

叶酸介导表没食子儿茶素没食子酸白蛋白纳米粒的制备及其体外靶向性与活性评价

祖元刚*, 袁 帅, 赵修华, 张 俞, 张晓楠, 姜 茹

(东北林业大学森林植物生态学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: 研究能主动靶向于前列腺癌细胞 PC-3 的表没食子儿茶素没食子酸 (EGCG) 白蛋白 (BSA) 纳米粒的制备工艺与体外靶向性和活性评价。去溶剂法制备叶酸介导 EGCG 白蛋白纳米粒 (FA-EGCG-BSANP), 采用原子力显微镜 (AFM) 观察纳米粒形状和粒径, HPLC 测定 EGCG 的载药量和包封率, 紫外分光光度法测定叶酸偶联量, 以激光共聚焦和荧光分光光度计测定 FA-EGCG-BSANP 对 PC-3 细胞的靶向性, 用 MTT 法测定其体外活性。所得 FA-EGCG-BSANP 的平均粒径为 200 nm 左右, 分布均匀; EGCG 的包封率可达 $(81.5 \pm 1.8) \%$, 载药量为 $(29.3 \pm 0.6) \%$, 叶酸偶联量为 $18.363 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ BSA; PC-3 细胞对 FA-EGCG-BSANP 的摄取量为 EGCG-BSANP 的 23.65 倍, 并且呈现较强的浓度依赖性; 同等浓度下 FA-EGCG-BSANP 对 PC-3 细胞的抑制率为 82.8%, 而 EGCG 溶液和 EGCG-BSANP 分别为 58.6% 和 55.1%, 并且抑制率与 PC-3 细胞对这些纳米粒的摄取能力呈正相关。FA-EGCG-BSANP 能明显提高 EGCG 对 PC-3 细胞的靶向效果, 并提高了对细胞的致死作用, 从而提高了 EGCG 作为一种潜在抗癌药物的治疗效果, 为进一步探索该纳米粒在体内的靶向性、活性和代谢规律提供了实验基础。

关键词: 表没食子儿茶素没食子酸; 叶酸; 纳米粒; 前列腺癌细胞; PC-3 细胞; 靶向性

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 05-0525-07

Preparation, activity and targeting ability evaluation *in vitro* on folate mediated epigallocatechin-3-gallate albumin nanoparticles

ZU Yuan-gang*, YUAN Shuai, ZHAO Xiu-hua, ZHANG Yu, ZHANG Xiao-nan, JIANG Ru

(Key Laboratory of Forest Plant Ecology, Northeast Forestry University, Ministry of Education, Harbin 150040, China)

Abstract: To study the preparation, activity and targeting ability evaluation *in vitro* on epigallocatechin-3-gallate (EGCG) bovine serum albumin nanoparticles targeting to PC-3 cells, the folate mediated EGCG bovine serum albumin nanoparticles (FA-EGCG-BSANP) were prepared by desolvation process. The morphology and particle size of the nanoparticles were determined by atomic force microscope (AFM). HPLC was used to analyse the entrapment efficiency and drug loading rate of EGCG. The amount of folate conjugation on the BSANP was determined by quantitative ultraviolet (UV) spectrophotometer analysis. The targeting ability to PC-3 was observed using laser scanning confocal microscope (LSCM) and fluorophotometer microscope. And the activity of FA-EGCG-BSANP was mensurated by MTT method. The morphology and particle size distribution of FA-EGCG-BSANP were uniform and even with the mean particle size of 200 nm. The entrapment efficiency and loading rate of EGCG were $(81.5 \pm 1.8) \%$ and $(29.3 \pm 0.6) \%$, respectively, and the amount of folate conjugation was $18.363 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ BSA. The FA-EGCG-BSANP uptakes by cultured PC-3 cells were 23.65 times the amount of EGCG-BSANP in a concentration dependant manner. The lethality of PC-3 cells treated with FA-EGCG-BSA

收稿日期: 2008-11-19.

基金项目: 国家科技支撑计划资助项目 (2006BAD18B0401).

*通讯作者 Tel: 86-451-82191517, Fax: 86-451-82102082, E-mail: zygorl@yahoo.com.cn

was 82.8%, while those treated with EGCG and EGCG-BSANP were 58.6% and 55.1%, respectively. And lethality of PC-3 cells was positively correlated with the nanoparticles uptake amount. FA-EGCG-BSANP can significantly promote EGCG to PC-3 cells sites and improve their efficacy, which is considered to an experimental foundation for further research on its activity, targeting ability and metabolism *in vivo*.

