

# 茶多酚锰-壳聚糖微球的制备、控释和诱导肝癌细胞凋亡的研究

黄河宁<sup>1,2</sup>, 李程<sup>1</sup>, 谢笠升<sup>1</sup>, 黄河清<sup>1,3</sup>

(1. 厦门大学生命科学学院细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005;

2. 三明学院化学与生物工程系, 三明 365004;

3. 厦门大学化学化工学院固体表面物理化学国家重点实验室, 福建省化学生物学重点实验室, 厦门 361005)

**摘要** 选用壳聚糖为微米粒包被材料, 制备茶多酚锰(Tea Polyphenol Manganese, TPMn)-壳聚糖微球. 用荧光显微技术研究了 TPMn-壳聚糖微球的荧光特性, 用扫描和透射电子显微镜证实 TPMn-壳聚糖微球尺寸和分布规律. RP-HPLC 定量分析 TPMn-壳聚糖微球包封率为 68%, 符合微米级微粒控释药物包封率的要求. 动力学研究表明, 茶多酚(TP)-壳聚糖和 TPMn-壳聚糖的微球均有控释 TP 的能力, 控释时间高达 40 h 以上, 但前者释放速率稍快于后者. TPMn 和 TPMn-壳聚糖微球均能诱导肝癌细胞凋亡, 但 TPMn-壳聚糖微球诱导肿瘤细胞的凋亡速率稍高于 TPM. 实验结果证实, 以 TPMn-壳聚糖微球方式控释 TPMn 有利于提高诱导肿瘤细胞凋亡速率. TPMn-壳聚糖微球具有研发成注射型抗肿瘤新药的可能性.

**关键词** 茶多酚锰-壳聚糖微球; 理化特性; 控释; 肝癌细胞; 凋亡

中图分类号 O623

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2008)08-1592-06

茶多酚(TP)是茶叶中约 30 种多酚类化合物的总称. 按分子结构不同, TP 可分为儿茶素类(Catechins)、黄酮酮类(Flavanones)、花青素(Anthocyanin)和酚酸类(Phenolic acid)等四大类, 其中儿茶素类含量最高, 占 TP 总量的 60% ~ 80%<sup>[1]</sup>. 大量研究报道和临床报告指出, TP 具有抗肿瘤<sup>[2-4]</sup>、杀菌抗病毒、抗氧化、保肝护肾和预防爱滋病等药理作用. 由于 TP 分子结构中含有多个邻位酚羟基, 它们可作为多羟基配体与金属离子发生配位反应, 形成 TP 金属化合物. 例如: 茶多酚锗和 TPMn, 它们均表现出比 TP 更强的抗癌活性<sup>[4,5]</sup>. 铂族金属包括铂、钯、铑、铱、钌、铑等 6 个元素, 均已研制成抗肿瘤药物, 并已应用于临床. 铂类药物的主要缺陷在于毒性较强, 主要是针对肾脏毒性, 从而限制了在临床上的过量使用或不适用于有肾脏疾病的患者. TP 对顺铂所致的肾毒性起保护作用<sup>[6,7]</sup>. 近期研究指出, 有机合成的 TPMn 能诱导 Hela 卵巢癌和 Raji 人 B 淋巴瘤细胞凋亡, 其细胞凋亡率明显高于 TP<sup>[4]</sup>.

