

槲皮素聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒子的制备、表征和体外抗人子宫内膜癌作用

孙 丽¹, 胡群英², 汪爱兵¹, 高 毅¹, 杨建敏¹, 王春延¹, 曾 晶¹, 杨 然¹, 任红娟¹, 苏 博¹

1. 郑州大学附属南阳市中心医院, 河南 南阳 473000

2. 陆军军医大学第一附属医院, 重庆 400038

摘要: 目的 制备槲皮素聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒子(QT-PBCA)并考察其理化性质、体外抗人子宫内膜癌作用。方法 采用阴离子乳液聚合法制备 QT-PBCA 纳米粒子。透射电镜观察纳米粒子的形态, Zeta 电位仪检测粒径和 Zeta 电位, 红外光谱仪检测 QT-PBCA 纳米粒子、BCA 单体、QT、空载体 PBCA 纳米粒子的红外吸收光谱, MTT 法检测细胞存活率。结果 QT-PBCA 纳米粒子呈球形或椭圆形, 表面光滑, 在透射电镜下因 PBCA 固有的黏合特性而处于略微聚集的状态, 其平均粒径为 (161.1 ± 0.44) nm, Zeta 电位为 (-7.28 ± 0.60) mV, 平均包封率为 $(79.86 \pm 0.45)\%$ 。在纳米粒子的封装以及制备的过程中槲皮素与聚合物之间可能发生的反应。槲皮素封存到 PBCA 纳米粒子中是靠分子间作用力(如氢键)完成的。随着顺铂、纳米粒子浓度的增加, JEC、LO2 细胞的存活率降低, 且顺铂组相比于纳米粒子组的存活率要更低 ($P < 0.05$)。纳米粒子在 6.67 mg/L 对 LO2 细胞有一定的毒性, 但随着浓度增高, 反而会产生促进细胞增殖的作用。结论 QT-PBCA 纳米粒子具有良好的理化性质和抗肿瘤作用且对正常细胞无害, 有潜力成为新型抗癌药物。

关键词: 槲皮素聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒子; 槲皮素; 氰基丙烯酸正丁酯; 制备; 粒径; Zeta 电位; 红外吸收光谱; 人子宫内膜癌细胞 JEC

中图分类号: R944

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2020)05- 0854 -05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.05.006

Preparation and characterization of Quercetin Polybutylcyanoacrylate Nanoparticles and its anti-human endometrial cancer *in vitro*

SUN Li¹, HU Qun-ying², WANG Ai-bing¹, GAO Yi¹, YANG Jian-min¹, WANG Chun-yan¹, ZENG Jing¹, YANG Ran¹, REN Hong-juan¹, SU Bo¹

1. Nanyang Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Nanyang 473000, China

2. The First Affiliated Hospital of Army Military Medical University, Chongqing 400038, China

Abstract Objective To prepare Quercetin Polybutylcyanoacrylate (QT-PBCA) Nanoparticles and study its physicochemical properties and anti-human endometrial cancer effect *in vitro*. **Methods** QT-PBCA nanoparticles were prepared by anionic emulsion polymerization method. Morphology of the nanoparticles was observed with transmission electron microscopy. Particle size and Zeta potential were detected with Zeta potentiometer. IR of QT-PBCA nanoparticles, BCA monomers, QT, and empty carrier PBCA nanoparticles were measured with infrared spectrometer. Cell proliferation rate was measured by MTT method. **Results** The prepared QT-PBCA nanoparticles were spherical or elliptical, indicating that they were smooth. They were slightly aggregated under the transmission electron microscope due to the inherent adhesion characteristics of PBCA. The average particle diameter was (161.1 ± 0.44) nm, and the Zeta potential was (-7.28 ± 0.60) mV, and the average encapsulation rate was $(79.86 \pm 0.45)\%$. The possible reaction between quercetin and polymer happened during the encapsulation and preparation of nanoparticles. Quercetin was encapsulated into PBCA nanoparticles by intermolecular forces, such as hydrogen bonds. After the treatment of JEC and LO2 cells with different concentrations of cisplatin and QT-PBCA nanoparticles, the survival rate of JEC and LO2 cells decreased with the increase of cisplatin concentration, and the survival rate was lower than that of the treatment group ($P < 0.05$). QT-PBCA nanoparticles had certain toxicity to LO2 cells at a concentration of 6.67 mg/L, but as the concentration increased, they could instead promote cell proliferation.

