

白藜芦醇白蛋白纳米粒的制备及其 抗卵巢癌细胞增殖作用的研究

郭莉媛, 姚晶萍, 隋丽华

(哈尔滨医科大学附属肿瘤医院妇科, 哈尔滨 150040)

摘要 以牛血清白蛋白 (BSA) 为载体, 用去溶剂化-化学交联法制备白藜芦醇白蛋白纳米粒 (RES-BSANP). 以原子力学显微镜 (AFM) 观察其形态, 用高效液相色谱法 (HPLC) 对制备的纳米微粒进行分析. 采用四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法 (MTT) 及流式细胞技术 (FCM) 比较 RES-BSANP 和 RES 对卵巢癌 SKOV3 细胞的抗增殖活性及对细胞周期和凋亡的影响. 结果表明, 获得的 RES-BSANP 纳米粒的平均粒径为 400 ~ 500 nm, 表面光滑, 12 mg 纳米粒中 RES 载药量为 4.077 mg, 封装率 33.97%, 24 h 内的稳定性好, 水溶性较 RES 显著提高. 二者的抗肿瘤增殖作用呈剂量依赖性, 中高浓度组纳米粒组的抗增殖活性及凋亡细胞比率显著提高. 两种药物均使细胞周期阻滞于 $G_0/G_1 + S$ 期, 纳米组使进入 S 期细胞比率明显增加, 表明白藜芦醇白蛋白纳米粒在抗卵巢癌细胞增殖方面有广阔的应用前景.

关键词 白藜芦醇 (RES); 牛血清白蛋白 (BSA); 白藜芦醇白蛋白纳米粒 (RES-BSANP)

中图分类号 O629.7; R284

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2009)03-0474-04

多年来的研究已证实, 天然抗肿瘤药物白藜芦醇对消化、血液、呼吸、生殖等多个系统来源的多种肿瘤细胞都有拮抗作用, 在肿瘤细胞的起始、促进、发展 3 个阶段均发挥抑制乃至逆转效应^[1]. 但白藜芦醇难溶于水, 能溶于乙醇、乙酸乙酯、丙酮等, 人口服白藜芦醇 1.5 mg/kg, 30 min 血药浓度达高峰, 120 min 恢复. 为了增加白藜芦醇的溶解度及改善吸收^[2], 提高生物利用度, 可将白藜芦醇制成白蛋白载药微粒. 随着新型白蛋白溶剂型药物如紫杉醇白蛋白纳米粒、阿霉素白蛋白纳米粒等的相继问世^[3,4], 多项临床研究已经证实, 其在乳腺癌等多种肿瘤的治疗中取得突破性进展^[5,6]. 本文采用去溶剂化-化学交联法制备白藜芦醇白蛋白纳米粒 (RES-BSANP), 检测其在体外条件下生物活性的改变.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

白藜芦醇 (西安华萃生物技术责任有限公司, 批号: HC-20070912, 纯度 > 90%); 人卵巢癌 SKOV3 细胞株 (哈尔滨医科大学肿瘤研究所提供), BSA 牛血清白蛋白 (东北林业大学生命科学院提供); 小牛血清 (杭州四季青生物公司); 1640 培养基和胰蛋白酶 (Gibco 公司); 二甲亚砜和四甲基偶氮唑盐 (Sigma 公司); 细胞周期试剂盒 (DNA-Pre), pStain Kit (Beckman-Coulter); Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒 (Apoptosis Detection Kit, Biovision 公司), 戊二醛及乙醇均为分析纯试剂. 高压均质机 (YOSHIDA), CSPM2000wt 原子力学显微镜, JHN2M24E 超声分散仪, STA409PC 型综合热分析仪, 高效液相色谱仪 (Waters 公司), ELITE ESP 型流式细胞仪, Wellscan MK3 全自动酶标仪.

1.2 实验过程

1.2.1 白藜芦醇白蛋白纳米粒的制备 取 10 mg BSA 溶于 1 mL 二次蒸馏水中, 将 12 mg RES 溶解于 6 mL 无水乙醇中, 然后逐滴将 RES 的无水乙醇溶液加入到 BSA 水溶液中; 加入 25 μ L 质量分数为

收稿日期: 2008-10-31.

