

转铁蛋白修饰的姜黄素脂质体的制备及体外抗肿瘤活性

季珂¹, 韩华¹, 韩冰¹, 梁绿圆², 祝侠丽¹, 关延彬^{1*}

1. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450040

2. 河南中医药大学儿科医学院, 河南 郑州 450040

摘要: 目的 制备转铁蛋白(transferrin, Tf)修饰的姜黄素(curcumin, Cur)脂质体(Tf-Cur-Lip), 并研究其理化性质和体外抗肿瘤活性。方法 采用薄膜分散法制备 Tf-Cur-Lip, 对其形态、粒径、多分散性指数、包封率、载药量、体外释放等进行表征; 以人前列腺癌 DU145 细胞为模型进行细胞抑制率实验与细胞摄取实验。结果 所制得的 Tf-Cur-Lip 呈类球形, 大小分布均匀, 平均粒径为 (68.27 ± 0.36) nm, 多分散指数为 0.194 ± 0.050 , 平均包封率与载药量分别为 $(98.13 \pm 0.38)\%$ 与 $(2.94 \pm 0.38)\%$ 。体外释放研究表明, Tf-Cur-Lip 相比游离姜黄素具有一定缓释效果。MTT 实验结果表明 Tf-Cur-Lip 对 DU145 细胞的抑制作用显著高于游离姜黄素, 与非靶向姜黄素脂质体(Cur-Lip)相比, 转铁蛋白的修饰明显增加了 DU145 细胞对脂质体的摄取效率。结论 成功制备了 Tf-Cur-Lip, 该脂质体能够提高肿瘤靶向性, 具有一定的抗肿瘤活性。

关键词: 姜黄素; 转铁蛋白; 脂质体; 抗肿瘤活性; 薄膜分散法; 靶向性

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)18-5649-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.18.007

Preparation and anti-tumor activity *in vitro* of transferrin modified curcumin liposomes

Ji Ke¹, Han Hua¹, Han Bing¹, Liang Lyu-yuan², Zhu Xia-li¹, Guan Yan-bin¹

1. School of Pharmacy, Henan University of TCM, Zhengzhou 450040, China

2. School of Pediatrics, Henan University of TCM, Zhengzhou 450040, China

Abstract: Objective To prepare transferrin (Tf) modified curcumin (Cur) liposomes (Tf-Cur-Lip) and evaluate its physicochemical properties and antitumor activity *in vitro*. **Methods** The Tf-Cur-Lip was prepared by thin film dispersion method, followed by characterization of the morphology, particle size, polydispersity index (PDI), encapsulation efficiency, drug loading amount and *in vitro* release. The anti-proliferative effect and cellular uptake of Tf-Cur-Lip were studied in DU145 cells. **Results** The prepared Tf-Cur-Lip showed spherical morphology, and the average particle size was (68.27 ± 0.36) nm and uniform distribution with narrow PDI was (0.194 ± 0.050) . The encapsulation efficiency and drug loading amount were $(98.13 \pm 0.38)\%$ and $(2.94 \pm 0.38)\%$, respectively. The *in vitro* release studies showed that Tf-Cur-Lip has a sustained-release property compared with free Cur. MTT assay showed that the inhibitory effect of Tf-Cur-Lip on DU145 cells was significantly higher than that of free Cur. Tf-Cur-Lip showed significantly increased cellular uptake than curcumin-loaded liposomes (Cur-Lip) in DU145 cells. **Conclusion** Tf-Cur-Lip were successfully prepared, which can improve tumor targeting capability with enhanced anti-tumor activity.

Key words: curcumin; transferrin; liposome; anti-tumor activity; thin film dispersion method; targeting

前列腺癌是全世界男性癌症死亡率最高的原因之一, 大多数前列腺癌患者后期会发展为抗去势前列腺癌(castration resistant prostate cancer, CRPC), 目前, 对 CRPC 缺乏有效的治疗方法^[1]。常规治疗

方式包括化疗、雄激素剥夺、分子靶向、免疫疗法等, 但其临床疗效及预后仍不理想, 一些患者出现耐药抵抗及严重不良反应^[2]。

姜黄素(curcumin, Cur)是从姜黄 *Curcuma*

收稿日期: 2022-04-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81803740); 河南省科技攻关项目(182102310096); 河南省高等学校重点科研项目(18B360002); 河南省中医药科学研究专项课题(20-21ZY2150); 河南省高校国家级大学生创新创业训练计划项目(202110471009)

作者简介: 季珂, 硕士研究生, 主要从事药物新剂型研究。Tel: 18738607939 E-mail: 1789271688@qq.com

*通信作者: 关延彬, 教授, 主要从事中药新剂型与新技术研究。Tel: (0371)65962746 E-mail: guanyanbin96@126.com

longa L. 植物根茎中提取的一种生物活性化合物, 临床前研究已经证实姜黄素具有抗炎、抗氧化和抗肿瘤活性。体内外研究表明, 姜黄素具有抑制前列腺肿瘤细胞增殖和细胞周期进展并诱导细胞凋亡发挥肿瘤的作用, 能够通过多种机制阻止或延缓前列腺癌的病情进展, 对 CRPC 也有良好的治疗效果。目前, 部分已完成的临床试验结果显示, 姜黄素对不同恶性肿瘤患者的治疗具有安全性和有效性, 其中姜黄素抗肿瘤效应最有前景的是姜黄素联合其他抗肿瘤化疗药物或使用新型药物递送方式^[3]。但由于其水溶性差、代谢快、吸收低、使摄入的姜黄素不能充分发挥其作用, 限制了姜黄素的临床使用^[4-6]。