收稿日期: 2020-01-09

基金项目: 河南省科技发展计划项目(182102310184、182102311190)

作者简介: 孙 丽(1985—), 女, 河南南阳人, 主治医师, 硕士, 研究方向妇科肿瘤。E-mail: bhh89hi0@163.com

Conclusion QT-PBCA nanoparticles have good physical and chemical properties, anti-tumor effects, and are not harmful to normal cells. They have the potential to become new anticancer drugs.

Key words: Quercetin Polybutylcyanoacrylate Nanoparticles; quercetin; polybutylcyanoacrylate; preparation; particle diameter; Zeta potential; IR; JEC cell

槲皮素的药理作用主要集中在抗肿瘤、抗病毒、抗炎方面,其中抗肿瘤作用特别突出,虽然槲皮素药理活性较多,但在水中溶解度较低,且生理环境下不稳定,极大限制了其在临床中的应用^[1]。槲皮素纳米制剂因具有粒径小、可被动靶向到达肿瘤组织的特点已成为研究的热点^[2]。氰基丙烯酸正丁酯是一种具有良好生物相容性的生物可降解材料,且毒性小,其单体中的双键被高负电性的氰基、烷氧基极化,一些常见的阴离子、氨基酸等物质中的亲质子基团均可引发其聚合形成氰基丙烯酸正丁酯长链,进而形成纳米粒子^[3]。子宫内膜癌是一种女性患者高发的恶性肿瘤,但其具体发病机制尚未明了,绝经后的女性发病率较高^[4]。故本实验制备了槲皮素聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒子,并探讨其对子宫内癌细胞的作用。

1 仪器与材料

Tecnai 12 透射电子显微镜(荷兰 Philips 公司),电位仪(美国 Microtrac 公司),双光束 UV-VIS 分光光度计(上海仪电公司)。

槲皮素(北京索莱宝科技有限公司,质量分数 98%,货号 IQ0010-1),氰基丙烯酸正丁酯(PBCA,上海凯茵化工有限公司,质量分数 99%),MTT 噻唑蓝(北京 Solarbio 公司),磷钨酸(北京凯瑞基生物科技有限公司),Pluronic F-68(美国 Sigma 公司)、聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA,北京康派特医药科技开发有限公司)。

人子宫内膜癌细胞 JEG(上海信裕生物科技有限公司,货号 TC-hxbz-309)、人正常肝细胞 LO2(上海信裕生物科技有限公司),RPMI 1640 培养液(含 10% 胎牛血清,上海 Hepengbio 公司)。

2 方法与结果

2.1 纳米粒子的制备

2.1.1 制备方法的选择 槲皮素的水溶性差,以氰基丙烯酸正丁酯为载体材料制备槲皮素聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒子时,槲皮素不满足乳化聚合法中的一步法对溶解性能的要求,故考虑采用二步法或界面缩聚法制备槲皮素聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒子。实验选用界面缩聚法制备纳米粒子,得白

色胶体溶液,滴于铜网上,1.5%磷钨酸负染,自然干燥后,电镜观察。结果表明界面缩聚法制得的槲皮素聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒子大小不均匀,并黏连,呈不规则球形。故实验选择阴离子乳液聚合法中的二步法制备槲皮素聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒子。

2.1.2 BCA 单体质量体积比的选择 BCA 单体质量体积比在 0~0.1%,槲皮素聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒子包封率呈线性关系,并且质量体积比为 0.1%时,包封率最高。

2.1.3 Pluronic F68 质量体积比的选择 Pluronic F68 质量体积比在 0~1.5%时,槲皮素聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒子包封率随着 Pluronic F68 质量体积比增加而增加,当 Pluronic F68 质量体积比在 1.0%时,效果较好。

2.1.4 槲皮素聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒子的制备 在 37℃下,将质量体积比 0.1% Pluronic F-68 溶解至 pH 2~3 HCl 溶液中,再将质量体积比 0.1% 的槲皮素粉末加入到上述溶液中。在磁力搅拌下将质量体积比 0.1% BCA 单体逐滴注入搅拌介质中,在 37℃下、以 400 r/min 恒定搅拌下进行聚合反应 4 h。使用 0.1 mol/L NaOH 将所得悬浮液的调节 pH 6.7~6.9。将聚合反应混合物再搅拌 2 h 以确保在恒定搅拌下完全除去混合物中的乙醇,并逐渐完成反应,滤过所得槲皮素聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒子悬浮液。使用 2 μm 注射器滤膜去除聚集物。16 000 r/min 超离心 60 min,用蒸馏水冲洗 3 次,将形成的沉淀悬浮在蒸馏水上,冷冻剂冻干,包被,即得。