基金项目: 国家中医药管理局中医药科学技术研究专项课题 (批准号: 06-07ZP15) 资助.

联系人简介: 隋丽华, 女, 主任医师, 博士生导师, 从事妇科肿瘤的分子流行病学及药物研究和综合治疗.

E-mail: suilihua2003@yahoo.com.cn

0.25%的戊二醛溶液, 搅拌 8 h 取 500 μL 搅拌均匀的混悬液离心 (1000 r/min), 上清液用 HPLC 法检测包被率. 剩下的混悬液旋转蒸发除去乙醇, 加入二次蒸馏水后超声清洗 20 min, 离心 (1000 r/min), 清洗 2 次. 最后加入蒸馏水至 6 mL, 超声混匀, 待用.

1.2.2 上清液 RES 的测试 将 5.0 mg 白藜芦醇对照品置于 25 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解至刻度, 摇匀. 分别取适量上述溶液, 用流动相稀释, 摇匀, 配成系列浓度的对照品溶液. 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取 20 μL 滤液进样, 进行 HPLC^[7] 分析, 以峰面积为纵坐标 (y), 浓度为横坐标 (x) 绘制标准曲线.

1.2.3 包封率、溶解性和原子力学显微镜检测 将混悬液离心洗涤后干燥至恒重. 按下式计算包封率. 包封率 (%) = [(投入量 - 上清液量) / 投入量] \times 100%.

分别取 RES 和 RES-BSANP 的过饱和水溶液, 离心后取上清液, 稀释至合适的浓度后, 在 306 nm 下测定其紫外吸收值, 再对照 RES 的工作曲线得出其饱和水溶液的浓度, 并折算出 RES 和 RES-BSANP 在水中的溶解度.

样品制备时, 吸取 50 μL 液体滴到新解离的云母片表面, 用滤纸吸去多余液体, 置于室温下风干后进行 AFM 观察. 每个样本观察 10 个不同的区域. 利用 AFM 支持软件 CSPM2000 Online 对有形颗粒的大小进行测量和三维构图.

1.2.4 MTT 法对细胞生长抑制率的测定 收集对数生长期细胞, 每孔 5×10^3 个接种于 96 孔培养板, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵育箱中培养 24 h, 细胞贴壁后弃去培养液, 分别加入 2, 5, 10, 20, 40, 60, 100 和 200 $\mu\text{mol/L}$ RES 和 RES-BSANP 200 μL , 为评估 DMSO 对实验的影响, 设 4 个 DMSO 组 (浓度与 RES 一致), 同时设空白对照组, 每组均设 4 个复孔. 继续培养 24 h, 每孔加入 20 μL 5 mg/mL 的 MTT, 继续孵育 4 h 后弃去培养液, 每孔加入 150 μL DMSO, 振荡 10 min, 用酶标仪测吸光度 (A), 按下式计算抑制率: 细胞增殖抑制率 (%) = [(对照组 $A_{490 \text{ nm}}$ - 实验组 $A_{490 \text{ nm}}$) / 对照组 $A_{490 \text{ nm}}$] \times 100%. 取 4 孔均值绘制浓度效应曲线.

1.2.5 流式细胞仪对细胞周期的测定 依据 MTT 结果, 分别取 15, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ RES-BSANP 及 RES, 设一个空白对照组与实验组共 7 组. 分别于 24 h 后收集细胞, 按 DNA-PrepStain Kit 试剂盒和 Apoptosis Detection Kit 试剂盒说明书进行细胞固定, 染色, 上流式细胞仪分析. 实验重复 3 次, 取均值进行统计.

2 结果与讨论

2.1 RES 对照品的 HPLC 标准曲线

流动相: $V(\text{乙腈})/V(\text{水}) = 25/75$; 检测波长: 305 nm; 流速: 1 mL/min; 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 10 μL . 色谱柱规格 Diamonsil- C_{18} 5U (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm). 在该色谱条件下白藜芦醇的保留时间约为 15.550 min (图 1).

