

- CYP2E1, CYP1A2 probe drugs in human and rats [D]. Zhengzhou University, 2013.
- [16] 吕秋军. 新药药理学研究方法[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 685.
- [17] CHO Y Y, JEONG H U, KIM J H, et al. Effect of honokiol on the induction of drug-metabolizing enzymes in human hepatocytes [J]. *Drug Des Dev Ther*, 2014, 8(8): 2137-2145.
- [18] PINTO N, DOLAN M E. Clinically relevant genetic variations in drug metabolizing enzymes [J]. *Curr Drug Metab*, 2011, 12(5): 487-497.
- [19] PARMENTIER Y, BOSSANT M J, BERTRAND M, et al. *In vitro* studies of drug metabolism [M].//TESTA B, VAN DE WATERBEEMD H. *Comprehensive Medicinal Chemistry II -ADME-Tox Approaches*. Beijing: Science Press, 2007: 246.
- [20] SHARDLOW C E, GENERAUX G T, MACLAUCHLIN C C, et al. Utilizing drug-drug interaction prediction tools during drug development: enhanced decision making based on clinical risk [J]. *Drug Metab Dispos*, 2011, 39(11): 2076-2084.
- [21] YUAN C, LIANG A J, ZENG L, et al. Pharmacokinetics profile of magnolol and honokiol in Wistar rats [J]. *Pharm J Chin PLA(解放军药理学学报)*, 2003, 19(4): 258-261.

收稿日期: 2015-11-03

## 聚丁二炔生物传感器变色免疫法检测乳腺癌 MCF-7 细胞

范彩霞<sup>1</sup>, 徐新<sup>2\*</sup>, 陈志喜<sup>2</sup>, 肖旺钊<sup>3</sup>, 纪孝峰<sup>4</sup>(1.汕头大学医学院, 广东 汕头 515041; 2.汕头大学医学院附属粤北人民医院, 广东 韶关 512024; 3.三明学院资源与化工学院, 福建 三明 365004; 4.三明市第一医院普外科, 福建 三明 365004)

**摘要:** 目的 合成能特异性识别肿瘤细胞的聚丁二炔生物传感器。方法 超声乳化-共价修饰法制备聚丁二炔/磷脂 (polydiacetylene/Phospholipid, PDA/PC) 纳米囊泡, 通过共价修饰法将鼠抗人细胞角蛋白抗体 CK19 共价修饰固定在 PDA/PC 纳米囊泡表面, 制备可变色的 PDA/PC 生物传感器, 用于检测肿瘤细胞。透射电镜负染技术, 激光散射粒径测定仪、紫外-可见分光光度计扫描, 计算比色响应(colorimetric response, CR)等对合成的 PC/PDA 生物传感器进行表征, 以乳腺癌细胞株 MCF-7 为模型, 模拟考察 PDA/PC 生物传感器识别鉴定外周血循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTCs) 可行性。结果 TEM 检查结果显示制备的 PDA/PC 生物传感器呈球形或类球形、粒径均匀, 平均粒径约为 (223.4±23.6)nm; 激光散射粒径分析仪显示生物传感器的强均粒径和分散系数为 298.4 nm 和 0.184; 特异性抗原加入后, 纳米粒发生团聚, 颜色出现由蓝至红的变化, 且 CR 值随着抗原浓度增加而增加, 与高表达的乳腺癌细胞 MCF-7 发生特异性结合, 充分混匀后, 溶液颜色产生由蓝至红的变化。结论 成功合成由单克隆抗体抗 CK19 修饰的 PDA/PC 生物传感器, 通过免疫化学显色技术, 可快速、有效、灵敏的检测溶液中微量乳腺癌 MCF-7 细胞, 为 PDA/PC 生物传感器技术在 CTC 识别上的应用奠定基础。

**关键词:** 聚丁二炔生物; 变色免疫分析; 合成; 表征; 乳腺癌 MCF-7 细胞

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2016)07-0875-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.07.010

