

• 药剂与工艺 •

载姜黄素两亲性星状聚酯纳米粒的制备、表征及体外抗肿瘤研究

洪伟勇^{1,2}, 王金明¹, 王海英¹, 周雪峰¹, 郭钊元², 杨根生^{2*}

1. 台州市立医院 药剂科, 浙江 台州 318000

2. 浙江工业大学药学院, 浙江 杭州 310032

摘要:目的 制备载姜黄素两亲性星状聚酯纳米粒 (Cur-NPs), 以解决其稳定性差、生物利用度低等问题。方法 通过开环聚合反应和酯化反应合成两亲性星状聚酯 (DPE-PCL-mPEG) 作为纳米粒的载体材料, 傅立叶变换显微红外光谱 (FT-IR)、¹H-NMR 和凝胶渗透色谱 (GPC) 表征确定其结构和相对分子质量。溶剂挥发法制备 Cur-NPs, 考察其粒径、 ξ 电位、载药量、包封率。对 Cur-NPs 进行稳定性、体外释放、材料安全性、体外抗肿瘤和细胞摄取能力考察。结果 成功合成 DPE-PCL-mPEG, 制备的 Cur-NPs 平均粒径为 (86.00 ± 2.01) nm, ξ 电位为 (-9.40 ± 0.09) mV, 包封率为 $(95.51 \pm 1.23)\%$, 载药量为 $(5.52 \pm 0.54)\%$ 。Cur-NPs 具有良好的稳定性和缓释能力。细胞毒性、细胞摄取和体外抗肿瘤实验表明, 空白纳米粒 (blank-NPs) 具有良好的生物安全性; 相对于姜黄素溶液, Cur-NPs 对人胶质瘤 U251 细胞的生长抑制作用更明显, 并且具有更强的入胞能力。结论 Cur-NPs 理化性质理想, 能有效提高药物体外生物活性, 为姜黄素的临床应用提供了新的解决方案。

关键词: 两亲性星状聚酯; 纳米粒; 姜黄素; 体外释放; 人胶质瘤 U251 细胞; 抗肿瘤; 稳定性; 开环聚合反应; 生物利用度; 酯化反应; 溶剂挥发法; 缓释; 细胞毒性; 细胞摄取; 生物安全性

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2021)08-2237-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.08.006

Preparation, characterization and *in vitro* anti-tumor evaluation of curcumin-loaded star-shaped polyester nanoparticlesHONG Wei-yong^{1,2}, WANG Jin-ming¹, WANG Hai-ying¹, ZHOU Xue-feng¹, GUO Fang-yuan², YANG Gen-sheng²

1. Department of Pharmacy, Taizhou Municipal Hospital, Taizhou 318000, China

2. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China

Abstract: Objective Curcumin loaded amphiphilic star-shaped polyester nanoparticles (Cur-NPs) were prepared to improve the bioavailability of curcumin. **Methods** Amphiphilic star-shaped polymers (DPE-PCL-mPEG) were synthesized by ring-opening polymerization and esterification and used as the polymer precursor of nanoscale drug carrier. The structures of polymers were characterized by FT-IR spectroscopy and ¹H-NMR. The molecular weights of polymers were determined via GPC. Cur-NPs were prepared by solvent evaporation. The physicochemical properties such as particle size, zeta potential, drug loading, encapsulation efficiency, stability, *in vitro* drug release behavior and cytotoxicity, anti-proliferation efficacy and cellular uptake of Cur-NPs were studied. **Results** DPE-PCL-mPEG was successfully synthesized. The particle size, ξ potential, encapsulation efficiency and drug loading of Cur-NPs was (86.00 ± 2.01) nm, ξ potential (-9.40 ± 0.09) mV, $(95.51 \pm 1.23)\%$ and $(5.52 \pm 0.54)\%$, respectively. In addition, the nanoparticles exhibited good stability and sustained release ability. *In vitro* cytotoxicity demonstrated that blank nanoparticles (blank-NPs) had favorable biosafety. Cur-NPs exhibited stronger anti-proliferation efficacy and better cellular uptake ability against U251 cell. **Conclusion** Cur-NPs with ideal physicochemical properties were successfully prepared. This novel

收稿日期: 2021-01-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (22078297); 浙江省自然科学基金项目 (LY19B060012); 浙江省药学会医院药学专项科研基金项目 (2017ZY28); 浙江省药学会医院药学专项科研基金项目 (2016ZY35); 台州市科技计划项目 (1901ky49)

作者简介: 洪伟勇 (1985—), 男, 主管药师, 博士研究生, 从事药物新剂型与临床药学研究。Tel: (0576)88858266 E-mail: weiyongh@126.com

*通信作者: 杨根生, 男, 教授, 博士生导师, 从事药物新剂型与新技术研究。Tel: (0571)88871077 E-mail: yanggs@zjut.edu.cn

nanocarrier system can effectively improve the bioavailability of curcumin and have potential applications in drug delivery.

Key words: amphiphilic star-shaped polymers; nanoparticle; curcumin; *in vitro* release; U251 cell; anti-tumor; stability; ring-opening polymerization; bioavailability; esterification; solvent evaporation; sustained release; cytotoxicity; cellular uptake; biosafety

目前,癌症是全球第 2 大致死疾病,每年超过 1000 万人被确诊为癌症^[1],90%以上的癌症在潜伏期没有明显症状,直到中晚期才被发现。化疗是临床上治疗中晚期癌症的主要方式之一,可以延缓癌症的扩散和转移;但缺乏靶向性,对正常组织有明显的毒副作用^[2],容易导致多药耐药和变态反应。姜黄素(curcumin, Cur)是从姜黄根茎中提取的天然产物^[3],经 FDA 认证具有很好的安全性,可以通过多种分子机制抑制肿瘤细胞的增殖、分化、侵袭和转移^[4-5],还可以逆转多药耐药性^[6]。但姜黄素难溶于水、易降解、体内生物利用度低等特点^[6]严重限制其临床应用。因此,急需研究新剂型以解决药物递送的一系列问题。

近年来,随着纳米技术^[7-8]的发展,纳米给药体系可以有效地改变药物在体内的药动学特征,从而实现药物的缓释及靶向递送,减轻毒副作用、提高疗效^[9-11]。星状聚合物因其具有独特的空间形态,自组装成粒后,内部可形成巨大的空腔;相比直链聚合物,星状聚合物制备的纳米粒具有更高的载药量和包封率^[12-13],是一种良好的纳米载体。聚乙二醇是广泛使用的亲水性材料^[14],常与其他载体材料共价连接^[15-17],以增加纳米粒的稳定性和体内循环时间^[17]。结合星状聚合物与聚乙二醇特性,将两者通过共价键连接成为一种新型两亲性星状聚酯,不仅可以实现姜黄素的高效包载,还可以有效避免网状内皮系统对纳米粒的清除,延长体内循环时间。此外,纳米粒可以通过实体瘤的高通透性和滞留效应(EPR 效应),使药物在肿瘤部位富集,增加药物进入肿瘤细胞几率,从而提高药物生物利用度实现治疗肿瘤目的。