纳米递药系统在癌症治疗方面比传统的化疗具有更多的优势。脂质体具有防止药物降解, 增强药物稳定性, 控制药物释放, 改善药物药代动力学等优势。但传统脂质体缺乏特异性和选择性。为了解决这个问题, 利用多种靶向配体对脂质体进行表面修饰, 通过识别细胞表面过表达的受体来提高脂质体对肿瘤细胞的定向传递, 已经被广泛应用^[7-8]。转铁蛋白受体 (transferrin receptor, TfR) 在恶性肿瘤细胞中表达显著增强。转铁蛋白 (transferrin, Tf) 与肿瘤细胞表面的 TfR 的亲合力是正常细胞表面的 10~100 倍, 故将 Tf 为靶向功能基团与脂质体相连, 可有效实现抗肿瘤的靶向治疗作用^[9]。

本研究目的是设计一种尺寸合适、包封效率高、具有缓释特性和靶向性好的 Tf 修饰的姜黄素脂质体 (transferrin modified curcumin liposomes, Tf-Cur-Lip), 对其理化性质进行表征。并选取前列腺肿瘤细胞 DU145 细胞系, 进一步考察其体外细胞毒性和细胞摄取能力, 以期提高姜黄素的生物利用度, 提高其在临床应用中的抗肿瘤疗效。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters E2695 型高效液相色谱仪, 美国沃特式公司; OSB-2100 型真空旋转蒸发仪, 上海爱朗仪器有限公司; NaNo-ZS90 型激光粒度分析仪, 英国 Malvern 公司; JY92-11N 型超声波细胞粉碎机, 宁波生物科技股份有限公司; Primovert Olympus 倒置荧光显微镜, 日本奥林巴斯株式会社; Tecnai G2 型透射电子显微镜 (SEM), 美国 Fei 公司。

1.2 试剂

姜黄素对照品, 批号 B20614, 质量分数 $\geq 98\%$, 上海源叶生物科技有限公司; 姜黄素原料药, 批号

M13GS148382, 质量分数 $> 95\%$, 科密欧化学试剂有限公司; 大豆卵磷脂, 批号 s30870, 上海源叶生物科技有限公司; 二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇 2000 (DSPE-PEG 2000)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇-转铁蛋白 (DSPE-PEG 2000-Tf), 批号 RD0200814、RD0200908, 西安瑞禧生物科技有限公司; 泊洛沙姆 F127 (Pluronic F127, F127), 批号 9003-11-06, 西安悦来医药科技有限公司; 辛基-琼脂糖凝胶 CL-4B, 批号 20180928, 北京索莱宝科技有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 批号 20190227, 南京建成生物工程研究所; 噻唑蓝 (MTT), 批号 2019325, Amersco 公司; 1640 培养液, 批号 20210927, 北京索莱宝科技有限公司; DU145 细胞株均购于中国科学院上海细胞库。

2 方法与结果

2.1 姜黄素脂质体 (curcumin liposome, Cur-Lip) 和 Tf-Cur-Lip 的制备

基于前期试验^[10], 采用薄膜水化法制备 Cur-Lip, 称取处方量的脂质材料磷脂-胆固醇物质的量比 6:3 于 250 mL 圆底烧瓶中, 加入 4 mL 氯仿溶解; 姜黄素溶于 1 mL 的无水乙醇, 加至圆底烧瓶, 脂质材料与药物质量比 (脂药比) 10:1, 45 °C 下减压旋蒸, 使成为均匀的薄膜。水合过程加入 15 mL 溶于 pH 6.5 PBS (含 1% F127), 水化 2 h。冰浴下探超 4 min, 4 °C 下冷藏备用。精密称取一定量 DSPE-PEG 2000-Tf 溶于氯仿中, 在茄形瓶中减压蒸发成膜, 除去有机溶剂, 置于真空干燥器中过夜, 使其充分干燥, 加入适量 PBS 水化, 制备成 DSPE-PEG 2000-Tf 胶束。分别将 Cur-Lip 与 DSPE-PEG 2000-Tf 胶束混合 (脂质材料与胶束物质的量比 500:1), 于恒温振荡器下, 37 °C 下避光反应 1 h, 反应后溶液过 PBS 平衡的 CL-4B 琼脂糖凝胶柱 (20 cm $\times$ 1 cm) 除去游离的 DSPE-PEG 2000-Tf, 得到 Tf-Cur-Lip^[11-14], 洗脱曲线见图 1。

2.2 姜黄素含量测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Dikma C₁₈ 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为甲醇-0.5%冰醋酸水溶液 (75:25); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 °C; 检测波长 424 nm。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取姜黄素对照品 12.5 mg 置于 25 mL 量瓶中, 加入无水乙醇溶解定容, 作为母液。精密吸取 1 mL 母液置 10 mL 量瓶中, 无水乙醇稀释至刻度, 配制质量浓度 50 μ g/mL

