

• 药剂与工艺 •

共载姜黄素和 IR780 的聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒的制备及其体外抗肿瘤评价

黄华婷¹, 吴念¹, 蔡梦如¹, 尹东阁¹, 付婷婷¹, 朱荣玥¹, 尹兴斌¹, 梁潇², 倪健^{1*}, 董晓旭^{1*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488

2. 比奥罗历加(北京)科技发展有限公司, 北京 100020

摘要: 目的 制备共载姜黄素和 IR780 的聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (poly lactic-co-glycolic acid, PLGA) 纳米粒 (curcumin/IR780 PLGA nanoparticles, Cur/IR780-NPs) 并对其表征和体外抗肿瘤评价。方法 采用乳化溶剂挥发法制备 Cur/IR780-NPs, 用马尔文激光粒度仪、X 射线粉末衍射仪、傅里叶变换红外光谱仪、紫外可见分光光度计、透射电子显微镜对其进行表征; HPLC 和紫外可见分光光度计分别测定姜黄素和 IR780 载药量, 并考察 Cur/IR780-NPs 稳定性和体外释药性能; 利用人肝癌 HepG2 细胞模型考察 Cur/IR780-NPs 的细胞摄取和体外抗肿瘤效果。结果 Cur/IR780-NPs 形态呈球形, 平均粒径为 (224.10 ± 7.06) nm、多分散指数 (polydispersity index, PDI) 为 0.081 ± 0.013 、 ζ 电位为 (-9.84 ± 0.16) mV, 具有良好的稳定性。Cur/IR780-NPs 能够有效负载姜黄素和 IR780, 载药量分别为 $(2.21 \pm 0.07)\%$ 、 $(2.35 \pm 0.31)\%$, 具有近红外光谱响应性释药性能。Cur/IR780-NPs 能够被 HepG2 细胞有效摄取, 经 808 nm 激光 (2.0 W/cm^2 、5 min) 照射后产生光热效应, 与姜黄素发挥联合抗肿瘤作用。结论 Cur/IR780-NPs 有助于将姜黄素和 IR780 共递送至 HepG2 细胞内, 发挥化疗-光热治疗联合抗肿瘤作用, 提高肝癌的治疗效果。

关键词: 姜黄素; IR780; 纳米粒; PLGA; 抗肿瘤; 联合治疗; 化疗-光热治疗; 乳化溶剂挥发法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)02-0498-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.02.017

Preparation and *in vitro* antitumor evaluation of PLGA nanoparticles co-loaded with curcumin and IR780

HUANG Hua-ting¹, WU Nian¹, CAI Meng-ru¹, YIN Dong-ge¹, FU Ting-ting¹, ZHU Rong-yue¹, YIN Xing-bin¹, LIANG Xiao², NI Jian¹, DONG Xiao-xu¹

1. School of Chinese Material Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. Bionorica (Beijing) Technology Development Co., Ltd., Beijing 100020, China

Abstract: Objective To prepare curcumin-IR780 nanoparticles (Cur/IR780-NPs) and investigate their characterization and antitumor activity *in vitro*. **Methods** Cur/IR780-NPs were prepared by emulsion solvent evaporation method, and characterized them by Malvern laser particle size analyzer, X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), UV-visible spectrophotometer, transmission electron microscopy (TEM). The drug loading of curcumin and IR780 were determined by HPLC and UV-visible spectrophotometer respectively, and the stability and release profiles of Cur/IR780-NPs were examined. The cellular uptake and cytotoxicity of Cur/IR780-NPs were evaluated on human liver cancer HepG2 cells. **Results** Cur/IR780-NPs displayed spherical shape and good stability, with a mean particle size of (224.10 ± 7.06) nm, polydispersity index (PDI) of 0.081 ± 0.013 and ζ potential of (-9.84 ± 0.16) mV. Cur/IR780-NPs could effectively load curcumin and IR780, and the drug loading was $(2.21 \pm 0.07)\%$

收稿日期: 2022-07-18

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目 (2022-JYB-XJSJ015)

作者简介: 黄华婷, 女, 硕士研究生, 从事中药新剂型与新技术的研究。E-mail: hht09091829@163.com

*通信作者: 倪健, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药新剂型与新技术的研究。E-mail: njtcm@263.net

董晓旭, 男, 博士, 讲师, 从事中药新剂型与新技术的研究。E-mail: dxiaoxv@163.com

and $(2.35 \pm 0.31)\%$, respectively. Cur/IR780-NPs could be effectively take up by HepG2 cells, and generated photothermal therapy after irradiation by 808 nm laser (2.0 W/cm^2 , 5 min), and combined with curcumin to improve anti-tumor efficiency. **Conclusion** Cur/IR780-NPs were helpful to deliver curcumin and IR780 into HepG2 cells and exerted the anti-tumor effect of chemo-photothermal therapy, which could improve the treatment efficiency of liver cancer.

Key words: curcumin; IR780; nanoparticles; PLGA; anti-tumor; combination therapy; chemo-photothermal therapy; emulsion solvent evaporation method

研究报道, 2020 年全球恶性肿瘤发病人数约为 1930 万, 死亡人数约为 1000 万, 严重危害人类健康^[1]。与传统的药物治疗、放疗和手术切除等治疗方法相比, 光热疗法具有创伤小、操作简单、特异性高、不良反应小等优点, 成为肿瘤领域的研究热点^[2]。光热疗法 (photothermal therapy, PTT) 是指采用近红外光激发光热试剂, 使其将光能转化为热能, 通过热消融杀死肿瘤细胞^[3]。近年来, 大量具有良好光热性能的光热剂被广泛应用于肿瘤领域, 包括无机光热转换材料 (例如金属纳米材料、过度金属氧化物、二维纳米片等) 和有机光热转换纳米材料 (小分子染料类、超分子复合物类等)^[4-5]。但由于肿瘤的异质性、激光穿透深度有限导致深部肿瘤光热效应转化低等问题, 单一光热治疗根除肿瘤的效果仍然差强人意。因此, 化疗-光热联合治疗在抗肿瘤领域极具潜力^[6-7]。

姜黄素是从姜科姜黄属植物姜黄 *Curcuma longa* L. 中提取分离得到的黄色多酚类物质, 其可通过抑制肿瘤细胞增殖、侵袭与转移、调节细胞能量代谢、抑制血管生成、诱导肿瘤细胞凋亡和自噬、调节免疫、逆转多药耐药等多种机制发挥抗肿瘤作用, 涉及磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K/ Akt)、Janus 激酶/信号转导与转录激活子 (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen- activated protein kinase, MAPK)、无翅型 MMTV 整合位点家族/ β -连环蛋白 (wingless type MMTV integration site family/ β -catenin, Wnt/ β -catenin)、p53、核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 等多种信号通路, 已被美国国家癌症研究所 (National Cancer Institute, NCI) 列为第 3 代癌化学预防药^[8-11]。然而姜黄素存在水溶性差 (水中溶解度仅为 $11 \mu\text{g/L}$), 在体内不易吸收、半衰期短、生物利用度低等局限性, 严重限制其临床应用^[12]。

