



CHẾ TẠO VẬT LIỆU NANO BERBERINE BẰNG PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN QUAY VÀ KHẢO SÁT KHẢ NĂNG ỨC CHẾ TĂNG SINH TẾ BÀO UNG THƯ

Đỗ Thanh Sinh¹, Võ Nhị Kiều¹, Phạm Đăng Phương Dung², Nguyễn Hữu Tuyển¹, Ngô Võ Kế Thành¹ và Mai Ngọc Tuấn Anh^{1*}

¹Trung tâm Nghiên cứu triển khai Khu Công nghệ cao, Quận 9, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Trường THPT Trần Đại Nghĩa, Quận 1, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Mai Ngọc Tuấn Anh (email: anh.maingoctuan@shtplabs.org)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 04/03/2020

Ngày nhận bài sửa: 31/03/2020

Ngày duyệt đăng: 29/06/2020

Title:

A study of fabrication of berberine nanoparticles by roll milling method and their ability to inhibit cancer cell lines

Từ khóa:

Hạt nano berberin, Hep G2, kháng ung thư, MCF-7, nghiên cứu quay

Keywords:

Antitumor, berberine nanoparticles, Hep G2, MCF-7, roll milling

ABSTRACT

Berberine (BBr), a natural isoquinoline alkaloid, has pharmacological activities such as anti-inflammatory, analgesic, antimicrobial and antitumor effects. However, the low bioavailability of BBr has restricted its applications. This study is aimed to fabricate berberine nanoparticles by roll milling method to enhance their bioavailability and study their anticancer activities. For the characterization of berberine nanoparticles, Field Emission Scanning Electron Microscopy (FE-SEM), Transmission Electron Microscopy (TEM), Dynamic Light Scattering (DLS), X-ray Diffraction (XRD) and Ultraviolet – visible spectroscopy (UV-Vis) were employed. The results showed that berberine nanoparticles average diameters were 60 nm after 120 hours roll milling with the support of Zirconia beads. Cytotoxicity assessments indicated that Nano BBr inhibited breast cancer (MCF-7) and hepatic cancer (Hep G2) cells growth.

TÓM TẮT

Berberine (BBr) là một alkaloid khung cấu trúc isoquinoline có nguồn gốc tự nhiên, có nhiều tính chất như kháng viêm, giảm đau, kháng khuẩn và kháng ung thư. Tuy nhiên, do có độ sinh khả dụng thấp nên việc ứng dụng BBr vẫn còn hạn chế. Nghiên cứu thực hiện nhằm chế tạo vật liệu nano BBr bằng phương pháp nghiền quay để tăng độ sinh khả dụng và thử nghiệm khả năng kháng ung thư. Tính chất vật liệu nano BBr được khảo sát bằng các phương pháp FE-SEM, TEM, DLS và XRD, kết quả cho thấy hạt nano BBr có kích thước trung bình khoảng 60 nm sau 120 giờ nghiền quay với sự hỗ trợ của bi zirconia. Vật liệu nano BBr cho thấy khả năng ức chế tăng sinh ở hai dòng tế bào ung thư vú (MCF-7) và gan (Hep G2).

Trích dẫn: Đỗ Thanh Sinh, Võ Nhị Kiều, Phạm Đăng Phương Dung, Nguyễn Hữu Tuyển, Ngô Võ Kế Thành và Mai Ngọc Tuấn Anh, 2020. Chế tạo vật liệu nano berberine bằng phương pháp nghiền quay và khảo sát khả năng ức chế tăng sinh tế bào ung thư. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(Số chuyên đề: Khoa học tự nhiên)(2): 33-40.

1 TỔNG QUAN

Berberine (BBr) đã được chứng minh là có nhiều tính chất dược lý khác nhau bao gồm kháng sinh, chống khối u, chống viêm và hạ đường huyết (Singh *et al.*, 2010; Tillhon *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2015). Tuy nhiên do BBr không tan trong nước và độ sinh khả dụng thấp (Battu *et al.*, 2010) dẫn đến sự hấp thụ chúng vào cơ thể kém. Đã có nhiều nghiên cứu chế tạo nano BBr với nhiều phương pháp khác nhau như: gắn BBr trên nano polymer, trên silica từ tính, trên lipid, gắn vào các dendrimer, graphene hay trên các nano vàng, nano bạc,... (Bhanumathi *et al.*, 2017; Mirhadi *et al.*, 2018) nhằm giúp khả năng phân tán của chúng tăng lên, tạo điều kiện cho cơ thể hấp thụ tốt hoạt chất BBr để phát huy hết tác dụng dược lý của chúng. Wang *et al.* (2010) đã nghiên cứu hệ micelles pha đảo chứa BBr được điều chế thông qua quá trình đông khô của nhũ tương nước trong dầu (W/O), sử dụng phosphatidylcholine đậu nành làm chất nhũ hóa. Vật liệu này cho thấy cải thiện sinh khả dụng đường uống và hiệu quả trong việc giảm đường huyết (Wang *et al.*, 2010). Lin *et al.* (2015) đã điều chế nano berberine trên chất mang Fucose-chitosan/Heparin với kích thước hạt $198,8 \pm 6,9$ nm có tác dụng ức chế *Helicobacter pylori* và giảm viêm dạ dày hiệu quả khi nghiên cứu trên động vật. Gupta *et al.* (2017) đã nghiên cứu gắn kết BBr vào các dendrimers PAMAM-G4 có kích thước 100-200 nm và cho thấy độ sinh khả dụng tăng đáng kể. Wang *et al.* (2015) đã điều chế hệ nhũ phân tán nano BBr bằng kỹ thuật đồng hóa áp suất cao cho ra hạt có kích thước trong khoảng $73,1 \pm 3,7$ nm và có tác dụng hạ đường huyết khi thử nghiệm trên mô hình chuột. Yu *et al.* (2017) đã nghiên cứu chế tạo hệ nano poly etylen glycol (PEG)-lipid-Poly(D,L-lactide-co-glycolide acid) (PLGA) làm chất mang berberine với kích thước khoảng 200 nm để ứng dụng trong thuốc dạng uống. Sahibzada *et al.* (2018) đã nghiên cứu chế tạo hệ nhũ nano chứa BBr bằng phương pháp tiêm nhanh pha đảo (APSP), kết quả cho thấy hạt nano tạo thành có kích thước từ 60 – 110 nm. Ngoài ra vật liệu nano berberine đã được chế tạo với cấu trúc khác nhau như mang trên hạt nano PLGA (Ochin *et al.*, 2018) hay các dạng nano lipid rắn, hệ nhũ nano hay nano liposome (Tan *et al.*, 2011) và cho thấy kết quả tích cực khi thử nghiệm kháng các dòng tế bào ung thư.

