

白藜芦醇温敏型凝胶剂的制备及抗膀胱癌细胞研究

王立红, 吴文丽, 罗永明, 车 鑫*

贵州中医药大学 药学院, 贵州 贵阳 550025

摘要: 目的 制备用于治疗膀胱癌、可经膀胱灌注给药的白藜芦醇温敏型凝胶剂。方法 以最低胶凝温度、溶蚀时间为指标, 筛选凝胶处方; 通过扫描电镜 (SEM) 观察凝胶的微观结构, 通过傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 观察凝胶基质与药物的相容性, 溶出度测定仪考察凝胶的体外释放行为; 体外培养小鼠膀胱癌细胞 (MB49-LUC), 划痕实验和MTT实验考察白藜芦醇浓度、作用时间对膀胱癌细胞迁移和增殖的影响。结果 凝胶的最优处方为白藜芦醇 30%、泊洛沙姆 407 19%、泊洛沙姆 188 7%、海藻酸钠 0.3%、碳酸钙 0.06%、 NH_4HCO_3 0.2%; SEM显示凝胶呈疏松多孔的三维网状结构, FTIR显示凝胶材料官能团结构无明显改变, 相容性良好; 药物从漂浮凝胶中缓慢释放, 80 d内累积释放 50.37%, 药物释放量达 135.58 mg。划痕实验显示, 与对照组相比, 白藜芦醇 $\geq 60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 可显著抑制MB49-LUC细胞的迁移($P<0.05$); MTT实验显示, 与对照组比较, 白藜芦醇作用 24 h的 120、150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组, 48 h的 60、90、120、150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组, 72 h的 30、60、90、120、150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组, 96、120 h的 15、30、60、90、120、150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞存活率显著下降($P<0.01, 0.001$)。结论 白藜芦醇对膀胱癌细胞的抑制作用呈浓度、时间相关性, 其温敏型凝胶剂能够长时间持续释放药物。

关键词: 白藜芦醇; 温敏型凝胶; 缓释; 膀胱癌; 膀胱灌注

中图分类号: R945

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376 (2024) 10-2334-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.10.013

Preparation of resveratrol temperature sensitive gel for chemotherapy via bladder perfusion

WANG Lihong, WU Wenli, LUO Yongming, CHE Xin

School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

Abstract: Objective To prepare resveratrol temperature-sensitive gel for the treatment of bladder cancer, which can be administered by bladder perfusion. **Methods** Using the lowest gelation temperature and dissolution time as indicators, the optimal gel formula was selected, the microscopic structure of the gel was observed by scanning electron microscope (SEM), and the compatibility of the gel matrix with the drug was observed by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), the *in vitro* release behavior of the gel was examined by dissolution tester, the migration and proliferation of MB49-LUC mouse bladder cancer cells were examined by scratch test and MTT assay with resveratrol concentration and action time as variables. **Results** The optimal gel formula was resveratrol 30%, polyoxyethylene sorbitan monolaurate 407 19%, polyoxyethylene sorbitan monooleate 188 7%, alginate 0.3%, calcium carbonate 0.06%, and ammonium bicarbonate 0.2%, SEM results showed that the gel had a loose and porous three-dimensional network structure, FTIR showed no significant change in the functional group structure of the gel material, indicating good compatibility, the drug was slowly released from the floating gel, with a cumulative release of 50.37% within 80 days, and a total drug release of 135.58 mg. The scratch test showed that compared with the control group, resveratrol concentrations of $\geq 60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ could significantly inhibit the migration of MB49-LUC cells ($P<0.05$), the MTT assay showed that compared with the control group, the 120, 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ groups at 24 h of resveratrol action, the 60, 90, 120, 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ groups at 48 h, the 30, 60, 90, 120, 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ groups at 72 h, and the 15, 30, 60, 90, 120, 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ groups at 96, 120 h had significantly lower cell viability ($P<0.01, 0.001$). **Conclusion** The inhibitory effect of resveratrol on bladder cancer cells is dose-dependent and time-dependent. With the long-lasting drug release capacity of temperature-sensitive gel, resveratrol temperature-sensitive gel has obvious inhibitory effect on bladder cancer cells.

收稿日期: 2024-04-26

基金项目: 贵州省基础研究计划(黔科合基础—ZK[2021]—一般524); 贵州省卫健委科学技术基金项目(gzkwj2022—233)

第一作者: 王立红(1979—), 女(汉族), 山东济南人, 副教授, 博士。E-mail: 315656071@qq.com

*通信作者: 车 鑫(1978—), 男(汉族), 辽宁沈阳人, 副教授, 博士, 主要从事中药制剂及新剂型研究。E-mail: 444096585@qq.com

Key words: resveratrol; temperature-sensitive gel; sustained release; bladder cancer; bladder perfusion

膀胱癌是世界第十大最常见癌症,又称泌尿系癌症,其致命性排第13位^[1-2]。GLOBOCAN数据资料显示,2018年诊断出患膀胱癌的55万人中,近20万人被夺走生命。流行病学调查报告表明,膀胱癌患者已占全世界总人数的0.5%~1.0%,而发病率仍在逐年上涨,在我国达0.42%。70%的膀胱癌早期可通过尿道膀胱肿瘤电切术切除^[3],但5年内复发率高达50%,且进一步发展为肌层浸润性膀胱癌的可能性约14%^[4]。手术切除结合膀胱灌注化疗是国际上防止膀胱癌复发、转移的主要手段^[5]。但膀胱灌注具有一定的局限性,一方面膀胱尿路上皮层的渗透性很低,限制了药物的疗效,一方面灌注的药物易随尿液排出,膀胱内滞留时间短,需频繁实施膀胱灌注给药。频繁膀胱灌注导致患者治疗依从性很差,如何延长药物在膀胱内的滞留时间是膀胱灌注给药化疗急需解决的问题。

