

白藜芦醇固体脂质纳米粒抑制小鼠移植性肿瘤 H22 的研究

熊清平*, 张强华, 徐燕萍, 沈诚, 张春燕
(淮阴工学院生化学院, 江苏 淮安 223003)

[摘要] **目的:**研究白藜芦醇固体脂质纳米粒(resveratrol-solid lipid nanoparticles, Res-SLN)对 H22 移植性肿瘤模型小鼠的肿瘤抑制作用。**方法:**将昆明种小鼠接种肝癌 H22 瘤株造成相应的移植性荷瘤小鼠模型后,随机分为荷瘤模型组、环磷酰胺(CTX)阳性药对照组($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), Res-SLN 低、中、高($35, 70, 105 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)3 个剂量组、白藜芦醇(resveratrol, Res)混悬液组($105 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、空白辅料组,以实体瘤模型小鼠的瘤重、抑瘤率观察 Res-SLN 对小鼠移植性肿瘤 H22 的抑制作用;以胸腺指数、脾脏指数为指标观察 Res-SLN 对免疫器官的影响;以小鼠平均生存时间观察 Res-SLN 对腹水瘤模型小鼠的生命延长作用。**结果:**Res-SLN 能有效地抑制实体瘤模型荷瘤小鼠体内肿瘤的生长,低、中、高 3 个剂量组的抑瘤率分别为 61.95%, 72.39%, 85.52%;Res-SLN 给药组小鼠胸腺指数和脾脏指数与荷瘤对照组相比,无显著性差异;Res-SLN 中、高剂量组对腹水瘤肿瘤模型小鼠的生存时间具有延长作用,与荷瘤对照组相比具显著性差异。**结论:**Res-SLN 对荷瘤小鼠肿瘤生长具有一定的抑制作用,抑制作用强于 Res,并有剂量依赖性。

[关键词] 白藜芦醇; 固体脂质纳米粒; 肿瘤抑制作用; 肝癌 H22 细胞株

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)02-0153-04

Study on the Anti-tumor Effect of Resveratrol-solid Lipid Nanopartieles on Mouse H22 Hepatocellular Carcinoma *in vivo*

XIONG Qing-ping*, ZHANG Qiang-hua, XU Yan-ping, SHEN Cheng, ZHANG Chun-yan
(Faculty of Life Sciences and Chemical Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huaian 223003, China)

[Abstract] **Objective:** To study the anti-tumor effect of resveratrol-solid lipid nanoparticles (Res-SLN) on mouse H22 hepatocellular carcinoma *in vivo*. **Method:** KM mice bearing H22 tumor cells were used in this study. It were randomly divided into tumor model group; CTX group ($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); low, middle, high dosage groups of Res-SLN ($35, 70, 105 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); suspensions group of Res ($105 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); auxiliary materials group. The anti-tumor activity of Res-SLN on solid tumor mice was evaluated by tumor mass weight and tumor inhibitory ratio, and the life-prolongation effect on ascitic tumor mice was assessed by average survival time. The influence on the immune organs was evaluated by the indexes of thymus and spleen of mice with transplanted tumor. **Result:** Res-SLN had significant inhibiting effect on transplanted tumor growth in mice. Inhibitory rates of Res-SLN in low, middle, high dose groups on H22 mice were 61.95%, 72.39%, 85.52%, respectively. The differences of indexes of thymus and spleen were insignificant between the ORI-SMEDDS group and model control group. Res-SLN in the middle, high dosage groups had an effect on prolonging the life of mice with transplanted tumor, the statistical difference being significant as compared with the model group. **Conclusion:** Res-SLN shows certain inhibition on the growth of transplanted H22 tumor with dose-dependence, and the inhibitory effect is stronger than oridonin.