IR780 是一种亲脂性小分子花青素染料, 在 780 nm 处有最大吸收, 具有良好的光热转化性能、稳

定性以及荧光成像特性, 在光疗抗肿瘤领域受到广泛关注。然而, IR780 难溶于水、代谢快且具有一定毒性, 限制其进一步开发和利用^[13-14]。

为了克服上述问题, 越来越多的纳米给药系统被开发出来并应用于抗肿瘤药物递送领域, 为实现高效、精准的抗肿瘤应用提供参考。聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (poly lactic-co-glycolic acid, PLGA) 由乳酸和羟基乙酸单体按所需比例聚合而成, 是一种被美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准的高分子纳米材料, 具有可生物降解性和良好的生物相容性、结构可修饰性、释药速度可控等优点, 被广泛用于药物递送领域^[15-17]。因此, 本研究以 PLGA 为载体, 通过乳化溶剂挥发法制备共载姜黄素和 IR780 的 PLGA 纳米粒 (curcumin/IR780 PLGA nanoparticles, Cur/IR780-NPs), 以期改善药物自身存在的局限性, 在肿瘤细胞内实现化疗-光热联合治疗, 以提高抗肿瘤疗效。

1 仪器与材料

1.1 仪器

KQ-500DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; CJB-S-10D 型多点磁力搅拌器, 郑州腾跃仪器设备有限公司; BY-G20 型医用离心机, 北京白洋医疗器械有限公司; SHA-BA 型水浴恒温振荡器, 常州市国旺仪器制造有限公司; MS105DU 型分析天平, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; JY92-IIN 型超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; FD-1A-80+型冷冻干燥机, 北京博医康实验仪器有限公司; ZEN-3600 型马尔文激光粒度仪, 英国马尔文公司; APEXII DUO 型 X 射线粉末衍射仪, 德国 Bruker 公司; ThermolS5 型傅里叶变换红外光谱仪, 美国 Thermo 公司; TU-1810 型紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司; 1200 型高效液相色谱仪, 美国安捷伦科技公司; Epoch 酶标仪, 美国 BioTek 仪器有限公司; JEM-1230 型透射电子显微镜 (TEM), 日本 JEOL 公司; SP8 型激光共聚焦显微镜, 德国 Leica 公司; Ts2 型荧光倒置显微镜, 日本尼康公司; BD FACS

Canto II 型流式细胞仪, 美国 BD 公司。

1.2 材料

PLGA (50:50, 相对分子质量 7000~17 000, 批号 M17GS141856)、对照品姜黄素 (批号 R12A10S85604, 质量分数 98%), 上海源叶生物科技有限公司; IR780, 批号 C11417798, 质量分数 98%, 重庆康合悦成医药科技有限公司; 聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol, PVA), 上海麦克林生物有限公司; 溴化钾, 色谱纯, 天津市大茂化学试剂厂; 聚山梨酯 80, 天津百伦斯生物技术有限公司; 甲醇、乙腈、冰醋酸、二氯甲烷均为色谱纯; 人肝癌 HepG2 细胞, 广州吉妮欧生物科技有限公司; DMEM 培养基、PBS 缓冲液、MTT 均购自兰博利德生物技术有限公司; Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒, 碧云天生物技术有限公司; 胎牛血清, 四季青生物技术有限公司; DAPI 溶液, 北京索莱宝科技有限公司; 0.25% 胰蛋白酶、三抗均购自 Gibco 公司; 96 孔板、24 孔板、培养瓶均购自美国 Corning 公司; 二甲基亚砜, 美国 Sigma 公司。

2 方法与结果

2.1 Cur/IR780-NPs 的制备

采用乳化溶剂挥发法^[18]制备 Cur/IR780-NPs, 称取 50 mg PLGA、2 mg 姜黄素和 2 mg IR780, 共同溶解于 2 mL 二氯甲烷中, 作为油相; 用注射器将油相逐滴加至持续搅拌 (转速 600 r/min) 的 10 mL 2% PVA 水溶液 (水相) 中。滴加完毕后, 在冰水浴下, 用超声波细胞粉碎机处理 3 min (功率 180 W, 开 5 s, 关 5 s), 即得到 O/W 型纳米乳; 置于磁力搅拌器上继续搅拌 (转速 600 r/min) 3 h, 挥尽有机溶剂, 10 000 r/min 离心 (离心半径 8.7 cm) 30 min, 收集沉淀, 去离子水洗涤 3 次后, 冷冻干燥, 即得 Cur/IR780-NPs。按上述相同方法分别制备空白纳米粒 (B-NPs)、姜黄素纳米粒 (Cur-NPs) 及 IR780 纳米粒 (IR780-NPs)。

2.2 纳米粒的表征

2.2.1 纳米粒的粒径、多分散指数 (polydispersity index, PDI) 与 ζ 电位考察 分别精密称取适量 Cur-NPs、IR780-NPs 及 Cur/IR780-NPs, 用 PBS 稀释到适当浓度, 用马尔文激光粒度分析仪分别测定 3 者的平均粒径、PDI 和 ζ 电位, 结果见表 1 和图 1、2。结果表明, Cur-NPs、IR780-NPs 和 Cur/IR780-NPs 的平均粒径分别为 (241.70±1.62)、(318.20±11.50)、(224.10±7.06) nm, PDI 分别为 0.108±

表 1 不同样品的平均粒径、PDI 及 ζ 电位

Table 1 Average particle size, PDI and ζ potential of different samples

样品	平均粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
Cur-NPs	241.7±1.6	0.108±0.031	-13.53±0.01
IR780-NPs	318.2±11.5	0.198±0.029	-11.15±0.12
Cur/IR780-NPs	224.1±7.1	0.081±0.013	-9.84±0.16