原位凝胶剂是一种体外呈低黏度流动液体状态,给药后可迅速响应体内环境而在给药部位形成固态凝胶的一类制剂^[6-8]。溶胶-凝胶相转变性质可防止药物流失,延长药物在给药部位的滞留时间^[9],已被研究用于膀胱灌注治疗,在凝胶中加入产气物质,还可降低凝胶的体密度,使之漂浮于尿液中,有效避免药物随尿液排出体外^[10-11]。

白藜芦醇是一种具抗炎、抗肿瘤等多种药理作用的多酚类化合物^[12-14],已有研究证明,白藜芦醇可抑制膀胱癌细胞增殖并诱导细胞凋亡,且可选择性的作用于膀胱肿瘤组织而不影响正常的膀胱黏膜,是一种潜在的极具价值的抗膀胱癌药物^[15-16]。本研究以白藜芦醇为模型药物,泊洛沙姆407(P407)、泊洛沙姆188(P188)、海藻酸钠、碳酸钙(CaCO_3)、 NH_4HCO_3 (NH_4HCO_3)为凝胶基质,制备温敏型凝胶剂,通过最低胶凝温度、起浮时间、溶蚀时间考察制剂特征,采用扫描电镜、傅里叶变换红外光谱对凝胶结构进行表征,通过体外释放研究、细胞实验进行体外评价,拟获得1种新型的膀胱灌注给药制剂,改善液体化疗药物膀胱灌注后易随尿液排出的缺点,降低膀胱灌注频率,提高患者顺应性。

1 材料

1.1 主要仪器

LC-100紫外分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司);LQ-C3002电子天平(昆山优科维特电子科技有限公司);FA2004分析天平(上海舜宇恒平科

学仪器有限公司);DF-101S集热式恒温加热磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限责任公司);RC-6溶出度测试仪(山东欧莱博仪器有限公司);T09-1S酶标仪、Sorvall ST 8R离心机[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];3131二氧化碳培养箱(美国热电公司);FD-1C-50冷冻干燥机(上海继谱电子科技有限公司);Inspect扫描电子显微镜(美国FEI公司);ALPHA红外光谱仪(BRUKER OPTICS, Germany)。

1.2 主要试剂

白藜芦醇对照品(批号R19J12S138916,质量分数>98%)、白藜芦醇原料药(批号R19J12S138916,质量分数>98%),上海源叶生物科技有限公司;P407(BASF SE, Germany, 批号GNC22022B);P188(山东优索化工科技有限公司,批号C15179922);海藻酸钠(国药集团化学试剂有限公司,批号9005-38-3); CaCO_3 (天津市致远化学试剂有限公司,批号2021011082); NH_4HCO_3 (天津市科欧化学试剂有限公司,批号Q/12HB 3817-2017);分析甲醇(天津市风船化学试剂科技有限公司,批号20220714);磷酸盐缓冲液(大连美仑生物科技有限公司,批号BC20230815);DMEM培养基、青链霉素双抗、0.25%胰蛋白酶[赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司];MTT试剂、二甲基亚砜(DMSO,索莱宝科技有限公司);胎牛血清(浙江天航生物科技股份有限公司,批号22050201)。

1.3 实验细胞

小鼠膀胱癌细胞MB49-LUC(湖南丰晖生物科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 白藜芦醇凝胶剂的制备

采用冷溶法^[17]制备凝胶。称取处方量P407、P188、海藻酸钠溶于7.5 mL蒸馏水中,于4℃冰箱中冷藏,使完全溶解;称取处方量 CaCO_3 、 NH_4HCO_3 、白藜芦醇溶解或分散于2.5 mL蒸馏水中,2份溶液在低于20℃条件下搅拌混匀后放置4℃冰箱中充分溶胀,即得。

2.2 含量测定^[18-19]

2.2.1 标准曲线的绘制 称取白藜芦醇对照品,精密称定0.03 g,置于100 mL棕色量瓶中,甲醇溶解并定容制得对照品储备液,精密移取对照品储备液适量,甲醇稀释,制成质量浓度分别为1.8、2.7、3.6、4.5、6.3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的白藜芦醇对照品溶液,以甲醇作

空白对照,在306 nm处测量其吸光度(A)值。

以 A 值对质量浓度(ρ , $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)进行线性回归,得到回归方程: $A=0.1503\rho+4.600\times 10^{-3}$ ($R^2=0.9996$)。结果表明白藜芦醇在0.9~6.3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 线性良好。

2.2.2 样品测定 精密量取白藜芦醇凝胶0.25 mL于50 mL棕色量瓶中,甲醇超声溶解,冷却后定容,过0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液1 mL于10 mL棕色量瓶,甲醇稀释定容后,取稀释液0.25 mL于10 mL棕色量瓶中,再次用甲醇稀释定容,得到供试品溶液。取适量供试品溶液,以甲醇溶液作空白对照,在306 nm处测量其 A 值。

2.3 最低胶凝温度、起浮时间、溶蚀时间的测定

采用试管倒置法^[20]测定最低胶凝温度。取2 mL凝胶溶液密封于试管中,置恒温水浴中缓慢升温,每升高1 $^{\circ}\text{C}$ 倒置试管30 s,凝胶溶液不流动时的温度即为最低胶凝温度。以样品连续3次测量结果相同的温度记为该样品的最低胶凝温度。