Key words: epigallocatechin-3-gallate; folate; nanoparticle; prostate cancer; PC-3 cell; target ability

前列腺癌多发于中老年男性,在欧美前列腺癌导致的死亡率仅次于肺癌^[1]。我国前列腺前期癌的发病率达25%。表没食子儿茶素没食子酸(epigallocatechin-3-gallate, EGCG)是绿茶提取物中的主要多酚类有效成分^[2],具有来源丰富、安全低毒和易溶于水的特点。近年研究表明,EGCG对前列腺癌细胞在体内外均具有显著的抑制效果,可能机制有诱导凋亡、周期阻滞^[3]、信号传导^[4-6]、抑制肿瘤侵袭和转移^[7]、抗氧化作用和抑制端粒酶活性等^[8-10]。适量的EGCG对人体无毒副作用,且对前列腺癌具有较强的抑制作用,但在体内能否高效的发挥抑瘤作用少有报道。

叶酸受体(folate receptor, FR)在正常组织中的表达高度保守,只在肺、肾、脉络膜和胎盘中低至中等水平表达,且以 β 亚型为主。但在大部分恶性肿瘤中,如卵巢癌、子宫内膜癌、前列腺癌、肾癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌和鼻咽癌中均高度表达^[11],有时可比正常组织高出100~300倍,这为叶酸(folate, folic acid, FA)介导药物靶向作用于肿瘤细胞的研究奠定了基础^[12-14]。牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)是一种安全无毒、无任何免疫原性、生物可降解的药物载体,对亲水性药物有较高的负载能力^[15,16],是靶向药物传递系统研究的热点。因此,本文以叶酸偶联白蛋白纳米粒为载体,制备了EGCG白蛋白纳米粒(FA-EGCG-BSANP),并对其形状、粒径、靶向性和体外活性等方面进行了探讨。

材料与方法

试剂与材料 叶酸(folate, FA, Sigma); *N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS, 上海延长生化科技发展有限公司); 二环己基碳二亚胺(DCC, 上海延长生化科技发展有限公司); 异硫氰酸荧光素(FITC, Sigma); EGCG (Sigma, 纯度98%); 白蛋白(BSA, Sigma); 0.25%戊二醛溶液(天津光复精细化工研究所); 二甲基亚砜(DMSO, Sigma, 纯度>99.5%); 四甲基偶氮唑盐(MTT, Sigma); F12细胞培养液(F12 Nutrient Mixture [Ham], Gibco); 优级胎牛血清(FBS, 中国科学院天津海洋生物); 含EDTA胰蛋白酶(0.25% Trypsin & 0.02% EDTA, Gibco); 前列腺癌细胞(PC-3,

中国科学院上海细胞库)。

仪器 Picoplus II 原子力显微镜 (MI, USA); Waters 高效液相色谱仪 (USA); UV-2550 全波长分光光度计 (Shimadzu); TE 2000-E 激光共聚焦显微镜 (Nikon); F-2500 荧光分光光度计 (Hitachi, Japan); Stat Fax-2100 酶标仪 (Awareness, USA)。

叶酸活性酯的制备^[17] 称取叶酸1g, 超声溶于DMSO (20 mL, 含三乙胺0.5 mL), 20 °C时搅拌下加入DCC 0.94 g和NHS 0.52 g, 避光反应12 h, 抽滤去除沉淀, 余液加入2倍体积的乙醚并搅拌产生沉淀, 抽滤, 并用乙醚洗涤所得沉淀, 干燥即为叶酸活性酯。

EGCG-BSANP 制备 EGCG-BSANP 制备步骤为: 称取适量BSA和EGCG加蒸馏水溶解, 室温搅拌下逐滴加入适量无水乙醇和0.25%戊二醛溶液, 搅拌反应适当时间, 离心, 沉淀用等体积蒸馏水分散即得EGCG-BSANP混悬液。采用单因素法考察BSA质量浓度(10、20和30 mg·mL⁻¹)、EGCG质量浓度(2.5、5、7.5和10 mg·mL⁻¹)、无水乙醇用量(1、3、5和7倍蒸馏水量)、戊二醛用量(5、10、25、50和100 μ L)和反应时间(3、6、12和24 h)对EGCG-BSANP的平均粒径、成球率、载药量和包封率的影响, 确定优化制备工艺。

FA-EGCG-BSANP 制备 称取叶酸活性酯50 mg, 溶于DMSO 1 mL中。另取制备的EGCG-BSANP溶液2 mL, 用1 mol·L⁻¹ Na₂CO₃/NaHCO₃缓冲溶液调节pH 10。将二者混合搅拌反应45 min, 离心, 收集沉淀, 最后用蒸馏水分散得FA-EGCG-BSANP混悬液。

FA-EGCG-BSANP 的形状与粒径测定 取FA-EGCG-BSANP 20 μ L均匀分布于新解离的云母片上, 自然风干, 置于原子力显微镜下, 观察其形状及粒径分布。