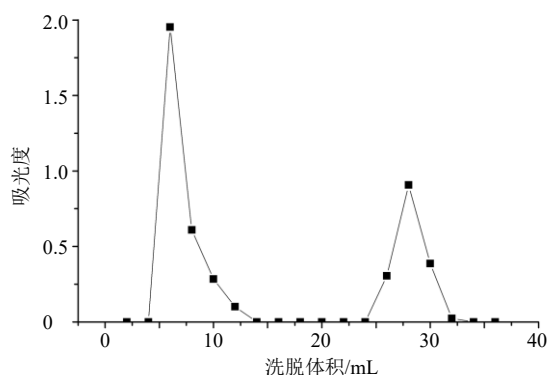


图 1 Tf-Cur-Lip 洗脱曲线

Fig. 1 Elution curve of Tf-Cur-Lip

姜黄素对照品储备液，避光保存。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密吸取 Tf-Cur-Lip 溶液 0.2 mL，加入甲醇至 4 mL，超声破乳，离心取上清液 0.5 mL，加入无水乙醇稀释定容至 5 mL 量瓶中，得 Tf-Cur-Lip 供试品溶液。

2.2.4 线性关系考察 将 50 $\mu\text{g/mL}$ 姜黄素对照品溶液用 PBS (pH 6.5) 溶液依次稀释为 0.2、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 的系列质量浓度对照品溶液，12 000 r/min 离心（离心半径 6.0 cm）10 min，取上清液进样检测，以峰面积对质量浓度进行线性回归处理，得标准曲线方程 $Y=180\,401X-22\,984$ ， $R^2=0.999\,7$ ，结果表明姜黄素在 0.2~2.0 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.2.5 精密度试验 将 0.2、1.2、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液各 5 份，分别于 1 d 内连续进样 3 次，连续 3 d，计算日内和日间精密度。结果表明低、中、高 3 个质量浓度的日内、日间精密度 RSD 值均小于 5%，表明该仪器精密度良好。

2.2.6 重复性试验 按“2.2.3”项方法制备 5 份 Tf-Cur-Lip 供试品溶液，在“2.2.1”项色谱条件下测定峰面积，计算姜黄素质量浓度，结果显示，姜黄素质量浓度的 RSD 为 1.37%，表明该方法重复性良好。

2.2.7 稳定性试验 按“2.2.3”项方法制备 Tf-Cur-Lip 供试品溶液，分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 取样，在“2.2.1”项色谱条件下进行 HPLC 分析，结果显示姜黄素峰面积的 RSD 为 0.95%，表明供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

2.2.8 加样回收率试验 精密量取已测定姜黄素含量的 Tf-Cur-Lip 供试品溶液 9 份，各 1 mL，分别加入低、中、高 3 种质量浓度的姜黄素对照品溶液，在“2.2.1”项色谱条件下进行 HPLC 分析，计算加

样回收率。结果显示，低、中、高质量浓度姜黄素对应的加样回收率分别为 $(99.70 \pm 0.67)\%$ 、 $(105.50 \pm 2.40)\%$ 和 $(103.20 \pm 0.52)\%$ ，RSD 分别为 1.67%、0.77%、0.38%。

2.3 包封率与载药量的测定

取适量脂质体混悬液过 0.22 μm 的微孔滤膜，精密吸取 0.2 mL 滤液，加入甲醇至 4 mL，超声破乳，离心取上清液 0.5 mL，稀释后 HPLC 测得姜黄素质量浓度 (C_1)，代入标准曲线计算得姜黄素质量 (W_1)。另取 0.2 mL 未过滤膜脂质体混悬液，同法破乳处理，测得质量浓度 (C_2)，制备脂质体的膜材与药物总质量 (W_2)。

$$\text{包封率} = C_1/C_2$$

$$\text{载药量} = W_1/W_2$$

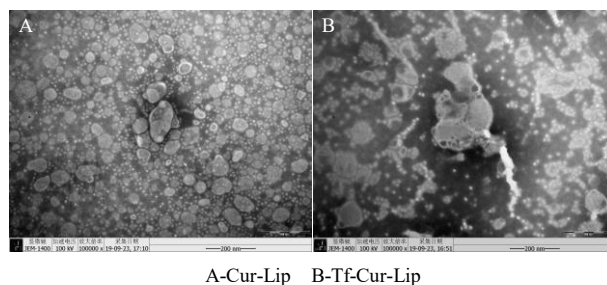
结果表明，Cur-Lip 与 Tf-Cur-Lip 包封率分别为 $(93.83 \pm 0.41)\%$ 、 $(98.13 \pm 0.38)\%$ ($n=3$)，RSD 值分别为 0.43%、0.65%；载药量分别为 $(3.14 \pm 0.08)\%$ 、 $(2.94 \pm 0.38)\%$ ($n=3$)，RSD 值分别为 2.40%、1.26%。

二喹啉甲酸法 (bicinchoninic acid, BCA) 测量经 CL-4B 柱滤过的蛋白浓度，及未经纯化的蛋白质量浓度，两者比值作 Tf 偶联脂质体的偶联率^[15]，结果为 $(29.28 \pm 1.15)\%$ ($n=3$)，RSD 值为 3.92%。

2.4 脂质体的表征

2.4.1 形态 取 2 种脂质体混悬液适量稀释，滴至覆有支持膜的铜筛网上，用 2% 磷钨酸染色 4 min，自然干燥后，使用 SEM 观察形态。结果见图 2，可知，Cur-Lip 呈均一球状且圆整度较好，Tf-Cur-Lip 形态规则，呈类球状，磷脂双分子层较清晰可见，推测蛋白分子或穿插于类脂膜中。

2.4.2 粒径与分布 取 2 种脂质体混悬液适量稀释，采用马尔文激光粒度测定仪检测其粒径分布。结果见图 3，可知，Cur-Lip 与 Tf-Cur-Lip 平均粒径分别为 (83.13 ± 1.59) 、 (68.27 ± 0.36) nm，多分散



