 用 PBS 小心冲洗孔板 3 次, 洗去划痕产生的细胞和细胞碎片。分别加入 DMEM 培养液 (对照组), DMEM 培养液和 DATS-MEs 30 $\mu\text{mol/L}$, DMEM 培养液和 DATS 裸药 30 $\mu\text{mol/L}$, DATS 裸药先用 DMSO 配成高浓度母液, 以增加 DATS 的溶解度, DMEM 培养液和空白微乳辅料, 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养, 分别在 0、24 h 时观察划痕并拍照, 采用 Olympus Cell Sens Standard1.18 软件测量划痕面积, 计算迁移面积及迁移抑制率。

结果显示 (图 6 和表 2), 划痕 24 h 后, LLC 细胞和 B16BL6 细胞发生迁移行为, 给药 24 h 后, 辅料组细胞的迁移几乎不受影响, 而 30 $\mu\text{mol/L}$ 的

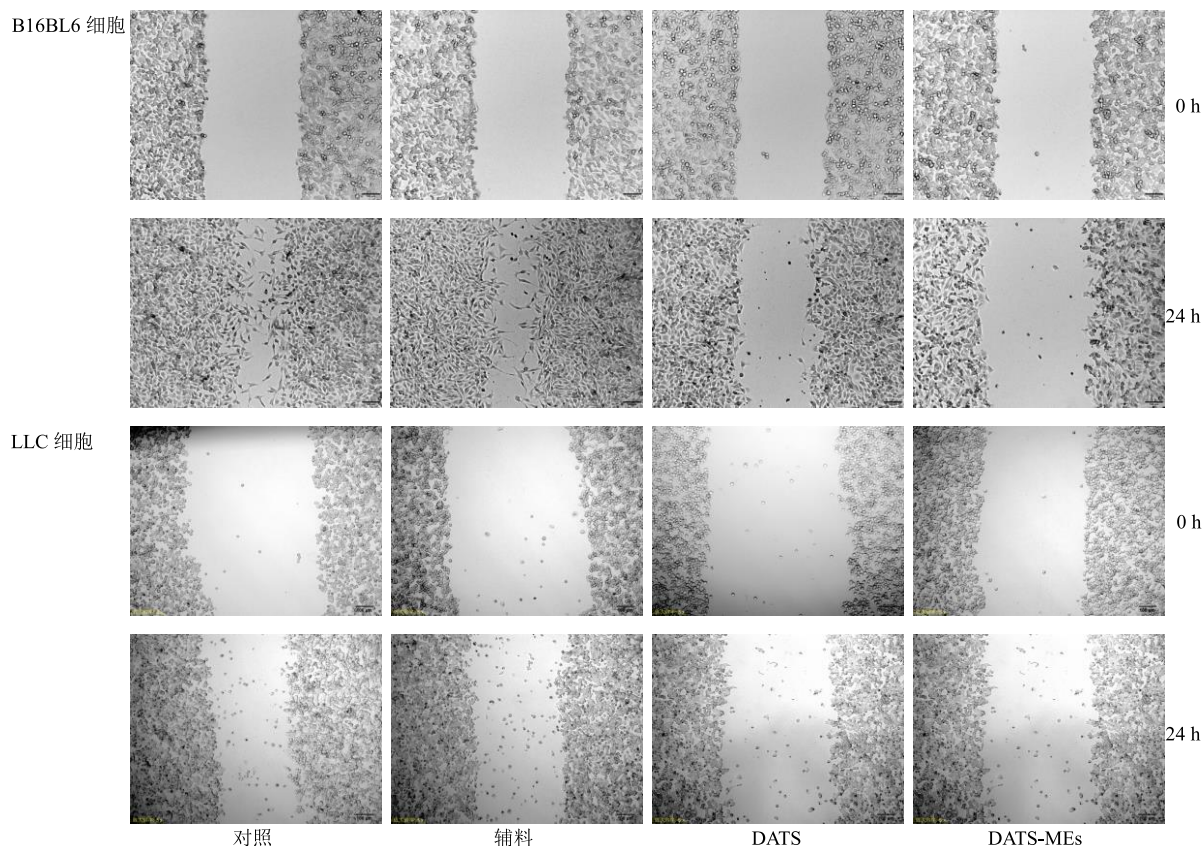


图 6 B16BL6 细胞及 LLC 细胞水平迁移情况

Fig. 6 Lateral migration of B16BL6 cells and LLC cells

表2 DATS及DATS-MEs对B16BL6及LLC细胞的迁移抑制率($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 2 Inhibition rate of DATS and DATS-MEs on migration of B16BL6 and LLC cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	迁移抑制率/%	
	B16BL6	LLC
辅料	14.54±13.21	7.49±11.29
DATS 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	60.21±10.29**	38.99±15.12*
DATS-MEs 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	99.99±8.96***	78.82±9.23***

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与DATS组比较: ** $P<0.01$ * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; *** $P<0.01$ vs DATS group