2.2 纳米粒子的表征

将槲皮素聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒子分散在蒸馏水中制成样品,并将一滴加入到铜格中制成薄膜。添加 2%的磷钨酸(pH 7.0)对薄膜进行负染色。将格栅在室温下干燥,并在透射电镜下检查纳米粒子的形态。在 30 000 倍放大倍率和 80 kV 电压下拍摄照片,见图 1。可见制备的槲皮素聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒子呈球形或椭圆形,表面光滑,在透射电镜下因 PBCA 固有的黏合特性而处于略微聚集的状态。

2.3 纳米粒子的粒径和包封率

在 37 °C 下、以 90° 的检测角度基于激光衍射的光散射,使用 Zeta 电位仪测定槲皮素聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒子的粒径、 ζ 电位。结果见图 2。槲皮素聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒子的平均粒径为 (161.1 ± 0.44) nm。Zeta 电位为 (-7.28 ± 0.60) mV, 其较强的静电排斥作用可防止颗粒聚集,并为粒子的悬浮液提供良好的稳定性。

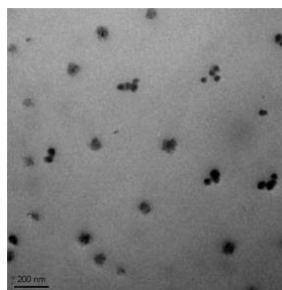


图 1 槲皮素聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒子的透射电镜图
Fig. 1 Transmission electron microscopy of QT-PBCA Nanoparticles

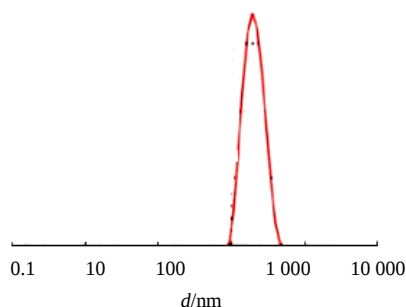


图 2 槲皮素聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒子的粒径分布
Fig. 2 Particle size distribution of QT-PBCA Nanoparticles

将新鲜制备的纳米粒子悬浮液在 4 °C 下,以 20 000 r/min 离心 60 min 以获得纳米粒子沉淀。将获得的沉淀溶解在甲醇中以提取槲皮素,将其适当稀释。在 374 nm 下测定槲皮素的质量浓度,计算平均包封率。结果平均包封率为 (79.86 ± 0.45) %。提示包封率越高,槲皮素与 PBCA 纳米粒子的作用越好。

包封率 = 纳米粒子中的槲皮素量 / 初始槲皮素量

2.4 纳米粒子的红外光谱检测

将槲皮素聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒子、BCA 单体、槲皮素、空载体 PBCA 纳米粒子溶解,制成 KBr 窗片,用红外光谱仪进行扫描,结果见图 3。在纳米粒子的封装以及制备的过程中槲皮素与聚

合物之间可能发生的反应。对于槲皮素,主要特征性较宽的谱带对应于 OH 酚醛在 $3\,385.07\text{ cm}^{-1}$ 处拉伸,到 C=O 吸收谱带在 $1\,666.5\text{ cm}^{-1}$ 处, C-C 的谱带在 $1\,612.49\text{ cm}^{-1}$ 处延伸,与预测的一致。纳米粒子、空白 PBCA 纳米粒子在 $3\,015.15\text{ cm}^{-1}$ (OH 拉伸) 处显示较宽的峰,对应于羟基自由基,并且在能量吸收期间略微移动或扩大。空白 PBCA 纳米粒子、纳米粒子的光谱中也存在 BCA 单体上 $2\,249.83\text{ cm}^{-1}$ 处的 C≡N 峰,表明 C≡N 不参与聚合反应,这表明槲皮素封存到 PBCA 纳米粒子中是靠分子间作用力(如氢键)完成的。

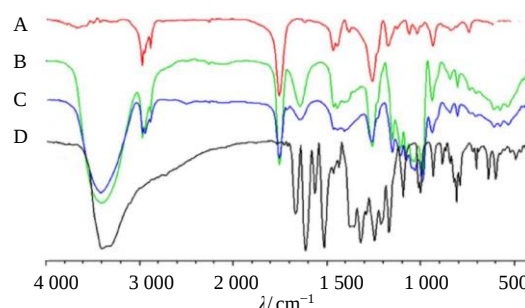


图 3 BCA 单体 (A)、空白 PBCA 纳米粒子 (B)、纳米粒子 (C)、槲皮素 (D) 的红外光谱图

Fig. 3 IR spectrograms of BCA monomer (A), blank PBCA nanoparticles (B), QT-NBCA nanoparticles (C), and QT (D)

