

• 药剂与工艺 •

盐酸小檗碱/叶酸-壳聚糖纳米粒的制备及其对 CNE-1 细胞的抑制作用

温宝芳¹, 李文涛¹, 庄宝祥¹, 张维芬^{2*}, 赵立民^{3*}

1. 潍坊医学院临床医学院, 山东 潍坊 261053

2. 潍坊医学院药学院, 山东 潍坊 261053

3. 潍坊医学院附属医院 耳鼻喉头颈外科, 山东 潍坊 261031

摘要: 目的 制备载盐酸小檗碱(berberine hydrochloride, BH)的叶酸(folic acid, FA)偶联壳聚糖(chitosan, CTS)纳米粒(BH/FA-CTS-NPs), 优化制备工艺并考察 BH/FA-CTS-NPs 的理化特性及其对 CNE-1 细胞的抑制作用。方法 利用 FA 活性酯与 CTS 分子上的氨基反应, 制得 FA 偶联 CTS(FA-CTS); BH 为模型药物, 通过离子交联法制备 BH/FA-CTS-NPs。考察其形态、粒径、包封率、载药量及体外释放等理化特性; 分别通过 MTT 法、划痕实验和 Annexin-V-FITC 单染法进行检测, 验证 BH/FA-CTS-NPs 对 CNE-1 细胞的抑制作用、抗增殖侵袭能力以及诱导凋亡作用。结果 透射电镜下观察所得 BH/FA-CTS-NPs 形态外观圆整, 大小均匀, 无粘连, 平均粒径为 (282.4 ± 4.5) nm; 包封率为 (89.82 ± 2.91) %; 载药量为 (9.16 ± 1.01) %; 5 h 内累积释药率为 (80.32 ± 3.24) %, 随后缓慢释放, 24 h 内累积释药率为 (90.92 ± 5.21) %。CNE-1 细胞实验显示, BH/FA-CTS-NPs 能够显著抑制 CNE-1 细胞的生存和增殖能力, 诱导细胞 CNE-1 凋亡, 具有剂量和时间依赖性。结论 离子交联法成功制备具有体外缓释作用的 BH/FA-CTS-NPs, 形态圆整, 粒径大小均一, 对抑制 CNE-1 细胞增殖及促进凋亡效果好, 为开发抗肿瘤给药系统提供了理论依据。

关键词: 叶酸; 壳聚糖; 盐酸小檗碱; 纳米粒; 偶联; 离子交联法; MTT 法; 划痕实验; Annexin-V-FITC 单染法; 抗肿瘤; 抗增殖侵袭能力; 凋亡

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2016)20-3594-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.20.008

Preparation and inhibition effects on CNE-1 cells of folate-conjugated chitosan nanoparticles loaded with berberine

WEN Bao-fang¹, LI Wen-tao¹, ZHUANG Bao-xiang¹, ZHANG Wei-fen², ZHAO Li-min³

1. Clinical College, Weifang Medical University, Weifang 261053, China

2. College of Pharmacy, Weifang Medical University, Weifang 261053, China

3. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Affiliated Hospital of Weifang Medical University, Weifang 261031, China

Abstract: Objective To prepare folate-conjugated chitosan nanoparticles loaded with berberine hydrochloride (BH/FA-CTS-NPs) and investigate the optimizing technology, physicochemical characterizations, and inhibitory effect on CNE-1. **Methods** Folate-conjugated chitosan (FA-CTS) was prepared by amino reaction of folic acid active ester and chitosan molecules; BH/FA-CTS-NPs were prepared using ion cross-linking technique with BH as a model drug. The morphology, particle size, and physicochemical characteristics such as entrapment efficiency (EE), drug-loading, and release *in vitro* of nanoparticles were studied. The effect of cell anti-migratory and anti-invasive actions of BH/FA-CTS-NPs was investigated using MTT assays, wound healing

收稿日期: 2016-05-30

基金项目: 国家科技部科技计划项目(2013GA740103); 山东省自然科学基金资助项目(ZR2012CM025); 山东省科技攻关项目(2012YD18063); 山东省潍坊市科技计划项目(2014WS045)

作者简介: 温宝芳(1987—), 女, 回族, 山东菏泽人, 潍坊医学院 2014 级研究生, 研究方向为耳鼻咽喉头颈外科疾病药物新剂型与新技术。Tel: 18263665120 E-mail: wenbaofang_521@163.com

***通信作者** 张维芬(1966—), 硕士生导师, 博士, 教授, 研究方向为药物新剂型与新技术研究。Tel: (0536)8462067 E-mail: zwf2024@126.com
赵立民(1964—), 硕士生导师, 副教授, 研究方向为耳鼻咽喉头颈外科相关疾病诊治。Tel: 13869651631 E-mail: 13869651631@163.com

assays and Annexin-V-FITC single staining assays, respectively. **Results** The prepared BH/FA-CTS NPs were round, and the size uniformity adhesion was not found. The results of mean particle size, EE, and drug-loading amount were (282.4 ± 4.5) nm, $(89.82 \pm 2.91)\%$, and $(9.16 \pm 1.01)\%$, respectively. $(80.32 \pm 3.24)\%$ of BH in nanoparticles was released within 5 h and then released slowly, and the accumulative release rate within 24 h was $(90.92 \pm 5.21)\%$. These results by MTT assay and wound healing assay indicated that BH/FA-CTS NPs not only inhibited the proliferation of CNE-1 cells in a concentration- and time-dependent manner, but can induced apoptosis. **Conclusion** BH/FA-CTS NPs with the sustained release effect could be prepared successfully by the ionic crosslinking method. Considering these properties, block proliferation and impair the migration of the CNE-1 cell line, BH/FA-CTS NPs could be an important compound for consideration in the treatment of nasopharyngeal carcinoma.