近些年来, 药物微囊化技术在制药领域中的应用已形成日益剧增趋势, 尤其磁性微球、微米囊和纳米囊技术已成为靶向给药的研究热点<sup>[8,9]</sup>. 化学与生物载体是药物释放的重要组成部分<sup>[10]</sup>, 同时也是影响药效的主要因素之一, 相关研究已经引起药物界的高度重视, 并有详细的研究报道. 明胶、阿拉伯胶和壳聚糖等高分子材料均具有稳定、无毒、成膜性或成球性较好等特点, 是常见的药物微囊化的包被材料, 尤其是壳聚糖包被材料<sup>[11,12]</sup>. 壳聚糖是一种线性氨基多糖<sup>[8]</sup>, 具有与粘多糖类似的结构, 无毒性, 生物可吸收和分解产物不会引起生物组织紊乱<sup>[11]</sup>. 此外, 该多糖穿透性在酸性环境比在碱性环境中要大, 具有控释和靶向性给药特点. 本论文选用常规壳聚糖微米包装技术制备 TPMn-壳聚糖微球, 研究其控释 TPMn 的速率, 并选用流式细胞术分析 TPMn-壳聚糖诱导肿瘤细胞凋亡能力和速率, 具有重要的科学意义和潜在的应用价值.

收稿日期: 2007-08-07.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 40776060)、厦门市科技项目(批准号: 3502Z2001263)和三明市科技项目基金(批准号: 2004-L-1)资助.

联系人简介: 黄河清, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事蛋白质结构与功能研究. E-mail: hqhuang@xmu.edu.cn

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

儿茶素(纯度 95%, 福建天宝化工厂); TPMn(自制<sup>[4]</sup>); 壳聚糖(A. R. 级, 上海中国医药集团公司); 聚磷酸钠(A. R. 级, 广东西陇化工厂); 荧光染料 PI(美国 Sigma 公司); Hep G2 肝癌细胞(中国科学院细胞研究所提供); 其它试剂均为市售分析纯或美国 Sigma 公司产品。

Millipore 中央超纯水系统(美国 Millipore 公司); QT-58A 智能紫外检测仪(上海琪特分析仪器公司); Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Genesys 型紫外-可见分光光度计(美国 Water 公司); XL-30 环境扫描电镜(荷兰 Philips-FEI 公司); JERM-2010 型透射电镜(日本电子株式会社); BX41 荧光显微镜(美国 Nikon 公司); EPICS-XL 型流式细胞仪(美国 Coulter 公司); Labconco Fezzne 18 型冻干机(美国 Labconco 公司); RF-301 型荧光分光光度计(日本 Shimadzu 公司)。

### 1.2 茶多酚锰的制备

TPMn 合成与制备参照文献[4]方法进行。

### 1.3 茶多酚锰荧光光谱的测定

精确称取 1 mg TPMn 固体, 加入 1 mL 二甲基亚砷溶液, 超声波助溶 3 min, 离心(转速 10000 r/min) 5 min. 取上层清液放入 10 mL 刻度试管中, 用体积分数为 95% 的乙醇稀释至刻度(0.1 mg/mL)。

测定条件: (1) 激发波长 340 nm, 扫描范围 240 ~ 340 nm; 发射波长 380 nm, 扫描范围 360 ~ 540 nm; 激发狭缝宽 3 nm, 发射狭缝宽 5 nm. (2) 激发波长 430 nm, 扫描范围 340 ~ 460 nm; 发射波长 490 nm, 扫描范围 460 ~ 560 nm; 激发狭缝宽 3 nm, 发射狭缝宽 5 nm. 按上述条件分别进行测试。

### 1.4 茶多酚锰-壳聚糖微球的制备

取 0.1 g 壳聚糖溶于 100 mL 体积分数为 1% 的醋酸溶液中, 将 8 mg TPMn 置于 1 mL 二甲基亚砷溶液中, 振荡助溶, 并用超纯水定容至 10 mL( $8 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$ )。将上述两种溶液在烧杯内混合, 搅拌 10 min 后进行超声分散. 用恒流泵缓慢滴加 50 mL 质量分数为 0.1% 的多聚磷酸钠溶液(流速 20 mL/h), 混合反应, 并静置于 4 °C 冰箱中过夜. 选用低速(1000 r/min) 离心方式, 收集 TPMn-壳聚糖微球. 用类似方法制备 TP-壳聚糖微球。