2.5 纳米粒子对子宫内腺癌细胞的影响

将 JEC、LO2 细胞分别置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,培养液为 RPMI 1640 (含 10% 胎牛血清),用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。分别加入 0、6.67、10.00、13.33 mg/L 顺铂和 0、6.67、10.00、13.33 mg/L 槲皮素聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒子作用于 JEC、LO2,采用 MTT 法在吸收波长 490 nm 下测定各组的吸光度 (A) 值,计算细胞存活率。

存活率 = 治疗组 A 值 / 空白组 A 值

采用 SPSS 25.0 进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差。结果见表 1。随着顺铂、纳米粒子浓度的增加,JEC、LO2 细胞的存活率降低,且顺铂组相比于纳米粒子组的存活率要更低 ($P < 0.05$)。纳米粒子在 6.67 mg/L 对 LO2 细胞有一定的毒性,但随着浓度增高,反而会产生促进细胞增殖的作用,表明纳米粒子对正常细胞的毒性作用不及顺铂,又可抑制子宫内腺癌的生长。

表1 槲皮素聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒子对 JEC、LO2 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
Table 1 Effect of QT-PBCA Nanoparticles on survival rates of JEC and LO2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

浓度/(mg·L ⁻¹)	存活率/%			
	JEC 细胞		LO2 细胞	
	顺铂	纳米粒子	顺铂	纳米粒子
0	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
6.67	74.53±8.92	91.42±10.52*	61.56±7.42	84.43±6.51*
10.00	60.34±7.34	76.43±8.75*	52.32±5.43	106.34±9.49*
13.33	42.00±5.36	61.24±6.44*	43.75±5.32	152.24±8.46*

3 讨论

子宫内膜癌是一种好发于子宫内膜上皮的恶性肿瘤,发病率呈逐年上升的趋势,已经严重地威胁到了女性的健康安全^[5]。大多数化疗药物特异性较差,对人体的伤害较大,开发出高效、无害的子宫内膜癌临床治疗药物刻不容缓^[6]。在过去的几十年中,许多制药公司已将重点转移到将聚合物纳米粒子制成可控制的药物输送系统,以提高亲脂性、疏水性药物的口服生物利用度^[7-8]。原理是通过专门的摄取机制、延长的半衰期、最小化的毒性以及纳米粒子穿越生理屏障的能力提高而实现的^[9-10]。

槲皮素是潜在的类黄酮,通常存在于水果、蔬菜、树叶和谷物中,由于其高抗氧化活性,能够作为自由基清除剂和从活性氧物种的产生的结果氧化应激保护细胞^[11]。槲皮素的内在毒性低,并且具有令人惊讶的广泛有益作用,如抗自由基、抗炎、抗诱变、抗癌、抗血管生成、抗菌、抗肿瘤、抗病毒、抗焦虑和认知增强作用^[12]。然而,尽管具有广泛的药理特性,但由于槲皮素的疏水性,生理介质不稳定性,在药物领域的应用受到了阻碍^[13]。为了提高槲皮素的口服生物利用度,许多研究人员已经尝试制备各种药物递送系统,如聚 PLA 的纳米粒子、基于卵磷脂的新型阳离子纳米载体^[14]。聚氰基丙烯酸正丁酯(PBCA)近年来由于其解决了之前的胶体载体的局限性而备受关注^[15]。PBCA 是一种可生物降解、生物相容、毒性最小、可生物吸收和具有生物黏附性的聚合物,在过去的几年中已对控制、靶向药物的输送进行了广泛的研究^[16]。已经成功研究了 PBCA 纳米粒子,以提高难溶性多酚和异黄酮(如姜黄素、葛根素)的口服吸收^[17]。

本研究采用阴离子乳液聚合法制备了槲皮素聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒子,并考察了其理化性质。基于阴离子乳液聚合过程,由胶束形成的溶胀