[Key words] resveratrol; solid lipid nanoparticles; anti-tumor activity; H22 hepatocellular carcinoma

[收稿日期] 20110621(009)

[基金项目] 江苏省科技厅工业支撑项目(BE2009098);淮安市工业支撑项目(HAG07066)

[通讯作者] *熊清平, 硕士, 从事天然活性成分的提取与药理、毒理研究, Tel: 0517-83591165, Fax: 0517-83591165, E-mail: xqp666@163.com

白藜芦醇 (resveratrol, Res) 是一种含有芪类结构的非黄酮类多酚化合物^[1]。1997 年由 Jang 等^[2]发现其对肿瘤的起始、促进、进展 3 个阶段均有抑制作用。现已表明,达到病灶部位的 Res,能通过抑制 RNA 还原酶和 DNA 聚合酶活性、干扰细胞周期等途径来抑制肝癌细胞增殖,能通过致敏肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL) 来诱导肝癌细胞凋亡,能通过抑制肝癌细胞与纤维粘连蛋白 (FN) 及其基底膜基质的降解等环节来抑制肝癌细胞的侵袭^[3-5],其为继紫杉醇之后又一新的绿色低毒抗癌药物。然而,Res 难溶于水、易氧化分解^[6],致使其普通给药剂剂的生物利用度较低,限制了该药临床应用。固体脂质纳米粒 (solid lipid nanoparticles, SLN) 指利用生理相容、生物可降解的高熔点天然或合成固体脂质为骨架材料 (如卵磷脂、三酰甘油等),将药物包裹或内嵌于类脂核中,制成粒径约为 50 ~ 1 000 nm 的固体胶粒给药系统。该给药系统室温及体温下呈固态粒子,能提高药物溶解性、靶向性及药效^[7]。为此,本文在 Res 和 Res-SLN 制备的基础上^[8-10],通过 H22 移植性荷瘤小鼠模型的实验,研究 Res 和 Res-SLN 的肿瘤抑制作用,为 Res-SLN 用于肿瘤的临床治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠,清洁级,体重 18 ~ 22 g,雌雄各半,由广州中医药大学实验动物中心提供,动物许可证 SYXK[粤]2009-0045。

1.2 药物 虎杖购于淮安市天颐药业有限公司 (产地湖北,批号 200908045,经广州中医药大学张丹雁教授鉴定为正品);Res 由本实验室按文献工艺^[8-9]从中药虎杖中提取,纯度为 96.2%,批号 20090923;Res-SLN:由本实验室按照文献工艺^[10]制备,批号 101105。

1.3 试剂 大豆磷脂 (上海太伟药业股份有限公司);单硬脂酸甘油酯 (上海国药化学试剂有限公司);泊洛沙姆 (poloxamer188,南京威尔化工有限公司);PEG400 (淮安国药集团化学试剂有限公司);NaCl 注射液 (双鹤药业有限公司);注射用环磷酰胺 (江苏恒瑞医药股份有限公司,批号 20090548)。

Res 混悬液:精密称取 60.2 mg Res,将其混悬于水-PEG400 (1 : 0.5),稀释至质量浓度 60.2 g·L⁻¹。

Res-SLN 分散液:精密称取 1.501 g Res-SLN 粉末,缓慢加入 10 mL 注射用水,搅拌使之完全分散溶解,得质量浓度为 150.1 g·L⁻¹ Res-SLN 胶体分散

溶液 (该溶液中载有 Res 为 60.2 g·L⁻¹)。

2 方法

2.1 接种造模 H22 肝癌细胞 7 d 传代 1 次,取第 3 代用于实验,腹水瘤小鼠脱颈椎处死,无菌条件下剖腹取腹水,按 1 : 7 的比例,加入无菌生理盐水稀释,制备肿瘤细胞悬液 (瘤细胞密度约 1 × 10⁷ 个/mL),按 0.1 mL/只的剂量注射接种于小鼠左腋下制备实体瘤模型,按 0.2 mL/只的剂量腹腔注射制备腹水型模型。