### Detection of MCF-7 Breast Cancer Cell Line Based on Polydiacetylene Chromatic Immunoassay

FAN Caixia<sup>1</sup>, XU Xin<sup>2\*</sup>, CHEN Zhixi<sup>2</sup>, XIAO Wangchuan<sup>3</sup>, JI Xiaofeng<sup>4</sup>(1.Shantou University Medical College, Shantou 515041, China; 2.Affiliated Yuebei People's Hospital, Shantou University Medical College, Shaoguan 512026, China; 3.College of Resource and Chemical Engineering, Sanming University, Sanming 365004, China; 4.Department of General Surgery, Sanming First Hospital, Sanming 365001, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To synthesize PDA/PC biosensor capable of specific recognition of cancer cells by immunoassay. **METHODS** Polydiacetylene/phospholipids (PDA/PC) nanoparticle vesicles were prepared by sonication and subsequent EDC/NHS coupling. Anti-Cytokeratin19 monoclonal antibody was covalent linked to PDA/PC nanoparticle vesicle to fabricate a polydiacetylene (PDA)-based colorimetric biosensor for detecting tumor cells. Physicochemical property were characterized by transmission electron microscope negatively staining technique, laser scattering particle size analyzer and UV-Vis spectrophotometer. Colorimetric response CR changing with the amount of CK19 antigen were determined to assess their color change sensitivity. Breast tumour cell line MCF-7 was chosen as a model to evaluate the biosensor to determine the tumor cell

**基金项目:** 福建省卫生教育联合攻关计划项目(WKJ-FJ-36); 韶关市医药卫生项目(Y13158); 韶关市科学计划项目(卫)(2013-CX/K191); 汕头大学医学院博士后基金资助项目

**作者简介:** 范彩霞, 女, 博士, 副主任药师 Tel: (0751)6913465 E-mail: mydream0509@qq.com \*通信作者: 徐新, 男, 博士, 教授, 主任医师, 硕导 Tel: (0751)6913202 E-mail: 03xuxin@163.com

with CK19 expressed. **RESULTS** The PDA/PC biosensors were round or oval with uniform particle size of  $(223.4 \pm 23.6)$  nm measured by TEM. Size by intensity of 298.4 nm and polydispersity index(PDI) of 0.184 were also determined by Malvern Zetasizer 3000HS. The PC/PDA biosensor was agglomerated with the addition of the human CK19 and CR increased with the rising of the concentration of monoclonal antibody solution. Also, the color of the solution was turned from blue to red. **CONCLUSION** The PDA/PC biosensor has been successfully fabricated for detection of cancer cell based on the chromatic immunoassay with the naked eye-discernible color change. This method is simple, rapid and sensitive and can be a potential technique for CTC recognition by PDA/PC biosensor.

**KEY WORDS:** polydiacetylene/phospholipids; chromatic immunoassay; synthesize; characterize; breast tumor MCF-7 cell line

肿瘤转移理论认为外周血循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTC)的出现是发生远处转移的前提和基础<sup>[1-2]</sup>。大量研究证实,检测肿瘤患者外周血 CTC 在乳腺癌早期诊断、疾病进展和预后判断、疗效实时监测以及作为治疗靶点对控制肿瘤转移等方面均具有重要临床意义<sup>[2-4]</sup>。基于抗原抗体反应检测方法的免疫细胞化学技术(immunocytochemistry, ICC)利用单克隆抗体与特异性肿瘤标志物结合,经酶和底物显色反应来判断肿瘤细胞的存在。其常用的肿瘤标志物有细胞角蛋白(cytokeratin, CK)、人表皮生长因子受体、上皮膜抗原(epithelial membrane antigen, EMA)等。因为 ICC 法具有简单、直观等特点,目前仍然是评价 CTC 识别的金标准<sup>[4]</sup>,将免疫磁性分离技术结合 ICC 法,可使 CTC 的检测灵敏度提高 103~104 倍,是目前 CTC 检测的主要手段<sup>[5]</sup>。但是该检测方法需要配备相对昂贵的设备,且技术要求较高,不利于在基层医院普及。本项目拟将免疫磁性分离富集技术(在另篇论文中报道)与 PC/PDA 生物传感器显色技术有机结合,探索一种灵敏、高效、经济、操作简便,适合临床推广应用的新 CTC 检测方法。