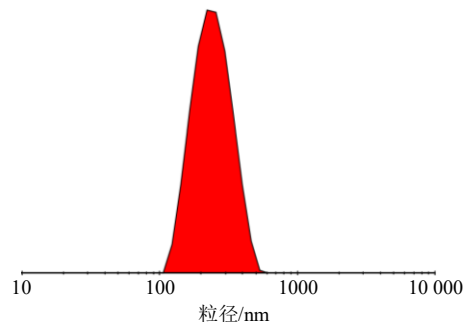


图 1 Cur/IR780-NPs 的粒径分布

Fig. 1 Particle size distribution of Cur/IR780-NPs

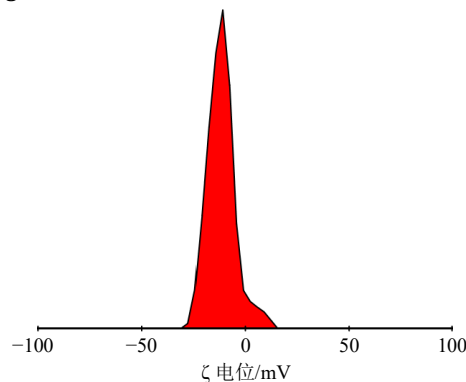


图 2 Cur/IR780-NPs 的 ζ 电位分布

Fig. 2 ζ Potential distribution of Cur/IR780-NPs

0.031、0.198±0.029、0.081±0.013, ζ 电位分别为 (-13.53±0.01)、(-11.15±0.12)、(-9.84±0.16) mV。可见与 Cur-NPs、IR780-NPs 相比, Cur/IR780-NPs 的平均粒径较小且粒径分布较窄。而 3 者 ζ 电位均为负值, 原因是 PLGA 结构中存在末端羧基, 使得纳米粒带负电荷。

2.2.2 纳米粒形态 精密称取 Cur/IR780-NPs 适量, 去离子水稀释, 滴 1~2 滴到铜网上, 静置 2~3 min, 使样品渗入通网孔内, 再用 2% 磷钨酸钠染色, 滤纸吸去过量的染色剂, 室温晾干, 置 TEM 下观察纳米粒的形态并拍照。结果如图 3 所示, Cur/IR780-NPs 的粒径在 200 nm 以下, 外观呈规则球状、大小均一、无黏连, 表明纳米粒形态良好。

2.2.3 X 射线粉末衍射 (XRD) 与傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 检测

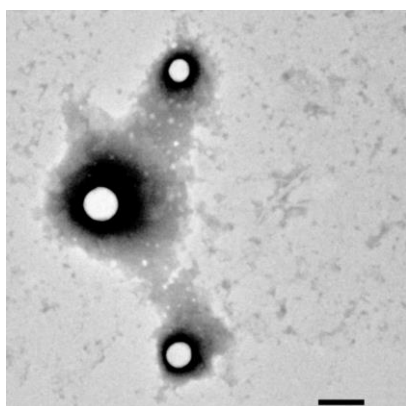


图 3 Cur/IR780-NPs 的 TEM 图 ($\times 20\,000$)
Fig. 3 TEM image of Cur/IR780-NPs ($\times 20\,000$)

(1) XRD: 分别称取姜黄素、IR780、B-NPs、Cur/IR780-NPs 适量, 用 X 射线粉末衍射仪进行分析。分析条件: Cu-K α 射线 ($\lambda=1.541\text{ nm}$), 衍射角度 (2θ) 扫描范围为 $5^\circ\sim 80^\circ$, 扫描速率为 $1^\circ/\text{min}$, 管压 50 kV, 管流 200 mA。

(2) FT-IR: 分别称取姜黄素、IR780、B-NPs、Cur/IR780-NPs 适量, 再分别与适量光谱纯溴化钾混合稀释, 研磨均匀后压片, 分别在 $4000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 进行 FT-IR 分析。

(3) 检测结果: 结果如图 4 所示, Cur/IR780-NPs

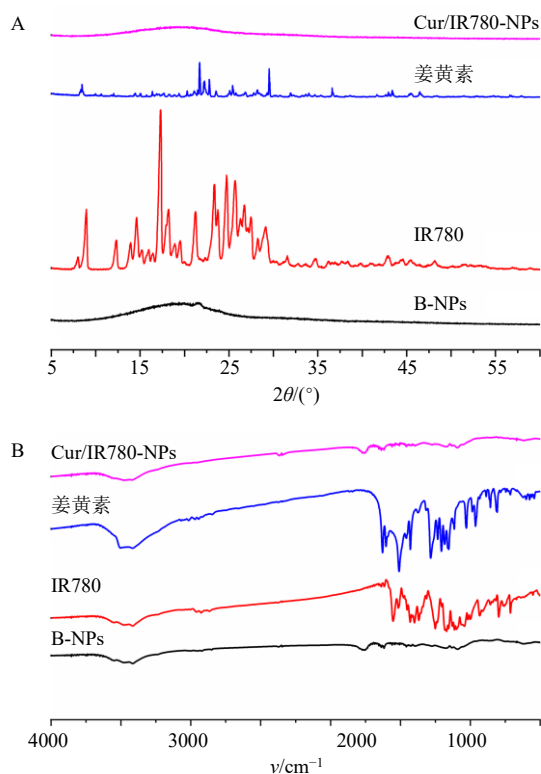


图 4 不同样品的 XRD 图谱 (A) 和 FT-IR 图谱 (B)
Fig. 4 XRD (A) and FT-IR (B) patterns of different samples

中姜黄素与 IR780 的特征衍射峰和 FT-IR 吸收峰均消失, 表明姜黄素和 IR780 成功包载至 PLGA 材料中, 且纳米粒表面未有吸附的游离姜黄素与 IR780。

2.2.4 Cur/IR780-NPs 的紫外-可见吸收光谱分析 分别称取姜黄素、IR780、B-NPs、Cur/IR780-NPs 适量, 用甲醇配制成适当浓度, 然后用紫外-可见分光光度计对其进行光谱扫描 ($200\sim 800\text{ nm}$), 结果如图 5 所示。可见, 姜黄素在 430 nm 处有最大吸收峰, IR780 在 780 nm 处有最大吸收峰, 在 Cur/IR780-NPs 图谱中能明显看到姜黄素和 IR780 的特征吸收峰, 而 B-NPs 在 430 、 780 nm 处无吸收, 表明 B-NPs 无干扰。

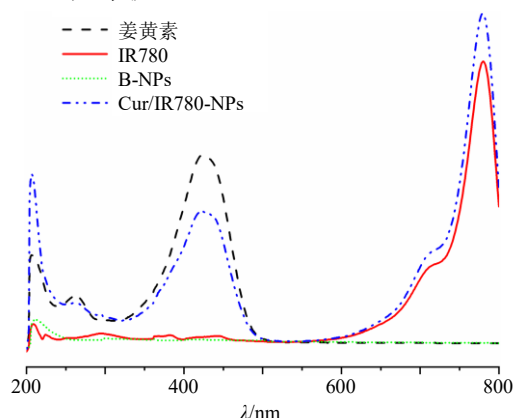


图 5 Cur/IR780-NPs 的紫外-可见吸收光谱
Fig. 5 UV-Vis absorption spectra of Cur/IR780-NPs

2.3 姜黄素载药量的测定

2.3.1 色谱条件 色谱柱为 Hypersil C₁₈ 柱 ($250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$); 流动相为乙腈-4%乙酸水溶液 ($52:48$); 检测波长 430 nm ; 体积流量 1 mL/min ; 柱温 $30\text{ }^\circ\text{C}$; 进样量 $10\text{ }\mu\text{L}$; 理论塔板数为 8406。

