

文章编号: 1673-1689(2010)03-0376-05

番茄红素纳米分散体抗小鼠肝移植瘤的作用

王晓岚¹, 王璇^{1,2}, 张连富²

(1. 江南大学 医药学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为了研究番茄红素纳米分散体对肿瘤生长的影响及其机制, 采用乳化-蒸发工艺(超声乳化)制备了番茄红素纳米分散体并用小鼠移植型肝癌模型研究了番茄红素纳米分散体的体内抗肿瘤作用和对机体抗氧化、抗增殖能力的影响。采用乳化-蒸发工艺(超声乳化)可获得纳米级别的番茄红素分散体系; 番茄红素纳米分散体以 1.95 mg/kg, 3.9 mg/kg 剂量给移植型肝癌 H₂₂ 小鼠用药 10 d 后, 移植瘤生长抑制率分别为 32.37%, 54.34%; 同时可提高小鼠血清谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性, 降低丙二醛(MDA)含量; 可提高小鼠肝组织总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)活性, 降低过氧化氢(H₂O₂)、MDA 含量; 下调增殖细胞核抗原(PCNA)蛋白表达。研究表明, 番茄红素纳米分散体在体内能明显抑制移植瘤的生长, 其机制可能与提高机体的抗氧化活性、抑制肿瘤细胞增殖有关。

关键词: 番茄红素; 纳米分散体; 抗肿瘤作用; 抗氧化活性; 增殖细胞核抗原

中图分类号: TS 202.3

文献标识码: A

Antitumor Effect of Lycopene Nanodispersion on Mice Transplanted with Hepatoma

WANG Xiao-lan¹, WANG Xuan², ZHANG Lian-fu²

(1. School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science & Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: To investigate the effect and mechanism of lycopene nanodispersion on tumor growth, lycopene nanodispersion was prepared by the emulsification-evaporation process (the ultrasonic emulsification). The antitumor effect, antioxidant activity and anti-proliferation activity in vivo were studied with the model of mice transplanted with hepatoma H₂₂. The results showed that lycopene nanodispersion was obtained by the process. When mice transplanted with hepatoma H₂₂ were treated with 1.95 mg/kg and 3.9 mg/kg lycopene nanodispersion for 10 days, the tumor growth inhibitory rate were 32.37% and 54.34% respectively. The intake of lycopene nanodispersion led to the increase of glutathione peroxidase (GSH-Px) activity, and the reduction of the mice serum malondialdehyde (MDA) content. It also led to the increase of total antioxidant capability (T-AOC) and superoxide dismutase (SOD) activity, but decrease the content of MDA and hydrogen peroxide (H₂O₂) of liver of mice. It also could inhibit the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in tumor tissue. These results suggested

收稿日期: 2009-04-16

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD27B03); 江苏省自然科学基金项目(BK2009517)。

* 通信作者: 王晓岚(1962-), 女, 江苏无锡人, 医学博士, 副教授, 主要从事天然药食研究。Email: wangxl@jiangnan.edu.cn

that lycopene nanodispersion can significantly suppress the growth of hepatoma H₂₂ in vivo. The increases of anti-oxidation activity and anti-proliferation activity may contribute to the antitumor mechanism.

Key words: lycopene, nanodispersion, antitumor activity, antioxidant activity, proliferating cell nuclear antigen

番茄红素(Lycopene)是一种重要的类胡萝卜素,研究表明番茄红素具有多种生理功能,如抗氧化、防癌抗癌、提高免疫能力、抗衰老、抗炎症、抗凝血等^[1-2],但由于番茄红素是脂溶性色素,限制了其使用范围。利用纳米技术可有效改善难溶性组分的水溶性及贮藏稳定性,并有可能提高其生物利用率,影响其生理功能^[3]。关于纳米级别番茄红素的抗肿瘤作用研究尚未见报道。作者参照乳化-蒸发工艺^[3-4](超声乳化)制备了番茄红素纳米分散体,在此基础上比较番茄红素纳米分散体和脂溶番茄红素对移植型小鼠肝癌 H₂₂的作用,并比较其抗氧化能力和抗增殖能力,以探讨番茄红素纳米分散体对肿瘤的作用及其可能机制,旨在为番茄红素纳米分散体的研究与开发利用积累有价值的资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验试剂 质量分数 10% 番茄红素粉:华北制药股份有限公司产品;乙酸乙酯、Tween-20:国药集团化学试剂有限公司产品;氟尿嘧啶注射液:南通精华制药有限公司产品,批号:071201;大豆油:中粮食品销售有限公司;总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化氢(H₂O₂)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测定试剂盒:南京建成生物工程研究所产品。小鼠增殖细胞核抗原(PCNA)免疫组化全套试剂盒:武汉博士德生物工程有限公司产品。