DATS-MEs组和30 $\mu\text{mol/L}$ 的DATS裸药组都能显著抑制2种细胞的水平迁移能力($P<0.05$),其中,DATS-MEs组与DATS裸药组相比,具有更强的抑制效果,对于B16BL6细胞的迁移抑制率高达99.99%,几乎完全抑制B16BL6细胞的水平迁移($P<0.01$)。表明将DATS制备成微乳,可明显提高其抗肿瘤细胞迁移能力。

$$\text{迁移面积} = 0\text{ h 划痕面积} - 24\text{ h 划痕面积}$$

$$\text{迁移抑制率} = 1 - 24\text{ h 给药组迁移面积} / 24\text{ h 对照组迁移面积}$$

3 讨论

DATS具有良好的抗肿瘤活性,但由于其存在难溶于水、不稳定、有刺激性气味等问题,使其无法在临床上得到良好的应用,本研究使用微乳载药系统包载DATS,通过水包油的方法,以HS15、PEG400为辅料,将DATS制成水包油微乳,提高DATS的水溶性及稳定性,降低其刺激性,并提高其对肿瘤细胞的抗增殖及转移的能力。

对于DATS理化性质的改善,已有研究采用表面活性剂聚山梨酯-80对DATS进行增溶,如大蒜素注射液,提高了DATS水溶性,但由于聚山梨酯-80的溶血副反应时有发生,因而被禁用或限用;也有研究采用 β -环糊精包合技术将DATS与外部环境物理阻隔,以提高挥发油的物理稳定性^[22-24],减轻药物的刺激性气味,然而研究发现该方法需加入大量的 β -环糊精,较难被胃酸和 α -淀粉酶溶解,几乎不参与生物体内代谢,以完整形式由肾脏排出,有加重肾脏负担的风险,因此亦受到限制。

笔者所在课题组经多年来的探索和研究建立了微乳纳米载药系统,用于增溶多种难溶性中药活性成分,提高了其疗效,降低了其毒副作用^[25-28]。本研究中,采用DATS自身作为油相代替了常规的油

相辅料,既减少了辅料的用量,又增加了DATS的溶解性,在一定程度上体现了制剂“药辅合一”的思想;采用增溶能力强,毒性低的新型辅料HS15作为辅料,HS15的溶血活性低于聚山梨酯80,血清组胺释放水平和引起生物过敏的可能性远低于后者^[29],且HS15本身黏度低,生物相容性好,大大降低了给药刺激性,可用于乳剂的静脉给药,其30%溶液可实现无痛给药。所制备的DATS微乳,溶解度提高了2 367倍,生物相容性好,能够有效解决DATS难溶于水、易挥发、不稳定等理化性质缺陷,有望将DATS研发成新药而更好地应用于临床^[29]。