Nhìn chung, các nghiên cứu nêu trên đã chế tạo nano BBr với nhiều tính chất ưu việt theo phương pháp từ dưới lên, nồng độ BBr trong hệ đều nhỏ hơn 1% và sử dụng các thiết bị hiện đại, đắt tiền nên

không mang lại hiệu quả kinh tế cao. Do vậy, việc chế tạo BBr ở kích thước nano với hàm lượng cao hơn là cần thiết để có thể chuyển về dạng bột rắn, phù hợp với ứng dụng trong thực phẩm hỗ trợ điều trị tiểu đường hay ngăn ngừa ung thư.

Nhận thấy BBr có cấu trúc tinh thể (Zou *et al.*, 2009; Sahibzada *et al.*, 2018) nên phương pháp từ trên xuống dưới đã được đề xuất để chế tạo các hạt nano tinh thể BBr (Loh *et al.*, 2015). Trong nghiên cứu này, vật liệu nano BBr được chế tạo bằng phương pháp nghiền quay ướt với sự hỗ trợ của bi zirconia ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 120 giờ, khảo sát ảnh hưởng của hàm lượng BBr trong hệ đến kích thước hạt nano tạo thành. Bên cạnh đó, liệu nano BBr cho thấy tính ức chế tăng sinh ở hai dòng tế bào ung thư vú (MCF-7) và gan (Hep G2) với giá trị MIC lần lượt là $11,11 \pm 0,48$ $\mu\text{g/mL}$ và $43,45 \pm 3,39$ $\mu\text{g/mL}$.

2 THỰC NGHIỆM

2.1 Hóa chất

Berberine 95% chuẩn dược phẩm (BBr, Công ty Cổ phần Dược phẩm Vĩnh Kim, Quận Hoàng Mai, Hà Nội), berberine chloride chuẩn HPLC (Sigma), polysorbate 80 (tween 80, Sigma), ethanol (Merck), methanol (Merck) và nước Milli-Q (Millipore). Các hóa chất được sử dụng không qua các bước tinh chế.

2.2 Chế tạo nano BBr bằng phương pháp nghiền quay

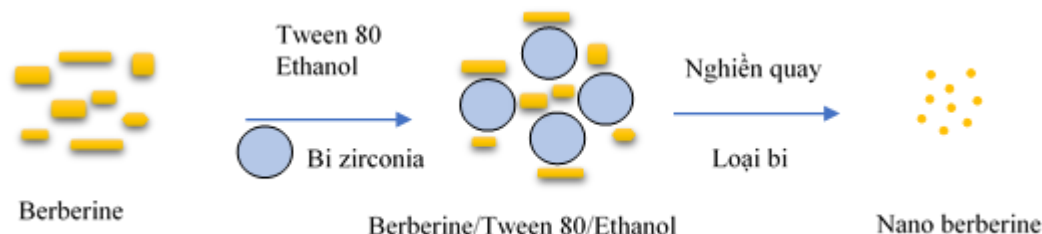
Nano BBr được chế tạo theo phương pháp nghiền quay theo sơ đồ được mô tả ở Hình 1. Tiến hành cân BBr với khối lượng khác nhau; 0,6 g tween 80; 3 g ethanol và nước vừa đủ 60 g tổng khối lượng vào chai trung tính Schott Duran (Đức). Cho tiếp 120 g bi zirconia (95% ZrO_2 , 5% Y_2O_3 , hãng CZM) có kích thước 0,4 – 0,6 mm, độ cứng trên 1000 Hv vào chai và đặt trên máy quay trục lăn ở tốc độ 1000 vòng/phút trong 120 giờ, các thông số này được chọn theo những kết quả đã thực hiện trước đó. Dưới sự va chạm của bi, bột BBr nguyên liệu được nghiền nhỏ và bao bọc bởi chất hoạt động tween 80 và tồn tại trong hệ ở dạng tinh thể với kích thước nano. Mẫu được lọc loại bi và thu được hỗn dịch chứa nano BBr. Trong nghiên cứu này, hàm lượng BBr được thay đổi để khảo sát ảnh hưởng của chúng đối với kích thước hạt nano BBr tạo thành.