A-Cur-Lip B-Tf-Cur-Lip

图 2 姜黄素脂质体的 TEM 图

Fig. 2 TEM image for curcumin liposomes

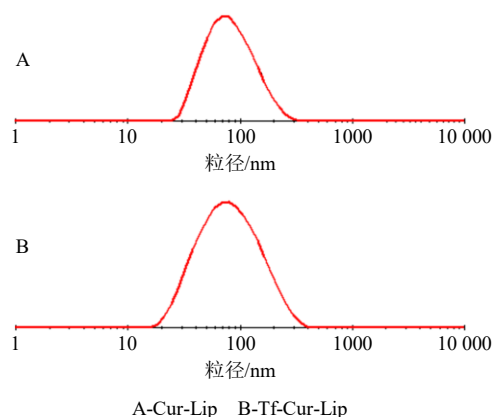


图 3 姜黄素脂质体粒径分布

Fig. 3 Particle size distribution of curcumin liposomes

指数 (polydispersity index, PDI) 值分别为 0.205 ± 0.030 、 0.194 ± 0.050 , 表明脂质体粒径大小均一, 分布均匀。

2.5 脂质体的体外释放实验

采用反相透析法研究 Cur-Lip 及 Tf-Cur-Lip 的体外释药行为。精密吸取 5 mL 姜黄素原料药混悬液 (姜黄素组)、Cur-Lip 混悬液及 Tf-Cur-Lip 混悬液 (姜黄素含量约 1 mg), 分别置于 45 mL 含 1% 聚山梨酯 80 的 PBS 释放介质中, 精密吸取 3 mL 释放介质于预先处理好的透析袋中 (截留相对分子质量 500), 两端夹紧, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 恒温水浴摇床震荡, 分别在 0.5、1、2、4、8、12、18、24、36、72 h 时间点下精密吸取透析袋内 0.2 mL 样品并

补充等体积空白释放介质, 无水乙醇适当稀释后 HPLC 测定, 使用 DDSolver 软件绘制计算体外累积释放率, 并对其进行体外释药动力模型拟合。由图 4 可知, 姜黄素组、Cur-Lip 组和 Tf-Cur-Lip 组在 72 h 累积释放率分别为 70.89%、63.27%、62.54%。与原料药相比较, 2 种脂质体制剂显示了出一定的缓释特征。分别采用零级动力学方程、一级动力学方程、Higuchi 方程对姜黄素组、Cur-Lip 组和 Tf-Cur-Lip 组于 0~72 h 的体外累积释放率进行拟合, 以相关系数 (r) 值望大以及均方误差 (MSE) 望小为最佳拟合, 由表 1 结果可知, 姜黄素组的释放曲线较符合零级动力学释药模型, 制剂组体外释放行为更符合 Higuchi 动力学模型。

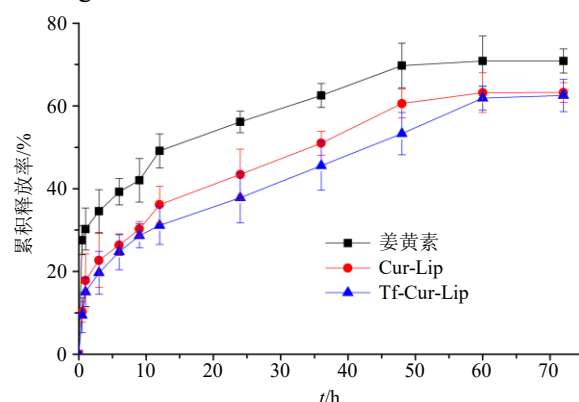


图 4 姜黄素与不同制剂的体外释放曲线

Fig. 4 *In vitro* release curve of curcumin and different preparations

表 1 姜黄素与不同制剂体外释药度模型拟合

Table 1 Curcumin and its preparations *in vitro* released in various models

样品	数学模型	拟合方程	k_0	k_1	k_H	r	MSE
姜黄素	0 级	$F=k_0t$	0.60			0.86	37.73
	1 级	$F=100(1-e^{-k_1t})$		0.03		0.23	351.03
	Higuchi	$F=k_H t^{1/2}$			10.21	0.59	184.73
Cur-Lip	0 级	$F=k_0t$	1.14			0.44	254.73
	1 级	$F=100(1-e^{-k_1t})$		0.02		0.70	135.71
	Higuchi	$F=k_H t^{1/2}$			8.51	0.93	32.51
Tf-Cur-Lip	0 级	$F=k_0t$	1.07			0.56	181.10
	1 级	$F=100(1-e^{-k_1t})$		0.02		0.75	103.78
	Higuchi	$F=k_H t^{1/2}$			7.91	0.96	17.78