基于此,本实验选用双季戊四醇(dipentaerythritol, DPE)、 ϵ -环己内酯(ϵ -cycloprolactone, ϵ -CL)和聚乙二醇单甲醚(polyethylene glycol monomethyl ether, mPEG, 相对分子质量 5000)通过开环聚合和酯化反应合成两亲性星状聚酯 DPE-PCL-mPEG,以姜黄素为模型药物,采用溶剂挥发法^[18]制备载姜黄素纳米粒(Cur-NPs),对其物理化学性质进行表征。选取人胶质瘤 U251 细胞为模型细胞,进一步考察该纳米粒的细胞

毒性、体外抗肿瘤活性和入胞能力。以期得到一种粒径小、安全性高、稳定性好、抗肿瘤活性良好的纳米给药体系,为姜黄素的临床应用提供新的解决途径。

1 材料与仪器

1.1 材料

姜黄素,质量分数 98%,杭州广林生物医药有限公司;异辛酸亚锡 [$\text{Sn}(\text{Oct})_2$],化学纯,国药集团化学试剂有限公司; ϵ -CL,分析纯,阿拉丁公司;DPE、mPEG、 N,N' -二环己基碳二亚胺(N,N' -dicyclohexylcarbodiimide, DCC)、4-二甲氨基吡啶(4-dimethylaminopyridine, DMAP)、聚山梨酯 80(化学纯),阿拉丁公司;丁二酸酐、三乙胺,上海凌峰化学试剂有限公司;四氢呋喃、乙腈为色谱纯;人胶质瘤 U251 细胞,中国科学院细胞库;DMEM 培养基、胎牛血清,浙江天杭生物科技股份有限公司;0.25%胰蛋白酶, Gibco 公司;96 孔板、细胞培养皿,耐思生物科技有限公司;MTT,索莱宝科技有限公司。

1.2 仪器

Malvern ZS90 激光纳米粒径测定仪,英国马尔文仪器有限公司;UV-2102 紫外可见分光光度计,美国尤尼柯公司;LGJ-10 冷冻干燥机,杭州诺丁科学器材有限公司;傅立叶变换显微红外光谱仪(FT-IR)、XIR 高速冷冻离心机、超净台, Thermo Fisher 公司;IL-161CT 二氧化碳培养箱,施都凯仪器设备上海有限公司;酶标仪, Biotek 公司;荧光显微镜, Olympus 公司;核磁共振波谱仪, Bruker 公司;X 射线衍射仪, PNAlytical 公司;透射电镜,日本电子株式会社。

2 方法与结果

2.1 DPE-PCL 和 DPE-PCL-mPEG 的合成

DPE-PCL-mPEG 合成分成 3 个步骤:首先,通过开环聚合反应生成 DPE-PCL。其次,用丁二酸酐修饰 mPEG 生成 mPEG-COOH。最后,通过酯化反应,生成 DPE-PCL-mPEG。具体步骤如图 1 所示。

2.1.1 DPE-PCL 的合成 1 mmol 的 DPE、60 mmol 的 ϵ -CL 和 0.06 mmol 的 $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ (催化剂)置于 50 mL 的三口瓶中, N_2 保护下, 450 r/min 磁力搅拌,

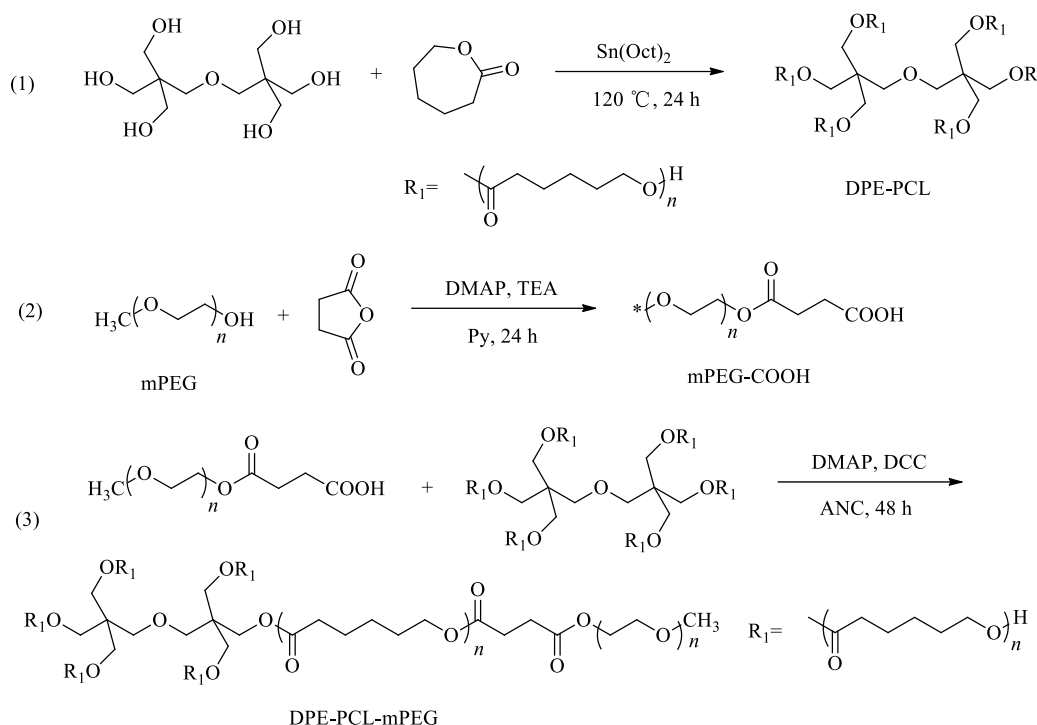


图 1 DPE-PCL-mPEG 的合成路线

Fig. 1 Synthesis scheme of DPE-PCL-mPEG

120 °C 反应 24 h。反应结束后，冷却至室温，加入 10 mL 二氯甲烷溶解，再逐滴加至冰乙醚中，沉淀纯化，抽滤收集粗产物。粗产物经二次沉淀纯化后于真空干燥箱干燥至恒定质量，称定质量计算 DPE-PCL 产率。

2.1.2 mPEG-COOH 的合成 2 mmol mPEG、3 mmol 的丁二酸酐和 15 mL 的吡啶在 100 mL 三口瓶内搅拌溶解。加入 0.002 mmol DMAP（催化剂）和 0.02 mmol 三乙胺（缚酸剂），N₂ 保护下，450 r/min 磁力搅拌，室温反应 24 h。反应结束后，逐滴加至冰乙醚中，沉淀纯化，抽滤收集粗产物。10 mL 二氯甲烷溶解粗产物后逐滴加至冰乙醚中，再次沉淀纯化，抽滤收集产物，于真空干燥箱干燥至恒定质量，称定质量计算 mPEG-COOH 产率。