### 1.5 茶多酚锰-壳聚糖微球的形貌观察和粒径测定

将静置 12 h 的 TPMn-壳聚糖微球悬浊液装入 10 K 的透析袋内, 置于 pH = 4.6 的 NaAc-HAc 缓冲溶液中, 透析 5 h. 将初步纯化后的 TPMn-壳聚糖微球悬浊液点滴于载玻片上, 在常温下自然干燥, 并用甘油封片, 在荧光显微镜下观察 TPMn-壳聚糖微球的形态和分布规律. 将 TPMn-壳聚糖微球悬浊液样品直接点滴在铜网上, 待干燥后置于透射电子显微镜内观察微球形态和分布情况. 将 TPMn-壳聚糖微球样品直接通过冷冻干燥机进行干燥. 干燥后的样品经再次脱水, 获得固体样品. 将样品切成薄片且经喷金处理后, 在扫描电子显微镜下观察微球形态, 并测定粒径。

### 1.6 茶多酚锰-壳聚糖微球包封率的测定

1.6.1 标准曲线的制备 配制不同浓度的 TPMn 标准溶液, 用 RP-HPLC 法分离与定量分析 TPMn, 并绘制标准工作曲线. 色谱条件: 依利特 ODS-C<sub>18</sub> 色谱柱, 4.6 mm × 250 mm(5 μm i. d.); 流动相为 TFA-H<sub>2</sub>O 和 H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>OH 的二元梯度洗脱体系. CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O(含质量分数为 0.003% 的 TFA, pH = 3.5), 体积比 13:87(10 min), 20:80(5 min), 35:65(20 min), 75:25(20 min), 85:15(5 min), 90:10(5 min), 100:1(5 min). 流速 1.0 mL/min, 柱温 28 °C, 检测波长 278 nm, 进样量 20 μL。

1.6.2 包封率的测定 参照文献[13]方法, 配制 10 mL TPMn 溶液(800 μg/mL), 参考上述 1.4 节方法制备 TPMn-壳聚糖微球. 将壳聚糖微球置入截留分子量为 10000 Da 的透析袋中, 并在 NaAc-HAc (pH = 4.6) 缓冲溶液中透析 5 h. 把透析液分装于 50 支离心管中, 并用离心浓缩仪浓缩 10 h, 将其样品定容于 250 mL 容量瓶中. 选用 RP-HPLC 法分离与定量检测 TPMn 含量, 根据公式

$$\text{载药量} = \text{TPMn 的投入总量} - \text{透析液中游离 TPMn 含量}$$

计算包封率:

$$\text{包封率} = (\text{载药量} / \text{TPMn 投入总量}) \times 100\%$$

### 1.7 茶多酚(锰)-壳聚糖微球控释 TP 的动力学过程

称取 TP 和 TPMn 各 0.1 g, 分别制成 TPMn-壳聚糖微球和 TP-壳聚糖微球样品. 该样品经透析、离心、弃上层清液和收集沉淀微球等步骤后, 采用 0.1 mol/L  $\text{Na}_3\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  (pH = 7.2) 作为释放介质. 在沉淀微球中各加入 20 mL 0.1 mol/L  $\text{Na}_3\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  缓释剂, 置于摇床上摇荡进行控释反应. 选用电子光谱技术监测 TP-壳聚糖和 TPMn-壳聚糖微球控释 TP 和 TPMn 的动力学过程和规律. 监测波长为 278 nm.

### 1.8 茶多酚锰-壳聚糖微球诱导肝癌细胞凋亡

1.8.1 分组细胞培养的主要步骤 肝癌细胞培养参照文献[4]方法进行. 将细胞培养 48 h 后, 加等量的壳聚糖、TP、TPMn 和 TPMn-壳聚糖微球药品. 对照组和处理组含有等量的 DMSO, 其余培养条件均相似.

1.8.2 肝癌细胞凋亡率分析 选用流式细胞术分析肝癌细胞凋亡率.