Key words: folic acid; chitosan; berberine hydrochloride; nanoparticles; coupling; ionic crosslinking; MTT assay; wound healing assay; Annexin-V-FITC single staining assay; antitumor; anti-invasion; apoptosis

鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 是鼻咽部最常见的上皮细胞恶性肿瘤^[1], 发病机制不明确, 早期结合逆向调强放疗 (intensity modulated radiation therapy, IMRT) 或放疗等辅助手段可以提高局部控制率^[2], 晚期辅助化疗因分子靶向性低、患者依从性及顺应性差等原因, 治疗效果不佳^[3]。近年来分子靶向治疗鼻咽癌方面开展了多项临床研究^[4], 但临床常用的抗肿瘤药物价格昂贵且选择性低, 在杀伤肿瘤细胞的同时也对机体产生许多严重的毒副作用^[5], 因此, 寻找具有靶向抗肿瘤作用、低毒且高效的新型靶向治疗药物是临床所需。

盐酸小檗碱 (berberine hydrochloride, BH) 是一种天然生物碱, 已知的药理活性包括抗炎、抗胆碱能、抗菌、抗高血压、抗氧化应激和抗包括鼻咽癌在内的多种类型肿瘤活性^[6-7], 有关 BH 作为抗肿瘤制剂应用于临床治疗各种晚期癌症的研究受到越来越多的关注^[8]。但 BH 为季胺盐类生物碱, 稳定性差, 药物剂型及给药方式大多以片剂及 im 和静脉滴注为主, 易被胃肠道中的黏蛋白吸附而影响吸收, 生物利用度低, 难以达到其发挥药理作用的有效浓度^[9]; 剂量增大易引起过敏性休克、药疹等不良反应, 临床应用受到很大限制^[10]。因此, 研发适用于临床应用的 BH 制剂以增加 BH 的稳定性、提高生物利用度、减少给药剂量、降低毒副作用以及实现对肿瘤组织的靶向性和缓控释性尤为重要。

叶酸 (folic acid, FA) /FA 受体可在多种类型的细胞中高表达, 而在正常组织中几乎不表达^[11]。利用 FA 受体能特异性识别配体这种特性, 制备针对 FA 受体的主动靶向制剂以提高药物的靶向性^[12-13]。壳聚糖 (chitosan, CTS) 是一种带正电的天然高分子化合物多糖, 来源丰富且价格便宜, 具有良好的生物相容性、无毒性、可降解性和生物黏附性, 越来越广泛地应用到生物医用材料缓释、靶向给药等

领域^[14-16]。本研究选用 CTS 为载体, 用离子交联法制备载 BH 的 FA 偶联 CTS 纳米粒 (BH/FA-CTS-NPs) (图 1), 并优化制备工艺, 检测其理化特性及评价其对鼻咽癌 CNE-1 细胞的生长抑制及诱导凋亡作用, 以期对临床鼻咽癌的治疗提供新的理论依据。

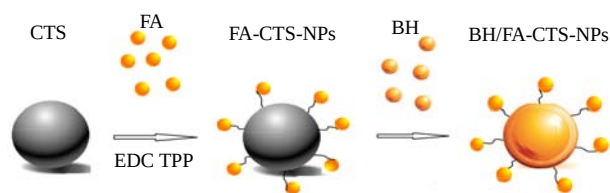


图1 BH/FA-CTS-NPs 模式图

Fig. 1 Schematic formation of BH/FA-CTS-NPs

1 仪器与材料

Mastersizer 2000 激光粒度分析仪, 英国马尔文公司; 85-2 恒温磁力搅拌器, 江苏金坛市环宇科学仪器厂; MCFD5508 冷冻干燥机, 美国西盟公司; 自动酶标仪, 美国伯腾仪器有限公司; HNA-122DTABAI 型 CO₂ 恒温培养箱, 日本三洋公司; EL204 型电子天平, 梅特勒-托利多仪器有限公司; UV-8000/8000A/8000S 双光束紫外分光光度计, Ultraviolet Spectrophotometric, 上海元析仪器有限公司; FIIR-650 傅里叶变换红外光谱, 天津港东科技发展股份有限公司。

CTS, 脱乙酰度 $\geq 96.5\%$, 山东莱州市海力生物制品有限公司; 冰乙酸, 分析纯, 青岛海滨试剂; BH, 200911, 质量分数 93%, 北京华清美恒天然产物技术开发有限公司; 磷酸二氢钠、磷酸氢二钠, 分析纯, 上海化学试剂公司; FA、三聚磷酸钠 (TPP)、N-羟基丁二酰亚胺 (NHS)、N'-二环己基碳二亚胺 (DCC)、无水二甲基亚砷 (DMSO), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 其余试剂均为分析纯, 水为超纯水。CNE-1 细胞, 北京解放军总医院实验室赠

送;胎牛血清,杭州四季青生物技术公司;DMEM培养基,美国Gibco公司;BH/FA-CTS-NPs(自制)以2%冰醋酸溶解,配制母液浓度5 mmol/L,0.45 μm 微孔滤膜滤过灭菌,-20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存,临用前用细胞培养基稀释至所需浓度。MTT 试剂盒、Annexin V-FITC 试剂盒,南京凯基生物试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 BH/FA-CTS-NPs 的制备

2.1.1 CTS-NPs 的制备^[17] 称取 50 mg CTS 溶于 1%醋酸溶液中,得到 1 g/L CTS 醋酸水溶液,用 6 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 5.5,过 0.45 μm 滤膜。称取适量 TPP 溶于超纯水配制成 1 g/L TPP 溶液,过 0.45 μm 滤膜。持续匀速磁力搅拌作用下,将 TPP 溶液逐滴缓慢滴入 CTS 醋酸水溶液中,搅拌 20 min,得到具有淡蓝色透明乳光的 CTS-NPs。