HPLC 测定包封率和载药量 将制备的FA-EGCG-BSANP的混悬液冷冻干燥, 取一定量的冻干粉用胰酶在37 °C摇床内消化4 h, 采用HPLC^[18]检测消化液中EGCG的含量, 计算EGCG载药量和包封率。计算公式如下:

EGCG标准曲线为: $y = 1 \times 10^{-7}x - 0.0219$ (y : EGCG质量浓度, mg·mL⁻¹; x : 峰面积), 相关系数 $r^2 =$

0.999 2。包封率 = $W_{\text{bsanpEGCG}} / W_{\text{totalEGCG}} \times 100\%$, 载药量 = $W_{\text{bsanpEGCG}} / W_{\text{BSANP}} \times 100\%$ (式中 $W_{\text{totalEGCG}}$ 为总药物量, $W_{\text{bsanpEGCG}}$ 为 FA-EGCG-BSANP 冻干粉中 EGCG 药物量, W_{BSANP} 为纳米粒的总量)。

成球率测定 采用考马斯亮蓝 G-250 蛋白含量测定法^[19]测定蛋白含量。取适量反应结束后 EGCG-BSANP 的混悬液, 超速冷冻离心, 取上清液 0.1 mL, 加入蒸馏水 0.90 mL, 考马斯亮蓝 G-250 蛋白试剂 5.0 mL, 充分混合, 放置 2 min 后, 于 595 nm 波长下测定吸收度, 代入标准曲线计算未成球蛋白质量, 通过公式计算成球率。成球率 = $(W_{\text{总}} - W_{\text{未成球}}) / W_{\text{总}} \times 100\%$ 。

叶酸与白蛋白偶联比测定 将 FA-EGCG-BSANP 用胰酶在 37 °C 摇床内水解 4 h。设置对照组, 即未加胰酶水解, 其他反应条件相同。用全波长分光光度计检测这两个样品内叶酸含量。

EGCG 纳米制剂靶向性测定 利用荧光 (FITC) 修饰白蛋白技术, 对 FA-EGCG-BSANP 进行标记。即用 0.025 mol·L⁻¹ 碳酸盐缓冲溶液 (pH 8.6) 将 FITC 配置成 5 mg·mL⁻¹ 溶液, 于 4 °C 冰浴中与白蛋白纳米粒反应 12 h。分别制备 3 种不同样品: ① FA+EGCG-BSA 纳米粒 (机械混合); ② FA-EGCG-BSA 纳米粒 (偶联); ③ EGCG-BSA 纳米粒 (无叶酸), 分别作用于 PC-3 肿瘤细胞, 培养 24 h, 置于激光共聚焦显微镜下在激发波长为 500 nm, 检测波长为 530 nm 下检测荧光强度, 并将培养后细胞用 TritonX100-PBS 缓冲溶液破碎, 用荧光分光光度计测定其荧光强度。同时, 按照该方法进行不同浓度的 FA-EGCG-BSA 纳米粒的测定。

MTT 法测定 EGCG 抑瘤率 取对数生长期细胞, 接种于 96 孔板, 每孔 100 μL。培养 24 h 后, 设平行培养液对照孔和调零孔, 其他分别加入 EGCG、FA+EGCG-BSA 纳米粒、FA-EGCG-BSA 纳米粒和 EGCG-BSA 纳米粒 10 μL。加入药物后继续培养 48 h, 取出后每孔加入 MTT 20 μL, 继续培养 4 h。取出 96 孔板, 弃孔内液体, 每孔加入 DMSO 150 μL, 迅速用水平振荡器摇动, 使孔内紫色结晶物充分溶解, 用酶标仪测定吸收度值 (检测波长 492 nm, 参比波长 630 nm)。将正常细胞存活率设为 100%, 计算加药细胞存活率, 从而得出抑制率。

数据分析 实验重复 3 次, 实验数据采用 Origin 7.5 软件处理, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。显著性检验采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

结果

1 EGCG-BSANP 制备工艺优化

在确定 EGCG-BSANP 制备工艺时, 采用单因素影响试验法考察了白蛋白浓度、EGCG 浓度、无水乙醇用量、戊二醛用量和固化时间等因素对纳米粒成球率、粒径及包封率的影响。结果表明: 当 BSA 质量浓度分别为 10、20 和 30 mg·mL⁻¹ 时, 所得 EGCG-BSANP 平均粒径相应为 210、368 和 445 nm, 所以本实验制备 EGCG-BSANP 时选择 BSA 质量浓度为 10 mg·mL⁻¹。当 EGCG 浓度分别为 2.5、5、7.5 和 10 mg·mL⁻¹ 时, 载药量分别为 8.4%、15.1%、24.5% 和 32.5%, 相应的包封率为 96.5%、92.8%、86.6% 和 80.3%。成球率为载体分子生成纳米粒的比率, 是衡量白蛋白载体使用效率的重要指标, 成球率越高, 纳米粒的得率相应也越高。为了研究靶向的需要, 本实验选择具有较高成球率且尽可能高的载药量的样品, 故选择 EGCG 的质量浓度为 10 mg·mL⁻¹。