2.2 Res-SLN 对荷瘤小鼠抑瘤作用和免疫器官影响 取昆明种小鼠 70 只,按 2.1 项下实体瘤模型的造模方法进行造模,各模型小鼠接种后 24 h,随机分为荷瘤模型组、环磷酰胺 (CTX) 阳性药对照组 (25 mg·kg⁻¹)、Res-SLN 分散液低、中、高 (35, 70, 105 mg·kg⁻¹) 3 个剂量组、白藜芦醇混悬液组 (105 mg·kg⁻¹)、空白辅料对照组,每组 10 只,雌雄各半。实验按设计剂量进行尾静脉注射给药,每天 1 次,连续用药 9 d,实验每天称重 1 次,观察并记录各组小鼠的体重变化情况和生存状况。于末次给药后次日脱颈椎处死小鼠,剥离瘤块称质量,按公式 1 计算抑瘤率;取胸腺及脾脏并称质量,按公式 2 计算胸腺 (脾) 指数。

$$\text{肿瘤抑制率} = \left(1 - \frac{\text{给药组平均瘤质量}}{\text{荷瘤对照组平均瘤质量}} \right) \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{胸腺 (脾) 指数 (mg} \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{\text{胸腺 (脾) 质量 (mg)}}{\text{去瘤后体重 (g)}} \quad (2)$$

2.3 Res-SLN 对腹水型小鼠生存时间的影响 取昆明种小鼠 70 只,按 2.1 项下腹水型模型的造模方法进行造模,分组与给药剂量、途径、天数同 2.2。记录各组小鼠的生存时间,以 60 d 为限,生存时间超过 60 d 按 60 d 计,按公式 3 计算小鼠的生命延长率。

$$\text{生命延长率} = \frac{\text{给药组生存时间} - \text{荷瘤对照组生存时间}}{\text{荷瘤对照组生存时间}} \times 100\% \quad (3)$$

2.4 数据处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析和显著性检验,方差齐时各组间两两比较采用 Bonferroni 检验进行,方差不齐时各组间两两比较采用 Tamhane's T2 检验进行, $P < 0.05$,有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 Res-SLN 对 H22 实体瘤模型小鼠的肿瘤抑制作用 Res-SLN 高、中、低 3 个剂量组对 H22 肝癌实体瘤模型小鼠均表现出明显的抑制作用,各剂量组

H22 荷瘤小鼠的平均瘤重与荷瘤对照组相比,其差异有极显著意义($P < 0.01$), Res-SLN 对 H22 荷瘤小鼠的抑瘤效果具有明显的剂量依赖性,其抑瘤率分别为 61.95%, 72.39%, 85.52%。在相同给药剂量(按 Res 含量计)条件下, Res-SLN 对 H22 肝癌实体瘤模型小鼠抑瘤作用相对于 Res 混悬液对照组,其差异具有显著意义($P < 0.05$), Res-SLN 显著强于 Res 混悬液对照组。空白辅料对照组与荷瘤对照组的平均瘤重差异不大,组间差异不具有统计学意义。见表 1。

表 1 Res-SLN 和 Res 混悬液对荷瘤小鼠抑瘤率的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	瘤重/g	抑瘤率/%
荷瘤对照	-	2.97 ± 0.09	-
空白辅料对照	-	2.74 ± 0.10	7.74
Res 混悬液	105	0.83 ± 0.17 ^{2,3)}	72.05
CTX 对照	25	0.39 ± 0.15 ²⁾	86.87
Res-SLN	35	1.13 ± 0.21 ^{2,3)}	61.95
	70	0.82 ± 0.18 ^{2,3)}	72.39
	105	0.43 ± 0.15 ²⁾	85.52

注:与荷瘤对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与 CTX 对照组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$;白藜芦醇(Res);白藜芦醇固体脂质纳米粒(Res-SLN);(表 2~3 同)。

3.2 Res-SLN 对荷瘤小鼠免疫脏器指数的影响

与荷瘤对照组比较,阳性药对照组小鼠的胸腺(脾)指数降低明显,其差异具有极显著意义($P < 0.01$),但 Res-SLN 3 个剂量组及 Res 混悬液对照组的胸腺(脾)指数降低不明显,组间差异不具有统计学意义,见表 2。