2.1.2 FA 活性酯的制备^[18] 三乙胺 1 mL 加入 10 mL DMSO 中混合均匀,加入 FA 10 mg 避光搅拌过夜。次日,将 25 mg DCC 和 12.5 mg NHS 溶解在 10 mL DMSO 中,两溶液混合后暗处搅拌过夜。加入 0.5 mL 冰乙酸,继续反应 4 h(除去多余 DCC)后,静置冷藏 0.5 h,抽滤并收集滤液所得即为 FA 活性酯。

2.1.3 FA-CTS 冻干粉末及其纳米粒的制备 称取 100 mg CTS 溶于 50 mL 10%的醋酸溶液中,逐滴滴加 10.0 mol/L 的 NaOH 将溶液的 pH 值调至 6.0。磁力搅拌下缓慢加入得到的 FA 活性酯的 DMSO 溶液(10 g/L),室温下避光搅拌过夜。反应结束后用 10 mol/L 的 NaOH 溶液调节 pH 至 9.0,离心并用蒸馏水洗涤数遍,冷冻干燥,得到淡黄色固体粉末即为 FA-CTS 冻干粉。利用傅里叶变换红外光谱仪,将冷冻干燥的 FA-CTS 置于室温下 KBr 压片。同样制备 FA、CTS 样品作对比。结果见图 2,FA-CTS 偶合物是以 CTS 分子链上质子化的氨基与 FA 分子结构上脱质子化的羧基之间利用静电作用结合在一起。图中 FA-CTS 偶合物曲线上 1 605、1 462 cm^{-1} 出现类似芳环骨架伸缩导致的振动峰波,说明 FA 与 CTS 偶合成功。FA 的 1 706 cm^{-1} 羧基峰(-COOH)消失可以说明 CTS 中的氨基与 FA 分子的羧基是静电作用相互结合在一起。用 FA-CTS 代替 CTS 后按“2.1.1”项方法制备 FA-CTS-NPs。

2.1.4 BH/FA-CTS-NPs 溶液的制备^[19] 将 FA-CTS 冻干粉末溶于 1%醋酸溶液中得 1 g/L FA-CTS 溶液。称取处方量 BH 粉末溶于适量无水乙醇中,超声至

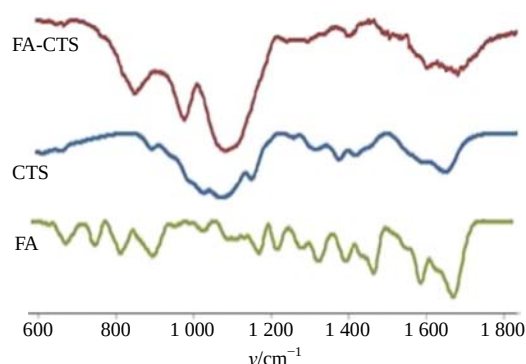


图2 FA-CTS、CTS 和 FA 的红外光谱图

Fig. 2 IR spectra of FA-CTS, CTS, and FA

完全溶解,得 BH 无水乙醇溶液。将两者混合,室温持续搅拌下,缓慢加入 TPP 溶液,搅拌 30 min,得到 BH/FA-CTS-NPs 混悬液。CTS 代替 FA-CTS 后,同样的方法制备 BH/CTS-NPs。

2.1.5 正交试验优化 BH/FA-CTS-NPs 处方 在纳米粒的制作过程中,粒径的大小是纳米粒制作成功与否的重要指标之一,在制作出合适粒径的纳米粒之后,再用包封率和载药量等理化特性对所制备的纳米粒进行综合评价^[20-21]。本实验以 BH 为模型药物,前期曾以粒径为指标,通过单因素实验考察各工艺因素对纳米粒粒径的影响后,根据实验过程中得知药物载体比例(BH/FA-CTS)及添加剂(TPP)用量,再以 FA-CTS 用量(A)、BH 用量(B)、交联剂 TPP 用量(C)为 3 个因素,每个因素设 3 个水平,以粒径为筛选指标, $L_9(3^4)$ 正交设计表进行处方优化。正交试验设计及结果见表 1,方差分析见表 2。极差(R)值越大表示该因素的影响越明显,由表 1 可知各影响因素的主次顺序为 $B > C > A$;由表 2 可知,因素 B 的影响最具有显著性($P < 0.05$),因素 A、C 无显著性;最优处方为 $A_1B_1C_1$,即 FA-CTS 为 0.5 g/L、BH 为 0.5 g/L、TPP 为 0.5 g/L。

2.2 BH/FA-CTS-NPs 的形态学特征及粒径分布

按最优处方量制备得到 BH/FA-CTS-NPs。室温下透射电镜(TEM)观察其形态,使用激光粒度分析仪测定其平均粒径、Zeta 电位和粒径分散指数(PDI)。所制得的 BH/FA-CTS-NPs 形态圆整、大小均一,为球类粒子(图 3),平均粒径为 (282.4 ± 4.5) nm ($n=6$)(图 4),Zeta 电位为 (-17.3 ± 1.2) mV ($n=6$)(图 5),PDI 为 0.043 ± 0.016 ($n=6$),粒度分布均匀呈单峰。

2.3 BH/FA-CTS-NPs 包封率、载药量的测定

2.3.1 BH 特征吸收波长的选择 称取 BH 对照品

表 1 正交试验设计及结果

Table 1 Design and results of orthogonal test

试验号	A/(g·L ⁻¹)	B/(g·L ⁻¹)	C/(g·L ⁻¹)	平均粒径/nm
1	0.5 (1)	0.5 (1)	0.5 (1)	265.2
2	0.5 (1)	1.0 (2)	1.0 (2)	339.9
3	0.5 (1)	1.5 (3)	1.5 (3)	475.2
4	1.0 (2)	0.5 (1)	1.5 (3)	315.2
5	1.0 (2)	1.0 (2)	0.5 (1)	367.8
6	1.0 (2)	1.5 (3)	1.0 (2)	491.3
7	1.5 (3)	0.5 (1)	1.0 (2)	282.9
8	1.5 (3)	1.0 (2)	1.5 (3)	409.8
9	1.5 (3)	1.5 (3)	0.5 (1)	442.0
K ₁	1 083.3	863.3	1 075.0	
K ₂	1 174.3	1 117.5	1 114.1	
K ₃	1 134.7	1 408.5	1 200.2	
R	91.0	545.2	125.2	