取2 mL凝胶溶液,注入37 $^{\circ}\text{C}$ pH值为5的醋酸水溶液中,在轻微搅动下(20 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$),凝胶脱离杯底悬浮于液体中的时间即为起浮时间。

取2 mL凝胶溶液,注入37 $^{\circ}\text{C}$ pH值为5的醋酸水溶液中,4 h后,再转移至37 $^{\circ}\text{C}$ 蒸馏水中,每隔4 h以20 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的桨速搅动15 min,观察凝胶完全溶蚀消失的时间即为溶蚀时间。

2.4 白藜芦醇凝胶剂的制备

2.4.1 凝胶基质的筛选 泊洛沙姆是常用温敏型高分子材料。本实验以P407和P188为凝胶基质,筛选具有适宜最低胶凝温度的混合基质浓度和比例。按“2.1”项下制备方法,称取处方量P407溶于10 mL蒸馏水中,于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷藏溶胀直至完全溶解,分别制备浓度为16%、19%、21%的P407溶液。预试验显示,白藜芦醇可以显著降低P407和P188混合基质的最低胶凝温度,常使其最低胶凝温度降低20 $^{\circ}\text{C}$ 以上。据此,设定P407和P188混合基

质的最低胶凝温度筛选目标为大于50 $^{\circ}\text{C}$ 。P407作为主要胶凝材料,其水溶液浓度小于16%时不胶凝,大于21%时溶液黏稠度较高,流动性不好,不易实施膀胱灌注,故选择中间浓度19%作为P407的用量,并以此为基础通过添加P188调节最低胶凝温度。固定P407浓度为19%,分别制备P188浓度为5%、7%和9%的溶液,结果显示(表1),随着P188的加入,混合基质的最低胶凝温度明显升高,当P188的用量为7%、9%时,最低凝胶温度均达到50 $^{\circ}\text{C}$ 以上,考虑到泊洛沙姆总浓度越大,溶解越困难,选择7%。

2.4.2 凝胶增强剂的筛选 筛选出的仅以泊洛沙姆作为基质的凝胶强度较低,溶蚀时间过短,无法达到长时间释放药物的目的。为增加凝胶强度,延长溶蚀时间,需在已筛选出的凝胶基质之中添加凝胶增强剂。考察了聚乙烯醇(PVA)、甲基纤维素(MC)、海藻酸钠、海藻酸钠与 CaCO_3 联用对于凝胶的溶蚀时间延长的效果。按“2.1”项下制备方法,固定P407浓度为19%、P188浓度为7%,分别制备PVA浓度为1.5%、2.5%和4.0%的溶液,MC浓度为1.0%、1.5%和2.0%的溶液,海藻酸钠为0.3%、0.6%和0.75%的溶液。结果显示,PVA与泊洛沙姆不互溶,无法形成均一凝胶,MC对延长凝胶溶蚀时间无明显作用,海藻酸钠可延长溶蚀时间至2~3 d。但海藻酸钠浓度越高,溶液越黏稠,流动性越差,不利于膀胱灌注。固定P407、P188和海藻酸钠浓度分别为19.0%、7.0%和0.3%,制备 CaCO_3 浓度为0.06%、0.15%、0.30%的溶液。结果显示,0.3%海藻酸钠与0.06% CaCO_3 联合使用可以显著延长溶蚀时间,使溶蚀时间超过50 d。过高的 CaCO_3 加入量会影响凝胶存放后的流动性。所选凝胶增强剂的加入均对凝胶的最低胶凝温度没有明显影响。

2.4.3 产气剂用量的筛选 产气剂是赋予凝胶漂浮性能的主要物质。本实验考察了添加0.2%~1.0%的 NH_4HCO_3 对凝胶漂浮性能及溶蚀性能的影响。按“2.1”项下制备方法,固定P407 19%、P188

表1 凝胶基质的考察($n\geq 3$)
Table 1 Investigation of gel matrices ($n\geq 3$)

凝胶基质	状态	最低胶凝温度/ $^{\circ}\text{C}$	溶蚀时间/h
16% P407	无色液体	不胶凝	—
19% P407	无色液体	29	0.94±0.10
21% P407	无色黏稠液体	24	1.05±0.09
19% P407+5% P188	无色液体	48	1.10±0.17
19% P407+7% P188	无色液体	52	1.15±0.15
19% P407+9% P188	无色液体	57	1.25±0.08

7%、海藻酸钠 0.3%、CaCO₃ 0.06%，分别制备NH₄HCO₃浓度为0.1%、0.2%、0.3%、1.0%的溶液。结果显示(表2)，添加0.2%~0.3%的NH₄HCO₃对凝胶的溶蚀时间和最低胶凝温度无明显影响。但是，NH₄HCO₃用量过大则会导致在产气的过程中凝胶崩解。根据以上结果，选择P407 19%、P188 7%、海藻酸钠 0.3%、CaCO₃ 0.06%、NH₄HCO₃ 0.2%为空白漂浮凝胶处方。

表2 产气剂NH₄HCO₃的考察($n \geq 3$)
Table 2 Investigation of NH₄HCO₃ gas producing agent ($n \geq 3$)

NH ₄ HCO ₃ /%	起浮时间/h	溶蚀时间/d	最低胶凝温度/℃
0.2	3.56±0.10	>50	52
0.3	3.67±0.17	>50	52
1.0	1.32±0.17	<1	50

2.4.4 载药量的筛选 白藜芦醇的加入显著降低最低胶凝温度，由52℃下降至26℃，且这种性质不具有浓度相关性，各载药量下的温敏型凝胶的最低胶凝温度均为26℃。载药量对溶液流动性和凝胶的机械强度有影响，过高的载药量使溶液流动性下降，甚至导致凝胶的机械强度降低。结果见表3。