1.1.2 实验仪器 VCX500 超声破碎仪:SONICS& MATERIALS. INC 产品;R-205 旋转蒸发器:上海申顺生物科技有限公司产品;Nano ZS90 型纳米粒度及 Zeta 电位分析仪:Malvern Instruments, UK 产品;2100 型 & UV-2100 型分光光度计:尤尼柯(上海)仪器有限公司产品;电热恒温水浴锅:上海精宏实验设备有限公司产品。

1.1.3 实验动物与细胞株 H₂₂腹水瘤小鼠,购自上海医药工业研究院。

ICR 小鼠,健康,雌性,体质量 18~22 g,购于扬州大学比较医学中心,许可证号:SCXK(苏)

2007-0001。

1.2 实验方法

1.2.1 番茄红素纳米分散体样品的制备 番茄红素粉溶解于乙酸乙酯中,恒温(50℃)缓慢滴加至含有定量 Tween-20 的水中。滴加完后以 1 000 r/min 搅拌 1 h,过滤,超声破碎(冰浴,500 W,1.0~1.0 秒/次,3 min)。最后减压旋转蒸发(50℃,0.1 MPa)以除去有机溶剂。所得样品置于棕色玻璃瓶内于 4℃保存^[3]。

1.2.2 空白乳化剂样品的制备 含有定量 Tween-20 的水,以 1 000 r/min 搅拌 1 h,过滤,超声破碎(冰浴,500 W,1.0~1.0 脉冲,3 min)。所得样品置于棕色玻璃瓶内于 4℃保存。

1.2.3 脂溶番茄红素样品的制备 番茄红素粉使用时以大豆油稀释至所需浓度。

1.2.4 番茄红素纳米分散体粒径的测定 采用激光光散射-Zeta 电位分析仪对样品的粒径进行检测,记录 Z 均粒径和粒径分布情况(多分散指数 PDI)。

1.2.5 抗肿瘤实验 无菌条件下,抽取接种传代 7 d 的 H₂₂肝癌小鼠的腹水,用生理盐水 1:3 稀释混匀后,每只动物右前肢腋窝皮下注射 0.2 mL。然后随机分为 5 组:空白对照组、1.95 mg/kg 分散体组、3.9 mg/kg 分散体组、3.9 mg/kg 脂溶组、阳性对照组,每组 10 只。以灌胃量为 0.2 mL/10g,空白对照组每鼠每天灌胃空白乳化剂样品一次;1.95 mg/kg 分散体组、3.9 mg/kg 分散体组每鼠每天灌胃相应剂量的番茄红素纳米分散体样品;脂溶组每鼠每天灌胃 3.9 mg/kg 脂溶番茄红素一次,连续 10 d。阳性对照组每鼠每天腹腔注射 25 mg/kg 氟尿嘧啶注射液一次,连续 10 d。给药期间,每日观察小鼠的一般活动、皮毛和粪便等情况。第 11 d 处死动物,分离瘤块称质量,计算抑瘤率:抑瘤率(%)=(空白组平均瘤重-给药组平均瘤质量)/空白组平均瘤质量×100%。

1.2.6 抗氧化实验 动物分组、给药同上。第 11 d 处死动物,取血清及制备肝匀浆测定相关指标。血清 T-AOC、SOD、GSH-Px 活性,MDA 含量及肝