PBS 缓冲液的配制: 将 8.0 g NaCl, 0.2 g KCl, 3.4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  和 0.2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  溶于 800 mL 双蒸水中, 定容至 1000 mL, 分装, 高压灭菌, 于 4 °C 保存备用.

质量分数为 0.25% 胰蛋白酶的配制: 称取胰蛋白酶 0.5 g, 溶于 200 mL PBS 缓冲液中, 调 pH 至 7.2 ~ 7.4, 用 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤器过滤除菌, 分装, 于 -20 °C 保存.

各样品加药培养 4 d (待 TPMn-壳聚糖微球中 TPMn 完全释放) 后, 按以下实验步骤进行分析: (1) 将质量分数为 0.25% 的胰酶消化细胞用培养基吹打成单细胞悬液, 以 2000 r/min 的速率离心 5 min, 弃上清液; (2) 用不含 Ca 或 Mg 的 PBS 将细胞洗涤 2 次, 计数细胞总数; (3) 用约 500  $\mu\text{L}$  的 PBS 重悬细胞, 加 5 mL 冷乙醇, 于 4 °C 固定过夜; (4) 取  $5 \times 10^6$  个细胞放入 15 mL 离心管中, 以 2000 r/min 的速率离心 5 min, 弃乙醇; (5) 旋搅沉淀, 用 5 mL PBS 清洗 2 次, 用 800  $\mu\text{L}$  的 PBS 重悬细胞沉淀; (6) 加入 100  $\mu\text{L}$  10  $\times$  PI 溶液, 振荡混匀; (7) 加入 100  $\mu\text{L}$  煮沸过的 RNA 酶 A, 振荡混匀, 于 37 °C 孵育 30 min; (8) 选用流式细胞仪分析 TPMn-壳聚糖微诱导肝癌细胞凋亡率.

## 2 结果与讨论

### 2.1 茶多酚锰-壳聚糖微米粒的特性

通过系列实验发现, TP 和 TPMn 均具有荧光特性. TP 和 TPMn 经壳聚糖微米包裹后, 仍显示出荧光微米颗粒的特性, 其中激发和发射波长分别为  $\lambda_{\text{ex}} = 430 \text{ nm}$  和  $\lambda_{\text{em}} = 494 \text{ nm}$ . TP 和经 TPMn-壳聚糖分别包裹后, 其微米颗粒表现出荧光特性 [图 1(A)]. 图 1(B) 是 TPMn-壳聚糖微米粒荧光照片. 可以看出, 壳聚糖包裹着 TPMn, 并形成了荧光微球. 这些微球的直径约在 1.0 ~ 5.0  $\mu\text{m}$  之间, 分布尺寸以微米粒为主.

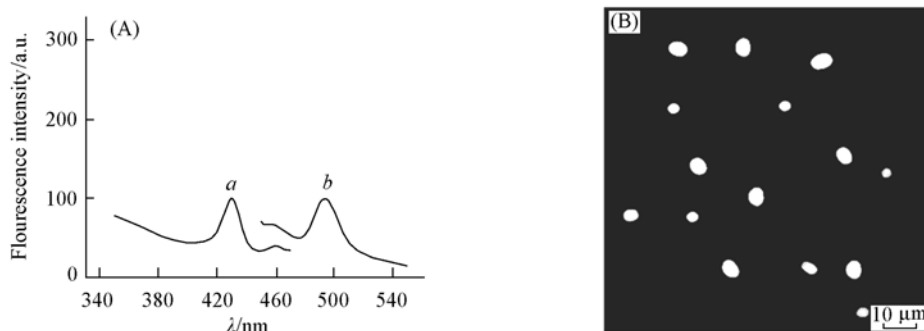


Fig. 1 Fluorescence spectra of tea polyphenol manganese loaded on a chitosan microparticles (A) and fluorescen microscopy image of TPMn-chitosan microparticles (B)

a. Excited spectrum; b. emission spectrum.