聚丁二炔纳米生物传感器包括聚丁二炔纳米微囊(信号传导装置)和结合生物分子(糖脂、糖蛋白、酶类、受体和抗体等生物分子)两部分,其中聚丁二炔纳米微囊具有随所处环境温度、溶剂、pH、机械应力及抗原-抗体反应而产生独特的蓝-红颜色变化的特性,在工农业环境、生物分析及病原微生物检测中应用广泛<sup>[7]</sup>。其比色响应值(colorimetric response, CR)与聚丁二炔单体类型及脂质量相关。文献报导天然脂质如 1,2-二豆蔻酰基-sn-丙三基-3-磷脂酸(1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, DMPC)加入 TCDA 单体,制备 PC/PDA 生物传感器可以增加 PDA 生物传感器 CR,响应灵敏度提高且响应时间显著缩短<sup>[8]</sup>。目前聚丁二炔生物传感器广泛用于脂质酶、细菌

多肽、离子、抗体、病毒、药物活性成分筛选等以及病原微生物诊断<sup>[8]</sup>,肿瘤特异性抗原诊断也有报道<sup>[9]</sup>。迄今为止,尚未见聚丁二炔生物传感器用于肿瘤细胞的检测、鉴定的报道。

本实验中采用超声乳化技术合成 PDA/PC 生物传感器并对其理化性质、变色灵敏度进行评价后,以乳腺癌 MCF-7 细胞株为模型,模拟考察 PDA/PC 生物传感器检测肿瘤细胞的可行性,建立一种快速、灵敏、高效且易于推广的肿瘤细胞检测的新方法。从而为 PDA/PC 生物传感器检测 CTC 奠定基础。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Scientz-IIID 超声细胞粉碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司); CHH-8 恒温水浴锅(金坛市晶玻实验仪器厂); Bio-II-A/M 生物安全柜(西班牙泰式达); IX73 倒置显微镜(日本奥林巴斯); LYUV07-II 紫外分析仪(上海兰仪实业有限公司); Thermo Scientific Series 8000 直热式 CO<sub>2</sub> 培养(Thermo Electron Corporation 热电公司); SRC20BA 型低速冷冻离心机(日立); TDL-5LM 台式冷冻离心机(湖南星科科学仪器有限公司); MDF-U72V-86 °C 超低温冰箱(日本三洋公司); YDS-10 液氮灌(东亚液氮生物容器有限公司); UV-3600 型紫外可见分光光度计(日本岛津公司); JEM-2100 型透射电镜(日本电子株式会社); Malvern-3000HS 激光散射粒度分析和电位测定仪(英国 Malvern 公司); DZF-6020 真空干燥箱(上海双旭电子有限公司)。

### 1.2 试剂和细胞株

10,12 二十五碳二炔酸(10,12-pentacosadiynoic acid, PCDA)、DMPC、N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS)和 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 [1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, hydrochloride, EDC·HCl]均购于美国 Sigma-Aldrich 公司;氯仿(色谱纯,广东省化学试剂有限公司);小鼠抗人细胞

角蛋白 19 单克隆抗体(Abcam 公司); 人角蛋白 CK19(Abcam 公司); RPMI1640 基础培养液(Hyclone 有限公司); 胎牛血清(杭州四季青生物有限公司); 乳腺癌 MCF-7 细胞株由中国科学院上海药物研究所黄永焯博士馈赠。

## 2 方法

### 2.1 PDA/PC 纳米囊泡的制备

将 PCDA 单体、DMPC 分别溶于氯仿溶液中, 配成  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的储备液, 将 PCDA 单体和 DMPC 的氯仿储备液以体积比 4:1 加入包有锡箔纸的棕色瓶中, 氮气流吹干, 于瓶底形成白色脂膜, 真空干燥 2 h 除去残余溶剂, 加入相同体积的双蒸水(电阻率  $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ )使类脂总浓度为  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 避光,  $72 \sim 75 \text{ }^\circ\text{C}$  超声乳化 15 min 直至溶液呈透明状, 于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱过夜, 使囊泡封闭。在 254 nm 紫外线照射激发 PDA/PC 单体聚合形成蓝色的 PDA/PC 纳米囊泡, 储存于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  备用。