匀浆 T-AOC、SOD 活性, MDA、H₂O₂ 含量测定: 均按试剂盒说明书操作。

1.2.7 免疫组化实验 留取适量瘤组织标本, 10% 中性甲醛固定, 常规石蜡包埋、切片, 石蜡切片脱蜡至水, 按试剂盒说明书检测瘤组织的增值细胞核抗原(PCNA) 表达。显微镜下观察, 细胞核内出现棕黄色颗粒者为 PCNA 阳性细胞, 选取阳性率较高的 5 个视野, 每个视野计数 100 个瘤细胞, PCNA 阳性细胞取均值, 作为阳性表达的百分率。

1.3 统计学分析

数据以均数±标准差表示, 显著性检验采用 SPSS16.0 的单因素方差分析进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 番茄红素纳米分散体样品的粒径大小和分布

肉眼观察, 番茄红素纳米分散体在水中分散均一, 呈现明亮的红色, 没有絮状、颗粒状的沉淀, 样品在 4℃ 冷藏 1 个月后仍然澄清透明, 无沉淀物, 分散性较好; 而脂溶的番茄红素分布不均匀, 且明显可见大量颗粒沉淀在容器底部。所得结果如图 1 所示, Z 均粒径是根据信号检测的相关曲线计算得到的, 可以较直观地反映体系中粒径的变化, 番茄红素纳米分散体样品呈二峰分布, Z 均粒径为 261 nm, PDI(粒径分布曲线的分布宽度指数) 为多分散性指数, 即粒径分布曲线的分布宽度指数, 根据信号检测的相关曲线计算得到, 代表粒径分布中的非均匀量, 较小, 等于 0.213, 说明粒径大小较均匀, 其中峰 1 的粒径为 293.7 nm, 强度为 98.78%, 宽度为 107.4 nm, 峰 2 的粒径为 5251 nm, 强度为 1.217%, 宽度为 440.8 nm。表明采用乳化-蒸发工艺(超声乳化)可以有效改善难溶性番茄红素在水中的分散。

对于金属与无机物, 通常将粒径在 1~100 nm 范围的颗粒称为纳米粒; 对于有机物和聚合物, 习惯上将粒径小于 1000 nm 的颗粒称为纳米粒^[5]。因此, 所制备的番茄红素样品属于纳米分散体系。

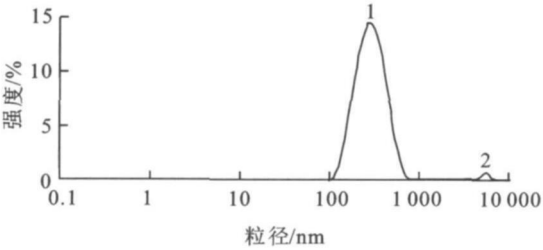


图 1 番茄红素纳米分散体粒径分布图

Fig. 1 Particle distribution of lycopene nanodispersion

2.2 对移植型小鼠肝癌 H₂₂ 的抑瘤作用

空白对照组小鼠接种瘤后活动度降低, 毛色较接种前差, 最早出现小鼠死亡。给予脂溶番茄红素的小鼠亦活动度降低, 毛色也较接种前差。给予番茄红素纳米分散体样品的各组小鼠皮毛光滑, 活动无异常。腹腔注射氟尿嘧啶注射液的小鼠出现松毛且腹泻。抑瘤率实验结果如表 1 所示, 与空白对照组相比, 3.9 mg/kg 番茄红素纳米分散体对移植型小鼠肝癌 H₂₂ 具有明显的抑制作用 ($P < 0.05$), 抑瘤率达到 53.34%。但 1.95 mg/kg 番茄红素纳米分散体对移植型小鼠肝癌抑瘤率仅为 32.37%, 3.9 mg/kg 脂溶番茄红素对移植型小鼠肝癌 H₂₂ 的抑瘤率仅 27.75%, 两组抑瘤作用与空白对照组差异均无显著性意义。有学者报道 20 mg/kg 脂溶番茄红素可有效抑制裸小鼠移植性肝癌肺转移, 与其抑制肿瘤的入侵、增殖及血管新生有关, 而 1 mg/kg 脂溶番茄红素效果不明显^[6]。这提示 3.9 mg/kg 脂溶番茄红素剂量较小, 尚不能取得有效的抗肿瘤作用, 而纳米化后同样剂量番茄红素可以有效地抑制肿瘤生长, 体现了纳米分散体制剂的优势; 1.95 mg/kg 番茄红素纳米分散体尚不能有效抑制肿瘤生长, 也属剂量偏小, 3.9 mg/kg 可能是取得抑瘤效果的较低剂量。阳性对照药抑瘤率高达 70.52%, 比其他受试样品的抑瘤效果好, 但从表中同样可以看出荷瘤小鼠存活数最少, 且小鼠毛发稀疏而精神萎靡, 可能与化疗药物的毒副作用有关。