当乙醇用量分别为溶解 BSA 蒸馏水量的 1、3、5 和 7 倍, EGCG-BSANP 的成球率分别为 80.2%、93.5%、94.1% 和 93.8%, 即乙醇用量在达到 3 倍蒸馏水量后, 成球率已符合要求, 增加乙醇量成球率也基本恒定在 93.5% 左右。

为考察戊二醛用量对成球率的影响, 分别加入 0.25% 戊二醛 5、10、25、50 和 100 μL, 成球率分别为 74.9%、85.0%、93.8%、95.1% 和 94.5%, 当戊二醛用量为 25~100 μL, 成球率较高, 本实验优选为 50 μL。

为考察不同反应时间对成球率的影响, 反应时间分别为 3、6、12 和 24 h, 所得成球率相应为 75.4%、81.6%、97.1% 和 98.2%。反应时间小于 12 h, 成球率不太满意, 游离蛋白过多。而在反应时间达到 12 h 后, 成球率符合要求。

综合以上单因素考察结果, 确定 EGCG-BSANP 的制备工艺如下: 称取 BSA 20 mg 和 EGCG 10 mg 溶于蒸馏水 2 mL, 在搅拌下逐滴加入无水乙醇 6 mL 和 0.25% 戊二醛 50 μL, 搅拌 12 h, 离心, 沉淀用等体积的蒸馏水分散沉淀得 EGCG-BSANP 混悬液。

2 FA-EGCG-BSANP 的形状与粒径

FA-EGCG-BSANP 的原子力观察结果如图 1 所示, 为近球形颗粒, 分散性较好。图 2 为 FA-EGCG-BSANP 的粒度分布, 分布区间为 20~250 nm, 平均粒径约为 200 nm。

3 EGCG 包封率和载药量

分别取 3 批最优条件下制备的 FA-EGCG-BSANP,

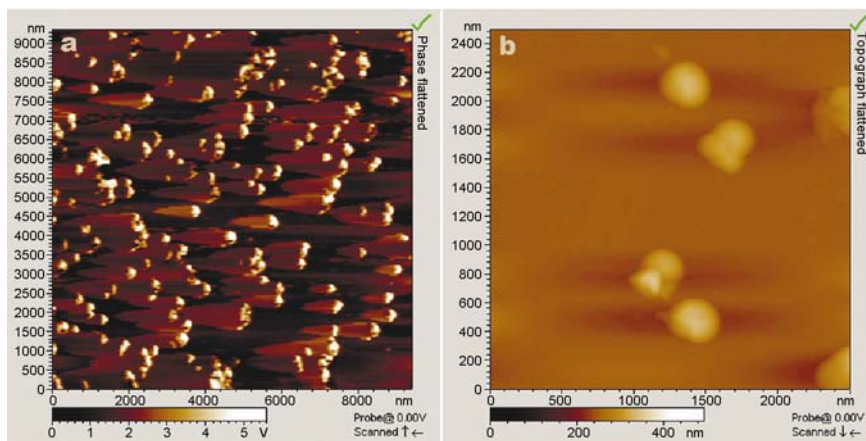


Figure 1 AFM image of FA-EGCG-BSANP. a: Low magnification; b: High magnification

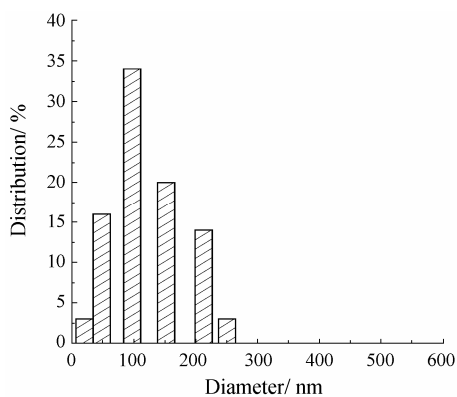


Figure 2 Particle size distribution of FA-EGCG-BSANP

依照前述方法测定各批样品的载药量与包封率, 结果包封率为 $(81.5 \pm 1.8)\%$, 载药量为 $(29.3 \pm 0.6)\%$ ($n = 3$)。