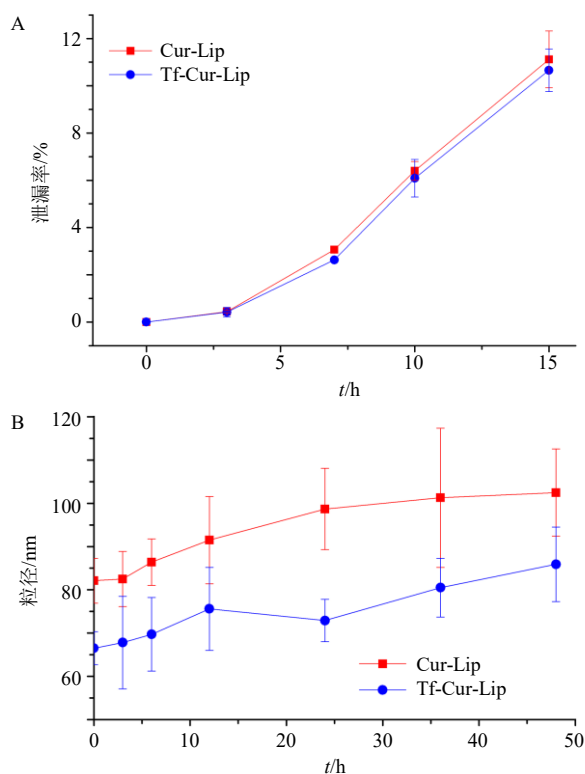
2.6 脂质体稳定性实验

2.6.1 长期稳定性实验 将 2 种脂质体放置在低温、避光的条件下, 于 0、3、7、10、15 d 测定其泄漏率及粒径, 评价其稳定性。结果见图 5-A。结果表明 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下避光存放 15 d 脂质体中药物泄漏率

超过 10%, 因此, 后续考虑通过引入稳定剂或添加冻干保护剂进行冷冻干燥等方式提高制剂稳定性、使其更宜长期储存。

泄漏率 = 储存后泄露到介质中的药物质量 / 储存前包装的药物质量

2.6.2 血浆稳定性实验 采用 10%胎牛血清模拟血浆环境, 分别将加入 2 种脂质体的 10%胎牛血清置于 37 °C 的恒温摇床中放置 48 h, 定时取样测定粒径。结果见图 5-B, 可知, Cur-Lip 与 Tf-Cur-Lip 在血浆中放置 48 h, 粒径有所增大, 但仍在 100 nm 左右, 表明其血浆稳定性良好。



A-4 °C 下储存 15 d 的泄漏率 B-10%胎牛血清中粒径变化
A-leakage rate stored at 4 °C for 15 d B-changes of particle size in 10% fetal bovine serum

图 5 Cur-Lip 和 Tf-Cur-Lip 稳定性考察

Fig. 5 Stability of various Cur-Lip and Tf-Cur-Lip

2.7 姜黄素脂质体体外抗肿瘤研究

2.7.1 样品溶液的配制 精密称取 9.2 mg 姜黄素, 溶于 1 mL 二甲基亚砜中, 用 1640 培养基稀释配制浓度为 10、20、30、40、50 $\mu\text{mol/L}$; 将适量 Cur-Lip 混悬液和 Tf-Cur-Lip 混悬液用 1640 培养基稀释配制浓度 10、20、30、40、50 $\mu\text{mol/L}$ 。将空白脂质体混悬液按照上述样品方法进行同步稀释。

2.7.2 MTT 细胞实验方法 将复苏的 DU145 细胞接种到 1640 培养基中(含 10%胎牛血清、100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素 100 U/mL 青霉素), 在 37 °C、5% CO_2 饱和湿度条件下培养。隔天传代。取处于对数生长期的 DU145 细胞制备成单细胞悬液, 以 5000 个/孔的细胞密度接种于 96 孔板。待细胞贴壁后, 再加入 200 μL 不同浓度梯度的样品(空白脂质体、姜黄素、

Cur-Lip、Tf-Cur-Lip) 至 96 孔板中(设 4 个复孔, 其中空白组没种细胞, 只加培养液, 对照组种细胞, 只加培养液), 姜黄素终浓度分别为 10、20、30、40、50 $\mu\text{mol/L}$, 分别培养 24、48、72 h。在终止培养 4 h 前, 取出 96 孔板, 每孔加入 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL), 于平板震荡仪上以 100 r/min 轻轻震荡 3 min, 使 MTT 溶液充分混匀。终止培养后, 使用平板离心机 2500 r/min 离心(离心半径 9 cm) 10 min 使甲瓚结晶与培养液分离, 使用移液枪沿壁小心吸弃培养液。每孔加入 150 μL 二甲基亚砜溶液, 震荡 2 min, 使用酶标仪在 490 nm 处检测每个孔的吸光度(A)值, 计算细胞存活率, SPSS 17.0 计算半数致死浓度(IC_{50})。

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

结果如图 6 所示, 前列腺肿瘤细胞正常培养 72 h, 空白载体在与加药组相同浓度范围内, 细胞存活率均大于 90%, 表明空白脂质体对 2 种细胞均无明显毒性作用。图 7 表明, 姜黄素组、Cur-Lip 组及 Tf-Cur-Lip 组对 DU145 细胞增殖均具有抑制作用, 且随着给药时间和给药浓度的延长, 特别是浓度超过 30 $\mu\text{mol/L}$ 后, 各制剂对前列腺肿瘤细胞的抗增殖能力均优于姜黄素, 且 Tf-Cur-Lip 效果又优于 Cur-Lip。在 72 h 时, Tf-Cur-Lip 的 IC_{50} 值最小, 为 15.58 $\mu\text{mol/L}$, 对前列腺肿瘤细胞增殖抑制效果是游离姜黄素的(2.07 $\pm$ 0.28)倍, 而 Cur-Lip 抑制效果是游离姜黄素的(1.55 $\pm$ 0.12)倍。