为了进一步证实图 1 结果, 并用于后续开展蛋白质结构与功能的研究, 选用透射电子显微镜观察

TPMn-壳聚糖微米粒分子形貌[图2(A)]. 可以看出, 壳聚糖(外壳)紧密结合包裹着 TPMn(核中心), 这一实验结果和图1的推测极为吻合. 图2(B)是 TPMn-壳聚糖微米粒的扫描电镜照片, 可以看出, 微米粒分子直径约为  $1.0 \sim 5.0 \mu\text{m}$ , 其粒子直径大小与分布形式与图1相似. 这一现象说明, 壳聚糖确实包裹了一定数量的 TPMn, 并形成直径为  $1.0 \sim 5.0 \mu\text{m}$  的微粒.

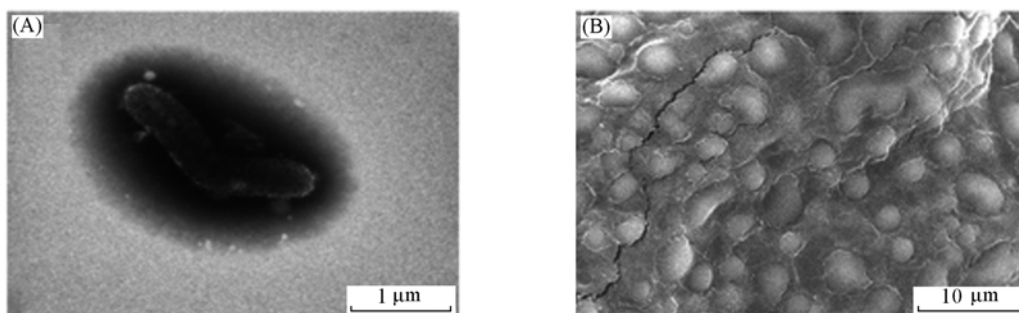


Fig. 2 Photographs of tea polyphenol manganese loaded on a chitosan microparticles observed with both transmission (A) and scanning electron microscopes (B)

## 2.2 茶多酚锰-壳聚糖微米粒控释茶多酚-锰的速率

包封率高低是评价壳聚糖是否适合作为微米粒包裹材料标准之一, 尤其是金属有机小分子化合物. 图3(A)为 TPMn 的 RP-HPLC 分离色谱图, 以 HPLC 法测定主峰面积[图3(A)峰1], 经测定 TPMn-壳聚糖微米微粒的包封率为 68%.

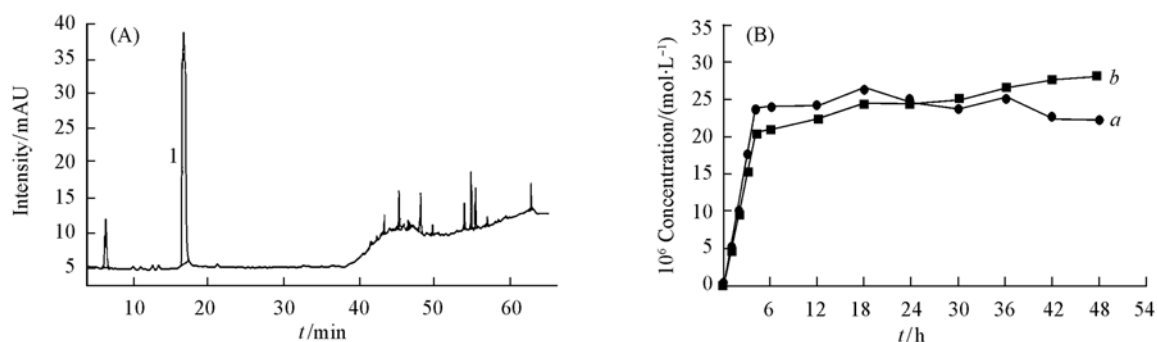


Fig. 3 RP-HPLC map for purifying tea polyphenol manganese (A) and kinetic complete process of controlling and releasing tea polyphenol manganese (B)

a. TP; b. TPMn.