表 1 对小鼠移植型肝癌 H₂₂ 的抑瘤作用

Tab. 1 The tumor growth inhibition on mice transplanted with hepatoma H₂₂

组别	鼠数/只		平均瘤质量/g	抑瘤率/%
	始	末		
空白对照组	10	7	1.73±0.71	/
1.95 mg/kg 纳米组	10	7	1.17±0.46	32.37
3.9 mg/kg 纳米组	10	9	0.79±0.39*	54.34
3.9 mg/kg 脂溶组	10	10	1.25±0.79	27.75
阳性对照组	10	6	0.51±0.34**	70.52

注: * 与空白对照组相比, $P < 0.05$; ** 与空白对照组相比, $P < 0.01$

2.3 对移植型肝癌 H₂₂ 小鼠血清酶活性、MDA 含量的影响

如表 2 所示, 与空白对照组小鼠相比, 给番茄红素纳米分散体样品的小鼠血清中 GSH-Px 活性都明显升高, MDA 含量都明显下降, 其中给 3.9 mg/kg 剂量的小鼠改变更明显 ($P < 0.01$); 在相同剂量下, 给予番茄红素纳米分散体样品的小鼠血

清 T-AOC、SOD、GSH-Px 活性都比给予脂溶番茄红素的升高,MDA 含量下降,但差异无显著性意义。GSH-Px 是机体内广泛存在的一种重要的催化过氧化氢分解的酶,GSH-Px 活力的高低可以间接反映机体清除氧自由基的能力;MDA 的量反映机体内脂质过氧化的程度,可以间接反映机体细胞受自由基攻击的严重程度。上述实验结果初步说明番茄红素纳米分散体具有明显的抗氧化作用。

表 2 移植型肝癌 H₂₂小鼠血清的抗氧化活性变化

Tab. 2 Changes of antioxidant activity of the serum of mice transplanted with hepatoma H₂₂

组别	总抗氧化能力/ (U/ mL)	超氧化物歧化酶/ SOD (U/mL)	谷胱甘肽过氧化物酶/ (U/mL)	丙二醛/ (nmol/mL)
空白对照组	8.61±0.81	273.75±72.65	18.80±8.62	7.87±1.04
1.95 mg/kg 纳米组	9.65±1.51	245.45±104.69	46.73±17.20*	5.92±0.50*
3.9 mg/ kg 纳米组	9.07±1.68	363.63±82.05	55.06±16.52**	4.54±1.66*
3.9 mg/ kg 脂溶组	8.49±2.48	313.52±82.04	42.04±20.57	6.13±1.21
阳性对照组	6.97±1.30	278.70±82.70	50.59±17.26*	6.77±0.78

注: * 与空白对照组相比,P< 0.05; ** 与空白对照组相比,P< 0.01

2.4 对移植型肝癌 H₂₂小鼠肝组织酶活性、H₂O₂、MDA 含量的影响

实验结果如表 3 所示,与空白对照组小鼠相比,各组小鼠肝组织中 H₂O₂、MDA 含量均有所下降(P< 0.05 或 P< 0.01);并且给 3.9 mg/kg 番茄红素纳米分散体样品的小鼠肝组织中 T-AOC 活性升高(P< 0.05),SOD 活性明显升高(P< 0.01)。与 3.9 mg/kg 脂溶组相比,在相同剂量下,给番茄红素纳米分散体样品的小鼠肝组织中 SOD 活性明显升高(P< 0.05)。T-AOC 反映机体总抗氧化能力,机体抗氧化能力的强弱与健康程度存在密切联系;SOD 是一种重要的抗氧化酶,能清除超氧阴离