Để thu nano BBr dạng bột rắn, hỗn dịch đã chế tạo ở bước trên được tiến hành đông khô trong 48 giờ ở -55°C với thiết bị đông khô Sanvac 55-9 Pro (Đan Mạch).

2.3 Các phương pháp phân tích

Các mẫu thí nghiệm được phân tích bằng phương pháp chụp ảnh kính hiển vi điện tử quét FE-SEM (Hitachi S-4800, Nhật Bản) và kính hiển vi

điện tử truyền qua TEM (JEM – 1400, Nhật Bản): thực hiện bằng cách nhỏ giọt mẫu đã pha loãng trong nước lên lưới đồng đường kính 3 mm, để khô ở nhiệt độ phòng và tiến hành phân tích ở điện thế 10 kV với FE-SEM và 100 kV với TEM.



Hình 1: Sơ đồ mô tả quy trình chế tạo nano berberine

Phương pháp DLS (Horiba SZ-100, Nhật Bản): trong phương pháp này, mẫu được pha loãng trong dung môi là nước và tiến hành phân tích ở góc 90°.

Mẫu bột nano BBr sau khi đông khô được phân tích XRD (Bruker D8-Advance, Đức) ở góc quét từ 4 – 40°.

2.4 Xác định hàm lượng BBr trong bột nano BBr

Bột nano BBr sau khi đông khô được xác định hàm lượng BBr bằng phương pháp đo phổ UV-Vis (Jasco V670, Nhật Bản).

Xây dựng đường chuẩn: Đường chuẩn được xây dựng bằng cách hòa tan 0,01 g bột BBr chuẩn HPLC (Sigma) trong 10 mL methanol, sau đó pha loãng ra các nồng độ ở 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,1 mg/mL, 0,05 mg/mL và 0,025 mg/mL. Đo độ hấp thụ của dung dịch chuẩn tại bước sóng cực đại 430 nm với mẫu trắng là methanol trong cuvet thạch anh.

Xác định hàm BBr: Cân 0,01 g bột nano BBr được chế tạo ở trên hòa tan hoàn toàn trong 10 mL methanol. Lấy 1 mL dung dịch trên pha loãng trong 19 mL methanol. Tiến hành đo hấp thụ của mẫu và suy ra hàm lượng dựa trên cường độ hấp thụ.

2.5 Thử nghiệm khả năng gây độc tế bào ung thư trong điều kiện in vitro

Thử nghiệm khả năng kháng ung thư được thực hiện tại phòng thí nghiệm Sinh học phân tử - Đại học Khoa học Tự Nhiên Thành phố Hồ Chí Minh và được tiến hành như sau:

Chuẩn bị tế bào và mẫu thử:

Chuẩn bị tế bào: Các dòng tế bào ung thư được sử dụng là MCF-7 và Hep G2. Các dòng tế bào ung thư được nuôi cấy dưới dạng đơn lớp trong môi

trường nuôi cấy E'MEM có bổ sung L-glutamine (2 mM), HEPES (20 mM), amphotericin B (0,025 µg/mL), penicillin G (100 UI/mL), streptomycin (100 µg/mL), 10% (v/v) huyết thanh bào thai bò FBS và ủ ở 37°C, 5% CO₂.

Chuẩn bị mẫu thử: Bột nano BBr sau khi đông khô được hòa tan trong DMSO 0,5% để đạt các nồng độ: 100 µg/mL; 50 µg/mL; 25 µg/mL; 12,5 µg/mL; 10 µg/mL; 6,25 µg/mL; 5 µg/mL và 3,125 µg/mL.

Tiến hành thử nghiệm:

Tế bào đơn được cấy trên những vi nuôi cấy 96 giếng với mật độ là 104 tế bào/giếng. Sau 24 giờ nuôi cấy, quần thể tế bào được ủ với chất khảo sát ở các nồng độ trong 48 giờ. Sau đó, protein tổng từ tế bào thử nghiệm được cố định bằng dung dịch Trichloroacetic acid 50% lạnh và nhuộm với dung dịch Sulforhodamine B 0,2%. Kết quả được đọc bằng máy ELISA reader ở hai bước sóng 492 nm và 620 nm. Các thí nghiệm được lặp lại ba lần và kết quả được trình bày dưới dạng giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn.