实验结果表明, TP 和 TPMn 均在波长 278 nm 处显示出特征吸收峰, 吸收强度与 TP 浓度成对应关系, 与金属锰浓度无关. 图3(B)是 TPMn-壳聚糖微米粒释放 TPMn 的全过程, 从图3(B)中可以看出, TP-壳聚糖微米粒释放 TP 和 TPMn-壳聚糖微米粒释放 TPMn 的速率及过程仅有微小差别, 其中在 4 h 内, TP-壳聚糖微米粒释放 TP 占总量的 95%. TPMn-壳聚糖微米粒释放 TPMn 的速率可分为快速和慢速阶段. 在 4 h 内, 该微粒释放 TPMn 占总量的 80%, 属于快速释放阶段, 其余 20% 以较缓慢的速率释放, 约需要 44 h, 属于慢速释放阶段. 尽管如此, 两者微米粒均显示出一定的控释能力, 其中 TP-壳聚糖微米粒释放 TP 的速率高于 TPMn-壳聚糖微米粒释放速率, 但两者均具有控释 TP 的能力, 为后续研制 TPMn-壳聚糖微米粒抗肿瘤新药提供了科学依据.

## 2.3 茶多酚锰-壳聚糖微米粒诱导肿瘤细胞凋亡

近期有许多研究报道都指出, 壳聚糖是有机和多肽药物的纳米和微米颗粒的较为理想的包被材料, 同时也发现了壳聚糖及其衍生物具有诱导肿瘤细胞凋亡的能力, 并能改善机体的免疫能力, 起到抗肿瘤作用<sup>[14-16]</sup>. 由于细胞各个时期的 DNA 含量不同, 从而结合的荧光染料不同. 细胞周期可分为  $G_0/G_1$ , S 和  $G_2/M$  期, 在  $G_0/G_1$  前期的细胞数量分为细胞凋亡与坏死数量, 常作为药物诱导肿瘤细胞凋亡速率和能力的评价指标.

图4是 TPMn-壳聚糖微米粒诱导肝癌细胞凋亡的流式细胞图谱. 图4(A)是壳聚糖对肝癌细胞凋

亡的流式细胞图谱,可以看出,壳聚糖具有诱导肝癌细胞凋亡的能力,凋亡率为 5.88%,具有一定的抗肿瘤作用,这一现象与前人的研究报道很类似.图 4(B)是 TP 诱导肝癌细胞凋亡的流式细胞图谱,其细胞凋亡率为 6.16%,略高于壳聚糖,认为壳聚糖和 TP 诱导肝癌细胞凋亡的能力和速率较为相当,TP 诱导肝癌细胞凋亡的能力和速率明显低于 TPMn.图 4(C)是 TPMn 直接诱导肝癌细胞凋亡的流式细胞图谱,其细胞凋亡率为 13.56%,明显高于壳聚糖和 TP 近 1 倍.显然通过有机途径合成的 TPMn 明显提高了抑制肿瘤细胞生长的能力,其抗肿瘤效果显著改善.图 4(D)是 TPMn-壳聚糖微米粒诱导肝癌细胞凋亡的流式细胞图谱,其细胞凋亡率为 15.16%,略高于 TPMn,但略低于壳聚糖和 TPMn 分别诱导肝癌细胞凋亡总效果(5.88% + 13.56% = 19.04%).据此推测:(1)壳聚糖包裹微米粒中的 TPMn 有可能没有完全释放,其中少部分残留的 TPMn 无法被进一步利用于诱导肝癌细胞凋亡.但是 TPMn-壳聚糖微米粒起到控释 TPMn 释放速率,其改善抗肿瘤效果是明显的;(2)TPMn-壳聚糖微米粒能起到了 TPMn 和壳聚糖诱导肝癌细胞凋亡的双重功效,故认为 TPMn-壳聚糖微米粒存在着开发成注射型抗肿瘤新药的可能.如将该微米粒用于肺癌治疗,其作用效果将更加显著.