子自由基保护细胞;过氧化氢是活性氧,可以直接氧化一些酶的巯基,使酶失去活性,并可透过大部分细胞膜进入细胞内,形成脂质过氧化物,导致细胞膜的损伤。由于机体产生的自由基不能被及时清除,化学性质活泼的自由基与游离或结合状态的不饱和脂肪酸作用,不但改变膜的结构和功能,还诱发脂质过氧化反应产物增多^[7]。MDA 是过氧化脂质的分解产物,如上所述它间接反映机体细胞受自由基攻击的严重程度。通过实验结果分析,可以说明番茄红素纳米分散体具有明显的抗氧化作用,且相同剂量下,纳米分散体比脂溶番茄红素更有效增强 SOD 活性。

表 3 移植型肝癌 H₂₂小鼠肝组织的抗氧化活性变化

Tab. 3 Changes of antioxidant activity of the liver of mice transplanted with hepatoma H₂₂

组别	总抗氧化能力/ (U/ mg)	超氧化物歧化酶活性/ (U/ mg)	过氧化氢/ (mmol/ L)	丙二醛/ (nmol/ mg)
空白对照组	0.69±0.20	128.35±27.60	109.64±43.27	8.65±1.05
1.95 mg/kg 纳米组	0.72±0.17	131.89±22.07	69.28±28.89*	5.68±0.81*
3.9 mg/ kg 纳米组	0.96±0.22*	177.17±20.47* △	61.25±13.21**	6.36±0.71*
3.9 mg/ kg 脂溶组	0.76±0.13	143.25±28.89	61.49±13.94**	6.46±1.46*
阳性对照组	0.48±0.13	142.18±15.53	66.07±12.62*	6.85±0.50*

注: * 与空白对照组相比,P< 0.05; ** 与空白对照组相比,P< 0.01 △ 与 3.9 mg/ kg 脂溶组相比,P< 0.05

2.5 对肿瘤组织 PCNA 表达的影响

阴性对照片肿瘤组织中仅见非特异性背景染色。空白对照组 PCNA 呈强阳性表达,肿瘤细胞核呈深棕褐色。给予 1.95、3.9 mg/ kg 纳米分散体肿瘤组织 PCNA 表达色浅;给予 3.9 mg/ kg 脂溶番茄红素肿瘤组织 PCNA 表达多且色深;阳性对照组 PCNA 表达最少,色最浅。由表 4 可知,给予 1.95、3.9 mg/ kg 番茄红素纳米分散体及给予 3.9 mg/ kg

脂溶番茄红素小鼠肿瘤组织的 PCNA 阳性表达细胞数较空白对照组均显著下降,腹腔注射氟尿嘧啶的小鼠肿瘤组织 PCNA 阳性表达细胞数最低(均 P< 0.01)。给予不同剂量的番茄红素纳米分散体的小鼠都比给予脂溶番茄红素的小鼠肿瘤组织 PCNA 阳性表达细胞百分率显著性下降。PCNA 是真核细胞 DNA 合成所必需的一种核蛋白,是 DNA 聚合酶 δ 的辅助蛋白,对 DNA 复制起着重要作用,其

合成和表达与细胞增殖有关,是细胞增殖的标志。本实验结果提示番茄红素纳米分散体可能通过影响荷瘤小鼠肿瘤组织 PCNA 表达阻止细胞 DNA 复制而发挥抗肿瘤作用。

表 4 肿瘤组织的增殖细胞核抗原阳性表达细胞百分率
Tab. 1 The percentage of PCNA positive cells in tumor tissue

组 别	增殖细胞核抗原阳性 表达细胞百分率/ %
空白对照组	82.20±5.50
1.95 mg/ kg 纳米组	50.60±8.99* * △△
3.9 mg/ kg 纳米组	41.60. ±3.85* * △△
3.9 mg/ kg 脂溶组	64.80±5.89* *
阳性对照组	36.80±4.15* *