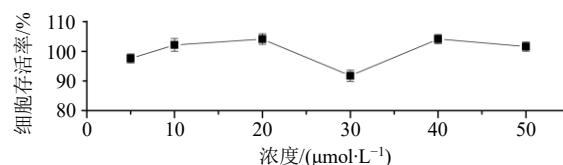


图 6 空白脂质体对细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of blank liposome on the viability of DU145 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.7.3 细胞摄取实验 取处于对数生长期的 DU145 细胞制备成单细胞悬液, 接种到 12 孔培养板中, 细胞密度控制为 1×10^5 /孔, 置于 37 °C, 5% CO_2 细胞培养箱中培养, 待细胞贴壁, 弃去培养基, PBS 清洗后, 分别加入含姜黄素、Cur-Lip、Tf-Cur-Lip 的培养基, 各组姜黄素终浓度分别为 10、20、30、40 $\mu\text{mol/L}$, 避光孵育 1 h。弃去培养基, 用 PBS 清洗, 加入 200 μL 1%细胞裂解液 Triton X-100, 4 °C 下避光充分裂解细胞后, 细胞悬液转移至离心管并反复冻融 3 次。12 000 r/min 离心(离心半径 6.0 cm)

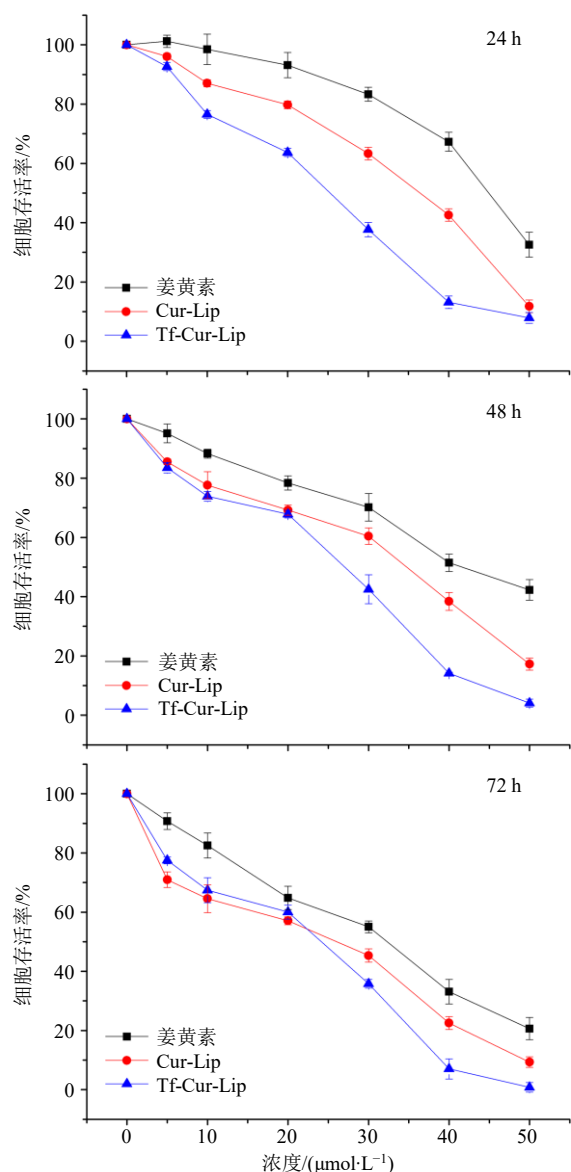


图 7 姜黄素与不同制剂组对 DU145 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effects of curcumin and different preparations on the viability of DU145 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

10 min, 精密量取上清液 100 μL , 甲醇 300 μL , 充分涡旋混匀后, HPLC 进样测定姜黄素含量。采用激光共聚焦显微镜观察姜黄素及其脂质体制剂使用 Hoechst 33342 染色液标记的 DU145 细胞, 观察相同孵育时间下, 姜黄素及其脂质体制剂在 DU145 细胞的分布情况。

如图 8 所示, Tf-Cur-Lip 组与 Cur-Lip 组细胞摄取量在实验浓度范围内均高于姜黄素组, 且靶向的 Tf-Cur-Lip 组细胞摄取量要高于 Cur-Lip 组, Cur-Lip 组在给药浓度 10、20、30、40 $\mu\text{mol/L}$ 下, 体外细胞摄取量分别是姜黄素组的 1.4、2.8、2.5、4.1 倍。

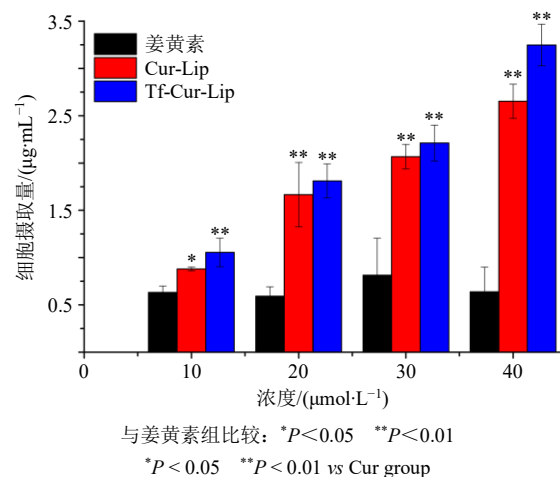


图 8 姜黄素与不同制剂在 DU145 细胞中的摄取量

Fig. 8 Cellular uptake of curcumin and different preparations on DU145 cells

而 Tf-Cur-Lip 组分别是姜黄素组的 1.7、3.1、2.7、5.1 倍。激光共聚焦显微镜的观察结果与此一致 (图 9), 姜黄素不仅分布于细胞膜及胞浆中, 而且可以进入细胞核中, 其中姜黄素组、Cur-Lip 组、Tf-Cur-Lip 组的共定位皮尔森相关系数分别为 0.50、0.52、0.61, Manders 相关系数分别为 0.77、0.80、0.86, 说明 Tf 的修饰增强了 DU145 细胞对姜黄素脂质体的摄取, 并且可以释放更多药物进入细胞核中。