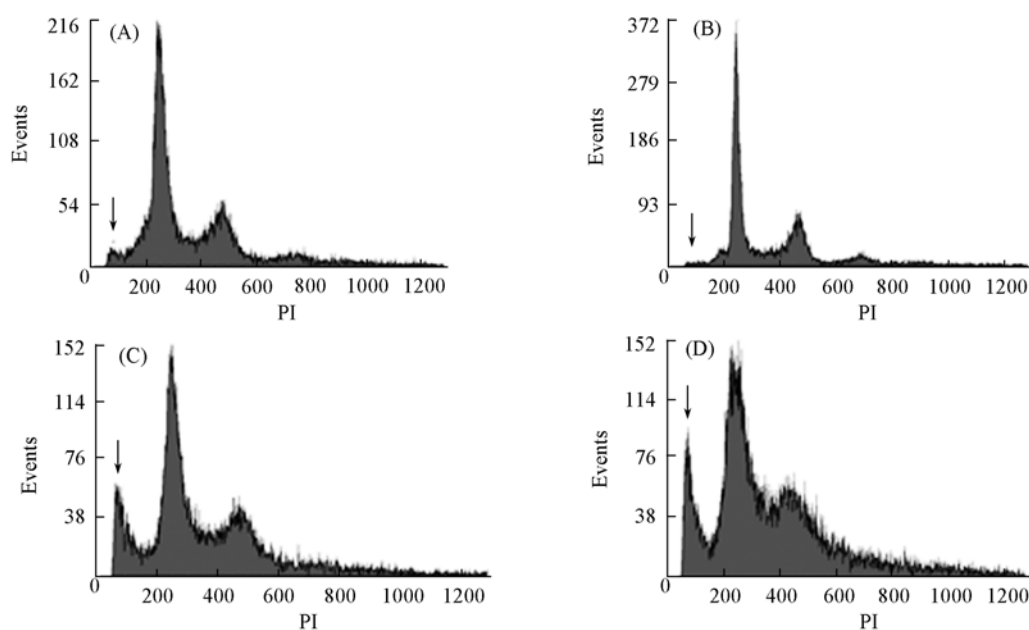


Fig. 4 Apoptosis rate of liver cancer cell by tea polyphenol manganese loaded on a chitosan microparticles

(A) Chitosan, apoptosis rate: 5.88%; (B) TP, apoptosis rate: 6.16%; (C) microparticles of TP, apoptosis rate: 13.56%; (D) microparticles of TPMn-loaded on a Chitosan, apoptosis rate: 15.61%.

### 参 考 文 献

- [ 1 ] ZHOU Bei(周蓓), WANG Lin(王琳), LI Wei(李伟), *et al.*. Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)[J], 2008, **36**: 494—498
- [ 2 ] Mohan K. V. P. C., Devaraj H., Prathiba D., *et al.*. Biochim. Biophys. Acta[J], 2006, **1760**: 1536—1544
- [ 3 ] Osanai K., Landis-Piowar K. R., Dou Q. P., *et al.*. Bioorgan. Med. Chem. [J], 2007, **15**: 50765—50782
- [ 4 ] HUANG He-Ning(黄河宁), LI An-Zhang(李安章), WENG Lu-Na(翁露娜), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2007, **28**(6): 1072—1076.
- [ 5 ] HUANG He-Ning(黄河宁), HU Xiao-Hui(胡晓慧), HUANG He-Qing(黄河清), *et al.*. Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)[J], 2006, **34**: 52—56
- [ 6 ] ZHANG Jin-Chao(张金超), ZHAO Xue-Jun(赵学军), SHEN Yong(申勇). Chinese J. Inorg. Chem. (无机化学学报)[J], 2007, **23**: 415—420
- [ 7 ] YUAN Li-Xin(原丽欣), ZHANG Xiao-Hong(张晓红), YI Long-Zan(伊龙赞). Liaoning Pharm. Clin. Rehedies(辽宁实用药物与临床)[J], 2004, **7**: 15—16
- [ 8 ] ZHA Rui-Tiao(查瑞涛), HE Xiao-Ting(贺晓婷), DU Tian(杜田), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2007, **28**(6): 1098—1100
- [ 9 ] Berrada M., Serreqi A., Dabbarh F. D., *et al.*. Biomaterials[J], 2005, **26**: 2115—2120