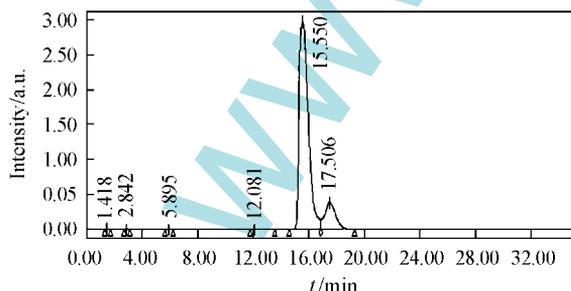


Fig 1 HPLC of RES control sample

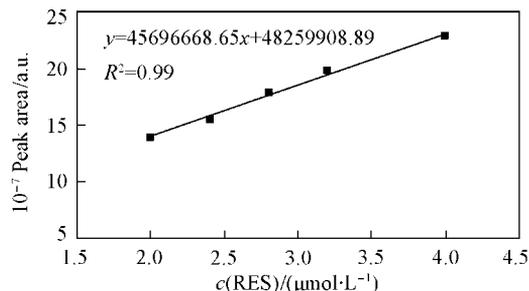


Fig 2 Standard curve of peak area vs. concentration of RES

白藜芦醇在 2 ~ 4 mg/mL 浓度范围内与峰面积之间线性关系良好, 回归方程为 $y = 45696668.65x + 48259908.89$; $R^2 = 0.99$, 结果见图 2

2.2 RES-BSANP 的包封率

由 HPLC 测得 RES-BSANP 上清液中的药物含量 (图 3), 计算包载纳米粒子的药量 (投入量 - 上清

液量), 得上清液浓度为 1.585 mg/mL, 上清液中 RES 含量为 7.923 mg, 纳米粒中 RES 含量为 12 - 7.923 = 4.077 mg, 经计算, 封装率 = (4.077/12) × 100% = 33.97%.

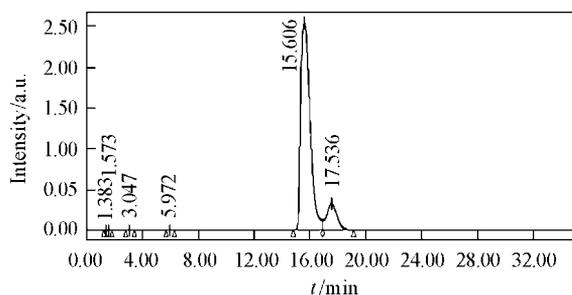


Fig 3 HPLC of clear supernatant of RES-BSANP

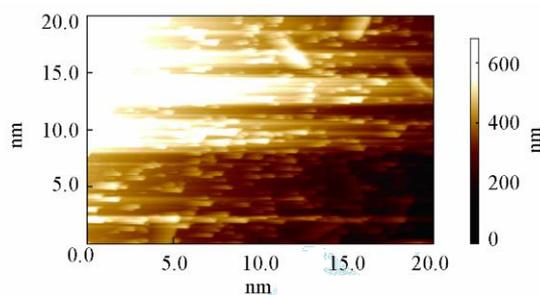


Fig 4 AFM image of microspheres of RES-BSANP

2.3 RES-BSANP的粒径形态、稳定性和溶解度

RES-BSANP形态多为圆形, 大小及粒径分布均匀, 所获得的 RES-BSANP平均粒径为 400 ~ 500 nm (图 4).

取同一份样品溶液, 在 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 时间段分别进样, 记录峰面积积分值, 求得 RSD 为 0.75%, 表明样品在 24 h 内稳定.

参照文献 [8] 的方法, 分别测定 RES 和 RES-BSANP 在纯水中的溶解度. 实验结果表明, RES 在纯水中的溶解度为 0.0169 mg/mL, 而 RES-BSANP 的溶解度为 0.2021 mg/mL, 表明 RES-BSANP 在纯水中的溶解度比 RES 提高了 12 倍. 这充分说明了将 RES 变为 RES-BSANP 后, 其水溶性得到了显著改善, 从而更有利于 RES 在生物体内的吸收和代谢, 这为提高 RES 的生物学性能、改变药物的给药方式和途径提供了可能.