3 讨论

姜黄素在水中溶解度极小、体液不稳定、体内代谢快, 导致其口服生物利用度低, 严重影响了其临床应用。此外, 姜黄素在生理条件下具有极其敏感的水解降解作用^[14]。目前多种纳米递药系统, 包括脂质体, 胶束等已被用于增加姜黄素的水溶性和稳定性^[13-14,16]。

研究表明, Pluronic F127 修饰的脂质体可以改善脂质体的粒径及稳定性^[17-18], 因此, 在制备脂质体过程中, 水化介质中加入了一定比例的 Pluronic F127 用以调节, 制备得到的 Cur-Lip 平均粒径在 83.13 nm, 而前期实验中没有加入 Pluronic F127 制备的 Cur-Lip 平均粒径在 151.1 nm 左右^[10], 表明加入一定比例的 Pluronic F127 确实可有效降低脂质体的粒径, 究其原因可能是 Pluronic F127 可选择性插入或吸附在脂质体双分子层中, 使脂质体排列的更致密。而且研究发现 Pluronic F127 包裹的纳米粒能有效克服胃肠道黏液屏障提高药物的跨膜吸收^[18]。因其能在纳米粒表面形成疏松的网状结构层, 有效屏蔽纳米粒表面的电荷, 且具有较强的亲水性, 可以减少纳米粒与黏液层之间的静电作用和疏水作用。

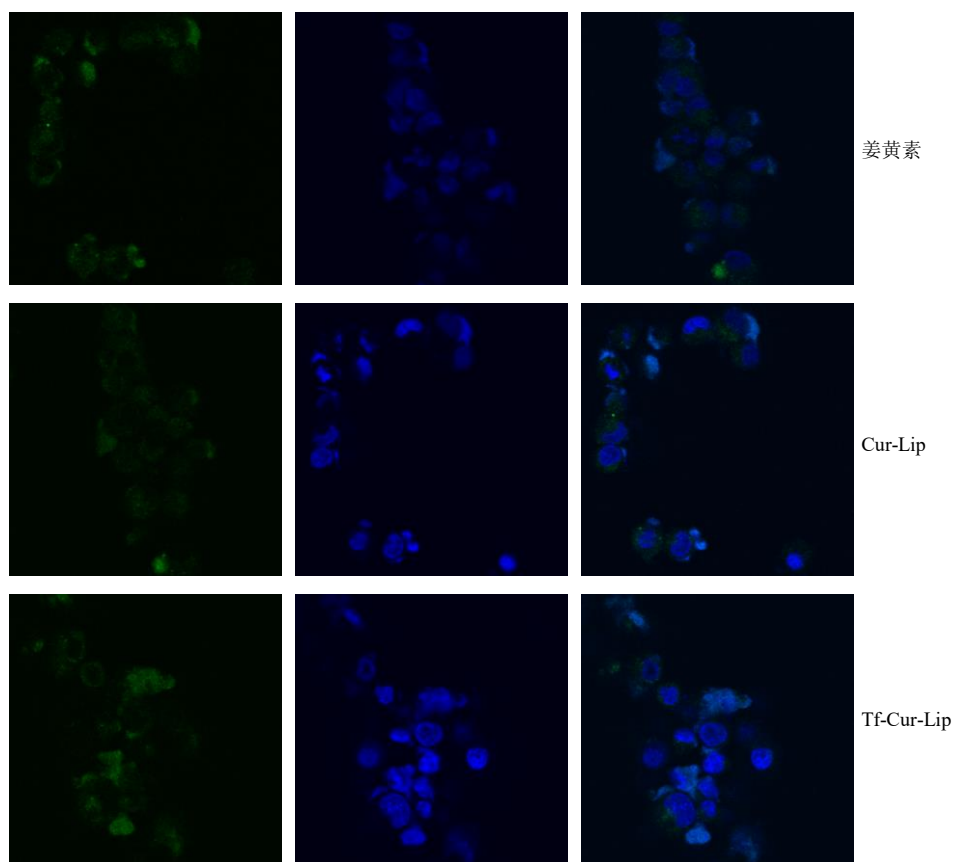


图 9 姜黄素与不同制剂处理 DU145 细胞激光共聚焦显微镜图像

Fig. 9 Confocal laser scanning microscope images of DU145 cells treated with curcumin and different preparations

后续实验会进一步考察 Tf-Cur-Lip 的小肠吸收机制，为探讨姜黄素口服纳米靶向制剂的研究提供理论依据。

释放度实验表明，Cur-Lip 及 Tf-Cur-Lip 具有相似的释药行为，说明 Tf 的结合对姜黄素脂质体释放行为无明显影响，表明姜黄素可以从 2 种脂质体中缓慢释放，在到达肿瘤组织之前有利于减少血液循环中的药物渗漏，有效提高药物的稳定性。有研究认为，Pluronic F127 插入脂质体膜，增加膜的稳定性，也可能会阻止药物从脂质体中释放起到长效作用^[13]。