### 2.2 碳化二亚胺法抗 CK19 单克隆抗体修饰组装 PDA/PC 纳米生物传感器

取  $100 \mu\text{L}$  PDA/PC 囊泡( $1 \text{ mmol}$ )溶液, 恢复至室温, 加入  $12.5 \mu\text{L}$   $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NHS 和  $12.5 \mu\text{L}$   $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 EDC 溶液, 混匀, 于气浴恒温振荡器中, 在室温下 2 h 活化羧基, 超滤离心分离浓缩。将活化的纳米微囊加入抗 CK19 单克隆抗体磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)溶液中, 室温下搅拌过夜, 单克隆抗体通过酰胺键共价结合至囊泡, 完成囊泡表面修饰, 组装 PC/PDA 纳米生物传感器。超滤离心/混悬洗涤 3 次, 除去未反应的抗体。最后加入牛血清白蛋白( $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) DPBS 洗涤 2 次, 封闭囊泡表面未被结合的活性基团, 以避免在应用过程中纳米囊泡与无关物质发生非特异性结合。

### 2.3 PDA/PC 生物传感器的理化性质表征

**2.3.1 免疫比色分析** 将一系列不同浓度的细胞角蛋白 CK19 PBS 溶液注入呈蓝色的 PC/PDA 纳米生物传感器溶液中, 室温下孵育 2 h, 肉眼观察其颜色变化并用紫外-可见分光光度计扫描。测试孵育前后可见光吸收光谱, 同时检测变色前后在 650, 540 nm 的吸收度值, 并计算 CR, 公式:  $\text{CR}(\%) = \frac{(\text{Pb}_0 - \text{Pb}_f)}{\text{Pb}_0} \times 100\%$ , 其中  $\text{Pb} = \frac{A_{650}}{A_{650} + A_{540}}$ ,  $A$  是蓝色 PDA/PC 组分在 650 nm 左右的吸收强度或红色 PDA/PC 组分在 550 nm 左右的吸收强度,  $\text{Pb}_0$  是加入待测物质前 PDA/PC 对红波吸收

所占的百分数,  $\text{Pb}_f$  是加入待测物质后 PC/PDA 对红波吸收所占的百分比。CR 值越大表明囊泡溶液的颜色越红。考察 CK19 抗原的浓度对 CR 的影响, 描绘细胞悬液浓度-CR 曲线, 观察该生物传感器的灵敏度。

**2.3.2 透射电镜检查** 分别取 CK19 抗原孵化前后的 PC/PDA 生物传感器, 稀释至适当浓度, 滴于碳膜包裹的铜网上, 2% 乙酸双氧铀水溶液负染, 透射电镜下负染观察 PC/PDA 生物传感器与 CK19 抗原结合前后形态的变化情况。

**2.3.3 流体粒径测定** 样品稀释相同倍数后, Malvern-3000HS 激光散射粒度分析检测聚丁二炔纳米粒与鼠抗人单克隆抗体发生特异性结合后粒径及粒径分布情况。

**2.3.4 紫外-可见分光光度计扫描** 紫外-可见分光光度计在 400~700 nm 内扫描, 比较加入抗原不同变色阶段 PDA/PC 生物传感器溶液吸收峰的变化。

### 2.4 聚丁二炔生物传感器检测 MCF-7 细胞

**2.4.1 MCF-7 细胞的传代培养** MCF-7 细胞培养于含 10% 胎牛血清,  $100 \text{ kU} \cdot \text{L}^{-1}$  青霉素和  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  链霉素的 DMEM 培养基中,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ , 饱和湿度细胞培养箱培养, 2 d 换液 1 次, 取对数生长期细胞用于实验。

**2.4.2 PDA/PC 生物传感器检测 MCF-7 肿瘤细胞** 取对数生长期的人乳腺癌细胞 MCF-7, 用 0.25% 胰酶 EDTA 溶液消化后, 离心, 用 pH 7.4 磷酸盐缓冲液(PBS)稀释后, 计数, 倍比稀释制成 MCF-7 1, 5,  $10 \cdot \text{mL}^{-1}$  的细胞悬液, 并取不含 MCF-7 细胞的 PBS 作为空白对照, 分别取 1 mL 上述 MCF-7 细胞悬液和空白对照加入 PDA/PC 生物传感器溶液中, 充分混匀后, 在冰浴下孵育 1 h, 肉眼观察溶液颜色变化。