2.4 抗卵巢癌细胞生长抑制率的比较

由表 1 可以看出, RES-BSANP 对 SKOV3 细胞的生长抑制作用在 5 μmol/L 以下时不明显, 尤其在 2 μmol/L 时反而较 RES 组有所下降 ($P < 0.05$). 当两组浓度分别为 10, 20, 40 μmol/L 时, RES-BSANP 组细胞生长抑制作用呈普遍增强趋势 ($P > 0.05$). 当 RES-BSANP 浓度分别为 60, 100, 200 μmol/L 时, 抗 SKOV3 增殖作用与对照组相比显著增强 ($P < 0.05$).

根据文献 [9] 报道, 当白藜芦醇浓度较高时, 与人血清白蛋白 (HSA) 的结合蛋白质的二级结构局部稳定性较强. 因此在本实验中, 浓度低于 5 μmol/L 时, RES-BSANP 的抗细胞增殖作用较差, 可能是由于药物在浓度较低的情况下, 短时间内无法完全释放, 且低浓度下药物结合局部稳定性差所致. 当药物浓度逐渐增加时, RES-BSANP 的抗肿瘤优势逐渐发挥出来, 尤其以 60 μmol/L 以上各浓度更为显著 ($P < 0.05$), 分析该药物的抗肿瘤活性不再受浓度和辅料的干扰, 因粒径改善及细胞膜对药物通透性的增加而使细胞毒性显著增强.

Table 1 Effects of RES and RES-BSANP on proliferation of SKOV3 cells (inhibit rate, %)

Sample	Drug concentration / (μmol · L ⁻¹)							
	2	5	10	20	40	60	100	200
RES	0.04 ± 0.02	0.11 ± 0.04	0.22 ± 0.04	0.43 ± 0.04	0.57 ± 0.06	0.64 ± 0.04	0.82 ± 0.05	0.89 ± 0.02
RES-BSANP	0.004 ± 0.02*	0.12 ± 0.04	0.25 ± 0.03	0.44 ± 0.05	0.54 ± 0.04	0.71 ± 0.03*	0.89 ± 0.03*	0.95 ± 0.01*

* Mean ± SD, $n = 2$, $P < 0.05$ as compared with control group.

2.5 FCM 检测细胞周期及凋亡

两组药物对 SKOV3 的细胞生长的抑制作用呈现剂量依赖性, 随着剂量的增加, 凋亡显著提高, 且 G₀/G₁ + S 期细胞阻滞加重. 与 RES 相比, RES-BSANP 在低剂量时 (15 μmol/L) 即能引起少量细胞发生凋亡 (凋亡率为 0.71 ± 0.03); 在中等剂量时, 进入 S 期细胞比率明显增加 (46.22 ± 3.32, $P < 0.05$), 凋亡显著增加 ($P < 0.01$); 当药物浓度为 100 μmol/L 时, 进入 S 期细胞比率进一步增加, G₀/G₁ + S 期细胞阻滞进一步加重 (表 2).

在肿瘤化疗过程中, G₀/G₁ 期细胞的大量存在是肿瘤复发和转移的主要原因之一, 而 S 期为 DNA

合成期,大量该期细胞 DNA 解旋复制,沿 DNA 单链暴露出更多活性部位,可为化疗药物提供更多的作用位点,有助于提高化疗的疗效. 本实验研究发现,对 SKOV3 细胞的增殖抑制和诱导凋亡作用而言,50 $\mu\text{mol/L}$ RES-BSANP 的细胞凋亡现象显著增强,且 S 期细胞增加明显 ($P < 0.05$),而 G_2/M 期相对稳定,这说明 RES 能动员 SKOV3 细胞由 G_0/G_1 期进入 S 期,同时,又能阻止 S 期细胞进入 G_2/M 期,导致细胞在 S 期阻滞增加,从而抑制细胞增殖并且提高化疗效果.