2.1.3 DPE-PCL-mPEG 的合成 称取 1 mmol 的 DPE-PCL 和 1 mmol 的 mPEG-COOH 于 50 mL 的三口瓶中，加入 1 mL 乙腈搅拌溶解。再加入 1 mmol 的 DCC（催化剂）和 0.1 mmol 的 DMAP（催化剂），N₂ 保护下，450 r/min 磁力搅拌，室温反应 48 h。反应结束后收集产物，方法同“2.1.2”项。

2.2 DPE-PCL 和 DPE-PCL-mPEG 的表征

通过 FT-IR 和 ¹H-NMR 确定 DPE-PCL 和 DPE-PCL-mPEG 结构；凝胶渗透色谱（GPC）^[16]和 ¹H-

NMR 分别计算 DPE-PCL 和 DPE-PCL-mPEG 相对分子质量。

DPE-PCL 的 FT-IR 结果如图 2 所示，其酯键中 C=O 的伸缩振动峰出现在 1 726.3 cm⁻¹，-C-O-C- 的不对称振动峰和对称振动峰分别出现在 1 295.5、1 191.5 cm⁻¹。而 2 945.3、2 866.3、1 471.0、732.5 cm⁻¹ 这 4 个吸收峰归属于 PCL 片段上的亚甲基中 C-H 的特征峰。DPE-PCL 的 ¹H-NMR 分析结果如图 3-A 所示。图中 -O-CH₂-、-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-、-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-和 -CH₂-COO- 均为 PCL 片段上的特征峰，其化学位移分别为 δ 2.32 (a)、1.39 (b)、1.66 (d)、4.06 (c)。而 PCL 的末端亚甲基质子峰

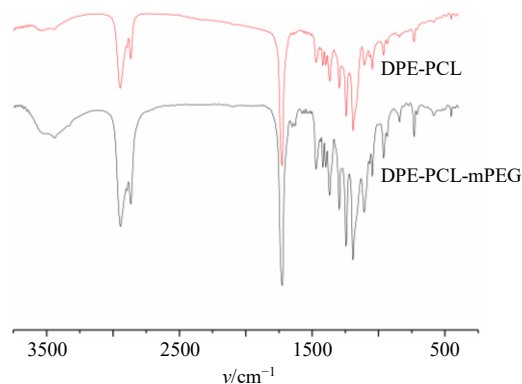


图 2 DPE-PCL 和 DPE-PCL-mPEG 的 FT-IR 图

Fig. 2 FT-IR spectra of DPE-PCL and DPE-PCL-mPEG

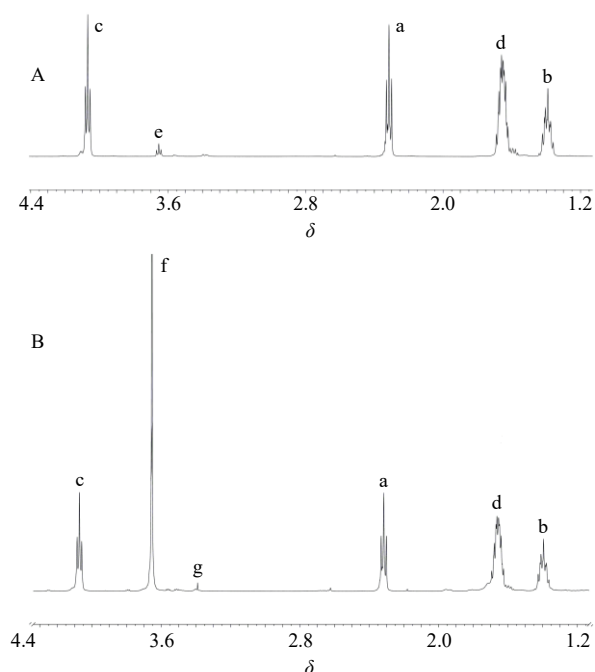


图 3 DPE-PCL (A) 和 DPE-PCL-mPEG (B) 的核磁图
Fig. 3 ^1H -NMR spectra of DPE-PCL (A) and DPE-PCL-mPEG (B)

($-\text{CH}_2\text{-OH}$)，由于受末端羟基的影响其化学位移向低场移至 δ 3.65 (e)。此外其相对分子质量可以通过 c 与 e 之间的峰面积积分比计算，结果见表 1。FT-IR 和 ^1H -NMR 的结果表明 DPE-PCL 已成功合成。

DPE-PCL-mPEG 的 FT-IR 结果如图 2 所示，与 DPE-PCL 的 FT-IR 结果相比较，DPE-PCL-mPEG 除了 PCL 片段中出现的酯键和亚甲基的特征峰，还出现了 mPEG 中醚键 ($-\text{C-O-C}-$) 的特征峰，分别位于 $1\,140.0$ 、 $1\,061.7\text{ cm}^{-1}$ 。DPE-PCL-mPEG 的 ^1H -NMR 分析结果如图 3-B 所示， δ 3.65 (g)、3.39 (f) 为 mPEG 中 $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{O-}$ 和 $-\text{OCH}_3$ 的特征峰。而 δ 2.32 (a)、1.39 (b)、1.66 (d)、4.07 (c) 为 DPE-PCL-mPEG 中 PCL 片段中亚甲基的特征峰。此外，通过表 1 DPE-PCL 和 DPE-PCL-mPEG 的相对分子质量、PDI 与产率

Table 1 Molecular weights, PDI, and yield of DPE-PCL and DPE-PCL-mPEG

样品	M_{na}	PDI	M_{nb}	产率/%
DPE-PCL	9443	1.08	9130	87.6 ± 2.30
DPE-PCL-mPEG	16 314	1.14	15 369	78.4 ± 1.94

M_{na} 为 GPC 中测得的数均相对分子质量，PDI 为 GPC 中测得的多分散指数， M_{nb} 为 ^1H -NMR 中计算得出的相对分子质量

M_{na} is the number average molecular weight measured by GPC, PDI is the polydispersion index measured by GPC, and M_{nb} is the relative molecular weight calculated by ^1H -NMR

f 与 g 之间的峰面积积分比计算其相对分子质量，结果见表 1。FT-IR 和 ^1H -NMR 的结果表明已成功合成 DPE-PCL-mPEG。

DPE-PCL 和 DPE-PCL-mPEG 的 GPC 分析结果如图 4 和表 1 所示，2 个化合物的 GPC 曲线均是单峰且基本对称，多分散指数 (PDI) 分别为 1.08 和 1.14，相对分子质量分布均比较集中。另外 GPC 中测得的数均相对分子质量与 ^1H -NMR 中计算得到的相近，表明该聚合物聚合度较均匀。