2.3.2 对照品储备液的制备 精密称取姜黄素对照品适量, 置于 50 mL 量瓶中, 加入甲醇溶解并稀释定容至刻度, 摇匀, 制成质量浓度为 $104.00\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的对照品储备液。

2.3.3 供试品溶液的制备 精密称取 Cur/IR780-NPs 适量, 加二氯甲烷超声, 使纳米粒内的药物释出后, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.3.4 空白样品溶液 精密称取 B-NPs 适量, 同“2.3.3”项供试品溶液制备方法制得空白样品溶液。

2.3.5 线性关系考察 取上述配制的姜黄素对照品储备液, 用甲醇依次稀释制得质量浓度梯度为 52.00 、 26.00 、 13.00 、 6.50 、 $3.25\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液, 以“2.3.1”项下色谱条件进行检测, 记录

峰面积。以姜黄素峰面积 (A) 对其质量浓度 (C) 进行线性回归, 得到回归方程为 $A=81.91 C-80.161$, $R^2=0.9998$, 表明姜黄素在 $3.25\sim 104.00\ \mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.3.6 专属性考察 将上述制备好的对照品溶液、空白样品溶液、供试品溶液, 以“2.3.1”项下色谱条件进样分析, 色谱图见图 6。结果显示空白材料对姜黄素的测定无影响, 说明本方法专属性良好。

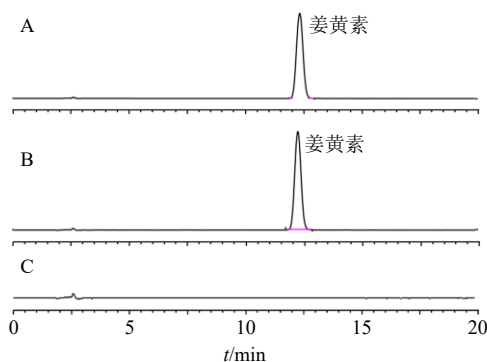


图 6 姜黄素对照品 (A)、Cur/IR780-NPs 样品 (B)、B-NPs 样品 (C) 的 HPLC 图

Fig. 6 HPLC of curcumin reference substance (A), Cur/IR780-NPs sample (B) and B-NPs sample (C)

2.3.7 精密度试验 精密称取姜黄素对照品适量, 置于 50 mL 量瓶中, 加入甲醇溶解并稀释定容至刻度, 摇匀, 制成质量浓度为 $127.0\ \mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。以“2.3.1”项下色谱条件检测, 连续进样 6 针, 记录姜黄素峰面积, 计算其 RSD 为 0.18%, 表明该仪器系统精密度良好。

2.3.8 重复性试验 称取同一批 Cur/IR780-NPs 样品 6 份, 加适量二氯甲烷溶解后挥干有机溶剂, 再精密量取甲醇适量超声溶解, 制得供试品溶液。以“2.3.1”项下色谱条件进行姜黄素检测。结果显示, Cur/IR780-NPs 载药量分别为 1.91%、1.90%、1.94%、1.90%、1.93%、1.92%, RSD 为 0.85%, 表明该实验重复性良好。

2.3.9 稳定性试验 精密称取 Cur/IR780-NPs 适量, 同“2.3.3”项制备方法制得供试品溶液, 分别在 0、1、2、4、6、8、12 h 以“2.3.1”项下色谱条件进行姜黄素检测。结果表明姜黄素峰面积的 RSD 为 0.55%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.3.10 加样回收率试验 精密称取 10 mg 姜黄素对照品置 10 mL 量瓶中, 制备成质量浓度为 $1\ \text{mg/mL}$ 的对照品溶液。再分别称取 5 mg B-NPs, 共 6 份, 分别置 10 mL 量瓶中, 再分别精密量取 0.5 mL

对照品溶液至各量瓶中, 并以甲醇定容至刻度。以“2.3.1”项下色谱条件进行检测。结果显示, 姜黄素的平均加样回收率为 101.94%, RSD 为 0.24%, 符合测定要求。

2.3.11 姜黄素载药量的测定 分别精密称取 Cur-NPs 和 Cur/IR780-NPs 样品各 1 mg, 加二氯甲烷超声, 使纳米粒内的药物释出后, 加甲醇溶解并定容至刻度, 摇匀, 用 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为供试品溶液。以“2.3.1”项下色谱条件, 用 HPLC 检测各样品中姜黄素峰面积。根据“2.3.5”项回归方程计算纳米粒中姜黄素的载药量 (载药量 = 纳米粒中姜黄素质量/纳米粒质量), 结果显示, Cur-NPs 和 Cur/IR780-NPs 中姜黄素的载药量分别为 $(2.05\pm 0.02)\%$ 、 $(2.21\pm 0.07)\%$ 。

2.4 IR780 载药量的测定

2.4.1 线性关系考察 精密称取 IR780 0.50 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加入 DMSO 溶解并定容至刻度, 摇匀, 制成质量浓度为 $5.00\ \mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液。再用 DMSO 稀释制得质量浓度梯度为 3.75、3.00、2.50、1.25 $\mu\text{g/mL}$ 的系列对照品溶液, 用酶标仪在 780 nm 处检测吸光度 (A) 值。以 IR780 的 A 值对其质量浓度 (C) 进行线性回归, 得到回归方程为 $A=0.1965 C-0.016$, $R^2=1.000$, 结果表明 IR780 在 $1.25\sim 5.00\ \mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.4.2 载药量的测定 分别精密称取 IR780-NPs 和 Cur/IR780-NPs 1 mg, 加入 DMSO 溶解并定容至刻度, 摇匀, 制得供试品溶液。用酶标仪在 780 nm 处检测 A 值, 将 A 值代入到回归方程中, 得到供试品溶液质量浓度, 进一步计算得到纳米粒中 IR780 的载药量 (载药量 = 纳米粒中 IR780 质量/纳米粒质量), 结果显示, IR780-NPs 和 Cur/IR780-NPs 中 IR780 的载药量分别为 $(1.09\pm 0.22)\%$ 、 $(2.35\pm 0.31)\%$ 。