## 3 结果

### 3.1 透射电镜

PC/PDA 纳米囊泡与抗 CK19 单克隆抗体修饰的 PC/PDA 生物传感器的透射电镜图见图 1, 可见 PC/PDA 纳米囊泡呈圆形、椭圆形或不规则形, 粒径约  $(123.4 \pm 11.5) \text{ nm}$ , 而 PC/PDA 生物传感器形态也为圆形、椭圆形和不规则形, 粒径较 PC/PDA 纳米囊泡的粒径明显增大, 约  $(223.4 \pm 23.6) \text{ nm}$ , 与特异性 CK19 抗原结合后, 生物传感器产生团聚, 形成不规则团聚体, 每个团聚体由不同数量的生物传感器聚集而成。结果见图 1。

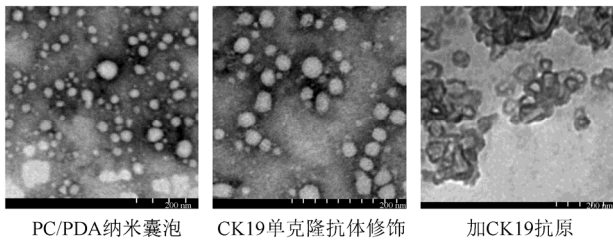


图 1 PC/PDA 纳米囊泡、抗-CK19 单克隆抗体修饰 PC/PDA 纳米生物传感器及 PC/PDA 纳米生物传感器溶液中加入 CK19 抗原后变色溶液的透色电镜图

Fig. 1 TEM images of PC/PDA nanoparticles vesicle, PC/PDA nanoparticle biosensor decorated by monoclonal anti-CK19 antibody and PC/PDA biosensor was interacted with CK-19 antigen

### 3.2 流体粒径测定结果

Malvern-3000HS 激光散射粒径分析仪测定, PC/PDA 纳米囊泡与抗 CK19 抗体修饰的 PC/PDA 生物传感器的强均粒径和分散系数分别为 145.5 nm、0.143 及 298.4 nm、0.184, 具体见图 2。

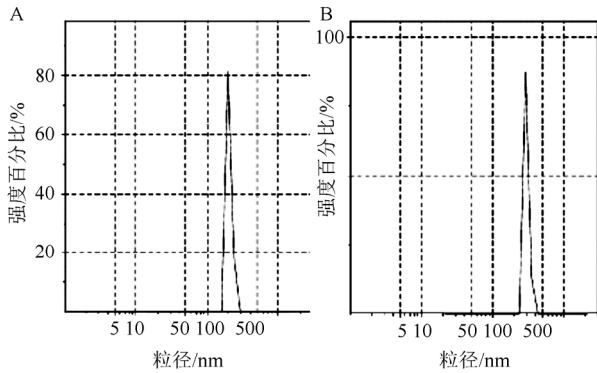


图 2 PC/PDA 纳米粒囊泡和抗 CK19 单克隆抗体修饰 PC/PDA 生物传感器的强均粒径分布图

A-PC/PDA 纳米粒囊泡; B-抗 CK19 单克隆抗体修饰。

Fig. 2 The intensity particle size distributions of PC/PDA nanoparticle vesicles and PC/PDA nanoparticle biosensor decorated by monoclonal anti-CK19 antibody

A-PC/PDA nanoparticle vesicles; B-decorated by monoclonal anti-CK19 antibody.

### 3.3 聚丁二炔生物传感器的颜色变化及紫外-可见分光光度扫描

聚丁二炔生物传感器与人角蛋白反应前后吸收峰的变化见图 3。加入 CK19 抗原前, 在 650.0 nm 处有出现最大吸收峰, 593.5 nm 处有 1 个肩峰, 在 459.5 nm 处出现 1 个峰谷; 加入人 CK19 后, 随着溶液颜色由“蓝”变“紫”吸收峰“蓝移”, 在 650.4 nm 和 549.5 nm 波长处出现吸收峰, 吸收峰吸收度减弱, 在 478.5 nm 的波长处出现 1 个吸收峰; 随着抗原浓度的继续增加, 溶液颜色变