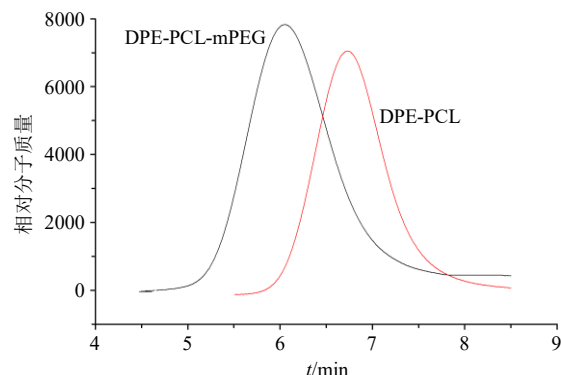


图 4 DPE-PCL 和 DPE-PCL-mPEG 的 GPC 数据
Fig. 4 GPC of DPE-PCL and DPE-PCL-mPEG

2.3 姜黄素分析方法的建立

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Axxclaim® Polar Advantage II- C_{18} 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)；流动相为乙腈-0.6%乙酸水溶液 (60:40)；体积流量 1.0 mL/min；进样量 10 μL ；检测波长 420 nm；柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.3.2 对照品溶液制备 精密称取姜黄素对照品 2.0 mg，用乙腈溶解并定容至 10 mL，配制成姜黄素对照品储备液。

2.3.3 专属性实验 取适量的姜黄素和纳米粒，乙腈溶解，配制成姜黄素溶液、空白纳米粒溶液 (blank-NPs)、载药纳米粒溶液，0.22 μm 微孔滤膜滤过，按“2.3.1”项色谱条件进样检测。HPLC 检测图谱如图 5 所示，姜黄素保留时间为 6.9 min，峰形较好，姜黄素与杂峰分离较好，载体材料对检测无干扰，方法专属性好，适用于纳米粒的包封率和载药量测定。

2.3.4 线性关系考察 取适量对照品溶液，用流动相稀释成质量浓度分别为 0.1、0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液，0.22 μm 微孔滤过，检测姜黄素含量。以姜黄素的质量浓度为横坐标 (X)，峰面积积分值为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线，进行线性回归，得到回归方程 $Y = 1.566\,9\,X +$

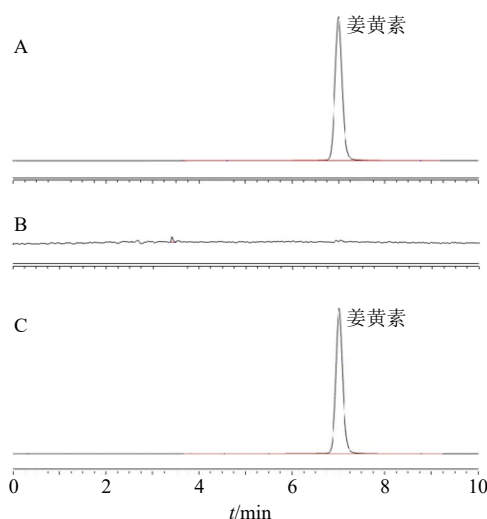


图 5 姜黄素 (A)、blank-NPs (B) 和 Cur-NPs (C) 的 HPLC 的图谱

Fig. 5 HPLC of curcumin (A), blank-NPs (B), and Cur-NPs (C)

0.008 6, $R^2=0.999\ 8$, 结果表明姜黄素在 0.1~8.0 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好, 该方法适用于姜黄素的含量测定。

2.3.5 精密度试验 在线性范围内, 精密量取对照品储备液, 分别配制质量浓度为 0.5、2.0、6.0 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液, HPLC 测定质量浓度并计算 RSD 分别为 0.10%、0.20%、0.07%、RSD 均 <2%, 该方法精密度良好, 方法可行。

2.3.6 回收率试验 分别取质量浓度为 6.0 $\mu\text{g/mL}$ 的姜黄素对照品溶液 2、3、4 mL 置于 10 mL 量瓶中, 取 0.5 mL 空白纳米粒溶液加入样品中, 流动相定容, 制得质量浓度分别为 1.2、1.8、2.4 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 0.22 μm 微孔滤过, 按“2.3.1”项色谱条件进样检测, 每个质量浓度平行操作 3 次, 计算回收率。回收率试验结果显示, 1.2、1.8、2.4 $\mu\text{g/mL}$ 的回收率分别为 98.56%、99.25%、99.12%, RSD 分别为 1.79%、1.21%、0.98%, 回收率均在 95%~105%, RSD 均 <2%, 符合方法学要求。

2.4 Cur-NPs 的制备

2.4.1 制备方法 溶剂挥发法制备 Cur-NPs 混悬液, 精密称取姜黄素和 DPE-PCL-mPEG, 丙酮溶解后缓慢滴加入纯水中, 450 r/min 磁力搅拌 30 min。40 $^{\circ}\text{C}$ 下真空干燥 3 h, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下低速离心 10 min (6000 r/min) 以除去游离姜黄素, 得到 Cur-NPs。空白纳米粒 (blank-NPs) 的制备除不加药物, 其余步骤相同。

2.4.2 包封率和载药量考察 取 Cur-NPs 在 15 000 r/min 的转速下高速离心 60 min, 收集并干燥沉淀, 精密称定质量, 加丙酮溶解定容, 测定姜黄素含量, 根据公式计算纳米粒的载药量和包封率。

$$\text{包封率} = W_{\text{姜黄素}} / W_{\text{投药量}}$$

$$\text{载药量} = W_{\text{姜黄素}} / W_{\text{Cur-NPs}}$$

$W_{\text{姜黄素}}$ 为 Cur-NPs 中姜黄素的质量, $W_{\text{投药量}}$ 为投入姜黄素的质量, $W_{\text{Cur-NPs}}$ 为 Cur-NPs 的质量

2.4.3 单因素考察 分别考察姜黄素与 DPE-PCL-mPEG 的质量比 (药材比, 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30)、有机相与水相的体积比 (脂水比, 1:3、1:4、1:5、1:6、1:7) 及姜黄素的质量浓度 (1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mg/mL) 这 3 个因素对制备 Cur-NPs 的影响。以平均粒径、PDI、包封率和载药量为指标, 优化制备 Cur-NPs 的处方。

单因素考察结果见表 2, 姜黄素与 DPE-PCL-mPEG 的质量比、姜黄素的质量浓度、有机相与水相的体积比对纳米粒的大小、载药量和包封率均有影响, 对 PDI 几乎没有影响。其中在姜黄素与 DPE-PCL-mPEG 的质量比为 1:20, 有机相与水相的体积比为 1:5, 姜黄素的质量浓度为 2.5 mg/mL 的条件下, Cur-NPs 的平均粒径理想, 载药量和包封率最高。