肿瘤细胞的恶性生物学行为决定了肿瘤的恶性程度,肿瘤细胞无限制的增殖以及肿瘤细胞获得迁移侵袭的表型是肿瘤十大特征中的2个重要特征。本实验通过MTT实验考察DATS-MEs的抗肿瘤细胞增殖能力,结果显示DATS-MEs及裸药均能有效抑制肿瘤细胞增殖,DATS-MEs在敏感性更高的B16BL6细胞模型上的高浓度组体现出更好的疗效,分析可能的原因之一是DATS裸药给药采用DMSO作为增溶剂,对DATS也具有一定的增溶作用;通过划痕实验评价DATS-MEs的抗肿瘤细胞迁移能力,结果发现DATS制成微乳后大大提高了DATS抑制肿瘤细胞迁移的作用,说明将DATS制成微乳制剂可以有效提高DATS抗肿瘤转移的潜能。本课题组已初步证实采用微乳制剂能够较好地提高DATS的抗肿瘤细胞增殖及迁移的活性,但是体内活性的评价还需进一步研究。

参考文献

- [1] Kim S, Lee H G, Park S A, *et al.* Keap1 cysteine 288 as a potential target for diallyl trisulfide-induced Nrf2 activation [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85984.
- [2] 董 华, 张书宇, 李月玲. 大蒜素胶囊联合康复新液治疗复发性口腔溃疡的临床研究 [J]. *现代药物与临床*, 2017, 32(6): 1109-1113.
- [3] 王卓为, 钱海燕. 大蒜素软胶囊联合碘甘油治疗复发性口腔溃疡的临床研究 [J]. *现代药物与临床*, 2018, 33(2): 330-333.
- [4] Charron C S, Dawson H D, Novotny J A. Garlic influences gene expression *in vivo* and *in vitro* [J]. *J Nutr*, 2016, 146(2): 444S-449S.
- [5] Puccinelli M T, Stan S D. Dietary bioactive diallyl trisulfide in cancer prevention and treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(8): 1645-1663.
- [6] Shin S S, Song J H, Hwang B, *et al.* Angiopoietin-like