Table 2 Effects of RES and RES-BSANP on cell cycle and cell apoptosis

Concentration/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	G_0/G_1 cell cycle (%)		S cell cycle (%)		Cell apoptosis	
	RES	RES-BSANP	RES	RES-BSANP	RES	RES-BSANP
15	50.87 \pm 2.13	51.53 \pm 1.61	35.31 \pm 0.49	34.98 \pm 3.2	0.11 \pm 0.02	0.71 \pm 0.03 ^c
50	49.27 \pm 0.63	42.22 \pm 4.50	40.47 \pm 0.93	46.22 \pm 3.32 ^a	3.59 \pm 0.48	8.18 \pm 0.52 ^d
100	69.53 \pm 3.61	50.93 \pm 3.01	24.56 \pm 1.18	47.34 \pm 1.91 ^b	9.42 \pm 0.46	10.67 \pm 0.62

a. Mean \pm SD, $n=2$, $P < 0.05$; b $P < 0.01$; c $P < 0.01$; d $P < 0.01$, as compared with control group at the same time

参 考 文 献

- [1] Jang M. S., Cai L. N., Udeani G. O.. Science[J], 1997, 275(10): 218—220
- [2] WANG Xin-Chun(王新春), HOU Shi-Xiang(侯世祥), LI Wen(李文). China Journal of Chinese Materia Medica(中国中药杂志)[J], 2007, 2(13): 232—235
- [3] Warthek H., Schmitt B. S., Strebhardt K. Controlled Release[J], 2004, 96(3): 483—495
- [4] Almond B. A., Hadba A. R., Freeman S. T. Controlled Release[J], 2003, 91(1/2): 147—155
- [5] Gradishar W. J., Tjulandin S., Davidson N. Clin Oncol [J], 2005, 23: 7794—7803
- [6] Haley B., Frenkel E. Urol Oncol [J], 2008, 26(1): 57—64
- [7] Bobbin R. P., Ceasar G., Fallon M. Hear Res [J], 1990, 46(1/2): 83—93
- [8] WANG Yin-Song(王银松), HAN Yue-Lian(韩月莲), LI Ying-Xia(李英霞), et al. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2007, 28(6): 1092—1097
- [9] Nsoukpoe-Kossi C. N., StLouis C., Beauregard M. Biomol Struct Dyn [J], 2006, 24(3): 277—83

Preparation and Effects of Resveratrol Bovine Serum Albumin Nanoparticles on Proliferation of Human Ovarian Carcinoma Cell SKOV3

GUO Li-Yuan, YAO Jing-Ping, SU I Li-Hua*

(Gynecology Department of Harbin Tumor Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150040, China)

Abstract Resveratrol bovine serum albumin nanoparticles (RES-BSANP) were synthesized by desolvation. HPLC and Atomic force microscopy (AFM) were employed to study the shape, mean size and particle distribution of RES-BSANP. MTT was used to detect the effects of RES and RES-BSANP on the growth rate of cell SKOV3 at various concentration of them, and flow cytometry (FCM) was applied to assaying the cell cycle and cell apoptosis of cells SKOV3. The results show that RES-BSANP are slick and uniformity, the average diameter of RES-BSANP is about 400—500 nm, drug loading is about 4.077 mg/12 mg, entrapment efficiency is 33.97%. MTT test shows the growth of SKOV3 can be significantly inhibited by RES and RES-BSANP in dose-dependence manner, while RES-BSANP is superior to RES at concentrations of 60, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$). FCM test shows RES-BSANP make cells SKOV3 be in S phase and the apoptosis of cells SKOV3 more significant compared with RES. Therefore, RES-BSANP appears to be a very promising drug for anti-proliferation on human ovarian carcinoma.

Keywords Resveratrol (RES); Bovine serum albumin (BSA); Resveratrol bovine serum albumin nanoparticles (RES-BSANP) (Ed: F, Z)