4 叶酸与白蛋白偶联度测定

通过全波长分光光度扫描, 得知叶酸活性酯在 281 nm 处有最大吸收峰, 在该波长下测定叶酸活性酯的标准曲线: $y = 14.951x - 0.8468$, $R^2 = 0.9988$ (y : 叶酸活性酯质量浓度 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; x : 吸收度)。对照组与 FA-EGCG-BSANP 的紫外吸收光谱如图 3 所示, 其中 1、2 和 3 分别为叶酸活性酯标准品、胰酶水解的 FA-EGCG-BSANP 样品和未水解的 FA-EGCG-BSANP 样品。由图可见, 对照组样品中无游离叶酸存在, 从而证明了水解组样品中检测出的叶酸是已与白蛋白相偶联的部分, 标准曲线计算可得叶酸偶联为 $18.363 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ BSA, 通过分子量换算可知, 白蛋白摩尔数/偶联叶酸摩尔数 = 1 : 2.754。

5 纳米粒对 PC-3 肿瘤细胞的靶向性

将 EGCG 质量浓度为 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 FA-EGCG-BSANP、FA 与 EGCG-BSANP 机械混合物和 EGCG-

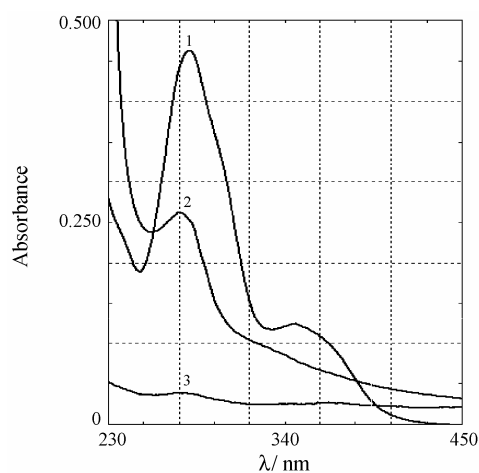


Figure 3 Ultraviolet spectral analysis of FA-EGCG-BSANP. 1: Reference substance of FA; 2: Hydrolyzed solution of FA-EGCG-BSANP by trypsin; 3: FA-EGCG-BSANP

BSANP, 进行 FITC 荧光修饰, 分别与前列腺癌细胞 PC-3 共培养 4 h, 置于激光共聚焦显微镜下观察 PC-3 细胞对纳米粒的摄取情况, 结果如图 4 所示。PC-3 细胞对 FA-EGCG-BSANP 的摄取量最多, 明显高于其他两组, 并且 FA 与 EGCG-BSANP 机械混合物和 EGCG-BSANP 被 PC-3 细胞的摄入量相当。结果表明, 通过叶酸受体介导可以显著提高前列腺癌细胞 PC-3 对 FA-EGCG-BSANP 的摄取能力, 能明显提高 EGCG 对 PC-3 的靶向性。

取上述相同量共培养的细胞用 TritonX100-PBS 缓冲溶液破碎, 测定其荧光强度, 结果如图 5 所示。对照组 (CK)、FA-EGCG-BSANP 组 (1)、FA 与 EGCG-BSANP 机械混合物组 (2) 和 EGCG-BSANP 组 (3) 与 PC-3 细胞作用后的荧光强度分别为 0.151、45.36、1.636 和 1.918, 即 FA-EGCG-BSANP 对 PC-3 的作用最强, 与图 4 所得结论一致。而 FA 与 EGCG-BSANP

机械混合物组略低于 EGCG-BSANP ($P > 0.05$), 可能与游离 FA 优先占据 PC-3 表面的受体有关, 从而降低了肿瘤细胞对纳米粒的摄取能力。

将 EGCG 质量浓度分别为 1、20 和 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ FA-EGCG-BSANP 进行 FITC 荧光修饰, 分别与前列腺癌细胞 PC-3 共培养 4 h, 置于激光共聚焦显微镜下观察 PC-3 细胞对纳米粒的摄取情况, 结果如图 6 所示。随着 FA-EGCG-BSANP 浓度的增加, PC-3 细胞对其摄取量越多, 其荧光也越强。这说明 PC-3 细胞对 FA-EGCG-BSANP 的摄取具有浓度依赖性的特点。测定上述相同量共培养的细胞破碎液的荧光强度结果如图 7 所示。对照组与 EGCG 质量浓度分别为 1、20 和 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 FA-EGCG-BSANP 组作用后的 PC-3 细胞的荧光强度分别为 0.151、15.512、26.55 和 35.136, 即 PC-3 细胞对 FA-EGCG-BSANP 的摄取具有较强的浓度依赖性, 与图 6 所得结论一致。

6 FA-EGCG-BSA 纳米粒对 PC-3 细胞的抑制效果

将对照 (BSANP) 与 EGCG 质量浓度为 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 FA-EGCG-BSANP、EGCG、FA 与 EGCG-BSANP 机械混合物和 EGCG-BSANP 与 PC-3 细胞共培养 48 h, 采用 MTT 法测定致死率, 结果如图 8 所示。对照组 (1)、FA-EGCG-BSANP 组 (2)、EGCG