兼顾流动性、机械强度和长时间释放药物的所需药量，选择的载白藜芦醇量为30%。最终确定温敏型凝胶剂的处方为白藜芦醇30%，P407 19%、P188 7%、海藻酸钠0.3%、CaCO₃ 0.06%、NH₄HCO₃

表3 载药量的考察($n \geq 3$)
Table 3 Investigation of drug loading ($n \geq 3$)

载药量/%	状态	最低胶凝温/℃	溶蚀时间/d	起浮时间/h
0	无色液体	52	>50	3.61±0.1
1.5	乳白色流体	26	>50	3.89±0.26
15	乳白色流体	26	>50	3.94±0.48
20	乳白色流体	26	>50	3.89±0.26
30	乳白色流体	26	>50	3.94±0.34
40	流动性很差	无法测定	机械强度低	无法测定

0.2%。所制备的凝胶剂26℃以上胶凝为固态，表面及内部可见微小气泡(图1)。

2.4.5 验证实验 根据最优处方制备3批凝胶剂进行验证实验，分别对最低凝胶温度、胶凝时间、起浮时间、溶蚀时间进行考察，并测定药物含量。结果见表4。

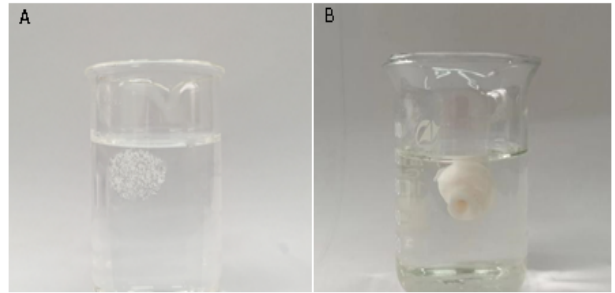


图1 空白凝胶(A)、载药凝胶(B)的漂浮状态
Fig. 1 Floating state of blank gel (A) and drug-loaded gel (B)

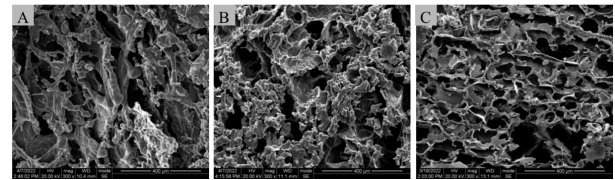
表4 验证实验结果
Table 4 Validation of experimental results

序号	胶凝时间/s	起浮时间/h	溶蚀时间/d	最低胶凝温度/℃	药物质量浓度/(g·mL ⁻¹)	药物质量浓度RSD/%
1	40	3.67	>50	26	0.258	2.52
2	45	3.67	>50	26	0.250	
3	40	4.17	>50	26	0.263	

2.5 凝胶的表征

2.5.1 扫描电镜 将胶凝后的空白凝胶和载药凝胶置于-20℃冰箱中冷冻24h，再将冷冻后的凝胶放入冷冻干燥机中干燥96h，取适量冻干样品轻轻黏于导电胶上，离子溅射喷镀，通过扫描电子显微镜观察其结构。

凝胶扫描电镜如图2所示，A、B、C分别为载药凝胶的表面、断面及空白胶凝表面的微观结构。凝胶具有层状和网状微观结构，使其可以装载大量药物，并实现药物的缓释。载药凝胶孔洞较空白凝胶致密，可能是白藜芦醇填充入网状结构内的结果。



A-载药凝胶表面；B-载药凝胶断面；C-空白凝胶表面。
A-drug-loaded gel surface; B-drug-loaded gel section; C-blank gel surface

图2 温敏型凝胶的微观结构
Fig. 2 Microstructure of temperature-sensitive gel

2.5.2 傅里叶变换红外表征 采用KBr压片法对白藜芦醇、P407、P188、海藻酸钠、白藜芦醇凝胶冻

干粉进行红外光谱测量,在400~4 000 cm^{-1} 进行扫描。

各样品的红外扫描结果如图3所示,白藜芦醇红外光谱中,3 289.53 cm^{-1} 处宽而强的峰为缔和—OH的特征峰,1 587.49、1 510.58 cm^{-1} 为苯环的吸收峰;海藻酸钠红外光谱中,3 452.42 cm^{-1} 为缔和—OH的特征峰,1 631.44、1 416.55 cm^{-1} 处为—COO⁻不对称和对称伸缩振动峰;泊洛沙姆红外光谱中,3 451.25、3 447.67 cm^{-1} 处为缔和—OH的伸缩振动峰,2 876.98 cm^{-1} 处为—CH₂—的伸缩振动峰,1 644.85 cm^{-1} 处为C=C的伸缩振动峰,1 105.36 cm^{-1} 处为—CO—的伸缩振动峰;在凝胶红外光谱中,—OH特征峰的位置较之在白藜芦醇、泊洛沙姆、海藻酸钠的红外光谱图中有较大变化,可能是分子间通过氢键相互作用的结果。凝胶红外光谱中的各物质的特征峰没有明显消失,表明各材料的官能团没有发生明显的化学变化,相容性良好。