2.4.4 Box-Behnken 效应面优化 Cur-NPs 处方 使用软件 Design Expert 10 中的 Box-Behnken 效应面,

表 2 单因素实验结果

Table 2 Results of single factor experiments

因素	水平	粒径/nm	PDI	载药量/%	包封率/%
药材比	1:10	96.88	0.195	2.74	73.28
	1:15	95.32	0.211	4.86	90.27
	1:20	90.71	0.187	5.31	93.44
	1:25	88.47	0.165	3.98	92.58
	1:30	84.69	0.156	2.55	89.65
脂水比	1:3	102.74	0.141	3.04	82.78
	1:4	99.55	0.218	3.56	92.65
	1:5	94.32	0.199	4.85	94.65
	1:6	87.25	0.179	4.02	91.33
	1:7	85.11	0.195	2.98	85.12
药物浓度/ ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	1.5	80.30	0.188	3.21	95.32
	2.0	80.50	0.171	3.98	93.21
	2.5	88.70	0.168	5.34	94.78
	3.0	92.60	0.159	4.95	92.87
	3.5	100.70	0.201	3.75	91.95

设置因素 X_1 (姜黄素与 DPE-PCL-mPEG 的质量比)、 X_2 (有机相与水相的体积比) 和 X_3 (姜黄素的质量浓度), 输入相应的平均粒径、PDI、包封率和载药量。根据 Hassan 方法将粒径和 PDI 结果用公式 $d_{\max}$ 处理, 包封率和载药量结果用公式 $d_{\min}$ 处理。最后根据公式计算总评归一值 (OD), 优化制备处方。

$$d_{\max} = (Y_i - Y_{\min}) / (Y_{\max} - Y_{\min})$$

$$d_{\min} = (Y_{\min} - Y_i) / (Y_{\max} - Y_{\min})$$

$$OD = (d_1 d_2 \cdots d_k)^{1/k}$$

根据单因素结果确定 X_1 、 X_2 和 X_3 3 个因素的考察范围分别为 X_1 1:10~1:30、 X_2 1:3~1:7 和 X_3 1.5~3.5, 每个因素设置 5 个水平, OD 值和方差

分析结果见表 3、4, 通过拟合得到方程: $OD = 0.8257 - 0.08210X_1 - 0.01785X_2 + 0.07358X_3 + 0.03073X_1X_2 + 0.05943X_1X_3 - 0.03883X_2X_3 - 0.02926X_1^2 - 0.22350X_2^2 - 0.56340X_3^2$ 。其三维曲线图见图 6。最终得到最优处方: 姜黄素与 DPE-PCL-mPEG 的质量比为 1:17.8, 有机相与水相的体积比为 1:4.9, 姜黄素的质量浓度为 2.5 mg/mL。

将 Box-Behnken 效应面中得到的处方进行验证, 结果如表 5 所示, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各指标实际值与预测值接近, 表明该回归方程的建立具有统计学意义。Cur-NPs 的平均粒径为 (86.00 ± 2.01) nm, 可以通过 EPR 效应进入肿瘤区域^[19]。另

表 3 Box-Behnken 效应面制备处方和结果

Table 3 Prescriptions and results of preparation of Box-Behnken response surface

试验号	X_1	X_2	$X_3/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	平均粒径/nm	PDI	包封率/%	载药量/%	OD 值
1	1:20 (0)	1:5 (0)	2.5 (0)	78.48	0.158	88.83	5.24	0.8257
2	1:15 (-1)	1:5	2.0 (-1)	89.62	0.159	90.72	2.19	0.2495
3	1:15	1:4 (-1)	2.5	81.87	0.153	89.03	3.98	0.6994
4	1:15	1:6 (+1)	2.5	80.67	0.149	83.75	4.05	0.6442
5	1:20	1:5	2.5	78.48	0.158	88.83	5.24	0.8257
6	1:20	1:4	3.0 (+1)	87.91	0.169	76.89	5.01	0.1553
7	1:25 (+1)	1:6	2.5	79.26	0.190	86.97	4.92	0.5079
8	1:20	1:5	2.5	78.48	0.158	88.83	5.24	0.8257
9	1:25	1:5	3.0	86.97	0.173	79.02	4.20	0.3355
10	1:25	1:5	2.0	91.56	0.181	83.74	2.98	0.0000
11	1:20	1:6	2.0	82.71	0.198	92.01	2.84	0.0000
12	1:20	1:5	2.5	78.48	0.158	88.83	5.24	0.8257
13	1:20	1:5	2.5	78.48	0.158	88.83	5.24	0.8257
14	1:20	1:4	2.0	85.74	0.184	97.92	2.03	0.0000
15	1:25	1:4	2.5	83.70	0.186	85.46	4.03	0.4402
16	1:20	1:6	3.0	79.13	0.178	76.81	3.89	0.0000
17	1:15	1:5	3.0	90.02	0.157	80.83	4.52	0.3473

表 4 OD 值方差分析

Table 4 Analysis of variance of OD value

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	1.750	9	0.190	88.37	<0.0001	X_1^2	3.605×10^{-3}	1	3.605×10^{-3}	1.64	0.2417
X_1	0.054	1	0.054	24.46	0.0017	X_2^2	0.210	1	0.210	95.42	<0.0001
X_2	2.549×10^{-3}	1	2.549×10^{-3}	1.16	0.0318	X_3^2	1.340	1	1.340	606.19	<0.0001
X_3	0.043	1	0.043	19.64	0.0030	残差	0.015	7	2.204×10^{-3}		
X_1X_2	3.776×10^{-3}	1	3.776×10^{-3}	1.71	0.2319	失拟项	0.015	3	5.144×10^{-3}		
X_1X_3	0.014	1	0.014	6.41	0.0392	纯差	0.000	4	0.000		
X_2X_3	6.030×10^{-3}	1	6.030×10^{-3}	2.74	0.1421	总和	1.770	16			

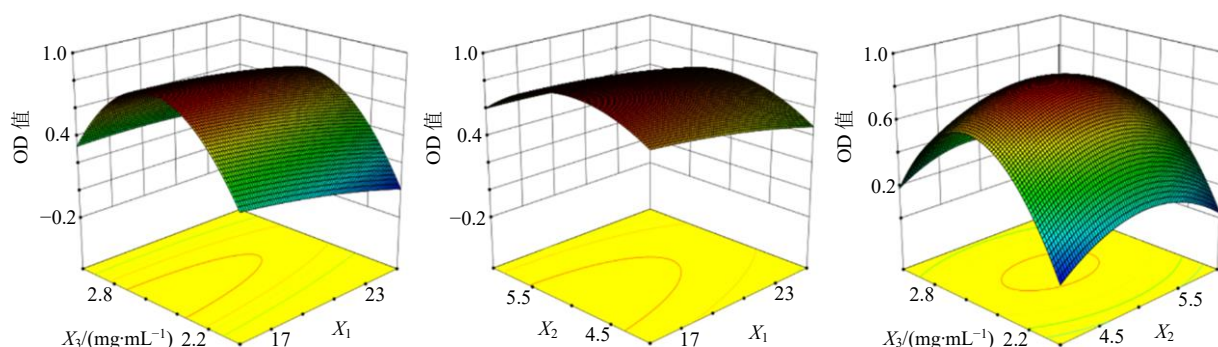


图 6 OD 值与 X_1 、 X_2 、 X_3 3 个因素的三维曲面图

Fig. 6 3D surface map of three factors of effect value OD and X_1 , X_2 , and X_3