表 2 Res-SLN 和 Res 混悬液对荷瘤小鼠胸腺指数和脾脏指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	胸腺指数/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	脾脏指数/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
荷瘤对照	-	2.20 ± 0.14	14.38 ± 0.16
空白辅料对照	-	2.29 ± 0.15	14.23 ± 0.22
Res 混悬液	105	2.14 ± 0.14 ⁴⁾	13.71 ± 0.17 ³⁾
CTX 对照	25	1.46 ± 0.13 ²⁾	9.17 ± 0.21 ²⁾
Res-SLN	35	2.03 ± 0.19 ⁴⁾	12.71 ± 0.11 ³⁾
	70	1.96 ± 0.13 ³⁾	12.45 ± 0.13 ³⁾
	105	1.98 ± 0.18 ³⁾	11.98 ± 0.16 ³⁾

3.3 Res-SLN 对腹水型小鼠生存时间的影响 与荷瘤对照组比较, Res-SLN 高、中、低 3 个剂量组及 Res 混悬液对照组的 H22 肝癌腹水型小鼠生存时间均长于荷瘤对照组,其中, Res-SLN 高、中 2 个剂量

组对 H22 肝癌腹水型小鼠的生存时间具有明显延长作用, ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 Res-SLN 和 Res 混悬液对腹水型小鼠生存时间的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	生存时间/d	生命延长率/%
荷瘤对照	-	12.13 ± 1.84	-
空白辅料对照	-	12.69 ± 4.10	4.41
Res 混悬液	105	16.83 ± 3.15	27.93
CTX 对照	25	17.01 ± 3.15	28.69
Res-SLN	35	18.13 ± 5.21	33.09
	70	23.75 ± 2.17 ¹⁾	48.93
	105	22.43 ± 3.08 ¹⁾	45.92

4 讨论

固体脂质纳米粒作为一种新型的固体胶粒给药系统,其既可利用“纳米粒的黏附性来增加载药粒子在药物吸收部位的停留时间和接触面积,减少不规则吸收,提高生物利用度,又可充分发挥脂质体的特点,有效提高药物肝脏靶向性^[7]。本研究通过观察比较 Res-SLN 对 H22 移植性肿瘤模型小鼠的“肿瘤抑制作用”的影响,发现在相同剂量下, Res 制备成 Res-SLN 后,其对 H22 肝癌实体瘤模型小鼠抑瘤作用明显增强, Res-SLN 的肿瘤抑制率明显大于 Res 混悬液。通过与空白辅料组肿瘤抑制作用的对比证明: Res-SLN 与 Res 的肿瘤抑制差异并非辅料作用的结果,而是与 Res 制备成 Res-SLN 后,提高了 Res “生物利用度和病灶部位的靶向性”有关。

免疫系统的保护作用是癌症临床用药选择的一重要指标。理想的抗癌药物是在不损伤免疫器官的前提下,实现高效抗癌。本研究发现:与荷瘤对照组比较,阳性药物对照组小鼠的脏器指数明显下降,而 Res-SLN 的各剂量给药组的脏器指数下降值都不具有显著性差异,表明 Res-SLN 在高效抑制肿瘤生长的同时,对小鼠的免疫系统的影响较小。

生存时间的延长作用是评价药物作用的核心指标,是药物作用效果的最终体现。本研究在腹水型小鼠生存时间的实验中发现:与荷瘤对照组比较, Res-SLN 对荷瘤小鼠的生存时间具有延长作用,其中, Res-SLN 的中、高剂量组对荷瘤小鼠的生存时间延长作用显著($P < 0.05$),表明, Res-SLN 能有效抑制荷瘤小鼠腹腔内肿瘤细胞的繁殖生长。

综上, Res 制备成 Res-SLN 后,其对 H22 肝癌实

活血益气方及其拆方药物血清对 VEGF₁₆₅ 转染 脐静脉内皮细胞分泌 MMP-9, MMP-2 的影响

陈萌¹, 娄利霞², 吴爱明², 柴立民², 吕晞滢², 张冬梅^{2*}

(1. 北京中医药大学, 北京 100029;

2. 北京中医药大学东直门医院中医内科学教育部暨北京市重点实验室, 北京 100700)