Tính toán kết quả:

- Giá trị OD = OD₄₉₂ – OD₆₂₀ (1)
- Tính OD₄₉₂ (hoặc OD₆₂₀) = OD_{tb} - OD_{blank} (2)
- Tính tỉ lệ (%) gây độc tế bào theo công thức:

$$\%I = \left(1 - \frac{OD_{TN}}{OD_C}\right) \times 100\%$$

Với:

- OD_{tb}: giá trị OD của giếng có chứa tế bào
- OD_{blank}: giá trị OD của giếng blank (không có tế bào)

– OD_{TN} : giá trị OD của mẫu thử tính từ công thức (1) và (2)

– OD_C : giá trị OD của mẫu chứng (control) tính từ công thức (1) và (2)

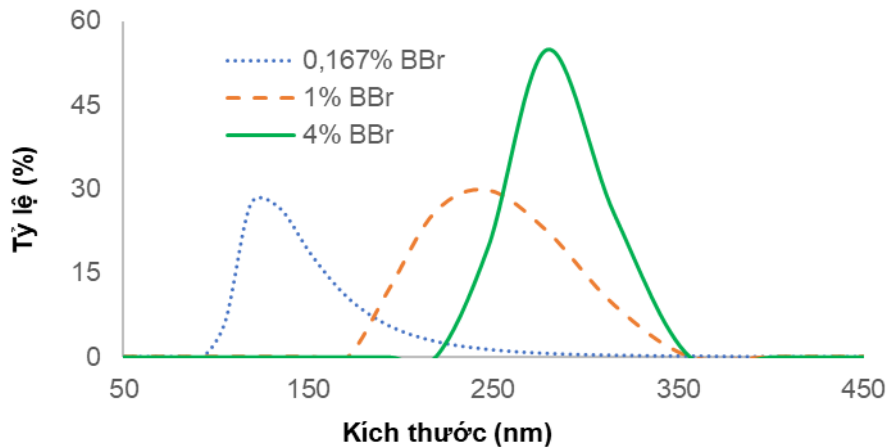
Dữ liệu sau đó được phân tích bằng bảng Excel và IC_{50} được xác định bằng cách sử dụng phần mềm Prism với phương pháp hồi quy không tuyến tính đa thông số và $R^2 > 0.9$.

3 KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

3.1 Kết quả chế tạo nano BBr bằng phương pháp nghiền quay

Kết quả DLS của các mẫu với hàm lượng BBr khác nhau được thể hiện ở Hình 2. Khi tăng dần hàm lượng BBr từ 0,167% lên 4%, kích thước hạt nano

tăng dần, tỷ lệ % kích thước hạt tăng dần và sự phân bố kích thước hạt hẹp dần. Do ở hàm lượng BBr thấp (0,167%) trong khi số lượng bi như nhau, sự tương tác, tiếp xúc, giữa các hạt BBr với bi nhiều và thường xuyên hơn nên các hạt BBr bị va đập nhiều dẫn đến kích thước hạt nano nhỏ hơn so với ở hàm lượng cao (4%). Mặt khác, với hàm lượng BBr 0,167% trong khi đó hàm lượng tween 80 (1%) lại cao hơn hàm lượng BBr nên sự phân tán các hạt trong dung dịch tốt dẫn đến các hạt tách rời và phân tán đều làm kích thước hạt nano được tạo ra nhỏ hơn. Ngược lại, ở hàm lượng BBr là 4% cao hơn hàm lượng tween 80 (1%) nên sự phân tán các hạt không được đồng đều dẫn đến các hạt kết tụ lại với nhau làm kích thước hạt tạo ra to hơn so với ở hàm lượng BBr 0,167%.



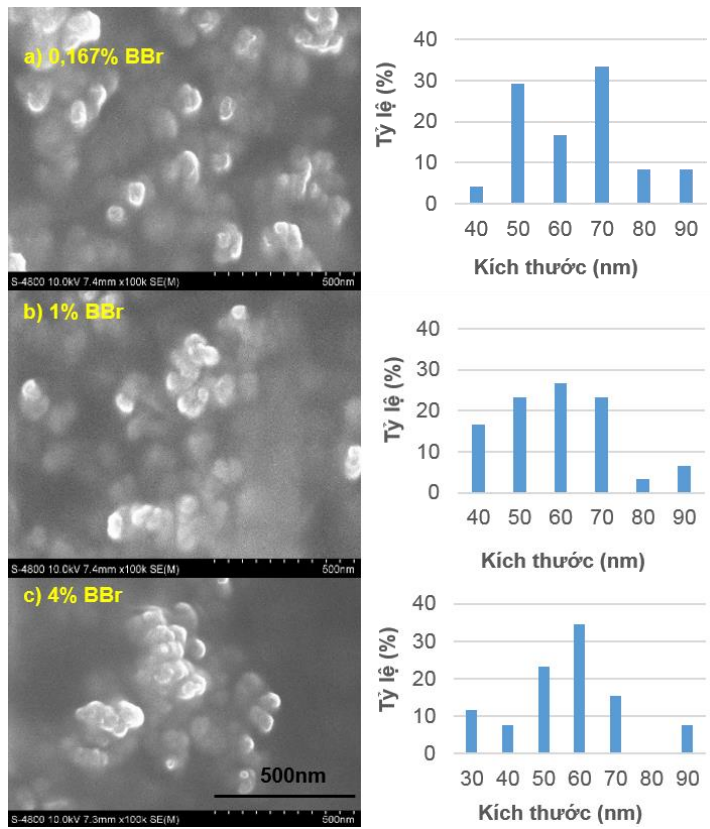
Hình 2: Kết quả DLS của các mẫu nano BBr với hàm lượng berberine khác nhau

Kết quả FE-SEM và giản đồ phân bố kích thước hạt của các mẫu với hàm lượng BBr lần lượt là 0,167%, 1% và 4% được thể hiện ở Hình 3. Ảnh FE-SEM cho thấy với hàm lượng BBr là 0,167%, hạt nano có kích thước tương đối nhỏ, khoảng kích thước 50 nm và 70 nm chiếm tỷ lệ cao. Hàm lượng BBr là 1%, kích thước hạt nano tập trung nhiều trong khoảng từ 40 nm đến 70 nm tương tự mẫu 0,167% BBr. Với mẫu ở hàm lượng BBr 4%, ảnh FE-SEM cho thấy trong mẫu cũng tồn tại các hạt nano chủ yếu trong khoảng kích thước từ 50 nm đến 70 nm. Độ phân bố kích thước có phần rộng hơn các mẫu ở nồng độ thấp hơn nhưng không rõ ràng.