表 2 方差分析

Table 2 Analysis of variance

方差来源	离均差平方和	自由度	F 值	显著性
A	0.001 48	2	1.843	
B	0.049 61	2	61.590	P<0.05
C	0.002 73	2	3.395	

$F_{0.05}(2, 2) = 19.00$ $F_{0.01}(2, 2) = 99.00$

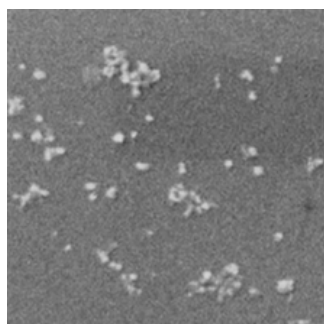


图 3 BH/FA-CTS-NPs 的 TEM 图

Fig. 3 TEM photograph of BH/FA-CTS-NPs

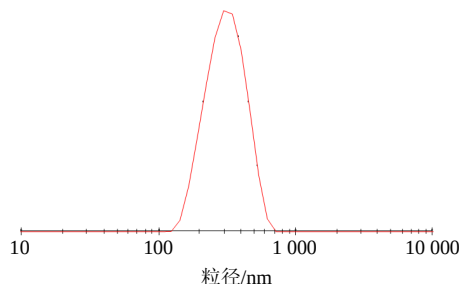


图 4 BH/FA-CTS-NPs 平均粒径分布 (n = 6)

Fig. 4 Mean particle size distribution of BH/FA-CTS-NPs (n = 6)

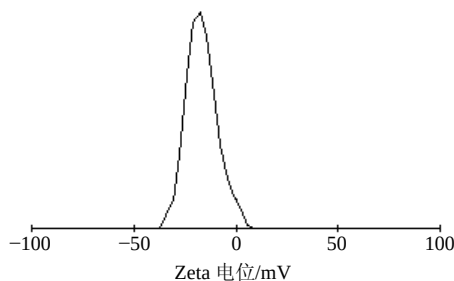


图 5 BH/FA-CTS-NPs 的 Zeta 电位图 (n = 6)

Fig. 5 Zeta potential of BH/FA-CTS-NPs (n = 6)

适量, 蒸馏水溶解后紫外分光光度仪在 200~800 nm 进行扫描, 得最大吸收波长在 421 nm 处。

2.3.2 标准曲线的绘制 用蒸馏水配制 0.5 g/L 的 BH 标准溶液储备液。分别精密移取上述储备液 0.2、0.6、0.8、1.0、1.4、1.8 mL, 移入 50 mL 量瓶中定容, 即得质量浓度为 2.0、6.0、8.0、10.0、14.0、18.0 mg/L 的标准溶液供试液。在 421 nm 波长处分别测定不同质量浓度 BH 供试液的吸光度 (A) 值, 以 A 值对质量浓度 (C) 进行线性回归, 回归方程为 $A = 0.0138C + 0.0152$ ($R^2 = 0.9996$, $n = 3$), 当 BH 质量浓度在 2.21~19.31 μg/mL 时, 线性关系良好。

2.3.3 BH 载药纳米粒的包封率、载药量的测定 将制备的 BH/FA-CTS-NPs 水分散体系, 5 000 r/min 超速离心 20 min。收集上清, 定容至 50 mL 量瓶中, 通过紫外可见光光度计测定 421 nm 下的 A 值, 带入标准曲线计算游离 BH 的量。BH 包封率与载药量分别按下式计算, 结果包封率和载药量分别为 $(89.82 \pm 2.91)\%$ 和 $(9.16 \pm 1.01)\%$ ($n = 3$)。

包封率 = (BH 总量 - 游离 BH 的量) / BH 总量

载药量 = (BH 总量 - 游离 BH 的量) / 纳米粒子的量

2.4 BH/FA-CTS-NPs 中 BH 的体外释放

取一定量 BH/FA-CTS-NPs 悬液于透析袋中, 采用转篮法测 BH 的体外释放。转速 50 r/min, 温度 $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。释放介质: PBS 缓冲液 (pH 7.4)。间歇收集释放液 2 mL, 同时补充等量的释放介质。将收集的释放液稀释, 其中 BH 的定量测定方法见“2.3”项。A 值均以未载药微球同样条件下的释放介质为参比。结果见图 6, 可以看出 BH/FA-CTS-NPs 中 BH 有很好的缓控释作用。BH 在最初的几小时内有一个快速释放, 0.5 h 内累积释放率分别为 $(32.91 \pm 3.91)\%$, 5 h 内累积释放率为 $(80.32 \pm 3.24)\%$, 这可能是吸附于纳米粒表面的药物释放所致, 这一特性有利于药物的快速起效; 中期的 5 h 至 24 h 间接近匀速释放, 24 h 内累积释放率分别为

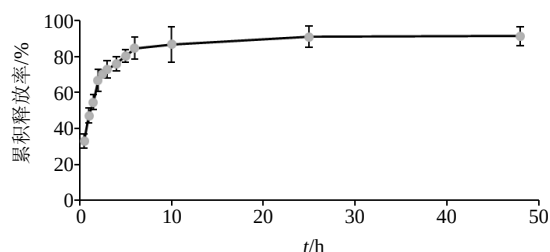


图6 BH/FA-CTS-NPs的体外释放 (PBS pH 7.4, $n=3$)