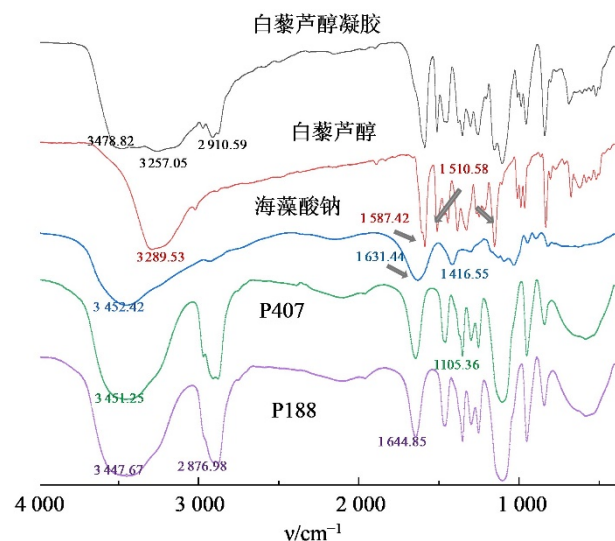


图3 不同样品的红外分析图

Fig. 3 Infrared analysis diagram of different samples

2.6 凝胶的体外释放

体外释药通过溶出度测定仪测定,设定溶出温度为37 $^{\circ}\text{C}$,桨速分别为100、0 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。取6份2 mL凝胶溶液分别注入500 mL pH值为5的醋酸缓冲溶液中,于4 h时取样,更换释放介质为500 mL水。将取出的样品溶液加甲醇稀释至10 mL,经0.22 μm 微孔滤膜滤过,紫外分光光度计测定白藜芦醇含量,于设定时间更换水溶液并取样检测,计算药物累计释放率。

本实验设计的白藜芦醇温敏型凝胶剂在灌注初期需对尿液进行酸化以促进 Ca^{2+} 和 CO_2 的释放,

通过 Ca^{2+} 与海藻酸钠交联增强凝胶的溶蚀时间,产生的 CO_2 则均匀分布于整个凝胶,使凝胶稳定漂浮于尿液中,尿液酸化可通过服用氯化铵实现。尿液pH值会在服用氯化铵后3~8 h内下降到5.3以下,并随着氯化铵的代谢消除而恢复至正常值(pH值6~8),为了模拟体内尿液酸化过程,本实验采用pH值为5的醋酸水溶液为首次释放介质,水为后续释放介质,研究凝胶的体外释放规律。

体外释放结果(图4)显示,100 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 和0 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下,药物均能长时间稳定释放。在100 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的桨速下,药物释放较快,80 d内累计释放50.37%,且仍在持续释放中;在0 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 桨速下,药物也能够稳定释放,但释放较为缓慢,51 d累计释放23.36%,可以预测,该凝胶在生理条件下仍将具有相对理想的药物缓释作用。

2.7 白藜芦醇原料药体外抗肿瘤活性研究

2.7.1 细胞培养与准备 MB49-LUC细胞培养在含体积分数为10%胎牛血清、1%双抗的DMEM培养基中,于5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中孵育,细胞贴壁并长至培养瓶体积的80%~90%后,胰酶消化细胞,取100 μL 细胞悬液稀释,在倒置显微镜下通过细胞计数板计算细胞个数,调整至所需细胞浓度。

2.7.2 细胞迁移实验 采用划痕实验进行检测。将MB49-LUC细胞悬液以每毫升含 1×10^6 个细胞的密度接种于6孔板中,每孔2 mL,于细胞培养箱中培养,待细胞铺满接种板90%后,用200 μL 枪头划3条直线,弃去培养基,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,除去刮起漂浮的细胞,进行药物干预。实验共设置5个组别,分别为对照组(不加药)和不同浓度(30、60、120、150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)白藜芦醇原料药组,药物溶液以DMSO配制成终浓度为150 $\text{mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的储备液,再用含1%胎牛血清的培养基配制。于药物干预前和药物干预48、120 h后采集图像,观察细胞迁移情况,并通过Image J软件按下式计算划痕愈合率。

$$\text{划痕愈合率} = (\text{初始面积} - \text{终时间点面积}) / \text{初始面积}$$

各时间点的迁移情况如图5所示,120 h划痕愈合率如表5所示,对照组愈合率为21.64%,各浓度白藜芦醇愈合率分别为30.79%、11.70%、5.39%、5.11%,与对照组相比,白藜芦醇在60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下即可显著抑制MB49-LUC细胞的迁移($P < 0.05$),表明低浓度白藜芦醇即可对膀胱癌细胞起到一定的抑制作用,并且这种抑制作用随浓度的提高而增强。同时也观察到30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组愈合率较对