注: * 与空白对照组相比, $P < 0.05$ ** 与空白对照组相比, $P < 0.01$ △ 与 3.9mg/kg 脂溶组相比, $P < 0.05$

3 结 语

纳米技术是 20 世纪 80 年代末、90 年代初迅速发展起来的一项高新科学技术,已广泛应用于材

料、化工、医药、通信、能源等领域。近年来纳米技术应用于食品和医药行业,改善了活性成分和药物的水溶性并增加了生物利用度,展示了技术创新的喜人前景^[4]。单线态氧和过氧化物与多种疾病(包括癌症)有关。番茄红素是天然胡萝卜素中最有效的单线态氧捕捉剂^[8]。早在 20 世纪 50 年代,美国医学专家首次报道番茄红素具有抗癌效应,但番茄红素含多不饱和和共轭双键,性质不稳定,易被氧化破坏,不溶于水,这些均影响其生物利用率,因此随后出现的各研究报道不尽一致。因此急需水溶性番茄红素产品的问世。番茄红素水溶性的提高,能使番茄红素更好的应用于饮料、化妆品、复合维生素制品等,发挥其生物活性^[9]。本实验通过制备番茄红素纳米分散体,获得粒径纳米级别、水中分散性好、稳定的体系;在此基础上进行体内实验,发现番茄红素纳米分散体比脂溶番茄红素具有更有效的抗肿瘤作用,其机制可能与提高机体的抗氧化活性、抑制肿瘤细胞增殖有关。

参考文献(References):

[1] Bhuvaneswari V, Nagini S. Lycopene: a review of its potential as an anticancer agent [J]. **Current medicinal chemistry Anti-cancer agents**, 2005, 5(6): 627- 35.

[2] 于文利, 舒伯, 赵亚平, 等. 番茄红素生理功能的动物实验评价[J]. 无锡轻工大学学报(食品与生物技术学报), 2005, 24(1): 99- 101.

YU Wen-li, SHU Bo, ZHAO Ya-ping, et al. The physiological functions of lycopene evaluated by animal experiment s[J]. **Journal of Wuxi University of Light Industry (Journal of Food Science and Biotechnology)**, 2005, 24(1): 99- 101. (in Chinese)

[3] 孙莹, 张胜文, 张连富. 番茄红素纳米分散体的制备[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(2): 65- 68.

SU N Ying, ZHANG Sheng-wen, ZHANG Lian-fu. Study on the preparation of lycopene nanø dispersion [J]. **Food and Fermentation Industries**, 2008, 34(2): 65- 68. (in Chinese)

[4] Tan CP, Nakajima M. (-Carotene nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation[J]. **Food Chemistry**, 2005, 92: 661- 671.

[5] 徐辉碧, 杨祥良. 纳米医药[M]. 北京: 清华大学出版社, 2004. 9.

[6] Huang Chin-Shiu, Liao Jiun-Wang, Hu Miaø-Lin. Lycopene inhibits experimental metastasis of human hepatoma SK-Hep-1 cells in athymic nude mice [J]. **The Journal of nutrition**, 2008, 138(3): 538- 543.

[7] 涂勇刚, 孙亚真, 田颖刚, 等. 泰和乌骨鸡黑色素的体外抗氧化作用[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(2): 145- 149.

TU Yong-gang, SUN Ya-zhen, TIAN Ying-gang, et al. The antioxidant activity of melanin from taihe black-bone silky fowl in vitro[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(2): 145- 149. (in Chinese)

[8] Sies H, Stahl W. Lycopene: antioxidant and biological effects and its bioavailability in the human [J]. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 1998, 218(2): 121- 124.

[9] 杨坤, 丁霄霖. 番茄红素水溶性包合物的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2005, 24(5): 98- 101, 106.

YANG Kun, DING Xiaø-lin. The study of water-soluble lycopene inclusion product[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2005, 24(5): 98- 101, 106. (in Chinese)

(责任编辑: 杨萌)