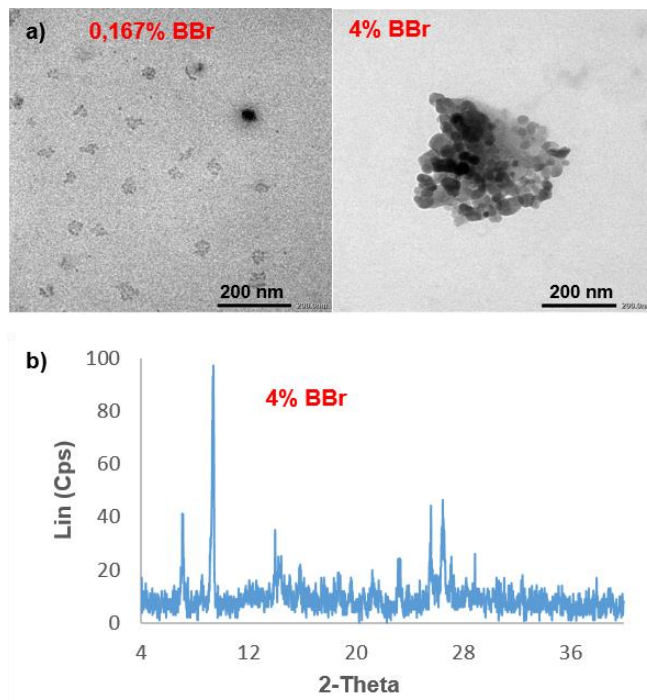
Ở hàm lượng ở 4% BBr tuy sự tiếp xúc và va chạm giữa các hạt nano BBr với bi hạn chế hơn so với ở hàm lượng thấp (0,167% và 1%) nhưng hạt nano tạo thành có kích thước gần bằng nhau, kết quả

này cần được kiểm chứng lại bằng phương pháp chụp ảnh TEM.

Ảnh TEM của mẫu nano với hàm lượng BBr khác nhau ở Hình 4a cho thấy kích thước hạt nano ở 0,167% BBr nhỏ hơn so với 4% BBr. Kết quả này hoàn toàn phù hợp với chứng minh từ kết quả DLS. Tuy nhiên các hạt nano ở mẫu 4% BBr có sự tụ lại với nhau, điều này lý giải cho việc khi đo kích thước hạt bằng phương pháp DLS cho kích thước hạt lớn hơn so với kết quả FE-SEM. Phương pháp DLS thực hiện đo trong dung dịch và các hạt có kích thước khoảng 60 nm kết tụ lại với nhau tạo thành khối với kích thước khoảng 300 nm. Trong khi đó ở phương pháp FE-SEM và TEM, mẫu được sấy khô nên có thể quan sát được các hạt nano nhỏ trong khối kết tụ, điều này giải thích cho kết quả ảnh FE-SEM khi kích thước hạt nano BBr ở mẫu 0,167% và 4% gần như bằng nhau.



Hình 3: Ảnh FE-SEM và giản đồ phân bố kích thước hạt của các mẫu nano BBr với hàm lượng berberine khác nhau



Hình 4: Kết quả TEM (a) mẫu 0,167% và 4 % BBr và Giản đồ XRD mẫu 4% BBr (b)