2.5 Cur/IR780-NPs 的稳定性考察

精密称取冻干后 Cur/IR780-NPs 1 mg, 加入 10 mL 磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 中, 置于摇床中 ($37\ ^\circ\text{C}$ 、 $100\ \text{r/min}$), 分别于第 1、2、3、4、5、6、7 天取样测定纳米粒的粒径, 结果 Cur/IR780-NPs 的平均粒径分别为 (244.4 ± 0.8) 、 (243.2 ± 17.6) 、 (240.2 ± 12.6) 、 (227.3 ± 12.0) 、 (237.6 ± 18.6) 、 (242.5 ± 16.0) 、 $(254.1\pm 14.3)\ \text{nm}$ 。结果表明, Cur/IR780-NPs 在 7 d 内粒径未发生明显变化, 表明其稳定性良好。

2.6 体外释放研究

采用透析袋法^[19]测定 Cur/IR780-NPs 在有无激光照射条件下的体外释药行为。分别称量 Cur/IR780-NPs 适量,用 2 mL 去离子水分散后转移至透析袋中,密封后放入 pH 7.4 的 PBS (含 5%聚山梨酯 80)中,置于摇床中水浴震荡(37 °C、100 r/min),避光,平行操作 3 份。分别于 1、2、4、8、10、12、24、36、48、60 h 吸取 3.0 mL 透析液,并补充同温等量释放介质,然后用紫外-可见分光光度计测定透析液中姜黄素含量,计算累积释放率,绘制得到溶出曲线。其中,激光照射组纳米粒每隔 12 h 用 808 nm 激光发射器 (2.0 W/cm²) 照射 5 min。

结果见图 7, Cur/IR780-NPs + 808 nm 组和 Cur/IR780-NPs 组在 60 h 内持续缓慢释放姜黄素,累积释放率分别为 61.76%、48.73%,呈现出良好的缓释特性。每隔 12 h 激光 (2.0 W/cm²) 照射 5 min 后,姜黄素从纳米粒中快速释放,说明该纳米粒具有良好的近红外光谱响应释放性能,分析原因为激光照射后纳米粒温度升高,加速载体的降解,进而促进药物释放。Cur/IR780-NPs 的缓释特性和近红外光谱响应性可能会减少药物在体循环中的过早释放,并增加药物在肿瘤部位的特定释放,有助于提高纳米粒的抗肿瘤效率。

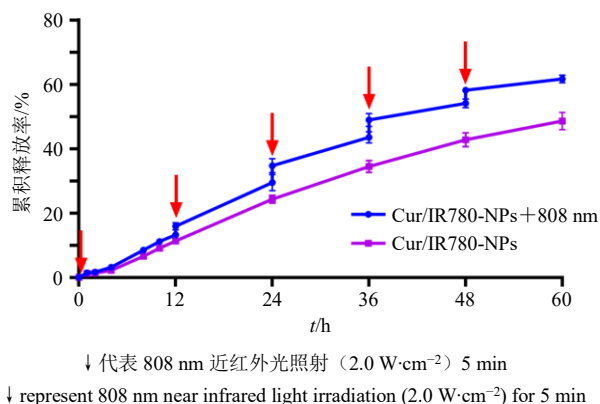


图 7 Cur/IR780-NPs 在有无近红外激光照射姜黄素的体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 *In vitro* release profile of Cur/IR780-NPs with or without NIR laser irradiation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.7 Cur/IR780-NPs 的光热性能评价

用 808 nm 激光发射器 (1.0、1.5、2.0 W/cm²) 分别照射不同质量浓度的 Cur/IR780-NPs 溶液 (以姜黄素质量浓度计: 5、10、20 μg/mL), 每隔 30 s 用红外热成像仪记录温度, 总计 5 min。每个质量浓度设置 3 个复孔, 绘制升温曲线。由图 8 可知,

与空白对照组 (PBS) 相比, 不同质量浓度 Cur/IR780-NPs 经 808 nm 激光照射 5 min 后温度分别升高至 31.9、35.5、43.7 °C, 显示良好的质量浓度相关性; 由图 9 可知, 质量浓度为 20 μg/mL 的 Cur/IR780-NPs 经过不同功率 (1.0、1.5、2.0 W/cm²) 的 808 nm 激光器照射 5 min 后, 最高温度分别升高至 33.8、38.7、43.7 °C, 表明此纳米粒具有较好的激光强度相关性。据报道, 杀灭肿瘤细胞的致死温度为 43 °C^[20], 因此, 后续细胞药效实验确定采用激光强度为 2.0 W/cm² 的 808 nm 激光器照射 5 min。

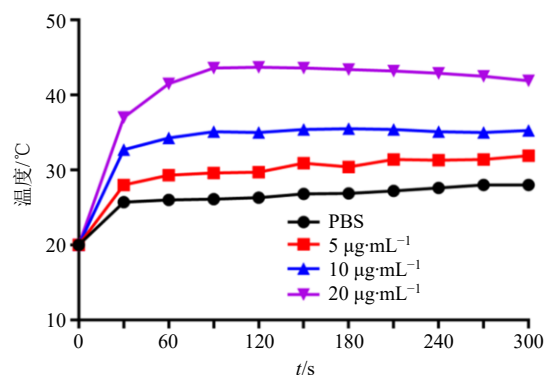


图 8 808 nm 激光发射器 (2.0 W·cm⁻²) 照射下不同质量浓度 Cur/IR780-NPs 的升温曲线

Fig. 8 Temperature rise curves with different mass concentrations of Cur/IR780-NPs under irradiation of 808 nm laser emitter (2.0 W·cm⁻²)

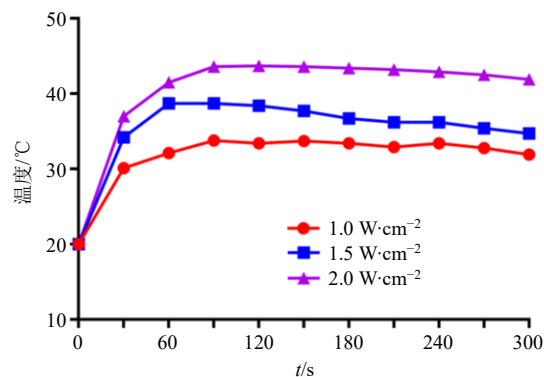


图 9 不同功率下的 808 nm 激光发射器照射下 Cur/IR780-NPs (20 μg·mL⁻¹) 的升温曲线

Fig. 9 Temperature rise curves with different powers of 808 nm laser emitter at Cur/IR780-NPs (20 μg·mL⁻¹)