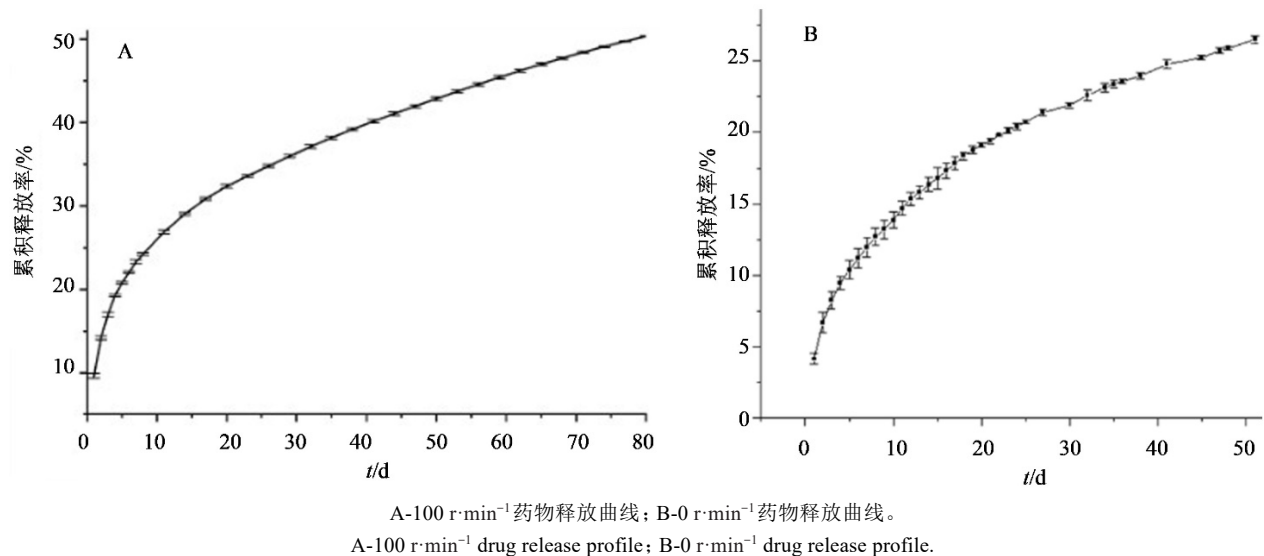


图 4 白藜芦醇温敏型凝胶体外释曲线 ($n=3$)
Fig. 4 *In vitro* release profile of resveratrol temperature-sensitive gel ($n=3$)

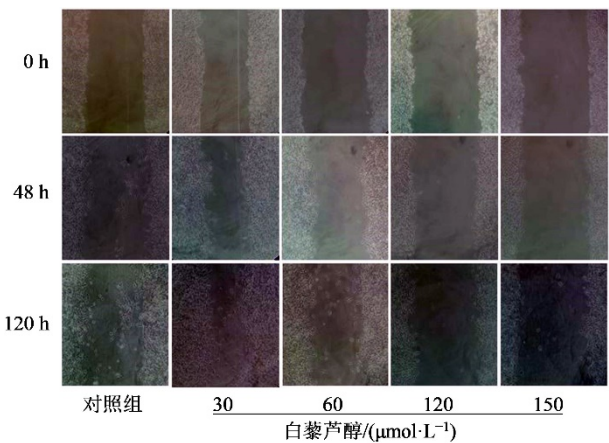


图 5 各时间点细胞迁移图
Fig. 5 Cell migration diagram at each time point

表 5 各浓度下划痕愈合率

Table 5 Scratch healing rates at each concentration		
组别	浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	愈合率/%
对照	—	21.64 $\pm$ 0.06
白藜芦醇	30	30.79 $\pm$ 0.44*
	60	11.70 $\pm$ 1.04*
	120	5.39 $\pm$ 0.19*
	150	5.17 $\pm$ 0.02*

与对照组比较: * $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs control group

照组高,这可能是由于低浓度白藜芦醇对膀胱癌的抑制作用短时间内还未体现出,而药物组中溶解药物的DMSO又对细胞功能具有一定的影响^[21],而这种影响在其他较高浓度药物组中被药物掩盖了。

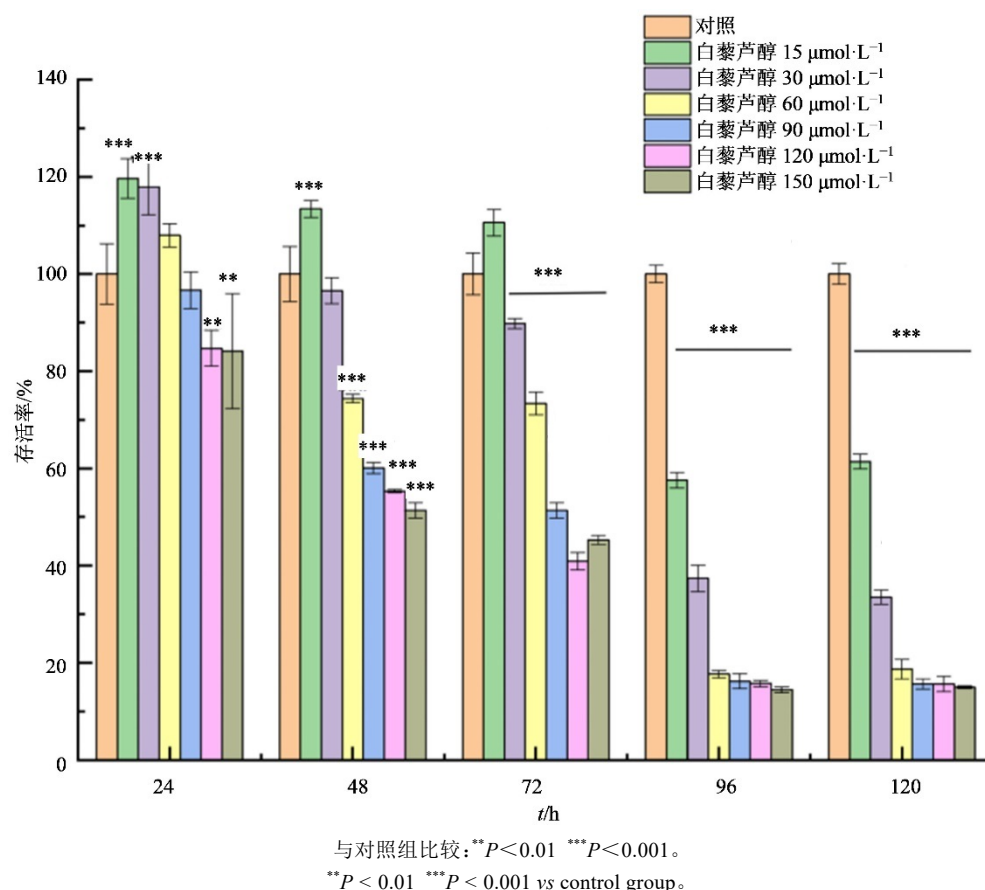
2.7.3 MTT 实验 将细胞悬液以 $9.4\times 10^4\cdot\text{mL}^{-1}$ 个细胞的密度接种于 96 孔板,每孔 200 μL ,于细胞培