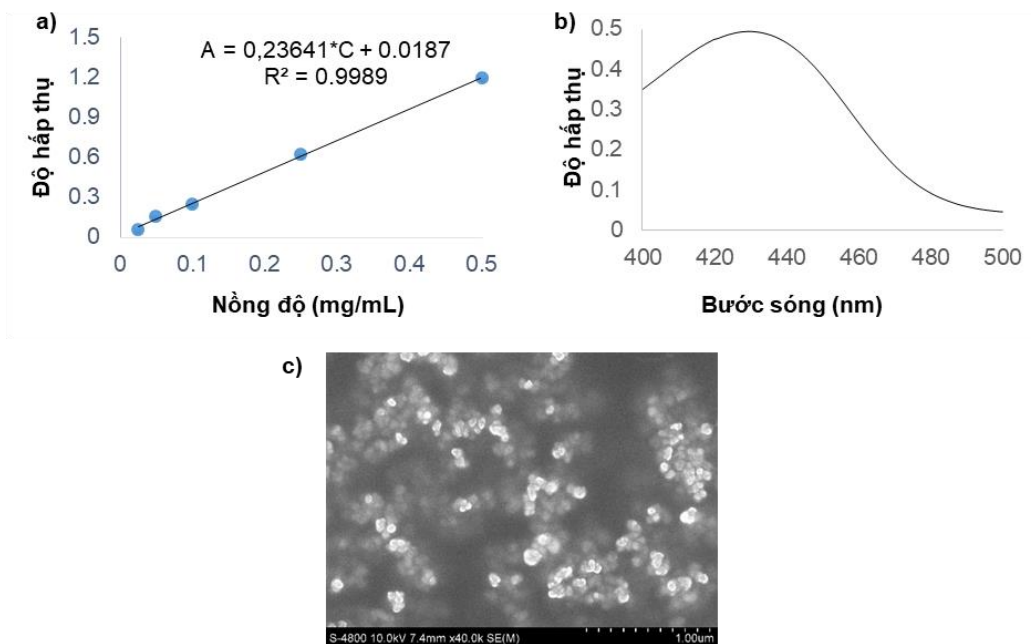
Như vậy có thể thấy hạt nano BBr được tạo thành trong phương pháp từ trên xuống trong nghiên cứu này đạt được kích thước nanomet, thậm chí kích thước hạt nhỏ hơn các phương pháp chế tạo theo kiểu từ dưới lên (Yu *et al.*, 2017; Sahibzada *et al.*, 2018; Ochin *et al.*, 2018). Điểm khác biệt của nghiên cứu này là chế tạo ở hàm lượng BBr đến 4%, trong khi các nghiên cứu trên thường dưới 1%.

Hình 4b cho thấy kết quả đo XRD của mẫu 4% BBr xuất hiện peak có cường độ mạnh trong khoảng $9,5^\circ$ và các peak có cường độ yếu hơn trong khoảng $25,5^\circ$ và $26,5^\circ$, đây là các peak đặc trưng cho cấu trúc tinh thể của BBr (Zou *et al.*, 2009; Jia *et al.*, 2017; Sahibzada *et al.*, 2018). Như vậy có thể thấy sau quá trình chế tạo bằng phương pháp nghiền quay, vật liệu nano BBr tạo thành vẫn giữ cấu trúc tinh thể rõ nét, đây là điểm khác biệt với vật liệu nano BBr được chế tạo bằng phương pháp từ dưới

lên như hạt nano chitosan gắn BBr (Zou *et al.*, 2019), hạt nano polymer β -cyclodextrin gắn BBr (Jia *et al.*, 2017) hay hạt nano nhũ tương chứa BBr (Sahibzada *et al.*, 2018). Với phương pháp từ dưới lên, các hạt này được chế tạo bằng cách hòa tan BBr vào dung môi hữu cơ trước nên khi tạo thành hạt nano đã mất cấu trúc tinh thể, trở thành dạng vô định hình, dẫn đến khi phân tích bằng XRD không còn xuất hiện peak nhiễu xạ hoặc peak với cường độ rất yếu, không rõ nét.

3.2 Kết quả định lượng BBr trong bột nano BBr sau khi đông khô

Do mục đích chế tạo nano BBr dạng bột rắn để có thể dễ dàng hơn khi ứng dụng làm thực phẩm chức năng hay dược phẩm, hỗn dịch nano BBr với 4% BBr và 1% tween 80 được đông khô thu bột và xác định hàm lượng BBr bằng phương pháp quang phổ UV-Vis.



Hình 5: Đồ thị biểu diễn sự phụ thuộc của độ hấp thụ và nồng độ của dung dịch chuẩn (a), phổ UV-Vis của mẫu bột nano BBr hòa tan trong methanol (b) và ảnh FE-SEM bột nano BBr sau khi đông khô (c)

Từ kết quả UV-Vis của mẫu chuẩn ở các nồng độ khác nhau, tiến hành dựng đường chuẩn biểu diễn mối liên hệ giữa độ hấp thụ và nồng độ của dung dịch BBr chuẩn ở vị trí peak 430 nm như ở Hình 5a. Phương trình biểu thị mối quan hệ này là:

$$A=0,23641 * C+0,0187 \quad (1)$$

với hệ số tương quan $R^2=0,9989$.

Phổ UV-Vis của mẫu nano BBr sau khi đông khô hòa tan lại trong methanol ở Hình 5b cho thấy peak 430 nm đặc trưng của BBr với độ hấp thụ là $A=0,49437$. Thay giá trị $A=0,49437$ vào phương trình (1), ta tính được hàm lượng BBr trong bột đông khô là 60,36%. Kết quả này cho thấy trong quá trình chế tạo, phân tử berberine có thể chuyển hóa thành các dạng khác như berberrubine, thalifendine... (Imenshahidi *et al.*, 2016) trong khi đường chuẩn

được dựng từ berberine tinh khiết (Sigma), hơn nữa đây là hệ nano với bề mặt hạt tinh thể BBr được bao phủ bởi tween 80 nên hàm lượng chỉ đạt 60,36%. Mặt khác, ảnh FE-SEM ở Hình 5c, được thực hiện bằng cách đo trực tiếp bột trên lưới đồng cho thấy trong bột sau khi đông khô vẫn tồn tại các hạt có kích thước khoảng 60 nm với hình dạng rõ ràng.