2.8 细胞摄取实验

取处于对数生长期的 HepG2 细胞, 以每孔 1.5×10^5 个接种于激光共聚焦小皿中, 过夜使其贴壁后, 移弃培养液, 分别加入姜黄素、Cur-NPs 及 Cur/IR780-NPs (均以姜黄素质量浓度计 20 μg/mL) 干预细胞, 空白对照组为未经任何处理的细胞。2.5 h

后在含 IR780 的每孔引入 808 nm 激光发射器 (2.0 W/cm²) 照射 5 min, 继续培养 0.5 h, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 通过激光扫描共聚焦显微镜观察 HepG2 细胞中姜黄素的绿光强度 (用 488 nm 激光激发), 结果如图 10 所示。结果显示, 与姜黄素组相比, Cur-NPs 组和 Cur/IR780-NPs+808 nm 组的绿色荧光显著增强, 表明 PLGA 纳米粒可以增强药物进入细胞

的能力; 与 Cur-NPs 组相比, Cur/IR780-NPs+808 nm 组具有更强的荧光强度, 提示经 808 nm 激光照射引发的光热效应可以诱导细胞膜通透性增加, 促进姜黄素的摄取和细胞内释放。上述结果表明, PLGA 纳米粒和光热效应可以显著提高药物的细胞摄取量, 为发挥化疗和光热治疗的联合抗肿瘤作用奠定了基础。

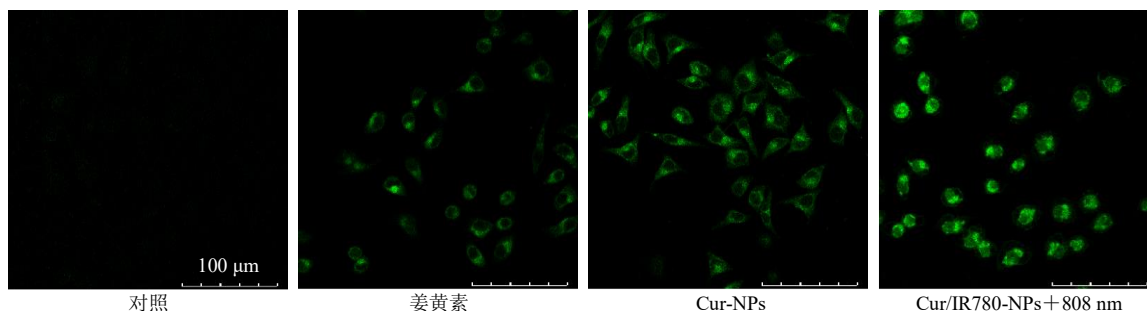


图 10 Cur/IR780-NPs 的体外细胞摄取效果 (×400)

Fig. 10 *In vitro* cellular uptake profiles of Cur/IR780-NPs by HepG2 cells (×400)

2.9 MTT 法评价载药纳米粒对 HepG2 细胞增殖的影响

2.9.1 空白载体细胞毒性 采用 MTT 法考察在近红外光 (near-infrared, NIR) 照射下 HepG2 细胞与不同质量浓度的 B-NPs 培养 24 h 后的相容性。取处于对数生长期的 HepG2 细胞, 以每孔 8×10^3 个接种于 96 孔板中, 过夜使其贴壁后, 移弃培养液, 分别加入不同质量浓度 (125、250、500、1000 μg/mL) 的 B-NPs 干预 12 h 后, 移弃旧培养基并加新鲜培养基, 用 808 nm 激光发射器 (2.0 W/cm²) 照射 5 min 后, 继续培养 12 h。到达干预时间后各孔均加入 5 mg/mL MTT 20 μL, 继续孵育 4 h, 小心移除旧培养基, 加入 100 μL DMSO, 置摇床上低速振荡 10 min, 酶标仪测定 490 nm 处 A 值。根据下列公式计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{调零}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{调零}})$$

质量浓度为 125、250、500、1000 μg/mL 的 B-NPs 干预 24 h 后, HepG2 细胞的存活率分别为 (97.4 ± 3.1)%、(96.0 ± 2.3)%、(94.1 ± 1.3)%、(91.1 ± 2.5)% ($n=3$), 结果表明, 在 808 nm 激光发射器照射下, B-NPs 在质量浓度高达 1000 μg/mL 时, HepG2 细胞的存活率依旧保持在 90% 以上, 表明 B-NPs 具有良好的细胞生物相容性。

2.9.2 Cur/IR780-NPs 对 HepG2 细胞的毒性考察 通过前期预实验发现, 5、10、20 μg/mL 姜黄素与 HepG2 细胞孵育 24 h 后 (给药 12 h 后用新鲜培养

基替换含药培养基, 继续孵育 12 h) 的细胞活力分别为 (95.6 ± 2.5)%、(77.0 ± 3.8)%、(46.8 ± 4.3)% ($n=3$), 其中当姜黄素质量浓度为 20 μg/mL 时细胞活力接近半数抑制浓度 (half inhibition concentration, IC₅₀) 值, 因此, 以含姜黄素质量浓度为 20 μg/mL 的 Cur/IR780-NPs 进行后续细胞实验。取处于对数生长期的 HepG2 细胞, 以每孔 8×10^3 个接种于 96 孔板中, 过夜使其贴壁后, 移弃培养液, 分别加入姜黄素、Cur-NPs、Cur/IR780-NPs 及 IR780-NPs (均以姜黄素质量浓度计 20 μg/mL) 干预细胞, 空白对照组为未经任何处理的细胞。12 h 后, 采用新鲜培养基替换含药培养基, 随后在含 IR780 的每孔引入 808 nm 激光发射器 (2.0 W/cm²) 照射 5 min, 继续培养 12 h。

到达干预时间后各孔均加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μL, 继续孵育 4 h, 小心移除旧培养基, 加入 100 μL 的 DMSO, 置摇床上低速振荡 10 min, 酶标仪测定 490 nm 处 A 值。结果见表 2。结果显示, Cur-NPs 组和 Cur-NPs+808 nm 组的细胞存活率无显著性差异 ($P>0.05$), 而 Cur/IR780-NPs+808 nm 组与 Cur-NPs 组和 IR780-NPs+808 nm 相比, 细胞存活率均显著降低 ($P<0.001$), 表明化疗联合光热治疗可明显提高抗肿瘤效果。