表 5 Cur-NPs 的物理化学表征 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 5 Physicochemical characterization of Cur-NPs ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

指标	粒径/nm	PDI	电位/mV	包封率/%	载药量/%
预测值	79.43	0.152	—	87.02	5.04
实际值	86.00 ± 2.01	0.142 ± 0.034	-9.40 ± 0.09	95.51 ± 1.23	5.52 ± 0.54

外 Cur-NPs 的 PDI 小于 0.2, 表明纳米粒的粒径分布较窄, 均一性良好。

2.5 Cur-NPs 的表征

2.5.1 纳米粒的平均粒径、 ξ 电位、包封率和载药量 取 Cur-NPs, 在 25 °C 下, 马尔文粒径仪测定其平均粒径和 ξ 电位; 包封率和载药量计算方法同“2.4.2”项。结果见表 5, Cur-NPs 呈负电荷, 可有效减少血浆蛋白在粒子表面吸附^[19]和被网状内皮系统清除^[20], 增加其体内稳定性和循环能力; Cur-NPs 具有较理想的包封率和载药量。

2.5.2 Cur-NPs 的形态 取 1 滴 blank-NPs 或 Cur-NPs 置于铜网 (200 目) 上, 2% 磷钨酸钠染色, 滤纸吸去过量的染色剂, 将样品在室温下干燥, 在透射电子显微镜下观察纳米粒形态 (图 7), blank-NPs 和 Cur-NPs 呈较规整的球形, 呈单分散状态, 平均粒径约为 80 nm 与激光粒度仪测定结果相符。

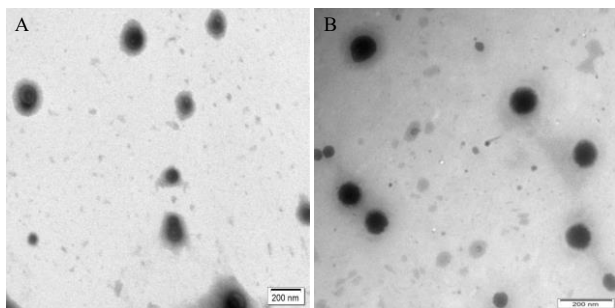


图 7 Blank-NPs (A) 和 Cur-NPs (B) 的透射电镜图

Fig. 7 TEM photograph of blank-NPs (A) and Cur-NPs (B)

2.6 Cur-NPs 的稳定性考察

取 2 mL Cur-NPs 分别加入 8 mL 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH 7.4) 和含 10% 血清 (FBS) 的 0.01 mol/L PBS (pH 7.4), 37 °C 下静置保存, 在 0、1、4、8、12、24 h 取样并测定其平均粒径和 ξ 电位。

Cur-NPs 在 PBS (pH 7.4) 和 PBS+10% FBS (pH 7.4) 中的稳定性结果如图 8 所示。24 h 内 Cur-NPs 在 PBS 中平均粒径从 86.5 nm 增大至 88 nm, 没有明显波动; 但在 PBS+10% FBS 中粒径从 86.5 nm 增大至 93 nm, 可能是由于血清中的蛋白在 Cur-NPs 表面少量附着导致粒径略有增大, 但 10 h 后粒径不再有明显的波动, 表明 Cur-NPs 处于稳定状态。

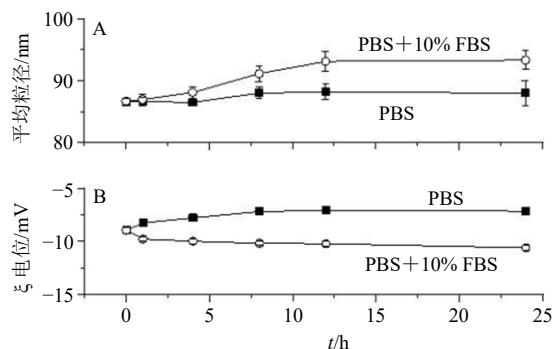


图 8 Cur-NPs 在 PBS 和 PBS+10% FBS 中 24 h 中的平均粒径 (A) 和 ξ 电位 (B) 的变化曲线图 ($n = 3$)

Fig. 8 Variation curve of Particle size (A) and ξ potential (B) of Cur-NPs in PBS and PBS + 10% FBS for 24 h ($n = 3$)

此外, Cur-NPs 在 PBS 和 PBS+10% FBS 中 ξ 电位变化均在 1 mV 以内, 没有明显改变。结果表明 Cur-NPs 稳定性良好。

2.7 X-射线衍射 (X-ray diffraction, XRD) 表征

取 4 mL Cur-NPs 和 blank-NPs 冷冻干燥, 将冻干的 Cur-NPs 和 blank-NPs, 以及姜黄素粉末, 用 XRD 进行表征, 观察其表面结构特征。姜黄素、Cur-NPs 和 blank-NPs 粉末的 XRD 结果如图 9 所示, 其中, 姜黄素具有明显的特征峰; Cur-NPs 和 blank-NPs 的图谱比较相似, 姜黄素特征峰基本消失; 由此可证明姜黄素被包裹在纳米粒中, 而非吸附在纳米粒表面。

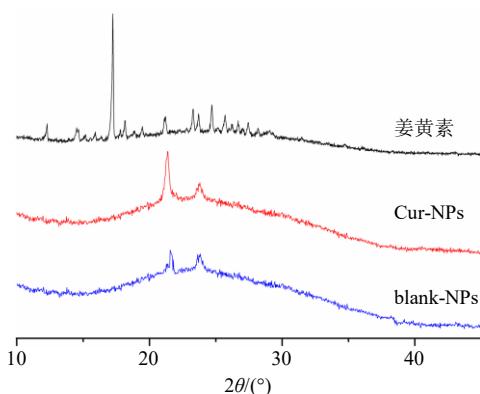


图 9 姜黄素、Cur-NPs 和 blank-NPs 粉末的 XRD

Fig. 9 XRD curve of curcumin, Cur-NPs, and blank-NPs powder

2.8 体外释放研究

将姜黄素溶液 (Cur-DMSO, 姜黄素用 1% DMSO 水溶液溶解) 和 Cur-NPs 分别用纯化水稀释至姜黄素质量浓度为 60 $\mu\text{g/mL}$, 取 1 mL 溶液至透析袋 (截留相对分子质量为 14 000) 中, 加入 200 mL 0.01 mol/L PBS (pH 7.4, 含 0.5% 聚山梨酯 80) 为释放介质, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、100 r/min 的恒温振荡箱内, 在设定时间点取出 5 mL 释放介质, 并补充相同体积的新鲜介质, 测定并计算药物的累积释放率, 每组平行 3 份。

$$\text{累积释放率} = (C_n V_0 + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V) / m_{\text{姜黄素}}$$