Fig. 6 Release profile of BH/FA-CTS-NPs (PBS pH 7.4, $n=3$)

(90.92 ± 5.21)%, 说明包裹在纳米粒内部的BH通过纳米粒中孔隙的扩散所致; 24 h后释放非常缓慢, 25 h后释放基本结束。

药物从骨架型缓控释系统中释放的评价方法不同。Yasir等^[22]曾用 Higuchi 方程进行氟哌啶醇固体脂质纳米粒经鼻入脑的体外药物释放和药物动力学评价, 发现一级释放模型和 Higuchi 方程拟合, 且后者能更好地描述壳聚糖纳米粒的体外释放曲线。为了进一步探讨 BH 纳米粒体外释放机制, 采用 Higuchi 方程拟合其体外释放曲线后发现, BH/FA-CTS-NPs 的体外释放标准曲线为 $Y=0.653\ 5\ X+47.169$, $R^2=0.378\ 6$, 表明 BH 从固体骨架剂载药体系中非匀速释放, 遵循单位面积的释放量与时间的平方根成直线关系, 具有较好的缓释效果, 符合水不溶性骨架的释药性能, 适合应用于缓控释药物制剂。

2.5 MTT 法测定 BH/FA-CTS-NPs 对 CNE-1 细胞的抑制率

2.5.1 细胞培养 人鼻咽癌 CNE-1 细胞株培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中, 置于 5% CO_2 细胞培养箱中, 恒温 37 °C 培养。每 1~2 d 换液 1 次, 使用 0.25%胰蛋白酶消化传代, 取对数生长期的细胞进行实验。

2.5.2 MTT 法测定 BH/FA-CTS-NPs 对 CNE-1 细胞的抑制率 取处于对数生长期的 CNE-1, 胰酶消化后进行细胞计数并将细胞的浓度调整为 1×10^5 个/mL, 用新鲜培养液制备成单细胞悬液, 按照每孔 100 μL 接种于 96 孔板中, 放置于 37 °C、含 5% CO_2 的二氧化碳培养箱中培养 24 h 观察细胞贴壁情况, 弃去原培养液, 加入不同物质。分组如下: 未处理组, 只接种细胞; 空白对照孔, 只加 DMSO、MTT 培养液, 不接种细胞; 实验组 1, 接种细胞并每孔加入含 BH 浓度为 5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的 BH 混悬液 50 μL 、培养液 50 μL , 每组设 3 个复孔;

实验组 2, 接种细胞并加入含 BH 浓度为 5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的 BH/CTS-NPs 50 μL 、培养液 50 μL , 每组设 3 个复孔; 实验组 3, 接种细胞并加入含 BH 浓度为 5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的 BH/FA-CTS-NPs 50 μL 、培养液 50 μL , 每组设 3 个复孔。同样条件培养 24、48 h, 取出培养板, 每孔加入 10 μL 新鲜配制含 5 mg/mL MTT 的培养液, 继续培养 4 h, 弃上清液终止培养, 每孔加 150 μL DMSO 溶解, 水平摇床上振荡混匀, 未处理孔调零, 酶标仪测定波长为 490 nm 时 A 值, 用下面公式计算药物对细胞的抑制率。结果见图 7。

细胞增殖抑制率 = (对照组平均 A 值 - 给药组平均 A 值) / 对照组平均 A 值

由结果可知, 各组 BH 制剂在不同时间作用于 CNE-1 细胞后, 细胞的生长均受到不同程度明显的抑制作用, 随着制剂浓度增大, 作用时间延长, 细胞的生长抑制作用也更为明显, 可以看出 BH 制剂对 CNE-1 细胞的生长抑制作用具有较明显的量效和时效关系; 不同 BH 制剂对细胞抑制作用也具有明显差异, BH/FA-CTS-NPs 对细胞的抑制作用强于 BH/CTS-NPs 和 BH 原料药组, 这可能是由于 FA 可以与肿瘤细胞表面的 FA 受体特异性结合增强了 BH 对 CNE-1 细胞的靶向性而导致。

2.6 BH/FA-CTS-NPs 对 CNE-1 细胞迁移能力影响

调整细胞浓度为 1×10^7 个/mL, 吸 1 mL 细胞悬液接种于 6 孔板, 加入 DMEM 培养 6 h, 待细胞呈单层贴壁生长状态时, 用 10 μL Eppendorf Tip 在细胞板上划痕, 培养液洗细胞 3 次, 依次加入含 BH 浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 BH 溶液、BH/CTS-NPs、BH/FA-CTS-NPs 及 0.05% DMSO (对照) 组, 另设未处理组, 每组设 3 个复孔, 放入 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后, 取样并拍照, 用 Image-Pro Plus 6.0 软件测量划痕的距离, 计算平均值与标准差。以 DMSO 组为对照, 进行组间比较。细胞的迁移能力以迁移率表示, 结果见图 8。

迁移率 = (原划痕宽度 - 现划痕宽度) / 原划痕宽度

实验结果显示, 未处理组、对照组以及 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 BH 溶液、BH/CTS-NPs、BH/FA-CTS-NPs 处理组在 0 h 时, 划痕距离大体相同。24 h 后, 未处理组 (迁移率 100%) 与对照组 [迁移率 (98.00 ± 1.41) %] 划痕距离明显缩短, 两者相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。而各 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 BH 制剂处理组划痕距离增宽 [BH、BH/CTS-NPs、BH/FA-CTS-