结构被 BCA 单体吸收。整个聚合过程中,介质中的氢氧根离子引发单体单元的反应,形成低聚物,该低聚物被表面活性剂稳定。所制备的槲皮素聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒子呈球形或椭圆形,表面光滑,在透射电镜下因 PBCA 固有的黏合特性而处于略微聚集的状态,其平均粒径为(161.1±0.44) nm, Zeta 电位约为(-7.28±0.60) mV,平均包封率为(79.86±0.45)%。MTT 实验的结果表明,槲皮素聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒子和顺铂均能对 JEC 人子宫内膜癌细胞的增殖产生一定的抑制作用,且槲皮素聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒子的作用不如顺铂,但是对于人的正常细胞 LO2,槲皮素聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒子的毒性远不及顺铂,且在较高浓度作用下,还能够促进 LO2 细胞生长。

综上所述,槲皮素聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒子具有良好的理化性质和抗肿瘤作用,且对正常细胞无害,有潜力成为新型抗癌药物。

参考文献

- [1] 卢双彦,张雅楠,翟光喜. 槲皮素纳米制剂研究进展 [J]. 药物生物技术, 2019, 26(6): 552-557.
- [2] 尹华珍,于雪梅,方可华,等. 槲皮素纳米制剂及其抗肿瘤研究进展 [J]. 中国新药与临床杂志, 2018, 37(1): 5-10.
- [3] 孙 晗. 聚氰基丙烯酸正丁酯药物载体在中药领域中的应用. 中国商品学会第五届全国中药商品学术大会论文集 [C]. 哈尔滨: 中国商品学会, 2017: 697-703.
- [4] 廖秦平,杨 曦. 子宫内膜癌筛查及早期诊断的现状与展望 [J]. 实用妇产科杂志, 2015, 31(7): 481-484.
- [5] 冯凤芝,范辰辰,林仲秋. 子宫内膜癌的靶向治疗 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2017, 33(5): 472-476.
- [6] 曹海敬,薛 嫚,李 芳,等. 子宫内膜癌靶向药物治疗研究进展 [J]. 中国新药与临床杂志, 2020, 39(1): 1-7.
- [7] Lee Y J, Park Y. Green synthetic nanoarchitectonics of

- gold and silver nanoparticles prepared using quercetin and their cytotoxicity and catalytic applications [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2020, 20(5): 2781-2790.
- [8] 刘娜, 荣雪云, 毛荐其. 新兴交叉领域技术会聚对技术价值的影响研究: 以纳米生物制药领域为例 [J]. 技术与创新管理, 2019, 40(6): 728-736.
- [9] Guo G L, Gong L C, Sun L Q, *et al.* Quercetin supports cell viability and inhibits apoptosis in cardiocytes by down-regulating miR-199a [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 2909-2916.
- [10] 马岚, 李冰, 陈建平, 等. 纳米技术在药物领域中的应用 [J]. 内蒙古医科大学学报, 2018, 40(5): 536-540.
- [11] Xu L N, Guo X J, Li N, *et al.* Effects of quercetin on Aroclor 1254-induced expression of CYP450 and cytokines in pregnant rats [J]. *J Immunotoxicol*, 2019, 16(1): 140-148.
- [12] Yarjanli Z, Ghaedi K, Esmaeili A, *et al.* The antitoxic effects of quercetin and quercetin-conjugated iron oxide nanoparticles (QNPs) against H₂O₂-induced toxicity in PC12 cells [J]. *Int J Nanomed*, 2019, 14: 6813-6830.
- [13] 吴愚, 林佳颖, 王未来, 等. 壳寡糖-槲皮素聚合物的制备及体外抗人子宫内膜癌作用的研究 [J]. 转化医学杂志, 2018, 7(5): 280-284.
- [14] Shah S M, Ashtikar M, Jain A S, *et al.* LeciPlex, invasomes, and liposomes: A skin penetration study [J]. *In J Pharm*, 2015, 490(1/2): 391-403.
- [15] 陈文学, 邹学森, 胡文强, 等. 适配子 PBCA-USPIO 纳米微粒的制备研究 [J]. 实用癌症杂志, 2019, 34(11): 1749-1751, 1763.
- [16] Lunin S M, Khrenov M O, Glushkova O V, *et al.* Protective effect of PBCA nanoparticles loaded with thymulin against the relapsing-remitting form of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(21): E5374.
- [17] Bagad M, Khan Z A. Poly (n-butylcyanoacrylate) nanoparticles for oral delivery of quercetin: Preparation, characterization, and pharmacokinetics and biodistribution studies in Wistar rats [J]. *Int J Nanomed*, 2015, 10: 3921-3935.