C_n 为释放各时间点测得释放介质中的姜黄素的质量浓度, V 为释放介质的总体积, V_0 为每次取样的体积, $m_{\text{姜黄素}}$ 为透析袋中姜黄素的总质量

以 PBS (pH 7.4) 模拟体内循环环境, Cur-DMSO 为对照, 研究 Cur-NPs 中姜黄素的释放行为, 结果如图 10 所示。Cur-DMSO 在 0~12 h 内姜黄素快速

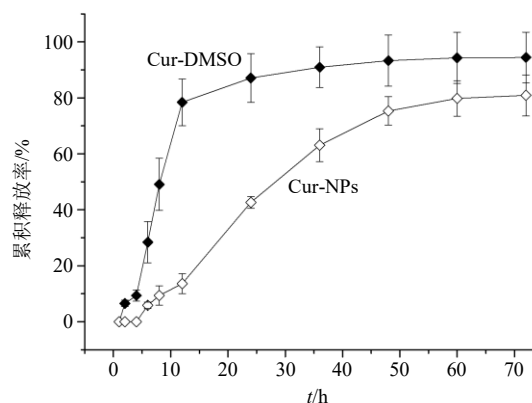


图 10 Cur-DMSO 和 Cur-NPs 在 PBS 中的体外释放曲线 ($n=3$)

Fig. 10 Release curve of Cur-DMSO and Cur-NPs in PBS ($n=3$)

释放, 在 12 h 累积释放率达到 78%, 其平均释放速率约为 6.50%/h; 12 h 后释放趋于平缓, 48 h 时基本完全释放, 累积释放率达到 94.44%。Cur-NPs 的释放过程分 3 个阶段: 在第 1 阶段 (0~4 h) 姜黄素基本没有释放, 可能由于 Cur-NPs 表面无姜黄素附着, 姜黄素需从 Cur-NPs 内向外扩散才能释放, 这一现象与 XRD 结果相符; 在第 2 阶段 (5~48 h), 随着 Cur-NPs 向外扩散通道的形成, 姜黄素平缓释放, 累积释放率从 0.3% 增加到 69.9%, 平均释放速率为每小时 1.62%, 远低于 Cur-DMSO 释放速率, 说明 Cur-NPs 具有良好的缓释能力; 第 3 阶段 (48 h 后), Cur-NPs 的释放速率趋于平缓, 72 h 时累积释放率达到 80.88%。

2.9 细胞毒性考察

用 MTT 法检测 blank-NPs 对 U251 细胞的细胞毒性, 将处于对数生长期的 U251 细胞以每孔 8×10^3 个接种于 96 孔板, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 24 h。将 blank-NPs 用新鲜培养基稀释至 50~800 $\mu\text{g/mL}$, 弃去原有的培养基, 每孔分别加入 100 μL 含 blank-NPs 的不同浓度培养基和新鲜培养基 (对照组, 细胞存活率为 100%), 各组平行 5 份, 另设无细胞孔为空白组。继续培养 24 h 后, 加入 10 μL MTT (5 mg/mL)。37 $^{\circ}\text{C}$ 下继续培养 4 h 后, 弃去旧培养基, 加入 150 μL 的 DMSO, 并在酶标仪上于波长 490 nm 处测定吸光度 (A), 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

$A_{\text{实验}}$ 为实验组测得的 A 值, $A_{\text{对照}}$ 为对照组测得的 A 值, $A_{\text{空白}}$ 为空白组测得的 A 值

Blank-NPs 的细胞毒性结果如表 6 所示。Blank-NPs 对 U251 细胞的生长抑制与 blank-NPs 浓度呈正相关, 当 blank-NPs 质量浓度高达 800 $\mu\text{g/mL}$ 时 U251 细胞的存活率依旧保持在 80% 以上。表明 NPs 体系生物安全性良好。

表 6 Blank-NPs 在 U251 细胞中的细胞毒性 ($n = 5$)
Table 6 Cell cytotoxicity of blank-NPs in U251 cells ($n = 5$)

blank-NPs/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	细胞存活率/ %	blank-NPs/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	细胞存活率/ %
50	99.99 $\pm$ 5.25	400	86.55 $\pm$ 2.83
100	93.90 $\pm$ 3.49	600	83.20 $\pm$ 1.71
200	91.58 $\pm$ 2.15	800	82.48 $\pm$ 2.09

2.10 细胞摄取实验

将处于对数生长期的 U251 细胞以每孔 1×10^5 个接种于 6 孔板, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 24 h。弃去培养基, 将 Cur-DMSO、Cur-NPs 用新鲜培养基稀释至 20 $\mu\text{g/mL}$ 后, 加至 6 孔板中, 每孔加入 1 mL。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育培养 3 h 后, 弃去含药培养基, PBS 冲洗 3 次, 荧光显微镜观察 U251 细胞的药物摄取情况。荧光显微镜观察 U251 细胞对 Cur-DMSO 和 Cur-NPs 的摄取结果如图 11 所示, 在相同条件下培养 4 h 后, 可以观察到 Cur-NPs 组细胞中的绿色荧光明显要强于 Cur-DMSO 组; 由此可知, 相比 Cur-DMSO, Cur-NPs 具有更强的抑制肿瘤细胞侵袭能力。

2.11 体外抗肿瘤细胞增殖实验

MTT 法测定 Cur-DMSO 和 Cur-NPs 对 U251 细胞的抗增殖效果, 细胞培养方法同“2.9”项。将

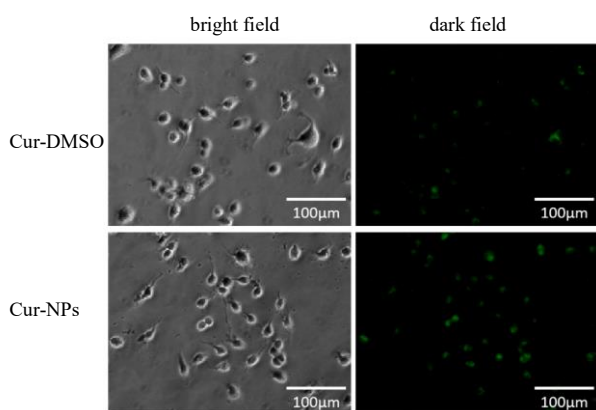


图 11 Cur-DMSO 和 Cur-NPs 在 U251 细胞中的细胞摄取情况

Fig. 11 Cellular uptake in U251 cells of Cur-DMSO and Cur-NPs

Cur-DMSO、Cur-NPs 用新鲜培养基稀释至药物质量浓度为 2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、60.0 $\mu\text{g/mL}$, 分别加入含 U251 细胞的 96 孔板中, 每孔 100 μL , 各浓度平行 5 份。另设新鲜培养基为对照组 (细胞存活率为 100%), 无细胞孔为空白组。培养 24 h 后, 弃去培养基, 加入含 10% MTT 的培养基 100 μL 。继续培养 4 h, 弃去旧培养基, 加入 150 μL 的 DMSO, 酶标仪测定 490 nm 处 A 值。按“2.9”项下公式计算细胞存活率, 并用 SPSS 计算 Cur-DMSO 和 Cur-NPs 的半数抑制浓度 (IC_{50})。