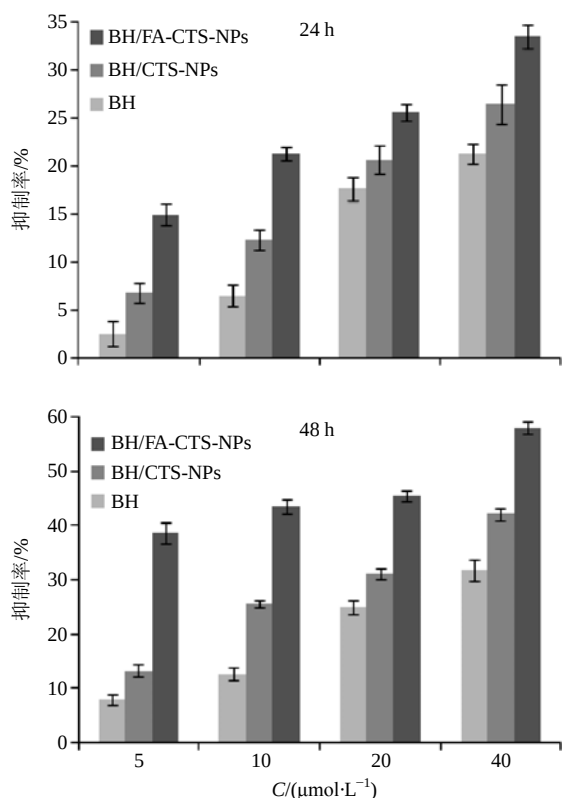


图7 MTT法测定24 h和48 h时BH/FA-CTS-NPs对CNE-1的增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Inhibitory rates of BH/FA-CTS NPs on CNE-1 cells at different time points by MTT ($\bar{x} \pm s, n=3$)

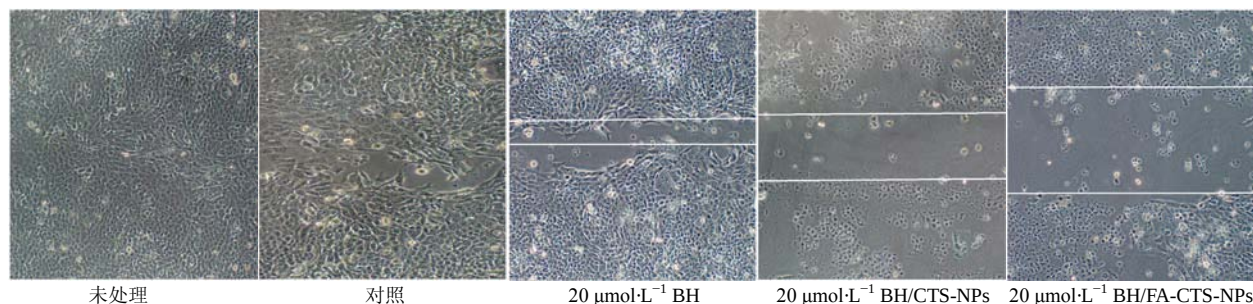


图8 BH/FA-CTS-NPs对CNE-1细胞迁移能力的影响

Fig. 8 Effect of BH/FA-CTS-NPs on migration of CNE-1 cells

与对照组和DMSO组相比明显增加,差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。各BH制剂组间相比较凋亡细胞数量差异也具有统计学意义 ($P<0.05$)。且细胞凋亡率的程度与MTT结果一致,证明了实验的可靠性。

3 讨论

本实验通过偶联法制备BH/FA-CTS-NPs。即先制备FA活性酯,与CTS上的氨基反应得到FA-CTS,然后与TPP通过离子交联法制备FA-CTS-NPs,最后用吸附法将抗肿瘤药物BH进行包埋(图

NPs组迁移率分别为(58.00 ± 2.24)%、(35.00 ± 2.10)%、(16.00 ± 1.45)%,与未处理组和DMSO组相比迁移率明显降低,差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。各BH制剂组间相比较划痕距离差异也具有统计学意义 ($P<0.05$)。

2.7 BH/FA-CTS-NPs对CNE-1细胞凋亡的影响

分别收集含BH浓度为 $20 \mu\text{mol/L}$ 的BH、BH/CTS-NPs、BH/FA-CTS-NPs作用24 h的CNE-1细胞,用胰酶消化, 1000 r/min 离心5 min, 4°C 预冷的PBS洗2次, 1000 r/min 离心5 min,弃上清收集细胞。另设未处理组和DMSO(对照)组。

加入250 mL的Binding Buffer重悬细胞,取 $100 \mu\text{L}$ 的细胞悬液于5 mL流式管中,加入 $5 \mu\text{L}$ Annexin V/FITC混匀后室温避光孵育5 min。滴一滴上述细胞悬液于载玻片,盖玻片盖上细胞并将盖玻片倒置后,于荧光显微镜下观察,结果如图9所示。结果显示,各加药组的细胞凋亡率[BH、BH/CTS-NPs、BH/FA-CTS-NPs组凋亡率分别为(10.36 ± 1.21)%、(28.31 ± 2.07)%、(62.41 ± 2.11)%]比未处理组[(0.13 ± 0.01)%]和对照组[(0.16 ± 0.01)%]明显增高 ($P<0.05$)。在作用24 h,未处理组与对照组细胞凋亡数量较少,两者相比,差异无统计学意义 ($P>0.05$),而各BH制剂处理组凋亡细胞数量

1)。You等^[17]用该方法制备了FA修饰靶向抗肿瘤纳米粒的粒径小且形态均匀呈球形,本实验在其方法基础上,优化药物载体比例,所制备的纳米粒粒径在 $200 \sim 400 \text{ nm}$,粒径与之前的研究相比要小且均一。谢黎崖等^[18]用离子交联法制备CTS-NPs时发现,在相同条件下粒径的大小随着CTS的相对分子质量增大而变大,本实验前期分别采用3个相对分子质量CTS(1.1×10^6 、 9.0×10^5 、 6.0×10^5)进行制备,发现在其他实验条件相同的情况下,CTS相对分子质量越小,所形成的纳米粒粒径越小,这与