“红”, 在 641.7 nm 处出现 1 个肩峰, 吸收峰减弱, 在 551.9 nm 和 505.7 nm 分别出现 2 个吸收峰, 吸收峰增强, 在短波长处溶液吸收度进一步增大。以上表明聚丁二炔纳米粒的吸收光谱产生了“蓝移”, 宏观上表现为溶液颜色由蓝向“紫”到“红”的转变。

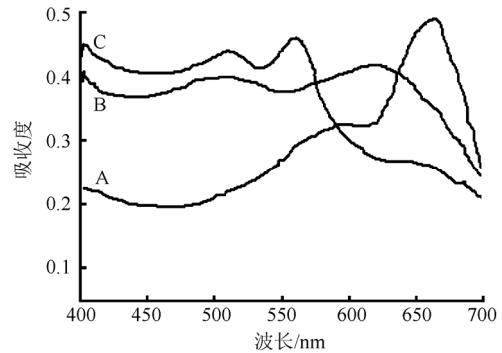


图 3 加入 CK19 前后聚丁二炔生物传感器的紫外-可见扫描图谱

A-未加 CK19; B, C-加入 CK19 后, 吸收峰“蓝移”。

Fig. 3 UV-visible absorption spectra of polydiacetylene biosensor nanoparticles caused by human CK19 solution

A-without human CK19; B, C-after adding CK19, the absorption peak blue shifted.

### 3.4 聚丁二炔生物传感器溶液的颜色变化

随着溶液中 CK19 抗原浓度的增加, CR 逐渐增加, 结果见图 4。当加入抗原浓度达到  $2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , CR 为 20.2, 溶液的颜色产生肉眼可辨的颜色变化。PDA/PC 生物传感器与 MCF-7 细胞悬液孵育后, 随着细胞浓度的增加, PDA/PC 溶液的颜色逐渐产生由蓝、浅紫色、紫色和红色的颜色变化。

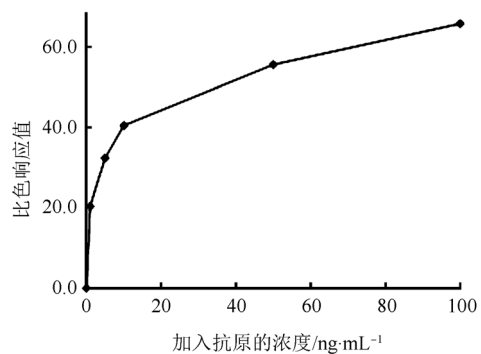


图 4 PDA/PC 生物传感器 CR 随加入不同 CK19 浓度的变化

Fig. 4 The relationship between the CR of PDA/PC biosensor with the concentration of CK19

## 4 讨论

聚丁二炔纳米粒的颜色由蓝色变成红色的根本原因在于共轭骨架长度缩短和聚丁二炔骨架键

角的变化,当外界环境改变时,聚丁二炔生物传感器可以产生肉眼可见的颜色变化。利用该特点,聚丁二炔生物传感器可以作为一种有用的工具用于检测目标蛋白,由图4中可见,随着CK19抗原浓度的增加,CR值呈相应的增加,当抗原浓度达到 $2\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,CR达到20.2,溶液呈浅紫色,根据文献报道,蓝色( $0\leq\text{CR}<10$ );紫色( $10\leq\text{CR}<30$ );粉色( $30\leq\text{CR}<60$ );红色( $\text{CR}\geq 60$ ),这与文献报道一致<sup>[6]</sup>。另据文献报道,加入非极性的脂类可以提高聚丁二炔纳米粒的灵敏度,如加入脂质体如20%~30% DMPC可以通过降低PDA骨架的刚性,显著提高PDA的颜色变化,在本实验中我们将PDCA/DMPC的摩尔比调整至4:1,使得PDA/PC的变色灵敏度明显提高, $2\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的CK19溶液,可产生肉眼可见的颜色变化,并可以用于识别溶液中存在的单个肿瘤细胞,灵敏度高。(Kim K-W)在溶液状态下,溶液中细胞角蛋白CK19和MCF-7细胞表达的CK19与PDA/PC生物传感器表面抗CK19单克隆抗体发生特异性免疫反应,由聚丁二炔生物传感器溶液的颜色变化实验结果可见,CK19和MCF-7作为一种交联剂加入PDA/PC溶液中,由于PDA的聚合产生肉眼可见的颜色反应,有人认为这是由于聚集引起PDA骨架的铰接并因此降低作用有效连接的长度,在PDA生物传感器 $\pi$ - $\pi$ 共轭将影响PDA胶束的可视性。导致溶液吸收波长由650 nm向550 nm改变,从而产生肉眼可见的蓝→红颜色变化,这与文献报道一致<sup>[7]</sup>。颜色变化时间约在20 min,体系有70%~80%发生了颜色变化,在大