(3)、FA 与 EGCG-BSANP 机械混合物组 (4) 和 EGCG-BSANP (5) 对 PC-3 细胞的致死率分别为 7.8%、82.8%、58.6%、51.5% 和 55.1%, 即 FA-EGCG-BSANP 对 PC-3 的作用最强, FA 与 EGCG-BSANP 机械混合物和 EGCG-BSANP 与 EGCG 的抑制率相当, 并且抑制率与 PC-3 对这些纳米粒的摄取能力呈正相关。与图 4 结果一致。这说明 FA 提高了 EGCG 对 PC-3 肿瘤细胞的靶向性, 并提高了对细胞的致死作用, 从而提高了 EGCG 作为一种潜在抗癌药物的治疗效果。

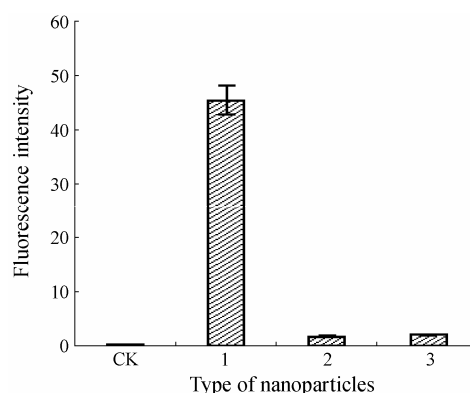


Figure 5 Fluorescence intensity of nanoparticle uptake by cultured PC-3 cells. CK: Control; 1: FA-EGCG-BSANP; 2: FA+EGCG-BSANP; 3: EGCG-BSANP ($n = 3$)

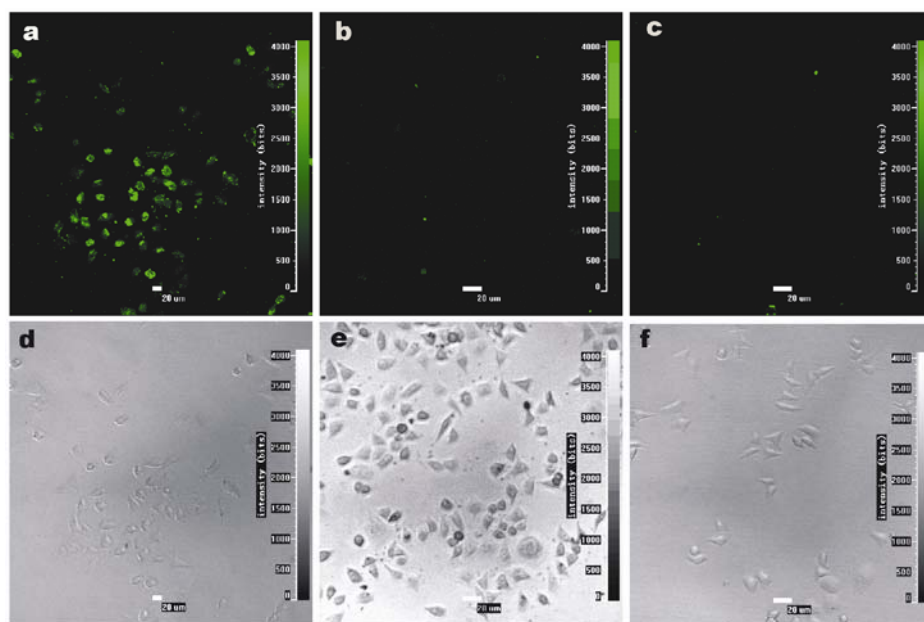


Figure 4 Various kinds of nanoparticles uptaken by cultured PC-3 cells. a: Fluorescence microscopy of FA-EGCG-BSANP; b: Fluorescence microscopy of mixture of FA and EGCG-BSANP; c: Fluorescence microscopy of EGCG-BSANP; d: Visible light microscopy of FA-EGCG-BSANP; e: Visible light microscopy of mixture of FA and EGCG-BSANP; f: Visible light microscopy of EGCG-BSANP