[摘要] 目的:探讨活血益气方及其拆方含药血清对含有血管内皮生长因子(VEGF)165 的重组质粒 pcDNA3.1-VEGF₁₆₅ 转染人脐静脉内皮细胞(HUVEC)分泌基质金属蛋白酶(MMP)2,9 的影响。方法:构建 pcDNA3.1-VEGF₁₆₅ 重组质粒,采用 Eugene HD 将质粒瞬时转染至 HUVEC 中。制备活血益气方及其拆方含药大鼠血清、生理盐水正常血清,以 5% 药物血清作用于转染后的 HUVEC,Western blot 法检测 VEGF 的表达,ELISA 法测定 MMP-2, MMP-9 的表达。结果:(1)活血益气方组 VEGF 蛋白表达高于生理盐水组,与之比较有统计学差异($P < 0.01$)。拆方各组则低于活血益气方组,与之比较有统计学差异($P < 0.01$)。(2)活血益气方组、活血方组 MMP-2 含量高于生理盐水组,与之比较有统计学差异($P < 0.05, P < 0.01$)。拆方各组中仅益气方组 MMP-2 含量低于活血益气方组,与之比较有统计学差异($P < 0.01$)。(3)活血益气方及其拆方各组 MMP-9 含量均高于生理盐水组,仅活血益气方组、活血方组与之比较有统计学差异($P < 0.01, P < 0.05$)。拆方各组 MMP-9 含量均低于活血益气方组,与之比较有统计学差异($P < 0.01$)。结论:活血益气方可以促进转染后 HUVEC 表达 VEGF 及分泌 MMP-2, MMP-9,活血方药在这方面起主要作用。推测其治疗性血管生成作用机制可能与促进内皮细胞分泌 MMP,从而促进内皮细胞迁移,提高血管通透性有关。

[关键词] 活血益气方;人脐静脉内皮细胞;血管内皮生长因子 165 质粒;转染;基质金属蛋白酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)02-0156-05

[DOI] CNKI:11-3495/R.20111116.1424.007 **[网络出版时间]** 2011-11-16 14:24

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20111116.1424.007.html>

[收稿日期] 20110418(013)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30701117)

[第一作者] 陈萌,博士,副教授,从事方剂配伍规律的研究, Tel:010-64287073, E-mail:cmazy@126.com

[通讯作者] *张冬梅,博士,副研究员,从事中西医结合应用基础研究, Tel:010-84013190, E-mail:chaweto@126.com

体瘤模型小鼠抑瘤作用明显增强,在有效剂量下,对荷瘤小鼠的免疫系统影响较小,生命延长作用明显,值得进一步的研究开发。

[参考文献]

- [1] 冯永红. 白藜芦醇药理作用进展[J]. 国外医药:植物药分册,1996,11(4):155.
- [2] Jang M, Cai L, Udeani G O, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes [J]. Science, 1997, 275 (5297):218.
- [3] Fontecave M, Lepoivre M, Elleingand E, et al. Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase[J]. FEBS Lett,1998,421(3):277.
- [4] Sun N J, Woo S H, Cassady J M, et al. DNA polymerase and topoisomerase II inhibitors from Psoralea corylifolia [J]. J Nat Prod,2003,66(5):734.

- [5] Delmas D, Jannin B, Malki M C, et al. Inhibitory effect of resveratrol on the proliferation of human and rat hepatic derived cell lines[J]. Oncol Rep,2000,7(4):847.
- [6] 陈易彬,孙宝祥,陈佳希,等. 虎杖中白藜芦醇的稳定性研究[J]. 中药材,2007,30(7):805.
- [7] 王影,李京京,陆兵. 固体脂质纳米粒的制备及应用研究进展[J]. 生物技术通讯,2006,17(3):471.
- [8] 张强华,熊清平,石莹莹. 虎杖中 Res 的提取、纯化工艺研究[J]. 中国药房,2009,20(12):909.
- [9] 熊清平,张强华,石莹莹. 虎杖中白藜芦醇罐组式动态逆流提取的中试工艺研究[J]. 中国现代应用药学,2010,27(10):901.
- [10] 张强华,熊清平,石莹莹,等. 白藜芦醇固体脂质纳米粒的制备表征与体外抗肿瘤作用研究[J]. 中药材,2010,33(12):1929.

[责任编辑 聂淑琴]