- protein 4 potentiates DATS-induced inhibition of proliferation, migration, and invasion of bladder cancer EJ cells; involvement of G₂/M-phase cell cycle arrest, signaling pathways, and transcription factors-mediated MMP-9 expression [J]. *Food Nutr Res*, 2017, 61(1): 1338918.
- [7] Yang H B, Liu H M, Yan J C, *et al.* Effect of diallyl trisulfide on ischemic tissue injury and revascularization in a diabetic mouse model [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2018, 71(6): 367-374.
- [8] 郭梦斐, 瞿 鼎, 王理想, 等. 转铁蛋白/叶酸双重修饰的薏苡仁油-雷公藤红素微乳制备及其体外靶向抗肿瘤研究 [J]. 中草药, 2017, 48(9): 1748-1756.
- [9] 李小江, 张 莹, 杨佩颖, 等. 消岩汤对肺癌 A549 细胞及肺癌干细胞迁移及侵袭的影响 [J]. 中草药, 2018, 49(4): 870-873.
- [10] 胡 铭, 李明强. 大蒜素药理作用及药用制剂研究进展 [J]. 现代医药卫生, 2017, 33(18): 2799-2802.
- [11] Li X, Meng Y, Xie C, *et al.* Diallyl trisulfide inhibits breast cancer stem cells via suppression of Wnt/ β -catenin pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(5): 4134-4141.
- [12] Wen S Y, Tsai C Y, Pai P Y, *et al.* Diallyl trisulfide suppresses doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis by inhibiting MAPK/NF- κ B signaling through attenuation of ROS generation [J]. *Environ Toxicol*, 2018, 33(1): 93-103.
- [13] Jurkowska H, Wróbel M, Kaczor-Kamińska M, *et al.* A possible mechanism of inhibition of U87MG and SH-SY5Y cancer cell proliferation by diallyl trisulfide and other aspects of its activity [J]. *Amino Acids*, 2017, 49(11): 1855-1866.
- [14] Choi Y H. Diallyl trisulfide induces apoptosis and mitotic arrest in AGS human gastric carcinoma cells through reactive oxygen species-mediated activation of AMP-activated protein kinase [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 94: 63-71.
- [15] Gonzalez-Beltran A N, Campbell J, Dunn P, *et al.* Data discovery with DATS: Exemplar adoptions and lessons learned [J]. *J Am Med Inform Assoc*, 2018, 25(1): 13-16.
- [16] Zhang F, Zhang Y, Wang K, *et al.* Protective effect of diallyl trisulfide against naphthalene-induced oxidative stress and inflammatory damage in mice [J]. *Int J Immunopathol Ph*, 2016, 29(2): 205-216.
- [17] 江敏瑜, 闫 丹, 陈 娇, 等. 蛇床子素发泡微乳剂制备研究 [J]. 中草药, 2018, 49(7): 1562-1568.
- [18] 轩肖玉, 王亚静, 张伟玲, 等. 芒果苷自微乳给药系统的制备及其大鼠体内药动学研究 [J]. 药物评价研究, 2013, 36(3): 166-170.
- [19] 肖 瑶, 苏文晶, 张明珠, 等. 番荔枝亚微乳的制备及其抗肿瘤作用研究 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(9): 1325-1330.
- [20] 吴军勇, 李泳江, 胡雄彬, 等. 葛根素与磷脂复合后对葛根素微乳经淋巴转运的影响 [J]. 中草药, 2018, 49(12): 2914-2918.
- [21] Liu Y, Zhu P, Wang Y, *et al.* Antimetastatic therapies of the polysulfide diallyl trisulfide against triple-negative breast cancer (TNBC) via suppressing MMP2/9 by blocking NF- κ B and ERK/MAPK signaling pathways [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0123781.
- [22] Zhang Y, Xie W P, Zhang Y K, *et al.* Experimental study of inhibitory effects of diallyl trisulfide on the growth of human osteosarcoma Saos-2 cells by downregulating expression of glucose-regulated protein 78 [J]. *Oncotargets Ther*, 2018, 11: 271-277.
- [23] 宋洪涛, 郭 涛, 张跃新, 等. 2-羟丙基- β -环糊精对大蒜油溶解度及稳定性的影响 [J]. 中草药, 2006, 37(2): 199-202.
- [24] Horn N, Miller G, Ajuwon K M, *et al.* Garlic diallyl disulfide and diallyl trisulfide mitigates effects of pro-oxidant induced cellular stress and has immune modulatory function in LPS-stimulated porcine epithelial cells [J]. *J Anim Sci*, 2017, 95(9): 4045-4051.
- [25] Qu D, Wang L X, Liu M, *et al.* Correction to oral nanomedicine based on multicomponent microemulsions for drug-resistant breast cancer treatment [J]. *Biomacromolecules*, 2018, 19(3): 1268-1280.
- [26] Qu D, Liu M, Huang M, *et al.* Octanoyl galactose ester-modified microemulsion system self-assembled by coix seed components to enhance tumor targeting and hepatoma therapy [J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12: 2045-2059.
- [27] Qi X, Qin J, Ma N, *et al.* Solid self-microemulsifying dispersible tablets of celastrol: Formulation development, characterization and bioavailability evaluation [J]. *Int J Pharm*, 2014, 472(1/2): 40-47.
- [28] Lu H, Li J, Li M, *et al.* Systemic delivery of alpha-asarone with Kolliphor HS 15 improves its safety and therapeutic effect on asthma [J]. *Drug Deliv*, 2015, 22(3): 266-275.
- [29] 张 蕾, 瞿 鹏, 高 洁, 等. 非离子型表面活性剂 HS 15 在药剂中的研究进展 [J]. 药学进展, 2015, 39(5): 370-375.