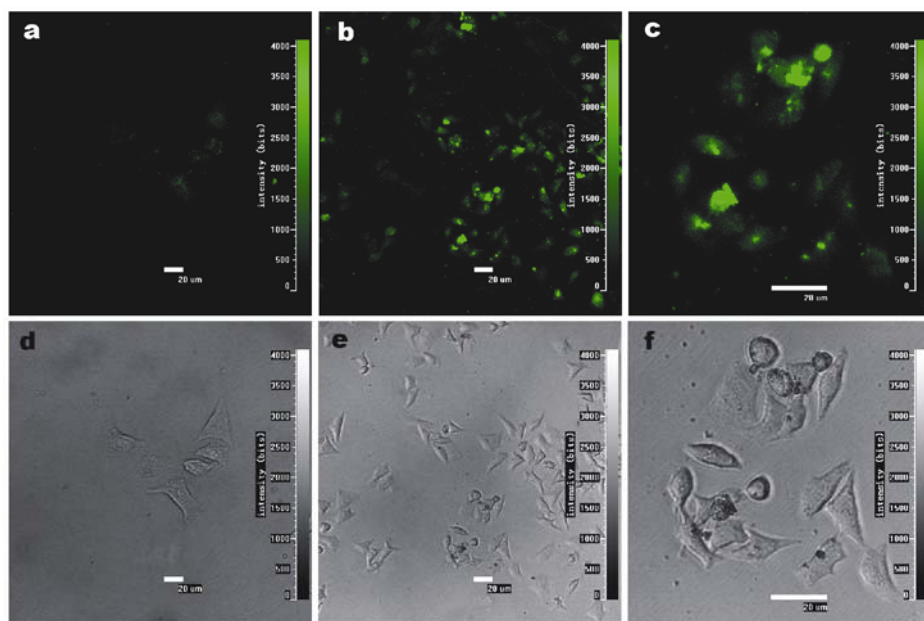


Figure 6 Different concentrations of nanoparticles uptaken by cultured PC-3 cells. a, b, c: Fluorescence microscopy of FA-EGCG-BSANP at concentration 1, 20, and 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, separately; d, e, f: Visible light microscopy of FA-EGCG-BSANP at concentration 1, 20, and 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, separately

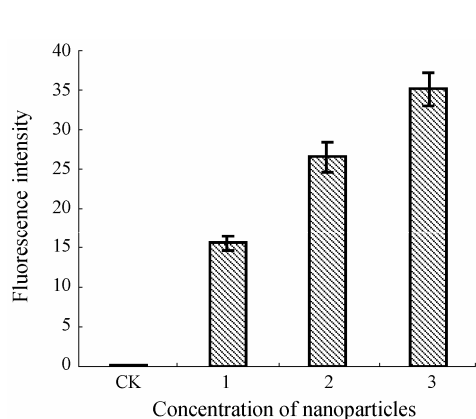


Figure 7 Concentration dependence of FA-EGCG-BSANP uptaken by cultured PC-3 cells. CK: Control; 1: 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ EGCG; 2: 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ EGCG; 3: 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ EGCG

讨论

叶酸受体是一种细胞表面蛋白,在大多数肿瘤细胞均高度表达,在前列腺癌细胞中发现其表达也非常显著。本研究尝试利用叶酸偶联牛血清白蛋白 (BSA) 作为药物载体,包裹 EGCG,成功制备了平均粒径约 200 nm 的 FA-EGCG-BSANP,EGCG 的包封率为 $(81.5 \pm 1.8)\%$,载药量为 $(29.3 \pm 0.6)\%$,叶酸偶联量为 $18.363 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ BSA。在确定 EGCG-BSANP 制备工艺时,采用单因素影响试验法考察了白蛋白浓度、EGCG 浓度、无水乙醇用量、戊二醛用量和固化时间等因素对纳米粒成球率、粒径及包封率的影响。实

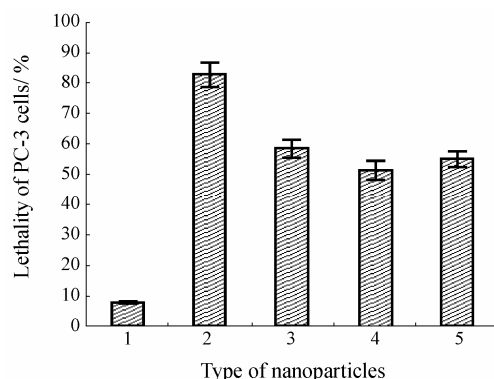


Figure 8 Lethality of PC-3 cells treated with various kinds of nanoparticles. 1: Control; 2: FA-EGCG-BSANP (20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of EGCG concentration); 3: EGCG (20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of EGCG concentration); 4: FA+EGCG-BSANP (20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of EGCG concentration); 5: EGCG-BSANP (20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of EGCG concentration) ($n = 3$)

验结果表明:随着 BSA 浓度增加所得 EGCG-BSANP 平均粒径相应增加;保持 BSA 浓度一定,EGCG 浓度增加时,载药量增加而包封率降低;成球率随着乙醇用量的增加而增加直至达到 3 倍蒸馏水量后,成球率基本恒定;同时,成球率也随着戊二醛用量和固化时间的增加而增加,当戊二醛用量为 25~100 μL 和固化时间 12 h 以上成球率符合要求。