在证实纳米载体良好的生物安全性基础上, 进一步研究 Cur-DMSO 和 Cur-NPs 对肿瘤细胞的抗增殖能力, 结果如表 7 所示。Cur-DMSO 和 Cur-NPs 对 U251 细胞抗增殖能力均随着药物浓度的升高而上升。经计算 Cur-DMSO 和 Cur-NPs 对 U251 细胞的 IC_{50} 分别为 20.92、14.74 $\mu\text{g/mL}$, 表明 Cur-NPs 的体外抗肿瘤活性更强。其可能原因: 在相同药物质量浓度下, Cur-NPs 可以更好地被摄取进入细胞并实现胞内释放, 使得肿瘤细胞内具有更高的姜黄素质量浓度, 因而具有更强的抗增殖能力。

表 7 Cur-DMSO 和 Cur-NPs 在 U251 细胞中的抗增殖实验 ($n = 5$)

Table 7 Anti-proliferation assay of Cur-DMSO and Cur-NPs in U251 cells ($n = 5$)

质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	细胞存活率/%	
	Cur-DMSO	Cur-NPs
2.5	101.51 $\pm$ 5.86	90.45 $\pm$ 3.07
5	86.86 $\pm$ 7.26	85.23 $\pm$ 2.60
10	82.73 $\pm$ 3.25	69.12 $\pm$ 3.77
20	41.59 $\pm$ 2.28	35.57 $\pm$ 1.37
40	26.40 $\pm$ 3.03	15.67 $\pm$ 3.78
60	23.33 $\pm$ 1.77	13.01 $\pm$ 0.49

3 讨论

本实验通过开环聚合和酯化反应成功合成了 DPE-PCL-mPEG, 采用溶剂挥发法制备了 Cur-NPs, 经单因素考察和 Box-Behnken 效应面选择最优处方, 得到粒径较小, 分布均匀, 理化特性理想的纳米粒。体外释放和稳定性实验表明, Cur-NPs 具有缓释能力, 且在 PBS 和 PBS+10% FBS 中稳定性良好。体外细胞毒性实验证实, blank-NPs 具有较好的生物安全性。而细胞摄取和体外抗肿瘤实验表明, 针对 U251 细胞, 相比 Cur-DMSO, Cur-NPs 具有更

强的抗肿瘤活性和入胞能力。总之, DPE-PCL-mPEG 是理想的载体材料, Cur-NPs 能有效提高姜黄素生物利用度, 是具有临床应用潜力的纳米给药系统; 此外, 该制剂的体内药理学特性仍需进行更系统、深入的研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(1): 7-30.
- [2] Miller K D, Nogueira L, Mariotto A B, *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics, 2019 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(5): 363-385.
- [3] Mehanny M, Hathout R M, Geneidi A S, *et al.* Exploring the use of nanocarrier systems to deliver the magical molecule: Curcumin and its derivatives [J]. *J Control Release*, 2016, 225: 1-30.
- [4] Liu J, Xu L, Liu C, *et al.* Preparation and characterization of cationic curcumin nanoparticles for improvement of cellular uptake [J]. *Carbohydr Polym*, 2012, 90(1): 16-22.
- [5] Lelli D, Sahebkar A, Johnston T P, *et al.* Curcumin use in pulmonary diseases: State of the art and future perspectives [J]. *Pharmacol Res*, 2017, 115: 133-148.
- [6] Manjili H K, Ghasemi P, Malvandi H, *et al.* Pharmacokinetics and *in vivo* delivery of curcumin by copolymeric mPEG-PCL micelles [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2017, 116: 17-30.
- [7] Miao L, Guo S, Lin C M, *et al.* Nanoformulations for combination or cascade anticancer therapy [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 115: 3-22.
- [8] Yu Y, Zhang X, Qiu L. The anti-tumor efficacy of curcumin when delivered by size/charge-changing multistage polymeric micelles based on amphiphilic poly (β -amino ester) derivatives [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(10): 3467-3479.
- [9] Ulbrich K, Holá K, Šubr V, *et al.* Targeted drug delivery with polymers and magnetic nanoparticles: Covalent and noncovalent approaches, release control, and clinical studies [J]. *Chem Rev*, 2016, 116(9): 5338-5431.
- [10] Sisson A L, Ekinici D, Lendlein A. The contemporary role of ϵ -caprolactone chemistry to create advanced polymer architectures [J]. *Polymer*, 2013, 54(17): 4333-4350.
- [11] Wang X, Wei F, Liu A, *et al.* Cancer stem cell labeling using poly(L-lysine)-modified iron oxide nanoparticles [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(14): 3719-3732.
- [12] Ren J, Zhang Z, Feng Y, *et al.* Synthesis of star-shaped poly(ϵ -caprolactone)-b-poly(L-lactide) copolymers: From star architectures to crystalline morphologies [J]. *J Appl Polym Sci*, 2010, 118(5): 2650-2658.
- [13] Allen R J, Mathew B, Rice K G. PEG-peptide inhibition of scavenger receptor uptake of nanoparticles by the liver [J]. *Mol Pharm*, 2018, 15(9): 3881-3891.
- [14] Jiao X, Yu Y, Meng J, *et al.* Dual-targeting and microenvironment-responsive micelles as a gene delivery system to improve the sensitivity of glioma to radiotherapy [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9(2): 381-396.
- [15] Guo F, Wu J, Wu W, *et al.* PEGylated self-assembled enzyme-responsive nanoparticles for effective targeted therapy against lung tumors [J]. *J Nanobiotechnology*, 2018, 16(1): 57.
- [16] Fang L, Fan Y, Lou L, *et al.* Pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin in Chinese tumor patients [J]. *Chin Pharm J*, 2012, 47(3): 222-228.
- [17] Dai Z, Yao Q, Zhu L. MMP2-sensitive PEG-lipid copolymers: A new type of tumor-targeted P-glycoprotein inhibitor [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(20): 12661-12673.
- [18] Peer D, Karp J M, Hong S, *et al.* Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy [J]. *Nat Nanotechnol*, 2007, 2(12): 751-760.
- [19] Ge L, Qiu L, Shan X, *et al.* Preparation and properties of heparosan polysaccharide-vitamin E succinate polymer micelles [J]. *Acta Pharm Sin*, 2017, 38(4): 621-623.
- [20] Chen B, Dai W, He B, *et al.* Current multistage drug delivery systems based on the tumor microenvironment [J]. *Theranostics*, 2017, 7(3): 538-558.

[责任编辑 郑礼胜]