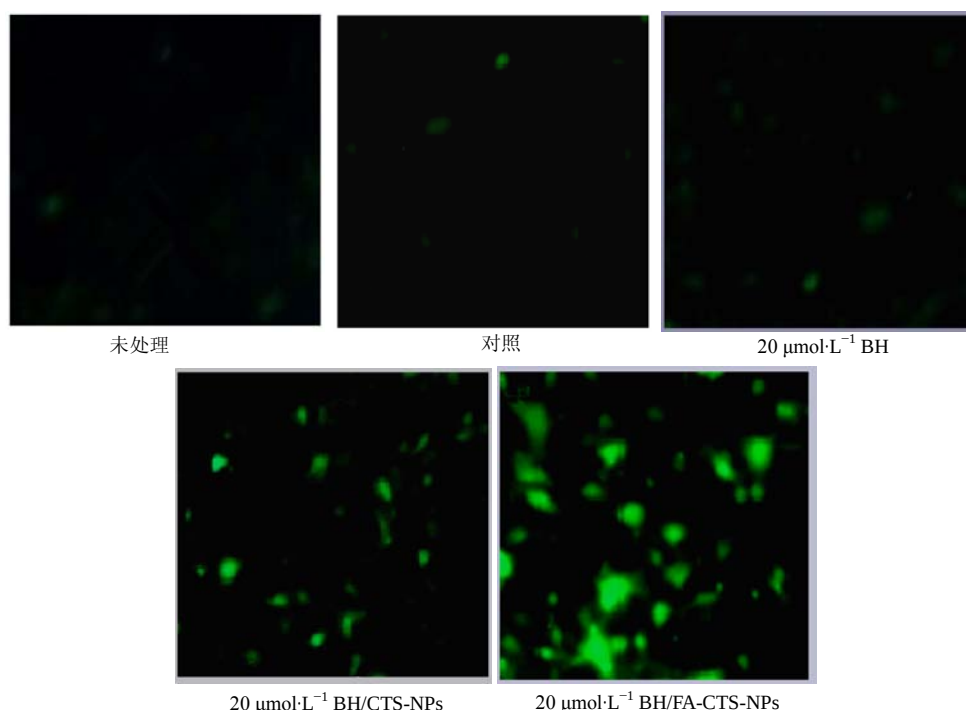


图 9 BH/FA-CTS-NPs 诱导的 CNE-1 细胞凋亡

Fig. 9 Apoptosis in CNE-1 cells induced by BH/FA-CTS-NPs

之前的研究是相同的,且本实验过程中发现,纳米粒的平均粒径越小,包封率相对较大,这可能是由于粒径越小,表面积越大,表面载药或者内部包裹的药物相对增多,这与 Kim 等^[8]对于纳米粒粒径大小的研究相一致。

Cosco 等^[23]发现纳米粒粒径愈大,被包封于内的药物量愈多,相对释放的量愈少,如果 CTS 纳米粒的粒径在几十天内未发生变化,只靠药物的缓慢渗透而使药物释放率发生变化很慢,这时需要添加辅酶来帮助释放。而本实验所得纳米粒 24 h 累积释放率达到 90%,说明在无添加辅酶的情况下大部分药物可以完全释放,释放性能较好,较适合制备成缓控释制剂进一步应用于临床研究。Yasir 等^[22]发现 Higuchi 方程能更好地描述 CTS 纳米粒的体外释放曲线,本实验所制纳米粒拟合其体外释放曲线后发现 BH 从固体骨架剂载药体系中非匀速释放,遵循单位面积的释放量与时间的平方根成直线关系,这种较好的缓释效果符合水不溶性骨架的释药性能,适合应用于缓控释药物制剂。

在比较 BH/FA-CTS-NPs、BH/CTS-NPs 和 BH 原料药抑制 CNE-1 细胞增殖作用之前,先进行预实验筛选出 NPs 和原料药的有效作用浓度范围及 IC₅₀,以此设立 BH/FA-CTS-NPs 的浓度梯度后,采用 MTT 法测定不同纳米粒组不同剂量浓度对

CNE-1 细胞的生长抑制率。与 BH 原料药和 BH/CTS-NPs 同浓度组相比较,含 BH 20 μmol/L 的 BH/FA-CTS 抑制 CNE-1 细胞增殖、体外迁移及诱导大量细胞凋亡作用显著,这可能因为纳米级的 BH 在溶液中的分散性优于普通 BH,FA 特异性靶向肿瘤表面配体的同时,使得 FA-CTS 载药 NPs 更容易附着到更多细胞表面或进入细胞内发挥作用,故而相等的药物浓度中经 FA 修饰的纳米级药物的作用得到显著提升,说明经 FA 修饰的载 BH 纳米粒,具备更好的抗肿瘤转移治疗效果。Li 等^[24]的研究证明了 BH 原料药对于 CNE-1 细胞的抑制作用具有时间和浓度依赖性,而本实验中抑制 CNE-1 细胞增殖所需要的 BH/FA-CTS-NPs 中 BH 的浓度和时间均低于前期的研究报道^[25],说明 BH/FA-CTS-NPs 与单纯原料药 BH 相比,能更好地抑制 CNE-1 细胞迁移及促进其凋亡。但本实验未能进一步明确观察 FA-CTS/BH-NPs 对 CNE-1 细胞的疗效显著提高是否确切为 FA 介导所致,这可以通过激光共聚焦,或游离 FA 竞争抑制等实验技术方法在以后的实验中进一步证实。

参考文献

- [1] Segawa Y, Oda Y, Yamamoto H, *et al.* Close correlation between CXCR4 and VEGF expression and their prognostic implications in nasopharyngeal carcinoma