养箱中培养 24 h 使完全贴壁后进行药物干预。实验共设置 7 个组,分别为对照组(完全培养基)和不同质量浓度(15、30、60、90、120、150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)白藜芦醇原料药组,每组设置 3 个复孔,分别于药物干预 24、48、72、96、120 h 后加入 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 MTT 溶液 20 μL ,继续培养 4 h。最后,弃去 96 孔板中溶液,每孔加入 150 μL DMSO 溶液,避光放置 10 min 使结晶充分溶解,酶标仪在 490 nm 处测定各孔 A 值,计算细胞存活率。

计量资料均以 $\bar{x}\pm s$,采用 SPSS 26.0 软件,统计分析方法是单因素方差分析。当 $P<0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

由于膀胱内尿液量的生理波动,以及膀胱的排尿作用,白藜芦醇温敏型凝胶剂在膀胱内释放出的药物浓度具有周期波动性。由体外溶出实验可知,溶出介质中白藜芦醇的最大浓度可达其在水中的饱和溶解度(131 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[22]。因此,白藜芦醇温敏型凝胶剂在尿液中释放的白藜芦醇浓度波动范围为 0~131 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。为了考察在这一浓度范围内白藜芦醇的抗肿瘤效果,设计了本体外抗肿瘤活性实验。

MTT 实验结果见图 6。与对照组比较,白藜芦醇 24 h 的 120、150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组,48 h 的 60、90、120、150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组,72 h 的 30、60、90、120、150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组,96、120 h 的 15、30、60、90、120、150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞存活率显著下降($P<0.01$ 、 0.001)。在同一时间下,随着药物浓度的增大,细胞毒性逐渐增大,表明白藜芦醇的抗肿瘤活性具有明显的浓度相关性;在相同浓度

图6 不同浓度白藜芦醇体外细胞毒性比较($n=3$)Fig. 6 Comparison of cytotoxicity of resveratrol with different concentration *in vitro* ($n=3$)

下,随着时间的增加,细胞存活率逐渐下降,表明白藜芦醇的抗肿瘤活性又具有明显的时间相关性。各低剂量组在短时间内的细胞毒作用均不明显,尤其是 $15\sim 60\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的3个较低剂量组在短期内未表现出细胞毒作用,但随作用时间的延长,细胞毒作用逐渐显现,表明低浓度的白藜芦醇可以依靠时间相关性起到抑制肿瘤细胞的作用。更准确的体内抗肿瘤效果有待进一步开展体内实验进行研究。

3 讨论

本实验以P407、P188为凝胶基质,以海藻酸钠和 CaCO_3 为凝胶增强剂, NH_4HCO_3 为产气剂,采用冷溶法制备了白藜芦醇温度敏感型凝胶剂。该凝胶在低于 $26\ ^\circ\text{C}$ 条件下为自由流动的液体,在膀胱生理条件下胶凝为固态,药物从漂浮凝胶中缓慢释放时间长达80 d,具有显著的缓释效果。

细胞迁移实验证明,白藜芦醇在 $60\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下即可抑制MB49-LUC细胞的迁移,并且这种抑制作用随浓度的提高而增强。细胞毒性实验证明,白藜芦醇各低剂量组在短时间内的细胞毒作用均不明显,但随作用时间的延长,细胞毒作用逐渐显

现,尤其是低浓度的白藜芦醇随着时间的延长也具有很好的抑制肿瘤细胞的作用。因此白藜芦醇温敏型凝胶制剂可以依靠自身长时间释放药物能力和白藜芦醇的时间依赖性起到抑制肿瘤细胞的作用。

本实验以海藻酸钠和 CaCO_3 为凝胶增强剂,在实际膀胱灌注白藜芦醇原位漂浮凝胶剂之前,患者可预先服用酸化尿液的药物(氯化铵或维生素C等)来达到酸化尿液的效果,在酸性环境下,体系中的钙离子被释放出,与海藻酸钠交联,形成强相互作用的“蛋盒结构”,起到增强凝胶剂强度的作用。该方法制备的温敏型凝胶剂,具有良好的缓释特性,可有效降低给药频率,提高患者顺应性,有望成为膀胱癌治疗中膀胱灌注化疗的替代给药形式^[23]。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.