- [10] HUANG He-Qing(黄河清), CHEN Ping(陈平), ZHU Bin-Lin(朱斌琳), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2007, **28**(11): 2073—2080
- [11] Pandey R., Ahmad Z., Sharma S., *et al.*. Pharm. Nanotechnol. [J], 2005, **301**: 268—275
- [12] WANG Yin-Song(王银松), HAN Yue-Lian(韩月莲), LI Ying-Xia(李英霞), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2007, **28**(6): 1092—1097
- [13] YUAN Hong(袁弘), HU Fu-Qiang(胡富强), YING Xiao-Ying(应晓英), *et al.*. Chinese Pharm. J. (中国药学杂志)[J], 2002, **37**: 349—352
- [14] Berrada M., Serreqi A., Dabbarh F., *et al.*. Biomaterials[J], 2005, **26**: 2115—2120
- [15] Yang Y., He Q., Duan L., *et al.*. Biomaterials[J], 2007, **28**: 3083—3090
- [16] Seo W. G., Pae H. Q., Kim N. Y., *et al.*. Cancer Letter[J], 2000, **159**: 189—195

## Preparation, Release-control and Cell Apoptosis of Liver Cancer in the Tea Polyphenol Manganese Loaded on a Chitosan Microparticles

HUANG He-Ning<sup>1,2</sup>, LI Cheng<sup>1</sup>, XIE Li-Sheng<sup>1</sup>, HUANG He-Qing<sup>1,3\*</sup>

(1. The Key Laboratory of MOE for Cell Biology and Tumor Cell Engineering of Ministry of Education, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. Department of Chemical and Biological Engineering, College of Sanming, Sanming 365004, China;

3. State Key Laboratory of Physical Chemistry of Solid Surface, Key Laboratory for Chemical Biology of Fujian Province, College of Chemistry & Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract** The chitosan as a wrapping material was selected to prepare a microparticles of tea polyphenol manganese-chitosan(TPMn). Fluorescence characteristics of TPMn-chitosan microparticles was revealed by fluorescence microscopy. Size and distribution orderliness of TPMn-chitosan microparticles was further approved by the scanning electron microscopy and the transmission electron microscopy, respectively. The envelopment ratio of TPMn-chitosan microparticles was calculated to be 68% by RE-HPLC approach, which is in accordance with the ratio request of release-controlled drug at the micron level of microparticles. The results of kinetic studies show that two chitosan microparticles loaded on both tea polyphenol(TP) and TPMn, respectively, have capacity for controlling-release TP for exceeding 40 h, but this rate in TP microparticles was somewhat quicker than that of TPMn microparticles. Even so, both microparticles have capacity for inducing cells of liver cancer apoptosis, but this apoptosis rate by TPMn-chitosan microparticles was somewhat higher than that by TP-chitosan microparticles. The experimental results prove that the TPMn-chitosan microparticles was propitious to release and control TPMn for enhancing the apoptosis rate of tumour cell induced. TPMn-chitosan microparticles would have a potential for developing a new injecting drug for antitumor.

**Keywords** TPMn-chitosan microparticles; Characteristics of physical chemistry; Controlling-release; Cell of liver cancer; Apoptosis

(Ed. : H, J, Z)