- [J]. *Oncol Rep*, 2009, 21(5): 1197-1202.
- [2] Peng G, Wang T, Yang K Y, *et al.* A prospective, randomized study comparing outcomes and toxicities of intensity-modulated radiotherapy vs conventional two-dimensional radiotherapy for the treatment of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Radiother Oncol*, 2012, 104(3): 286-293.
- [3] Fountzilas G, Ciuleanu E, Bobos M, *et al.* Induction chemotherapy followed by concomitant radiotherapy and weekly cisplatin versus the same concomitant chemoradiotherapy in patients with nasopharyngeal carcinoma: a randomized phase II study conducted by the Hellenic Cooperative Oncology Group (He COG) with biomarker evaluation [J]. *Ann Oncol*, 2012, 23(2): 427-435.
- [4] Chen C Y, Zhao C, Gao L, *et al.* An open-labeled, multicentric clinical study of cetuximab combined with intensity-modulated radiotherapy (IMRT) plus concurrent chemotherapy in locoregionally advanced (LA) nasopharyngeal carcinoma (NPC): a 2-year follow-up report [J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(Suppl): 5535-5541.
- [5] Chen L, Hu C S, Chen X Z, *et al.* Concurrent chemoradiotherapy plus adjuvant chemotherapy versus concurrent chemoradiotherapy alone in patients with locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma: a phase 3 multicentre randomised controlled trial [J]. *Lancet Oncol*, 2012, 13(2): 163-171.
- [6] Tan W, Li Y, Wang Y, *et al.* Berberine hydrochloride: anticancer activity and nanoparticulate delivery system [J]. *Int J Nanomed*, 2011, 6(1): 1773-1777.
- [7] 万强, 周凤华, 崔小冰, 等. 小檗碱通过 JNK 通路降低内脏脂肪素诱导人脐静脉内皮细胞分泌 IL-6 和 TNF- α 的研究 [J]. 中草药, 2015, 46(7): 1012-1017.
- [8] Kim S, Oh S J, Lee J, *et al.* Berberine suppresses TPA-induced fibronectin expression through the inhibition of VEGF secretion in breast cancer cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 32(5): 1541-1550.
- [9] 尤静, 余丽丽, 杨黎燕. 盐酸小檗碱 β -环糊精微球的制备及体外释药研究 [J]. 应用化工, 2013, 42(3): 447-452.
- [10] 姚金铭, 宋秀玲, 王焕君. 黄连素 (小檗碱) 治疗糖尿病肾病疗效和安全性的系统评价 [J]. 中华临床医师杂志, 2015, 9(13): 4396-4401.
- [11] 杜长丽, 顾月清. 叶酸靶向的肿瘤治疗研究进展 [J]. 药物生物技术, 2012, 19(3): 261-264.
- [12] 于莲, 杜妍, 平洋, 等. 叶酸修饰的水飞蓟宾固体脂质纳米粒体内药动学及靶向性研究 [J]. 中草药, 2014, 45(8): 1110-1114.
- [13] 于莲, 杜妍, 田丽华, 等. 叶酸修饰水飞蓟宾固体脂质纳米粒的制备及其对 A549 细胞抑制作用研究 [J]. 中草药, 2013, 44(2): 158-164.
- [14] Singh T, Vaid M, Katiyar S K, *et al.* Berberine, an isoquinoline alkaloid, inhibits melanoma cancer cell migration by reducing the expressions of cyclooxygenase-2, prostaglandin E and prostaglandin E receptors [J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(1): 86-92.
- [15] 张亚会, 李喜香, 包强, 等. 甘草次酸-壳聚糖纳米粒的制备及其质量评价 [J]. 中草药, 2015, 46(15): 2232-2237.
- [16] 潘永毅, 刘强, 蔡保塔, 等. 密闭性中药海绵敷料的制备研究 [J]. 中草药, 2014, 45(4): 485-489.
- [17] You H, Fu S, Qin X, *et al.* A study of the synergistic effect of folate-decorated polymeric micelles incorporating Hydroxycamptothecin with radiotherapy on xenografted human cervical carcinoma [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2016, 1(140): 150-160.
- [18] 谢黎崖, 胡权, 吴永良. 叶酸和聚乙二醇双修饰的壳聚糖纳米粒的制备及其性能表征 [J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(3): 284-289.
- [19] Kim Y, Park J H, Lee H, *et al.* How do the size, charge and shape of nanoparticles affect amyloid β aggregation on brain lipid bilayer? [J]. *Sci Rep*, 2016, 19(6): 141-153.
- [20] 邢志华, 方桂珍, 苏玲, 等. 羟基喜树碱-壳聚糖纳米粒的制备及其性能研究 [J]. 功能材料, 2012, 43(1): 322-326.
- [21] Haggag Y, Abdel-Wahab Y, Ojo O, *et al.* Preparation and *in vivo* evaluation of insulin-loaded biodegradable nanoparticles prepared from diblock copolymers of PLGA and PEG [J]. *Int J Pharm*, 2015, 30(499): 236-246.
- [22] Yasir M, Sara U V. Solid lipid nanoparticles for nose to brain delivery of haloperidol: *in vitro* drug release and pharmacokinetics evaluation [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2014, 4(6): 454-463.
- [23] Cosco D, Cilurzo F, Maiuolo J, *et al.* Delivery of miR-34a by chitosan/PLGA nanoplexes for the anticancer treatment of multiple myeloma [J]. *Sci Rep*, 2015, 1(5): 175-179.
- [24] Li C H, Wu D F, Ding H, *et al.* Berberine hydrochloride impact on physiological processes and modulation of twist levels in Nasopharyngeal Carcinoma CNE-1 cells [J]. *Res Art*, 2014, 15(4): 1815-1821.
- [25] Eom K S, Hong J M, Youn M J, *et al.* Berberine induces G1 arrest and apoptosis in human glioblastoma T98G cells through mitochondrial/caspases pathway [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(4): 558-562.