3.3 Kết quả thử nghiệm khả năng gây độc tế bào ung thư trong điều kiện in vitro

Kết quả thử nghiệm gây độc tế bào ung thư Hep G2 và mẫu MCF-7 được thể hiện ở Bảng 2 và Bảng

3. Giá trị hiệu quả ức chế trung bình và độ lệch chuẩn được tính toán dựa trên 3 lần đo. Mẫu nano BBr cho thấy khả năng gây độc trên cả 2 dòng tế bào khảo sát, trong đó hiệu quả trên dòng tế bào MCF-7 mạnh hơn so với dòng tế bào Hep G2. Ở nồng độ 50 µg/mL, phần trăm gây độc ở dòng tế bào MCF-7 là 73,11% so với 52,71% trên dòng tế bào Hep G2. Ở nồng độ thấp nhất thử nghiệm (3,125 µg/mL trên dòng tế bào MCF-7 và 5 µg/mL trên dòng tế bào Hep G2) cho thấy phần trăm gây độc tế bào lần lượt là 25,36% và 21,03%.

Bảng 2: Hiệu quả ức chế tế bào ung thư của mẫu nano BBr với hàm lượng khác nhau

Dòng tế bào	Nồng độ (µg/mL)	Hiệu quả ức chế (%)				
		Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB	ĐLC
Hep G2	100	63,77	57,05	62,56	61,12	3,58
	50	50,36	55,70	52,05	52,71	2,73
	25	43,84	41,61	42,47	42,64	1,12
	10	33,33	26,51	29,68	29,81	3,41
	5	24,28	22,82	15,98	21,03	4,43
MCF-7	50	72,98	73,59	72,75	73,11	0,43
	25	65,56	62,01	62,93	63,05	1,85
	12,5	54,97	53,61	53,89	54,16	0,72
	6,25	42,25	41,94	42,99	42,39	0,54
	3,125	26,77	25,81	23,52	25,36	1,67

TB: trung bình; ĐLC: độ lệch chuẩn

Giá trị IC₅₀ của mẫu nano BBr đối với dòng tế bào ung thư MCF-7 và Hep G2 lần lượt là 11,11 ± 0,48 µg/mL và 43,45 ± 3,39 µg/mL. Một số nghiên cứu cho thấy BBr ở kích thước nano có khả năng kháng ung thư tốt hơn so với nguyên liệu có kích thước micromet (Bhanumathi *et al.*, 2017; Ochin *et al.*, 2018), nguyên nhân là do kích thước nhỏ, độ

sinh khả dụng cao hơn nên dễ tiếp xúc với tế bào ung thư. Bản thân berberine nguyên liệu cũng có tính kháng ung thư với giá trị IC₅₀ từ 40 – 50 µg/mL với tế bào MCF-7 (Bhanumathi *et al.*, 2017). Tuy nhiên cần kiểm chứng lại với nguyên liệu berberine trong nghiên cứu này.

Bảng 3: Giá trị IC₅₀ của mẫu nano BBr trên các dòng tế bào thực hiện ở 3 lần đo

Dòng tế bào	Giá trị IC ₅₀ (µg/mL)			
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB ± ĐLC
MCF-7	10,56	11,36	11,42	11,11 ± 0,48
Hep G2	40,14	46,91	43,30	43,45 ± 3,39

TB: trung bình; ĐLC: độ lệch chuẩn

Bên cạnh đó, giá trị IC₅₀ của mẫu nano BBr có hiệu quả gây độc cả 2 dòng tế bào tốt hơn so với các cao chiết nước lã dung môi hữu cơ thực vật như rễ chùm ngây (Lương Hiền Minh và *ctv.*, 2017) hay địa tiền *Marchantia polymorpha* L. (Trần Quốc Tân và *ctv.*, 2018). Một điều đáng lưu ý là nồng độ thử nghiệm được tính trên khối lượng bột nano BBr sau khi đông khô, hàm lượng berberine và các dạng chuyển hóa của chúng sẽ nhỏ hơn khối lượng bột do bề mặt các hạt nano đã được bao bọc bởi tween 80. Từ những kết quả trên, cho thấy vật liệu nano berberin được chế tạo theo phương pháp này rất có

tiềm năng ứng dụng trong thực phẩm hỗ trợ phòng ngừa ung thư hoặc dược phẩm.

4 KẾT LUẬN

Vật liệu nano BBr đã được chế tạo thành công với cấu trúc tinh thể bằng phương pháp nghiền quay, được kiểm định qua các phân tích DLS, FE-SEM, TEM và XRD. Hàm lượng BBr ảnh hưởng đến kích thước hạt nano tạo thành. Kết quả thu được hạt nano BBr có kích thước trong khoảng 60 nm ở hàm lượng 1% tween 80 và 4% BBr. Bằng phương pháp đông khô, mẫu nano BBr được đưa về dạng bột vẫn giữ

được kích thước nanomet và hàm lượng BBr có trong bột sau khi đông khô là 60,36%. Vật liệu nano BBr cho thấy khả năng ức chế tế bào ung thư vú MCF-7 và gan Hep G2 với giá trị IC₅₀ lần lượt là 11,11 ± 0,48 µg/mL và 43,45 ± 3,39 µg/mL.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Ủy ban nhân dân Thành phố Hồ Chí Minh, thực hiện với sự ủng hộ của Ban Quản lý Khu Công nghệ cao (SHTP) và Trung tâm Nghiên cứu triển khai Khu Công nghệ cao (SHTPLABs).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Battu, S. K., Repka, M. A., Maddineni, S., Chittiboyina, A. G., Avery, M. A. and Majumdar, S., 2010. Physicochemical Characterization of Berberine Chloride: A Perspective in the Development of a Solution Dosage Form for Oral Delivery. *AAPS PharmSciTech*. 11(3): 1466-1475.