2.10 载药纳米粒对 HepG2 细胞凋亡影响

2.10.1 DAPI 染色细胞核定性实验 取处于对数生长期的 HepG2 细胞, 以每孔 8×10^4 个接种于 24 孔

表 2 不同处理组对 HepG2 细胞的体外细胞毒性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 *In vitro* cytotoxicity on HepG2 cells of different treatment groups ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	细胞存活率/%
对照	100.0
姜黄素	48.8 $\pm$ 3.4 ^{###}
Cur-NPs	46.6 $\pm$ 1.6 ^{###}
Cur-NPs+808 nm	43.1 $\pm$ 2.4 ^{###}
IR780-NPs+808 nm	68.2 $\pm$ 3.7 ^{###}
Cur/IR780-NPs+808 nm	13.5 $\pm$ 1.8 ^{####}

与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与任意单一治疗组比较: ^{***} $P < 0.001$, 表 3 同

^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{***} $P < 0.001$ vs any monotherapy group, same as table 3

板中, 过夜使其贴壁后, 移弃培养液, 分别加入姜黄素、Cur-NPs、Cur/IR780-NPs 及 IR780-NPs (均以姜黄素质量浓度计 20 $\mu\text{g/mL}$) 干预细胞, 空白对照组为未经任何处理的细胞。12 h 后, 采用新鲜的培养基替换含药培养基。随后在含 IR780 的每孔引入 808 nm 激光发射器 (2.0 W/cm²) 照射 5 min, 继续培养 12 h。达到干预时间后用 PBS 洗涤细胞后用 4% 多聚甲醛固定 15 min, 后以 DAPI 染细胞核, 洗涤 2 次后在荧光倒置显微镜下观察并拍照, 结果见图 11。结果显示, 空白组细胞形态正常, 生长良好; 各给药组细胞形态发生明显改变, 包括染色质凝结、细胞核碎裂等, 其中 Cur/IR780-NPs+808 nm 组产生的凋亡细胞的数量明显增多。

2.10.2 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率

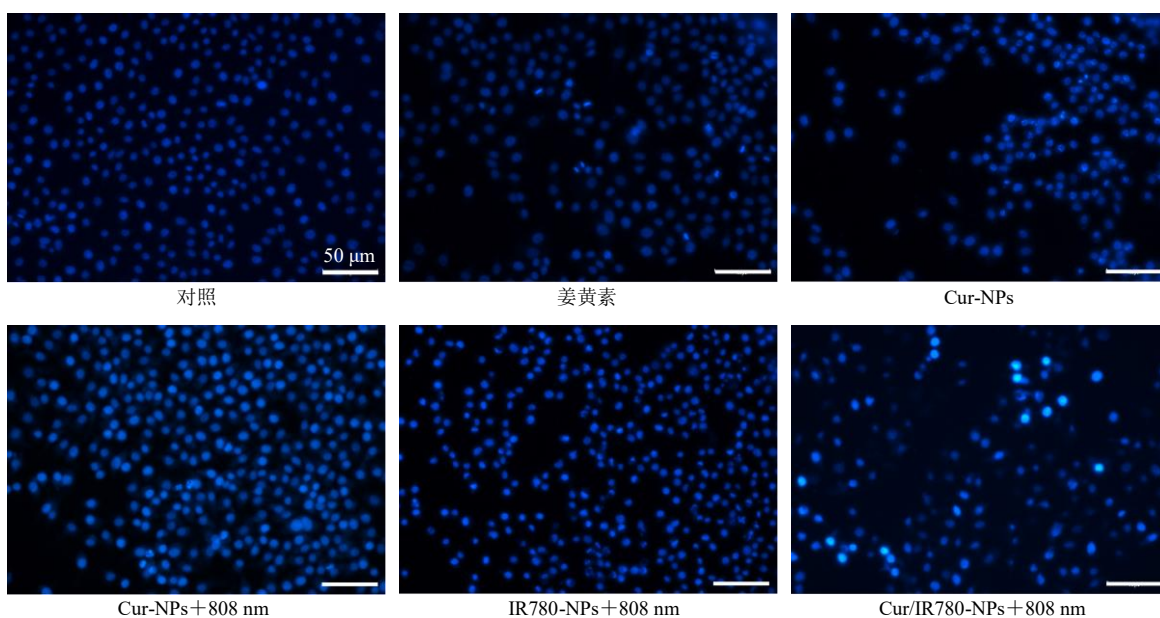


图 11 不同处理组对 HepG2 细胞的 DAPI 染色实验 ($\times 200$, 比例尺 = 50 μm)

Fig. 11 DAPI staining experiment on HepG2 cells of different treatment groups ($\times 200$, scale bar = 50 μm)

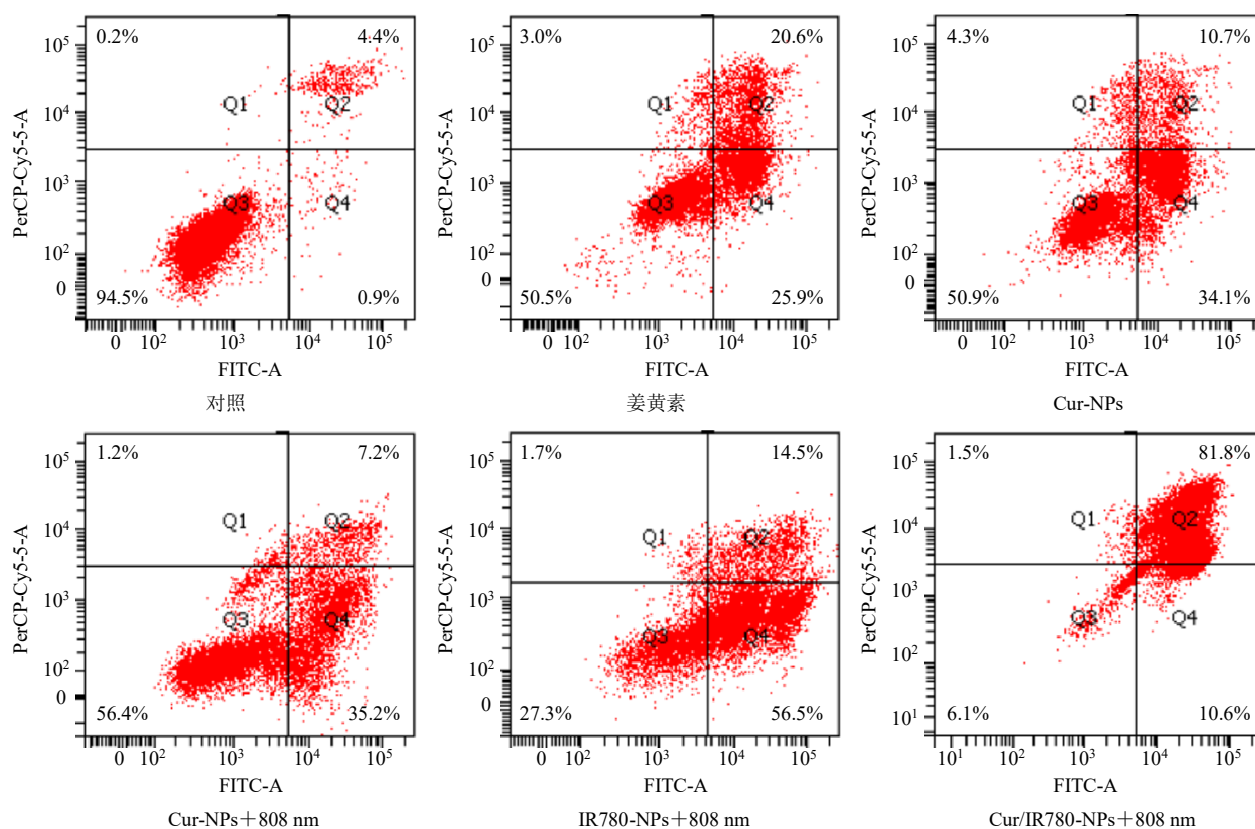
细胞分组和操作同“2.9.1”项, 达到干预时间后收集各组细胞分别加入 5 μL Annexin V-FITC 及 10 μL 碘化丙啶染液, 室温避光孵育 15 min, 用流式细胞仪检测细胞凋亡, 结果见图 12 和表 3。结果显示, Cur/IR780-NPs+808 nm 组细胞凋亡率高达 93.2%, 明显高于 Cur-NPs (41.6%) 和 IR780-NPs+808 nm (72.7%) 组, 表明化疗与光热联合疗法能更有效地诱导 HepG2 细胞凋亡。