纳米粒与前列腺癌细胞共培养研究结果显示,FA-EGCG-BSANP 进入 PC-3 细胞的量显著高于 EGCG-BSA,且摄入量随浓度增大而增加。而 EGCG-

BSANP+FA 共混组的摄入量略低于 EGCG-BSANP, 说明游离叶酸对 EGCG-BSANP 的摄入具有竞争性抑制作用。由此可见, FA-EGCG-BSANP 是通过叶酸受体介导而进入 PC-3 肿瘤细胞。这说明 FA-EGCG-BSANP 能明显提高 EGCG 对 PC-3 细胞的靶向性, 并提高了对细胞的致死作用, 从而提高了 EGCG 作为一种潜在抗癌药物的治疗效果。

本次实验制备了 FA-EGCG-BSANP, 并初步评价了其对于 PC-3 肿瘤细胞的体外靶向和活性效果, 为进一步探索该纳米粒在体内的靶向性、活性和代谢规律提供了实验基础。

References

- [1] Albrecht DS, Clubbs EA, Bomser JA, et al. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibits PC-3 prostate cancer cell proliferation via MEK-independent ERK1/2 activation [J]. *Chem Bio Interact*, 2008, 171: 89–95.
- [2] Xu GL, Yao L, Yu SQ, et al. Effect of epigallocatechingallate on acute lung injury induced by oleic acid in mice [J]. *Acta Pharm Sin (药理学报)*, 2005, 40: 231–235.
- [3] Stuart EC, Scandlyn MJ, Rosengren RJ. Role of epigallocatechin gallate (EGCG) in the treatment of breast and prostate cancer [J]. *Life Sci*, 2006, 79: 2329–2336.
- [4] Hwang JT, Ha J, Park IJ, et al. Apoptotic effect of EGCG in HT-29 colon cancer cells via AMPK signal pathway [J]. *Cancer Lett*, 2007, 247: 115–121.
- [5] Gupta S, Hastak K, Afaq F, et al. Essential role of caspases in epigallocatechin-3-gallate-mediated inhibition of nuclear factor kappa B and induction of apoptosis [J]. *Oncogene*, 2004, 23: 2507–2522.
- [6] Chen C, Shen G, Hebbar V, et al. Epigallocatechin-3-gallate-induced stress signals in HT-29 human colon adenocarcinoma cells [J]. *Carcinogenesis*, 2003, 24: 1369–1378.
- [7] Yoshinori F, Daisuke U, Satomi Y, et al. The 67 kDa laminin receptor as a primary determinant of anti-allergic effects of O-methylated EGCG [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 364: 79–85.
- [8] Yu HN, Yin JJ, Shen SR. Effects of epigallocatechin gallate on PC-3 cell cytoplasmic membrane in the presence of Cu²⁺ [J]. *Food Chem*, 2006, 95: 108–115.
- [9] Chen X, Yu HN, Shen SR, et al. Role of Zn²⁺ in epigallocatechin gallate affecting the growth of PC-3 cells [J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2007, 21: 125–131.
- [10] Yu HN, Yin JJ, Shen SR. Effects of interactions of EGCG and Cd²⁺ on the growth of PC-3 cells and their mechanisms [J]. *Food Chem Toxicol*, 2007, 45: 244–249.
- [11] Yan Y, Qi XR. Preparation and properties of folate receptor-targeted cationic liposomes [J]. *Acta Pharm Sin (药理学报)*, 2008, 43: 1134–1139.
- [12] Zhang LK, Hou SX, Mao SJ, et al. Uptake of folate-conjugated albumin nanoparticles to the SKOV3 cells [J]. *Int J Pharm*, 2004, 287: 155–162.
- [13] Lee RJ, Low SP. Delivery of liposomes into cultured KB cells via folate receptor-mediated endocytosis [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269: 3198–3204.
- [14] Guo WJ, Hinkle GH, Lee RJ. ^{99m}Tc-HYNIC-folate: a novel receptor-based targeted radiopharmaceutical for tumor imaging [J]. *J Nucl Med*, 1999, 40: 1563–1569.
- [15] Coombes AG, Breeze V, Lin W, et al. Lactic acid-stabilised albumin for microsphere formulation and biomedical coatings [J]. *Biomaterials*, 2001, 22: 1–8.
- [16] Weber C, Coester C, Kreuter J, et al. Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles [J]. *Int J Pharm*, 2000, 194: 91–102.
- [17] Xiao SY, Tong CY, Liu XM, et al. Preparation of folate-conjugated starch nanoparticles and its application to tumor-targeted drug delivery vector [J]. *Chin Sci Bull*, 2006, 51: 1693–1697.
- [18] Saigo R, Takeda Y. HPLC analysis of catechins in various kinds of green teas produced in Japan and abroad [J]. *J Jan Soc Food Sci Technol*, 1999, 46: 138–147.
- [19] Liu XH, Zhang MX, Yu CM, et al. The determination of protein in chitosan with coomassie brilliant blue G-250 [J]. *Chin Med J Commun (中国交通医学杂志)*, 2006, 20: 159–160.