Bhanumathi, R., Vimala, K., Shanthi, K., Thangaraj, R. and Kannan, S., 2017. Bioformulation of Silver Nanoparticles as Berberine Carrier cum Anticancer Agent against Breast Cancer. *New Journal of Chemistry*. 41(23): 14466-14477.

Gupta, L., Sharma, A. K., Gothwal, A. *et al.*, 2017. Dendrimer encapsulated and conjugated delivery of berberine: A novel approach mitigating toxicity and improving in vivo pharmacokinetics. *International Journal of Pharmaceutics*. 528: 88-99.

Imenshahidi, M. and Hosseinzadeh, H., 2016. Berberis Vulgaris and Berberine: An Update Review. *Phytotherapy Research*. 30(11): 1745-1764.

Jia, J., Zhang, K., Zhou, X., Zhou, D. and Ge, F., 2017. Precise Dissolution Control and Bioavailability Evaluation for Insoluble Drug Berberine via a Polymeric Particle Prepared Using Supercritical CO₂. *Polymers*. 10(11): 1198-1214.

Kumar, A., Ekavali, Chopra, K., Mukherjee, M., Pottabathini, R. and Dhull, D. K., 2015. Current knowledge and pharmacological profile of berberine: An update. *European Journal of Pharmacology*. 761: 288-297.

Lin, Y. H., Lin, J. H., Chou, S. C., Chung, C. C., Chen, Y. C. and Chang, C. H., 2015. Berberine-loaded targeted nanoparticles as specific *Helicobacter pylori* eradication therapy: in vitro and in vivo study. *Nanomedicine*. 10(1): 57-71.

Loh, Z. H., Samanta, A. K. and Heng, P. W. S., 2015. Overview of milling techniques for improving the solubility of poorly water-soluble drugs. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 10(4): 255-274.

Lương Hiền Minh, Huỳnh Thanh Trang, Nguyễn Đức Bách và Phí Thị Cẩm Miện, 2018. Nghiên

cứ khả năng ức chế 5 dòng tế bào ung thư ở người của cao dịch chiết rễ chùm ngây trong điều kiện in vitro. *Tạp chí Khoa Học và Công nghệ Việt Nam*. 60(7): 28-31.

Mirhadi, E., Rezaee, R. and Malaekheh-Nikouei, B., 2018. Nano strategies for berberine delivery, a natural alkaloid of Berberis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 104: 465-473.

Ochin, C. C. and Garelnabi, M., 2018. Berberine Encapsulated PLGA-PEG Nanoparticles Modulate PCSK-9 in Hep G2 Cells. *Cardiovascular & Haematological Disorders-Drug Targets*. 18(1): 61-70.

Sahibzada, M. U. K., Sadiq, A., Faidah, H. S. *et al.*, 2018. Berberine nanoparticles with enhanced in vitro bioavailability: characterization and antimicrobial activity. *Drug Design, Development and Therapy*. 12: 303-312.

Singh A., Duggal, S., Kaur, N. and Singh, J., 2010. Berberine: Alkaloid with wide spectrum of pharmacological activities. *Journal of Natural Products*. 3: 64-75.

Tan, W., Li, Y., Chen, M. and Wang, Y., 2011. Berberine hydrochloride: anticancer activity and nanoparticulate delivery system. *International Journal of Nanomedicine*. 6: 1773-1777.

Tillhon, M., Guamán-Ortiz, L. M., Lombardi, P. and Scovassi, A. I., 2012. Berberine: New perspectives for old remedies. *Biochemical Pharmacology*. 84: 1260-1267.

Trần Quốc Tân, Lương Thiện Tâm, Phan Ngô Hoang và Quách Ngô Diễm Phương, 2018. Khảo sát một số hoạt tính sinh học của loài địa tiền *Marchantia polymorpha* L. thu hái tại Đà Lạt, Lâm Đồng. *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ*. 2(5): 26-34.

Wanga, T., Wang, N., Hao, A., He, X. and Deng, Y., 2010. Lyophilization of water-in-oil emulsions to prepare phospholipid-based anhydrous reverse micelles for oral peptide delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 39: 373-379.

Wang, Z., Wu, J., Zhou, Q., Wang, Y., and Chen, T., 2015. Berberine Nanosuspension Enhances Hypoglycemic Efficacy on Streptozotocin Induced Diabetic C57BL/6 Mice. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Article ID 239749, 5 pages.

Yu, F., Ao, M., Zheng, X. *et al.*, 2017. PEG-lipid-PLGA hybrid nanoparticles loaded with berberine-phospholipid complex to facilitate the oral delivery efficiency. *Drug Delivery*. 24(1): 825-833.

Zou, Q., Li, Y., Zhang, L., Zuo, Y., Li, J. and Li, J., 2008. Antibiotic delivery system using nano-hydroxyapatite/chitosan bone cement consisting of berberine. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 89A(4): 1108-1117.