- [2] Antoni S, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Bladder cancer incidence and mortality: A global overview and recent trends [J]. Eur Urol, 2017, 71(1): 96-108.
- [3] Saginala K, Barsouk A, Aluru J S, et al. Epidemiology of bladder cancer [J]. Med Sci, 2020, 8(1): 15.
- [4] Kurth K H, Bouffieux C, Sylvester R, et al. Treatment of superficial bladder tumors: Achievements and needs. The EORTC Genitourinary Group [J]. Eur Urol, 2000, 37 (Suppl 3): 1-9.
- [5] Oliveira M B, Villa Nova M, Bruschi M L. A review of recent developments on micro/nanostructured pharmaceutical systems for intravesical therapy of the bladder cancer [J]. Pharm Dev Technol, 2018, 23(1): 1-12.
- [6] Buwalda S J, Boere K W, Dijkstra P J, et al. Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials [J]. J Control Release, 2014, 190: 254-273.
- [7] Dragan E S. Design and applications of interpenetrating polymer network hydrogels. A review [J]. Chem Eng J, 2014, 243: 572-590.
- [8] 谢伟杰, 张永萍, 徐剑, 等. 原位凝胶新型给药系统的现代研究进展 [J]. 黔南民族医专学报, 2015, 28(1): 9-13.
Xie W J, Zhang Y P, Xu J, et al. Progress of modern researches of the *in situ* gel new drug delivery system [J]. J Qiannan Med Coll Natl, 2015, 28(1): 9-13.
- [9] Fathalla Z M A, Vangala A, Longman M, et al. Poloxamer-based thermoresponsive ketorolac tromethamine *in situ* gel preparations: Design, characterisation, toxicity and transcorneal permeation studies [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2017, 114: 119-134.
- [10] Lin T S, Wu J H, Zhao X Z, et al. *In situ* floating hydrogel for intravesical delivery of adriamycin without blocking urinary tract [J]. J Pharm Sci, 2014, 103(3): 927-936.
- [11] Zhu G C, Zhang Y F, Wang K K, et al. Visualized intravesical floating hydrogel encapsulating vaporized perfluoropentane for controlled drug release [J]. Drug Deliv, 2016, 23(8): 2820-2826.
- [12] 张栋, 杨小杰, 雒启东, 等. 白藜芦醇抑制膀胱癌细胞体外侵袭能力的研究 [J]. 现代泌尿外科杂志, 2019, 24 (10): 855-858.
Zhang D, Yang X J, Luo Q D, et al. Resveratrol inhibits the invasion capability of bladder cancer cells *in vitro* [J]. J Mod Urol, 2019, 24(10): 855-858.
- [13] 王真, 陈立伟. 白藜芦醇抗肿瘤药理作用机制研究进展 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(2): 445-452.
Wang Z, Chen L W. Research progress in antitumor mechanism of resveratrol [J]. Drug Eval Res, 2023, 46 (2): 445-452.
- [14] 杨萍. 白藜芦醇通过调控信号通路治疗膝骨关节炎的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(4): 1311-1320.
Yang P. Research progress on resveratrol in treatment of knee osteoarthritis by regulating signaling pathway [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(4): 1311-1320.
- [15] 吴茉莉. 白藜芦醇短时定期治疗对膀胱癌的抑制作用及其主要分子靶点 [D]. 大连: 大连医科大学, 2014.
Wu M L. Inhibitory effect of short-term regular treatment of resveratrol on bladder cancer and its main molecular targets [D]. Dalian: Dalian Medical University, 2014.
- [16] 张栋, 杨小杰, 雒启东, 等. 白藜芦醇促进膀胱癌细胞对 TRAIL 凋亡诱导作用的研究 [J]. 现代泌尿外科杂志, 2019, 24(2): 141-144.
Zhang D, Yang X J, Luo Q D, et al. Resveratrol sensitizes bladder cancer cells to TRAIL-induced apoptosis [J]. J Mod Urol, 2019, 24(2): 141-144.
- [17] 李星, 束怡, 丁明和, 等. 温度敏感型布洛芬缓释液体栓的制备与体内外评价 [J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31 (17): 1410-1413.
Li X, Shu Y, Ding M H, et al. Preparation and evaluation of thermosensitive ibuprofen sustained-release liquid suppository *in vitro* and *in vivo* [J]. Chin J Hosp Pharm, 2011, 31(17): 1410-1413.
- [18] 王晴晴, 王晓楠, 余双双, 等. 白藜芦醇滴丸的制备工艺与质量标准研究 [J]. 广东化工, 2020, 47(8): 16-18.
Wang Q Q, Wang X N, Yu S S, et al. Preparation and quality standard research of resveratrol dropping pills [J]. Guangdong Chem Ind, 2020, 47(8): 16-18.
- [19] 要辉. 白藜芦醇脂质体温敏凝胶剂制备及对外周神经损伤修复的研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2020.
Yao H. Preparation of resveratrol lipid thermosensitive gel and study on the repair of peripheral nerve injury [D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine, 2020.
- [20] 姜杰, 贾运涛, 田睿, 等. 眼用小檗碱白蛋白纳米粒温敏原位凝胶的制备及性质研究 [J]. 中草药, 2013, 44(3): 277-281.
Lou J, Jia Y T, Tian R, et al. Preparation and characterization of thermosensitive *in situ* gel containing berberine bovine serum albumin nanoparticles for ophthalmic drug delivery [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2013, 44(3): 277-281.
- [21] 张鑫. 低浓度二甲基亚砜对 RANKL 诱导的 RAW_{264.7} 细胞破骨分化影响的体外研究 [D]. 唐山: 华北理工大学, 2018.
Zhang X. Effect of low concentration dimethyl sulfoxide on osteoclast differentiation of RAW_{264.7} cells induced by RANKL *in vitro* [D]. Tangshan: North China University

- of Science and Technology, 2018.
- [22] 唐宏伟. 水溶性白藜芦醇的制备与性能研究 [D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2019.
- Tang H W. Study on preparation and properties of water-soluble resveratrol [D]. Changsha: Central South University of Forestry & Technology, 2019.
- [23] 曹锴. 基于树状分子PAMAM及温敏漂浮凝胶的膀胱灌注药体系的构建及评估 [D]. 南京: 南京大学, 2016.
- Cao K. Construction and evaluation of drug delivery system for bladder perfusion based on dendrimer PAMAM and temperature-sensitive floating gel [D]. Nanjing: Nanjing University, 2016.

[责任编辑 兰新新]

=====

•公益广告•