脂质体的包载明显提高了前列腺肿瘤细胞对姜黄素的摄取，而且 Tf-Cur-Lip 相较于普通 Cur-Lip 能够更多的被 DU145 细胞摄取。研究证实转铁蛋白修饰脂质体可通过受体介导的内吞作用进入肿瘤细胞^[20-21]，说明 Tf-Cur-Lip 的靶向性可能与 TfR 修饰的内吞作用有关，使更多的姜黄素进入肿瘤组织，实现了 Tf 修饰的纳米靶向脂质体对前列腺肿瘤细胞的高效亲和力及转运能力。本实验发现如果在细胞摄取实验中，提前加入 150 $\mu\text{g/mL}$ 的游离 Tf 孵育

细胞 30 min，再加入 Tf-Cur-Lip 处理细胞，与没有加入 Tf 孵育的 Tf-Cur-Lip 实验组相比较，细胞摄取量会降低，分别为 (2.45 ± 0.27) 、 (3.25 ± 0.52) $\mu\text{g/mL}$ 。通过竞争性抑制实验说明 Tf-Cur-Lip 被细胞所摄取与细胞表面的转铁蛋白受体介导的内吞作用有关，但具体内吞机制还有待进一步说明。细胞毒性实验结果与此一致，说明载药脂质体对肿瘤细胞增殖抑制作用可能与肿瘤细胞对 Tf-Cur-Lip 的摄取增加有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Akanda M, Getti G, Nandi U, *et al.* Bioconjugated solid lipid nanoparticles (SLNs) for targeted prostate cancer therapy [J]. *Int J Pharm*, 2021, 599: 120416.
- [2] 崔洪泉, 白洋洋, 韩艳丽, 等. 中药治疗去势抵抗性前列腺癌临床疗效评价 [J]. *国医论坛*, 2022, 37(3): 29-32.
- [3] 李玉倩, 李学军. 姜黄素抗肿瘤作用基础与临床研究进展 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2020, 34(5): 321-335.
- [4] Rutz J, Benchellal A, Kassabra W, *et al.* Growth,

- proliferation and metastasis of prostate cancer cells is blocked by low-dose curcumin in combination with light irradiation [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(18): 9966.
- [5] Pan L, Sha J, Lin W Y, *et al*. Curcumin inhibits prostate cancer progression by regulating the miR-30a-5p/PCLAF axis [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(3): 969.
- [6] Nakayama A, Ide H, Lu Y, *et al*. Effects of curcumin combined with the 5- α reductase inhibitor dutasteride on LNCaP prostate cancer cells [J]. *In Vivo*, 2021, 35(3): 1443-1450.
- [7] AlSawaftah N M, Awad N S, Paul V, *et al*. Transferrin-modified liposomes triggered with ultrasound to treat HeLa cells [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 11589.
- [8] Liu X, Dong S Y, Dong M Y, *et al*. Transferrin-conjugated liposomes loaded with carnosic acid inhibit liver cancer growth by inducing mitochondria-mediated apoptosis [J]. *Int J Pharm*, 2021, 607: 121034.
- [9] 朱庆, 曹燕丽, 徐云燕, 等. 酸变性法构建转铁蛋白-姜黄素纳米粒子及其肿瘤靶向性 [J]. 东南国防医药, 2019, 21(3): 262-266.
- [10] 关延彬, 韩冰, 田雨冬, 等. 姜黄素脂质体的制备及质量评价 [J]. 中药材, 2019, 42(2): 385-389.
- [11] Chiu S J, Liu S J, Perrotti D, *et al*. Efficient delivery of a Bcl-2-specific antisense oligodeoxyribonucleotide (G3139) via transferrin receptor-targeted liposomes [J]. *J Control Release*, 2006, 112(2): 199-207.
- [12] Jhaveri A, Deshpande P, Pattni B, *et al*. Transferrin-targeted, resveratrol-loaded liposomes for the treatment of glioblastoma [J]. *J Control Release*, 2018, 277: 89-101.
- [13] 靳彩玲, 赵树鹏, 张敏, 等. 转铁蛋白修饰紫杉醇脂质体的制备及其抑瘤作用 [J]. 中国药房, 2016, 27(1): 44-47.
- [14] Mahjoob M, Stochaj U. Curcumin nanoformulations to combat aging-related diseases [J]. *Ageing Res Rev*, 2021, 69: 101364.
- [15] Anabousi S, Laue M, Lehr C M, *et al*. Assessing transferrin modification of liposomes by atomic force microscopy and transmission electron microscopy [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2005, 60(2): 295-303.
- [16] Khezri K, Saeedi M, Mohammadamini H, *et al*. A comprehensive review of the therapeutic potential of curcumin nanoformulations [J]. *Phytother Res*, 2021, 35(10): 5527-5563.
- [17] 李文娟, 廖璇, 熊向源, 等. Pluronic 修饰脂质体的研究进展 [J]. 材料导报, 2021, 35(S2): 612-615.
- [18] 李资玲. Pluronic 修饰脂质体的结构特性、稳定性及细胞毒性研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2019.
- [19] Liu Y H, Yang T, Wei S J, *et al*. Mucus adhesion- and penetration-enhanced liposomes for paclitaxel oral delivery [J]. *Int J Pharm*, 2018, 537(1/2): 245-256.
- [20] Sakpakdeejaroen I, Somani S, Laskar P, *et al*. Transferrin-bearing liposomes entrapping plumbagin for targeted cancer therapy [J]. *J Interdiscip Nanomed*, 2019, 4(2): 54-71.
- [21] Liu X, Dong S Y, Dong M Y, *et al*. Transferrin-conjugated liposomes loaded with carnosic acid inhibit liver cancer growth by inducing mitochondria-mediated apoptosis [J]. *Int J Pharm*, 2021, 607: 121034.

[责任编辑 郑礼胜]