约1 h内体系的颜色变化即基本完成,变色速度较快。该检测方法灵敏、高效,可以为肿瘤细胞的体外快速检测提供依据,从而为探索PDA/PC生物传感器在CTC的检测提供依据,促进CTC的检测在基层医院的开展,为癌症早期诊断、预后评价及个体化治疗方案设计提供依据。

## REFERENCES

- [1] CHAFFER C L, WEINBERG R A. A perspective on cancer cell metastasis [J]. *Science*, 2011, 331(6024): 1559-1564.
- [2] ALIX-PANABLERES C, SCHWARZEN B H, PANTEL K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA [J]. *Annu Rev Med*, 2012(63): 199-215.
- [3] WANG Z D, ZHAO W H, LI S. Advance in the detection of circulating tumor cells [J]. *Chin J Cancer Prevent Treat*(中华肿瘤防治杂志), 2014, 21(17): 1391-1394.
- [4] SUN Y F, YANG X R, ZHOU J, et al. Circulating tumor cells: advances in detection methods, biological issues, and clinical relevance [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(8): 1151-1173.
- [5] LU X Y, RAO Y F, LOU Y, et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: key physicochemical properties and biomedical applications [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2013, 30(2): 209-213.
- [6] JELINEK R, KOLUSHEVA S. Polymerized lipid vesicles as colorimetric biosensors for biotechnological applications [J]. *Bio Adv*, 2001, 19(2): 109-118.
- [7] KIM K W, CHOI H, LEE G S, et al. Effect of phospholipid insertion on arrayed polydiacetylene biosensors [J]. *Coll Surf B: Biointerfaces*, 2008, 66(7): 213-217.
- [8] GUO X J, HE J T, ZHANG Y D, et al. Immunodetection to *Escherichia coli* of polydiacetylene nanoparticles [J]. *J Clin Rehabil Tissue Eng Res*(中国组织工程研究与临床康复), 2011, 15(38): 7105-7108.
- [9] KWON I K, KIM J P, SIM S J. Enhancement of sensitivity using hybrid stimulus for the diagnosis of prostate cancer based on polydiacetylene (PDA) supramolecules [J]. *Biosens Bioelectron*, 2010, 26(8): 1548-1553.

收稿日期: 2016-02-08

## 吴兴铁线莲总黄酮的提取及体外抗肿瘤活性研究

张志荣, 吴文辉\*, 陶周超(浙江中医药大学, 杭州 310053)

**摘要:** 目的 对吴兴铁线莲总黄酮成分进行分离提取, 研究其抗肿瘤活性。方法 采用紫外可见分光光度法测定总黄酮含量, 以聚酰胺层析柱层析乙醇洗脱提纯吴兴铁线莲中的黄酮成分得到黄酮浸膏, 通过MTT比色法用酶标仪测定光吸收值, 计算半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ ), 观察 $100\sim 25\ 600\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 不同浓度的铁线莲黄酮溶液对小鼠骨髓瘤细胞SP2/0体外增殖的作用, 来反映其抑制肿瘤细胞生长的灵敏性。结果 铁线莲浸膏稀释液经芦丁标准曲线吸光度测定, 浸膏中黄酮含量为82.7%, 铁线莲干粉中黄酮含量为 $47\text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $2.843\text{ g}$ 铁线莲浸膏经洗脱提纯得到黄酮浸膏 $0.158\text{ g}$ 。提纯后铁线莲黄酮溶

基金项目: 浙江省中医药科技计划项目(2015ZB058)

作者简介: 张志荣, 男, 硕士, 主治医师 Tel: (0571)86919399 E-mail: fdzuo1502@163.com \*通信作者: 吴文辉, 男, 博士, 主治医师 Tel: (0571)87071109 E-mail: wuxiaxy@163.com