3 讨论

PLGA 制备纳米粒常用的方法有沉淀法、乳化溶剂挥发法、复乳法等。沉淀法制得的纳米粒较重, 其影响因素不易控制^[21], 复乳法更适合用于

装载水溶性的中药抗肿瘤成分, 如山药多糖^[22]、当归多糖^[23]等。乳化溶剂挥发法是目前制备纳米粒最常用的方法, 具有操作简单、重复性好的优点, 被广泛用于疏水性成分纳米粒的制备。有研究表明, 油相的种类、投药比、油水比、乳化剂的种类及浓度、探头超声的功率及时间等均对制备的纳米粒有影响^[24-25]。

本实验通过前期预实验并结合文献, 确定 Cur/IR780-NPs 的最优制备工艺为 PLGA 质量为 50 mg, 姜黄素质量为 2 mg, IR780 质量为 2 mg, PVA 质量分数为 2%, 油水比例为 1:5, 超声条件为 180 W, 3 min。在最优制备工艺条件下制备纳米粒, 发

图 12 不同处理组对 HepG2 细胞的 Annexin V-FITC/PI 双染实验 ($n = 3$)Fig. 12 Annexin V-FITC/PI double staining experiment on HepG2 cells of different treatment groups ($n = 3$)表 3 不同处理组对 HepG2 细胞的细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 3 Apoptosis rate on HepG2 cells of different treatment groups ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分组	细胞凋亡率/%
对照	3.5 ± 1.5
姜黄素	$46.8 \pm 0.4^{###}$
Cur-NPs	$41.6 \pm 2.9^{###}$
Cur-NPs+808 nm	$38.3 \pm 3.6^{###}$
IR780-NPs+808 nm	$72.7 \pm 1.6^{###}$
Cur/IR780-NPs+808 nm	$93.2 \pm 0.8^{####*}$

现 Cur/IR780-NPs 平均粒径较 IR780-NPs 和 Cur-NPs 小, 可能是 PLGA 质量与药物总质量的比例不同导致的。研究表明, 载体用量较大时, 样品极易聚集使粒径增加, 因此合适的投药比是纳米粒制备的关键因素之一^[26]。此外, Cur/IR780-NPs 的 ζ 电位较小, 理论上易发生聚集, 但稳定性实验却发现其粒径在 7 d 内变化不明显。分析其原因: 一方面, 2% PVA 能够充分包围在纳米粒表面, 使其均匀分散在悬浮液中; 另一方面, 纳米粒置于摇床中 (37 °C、100 r/min), 减缓了纳米粒的聚集。

由于姜黄素难溶于水, 在体外释放实验中选用 PBS 或生理盐水作为释放介质时, 几乎检测不到药物。另外, 选择含有 30%乙醇^[27]的 PBS (pH 7.4) 作为释放介质时, 发现姜黄素在 12 h 后吸光度明显下降, 随着时间的延长, 能明显看到黄色释放介质逐渐变浅, 最后接近无色。由此推测姜黄素可能在含有乙醇的 PBS 中稳定性较差。基于上述预实验摸索和查阅相关文献报道^[19], 最终以含有 5%聚山梨酯 80 的 PBS (pH 7.4) 作为释放介质, 结果证实此条件既能满足漏槽条件, 又能有效提高姜黄素的稳定性。体外释放研究发现, Cur/IR780-NPs 包载药物后具有良好的缓释性能, 并在激光照射下呈现近红外响应释放性能。细胞实验结果显示, 与其他给药组相比, Cur/IR780-NPs 的细胞增殖抑制率和细胞凋亡率显著提高, 呈现高效抗肿瘤效率。分析原因为纳米粒增强的实体肿瘤渗透性和滞留效应 (enhanced permeability and retention effect, EPR) 与激光照射可以促进药物在肿瘤细胞的摄取量, 有利于 Cur/IR780-NPs 发挥化疗-光热联合抗肿瘤作用。

化疗-光疗联合治疗通过整合 2 种治疗方法, 克服了单一化疗和光疗的局限性, 展现出良好的应用

前景。姜黄素和 IR780 的联合治疗在抗恶性肿瘤方面受到了越来越多的关注。洪峰等^[28]将两者共同装载到经过 VEGF 靶向修饰的介孔二氧化硅纳米颗粒中,发现其联合杀伤 HeLa 肿瘤细胞效果高达 99%;崔馨月^[29]通过纳米金刚石与蛋白之间的相互作用将姜黄素和 IR780 包裹制备纳米粒,证实两者能够共同抑制乳腺癌细胞的增殖和迁移。本研究以 PLGA 为载体,采用乳化溶剂挥发法制备共载姜黄素和 IR780 纳米粒并进行体外抗肿瘤评价,结果表明空白纳米粒具有良好的生物安全性, Cur/IR780-NPs 经 808 nm 激光发射器 (2.0 W/cm²) 照射 5 min 后,能显著抑制 HepG2 细胞的生长,这与前面学者的研究结论一致。该结果表明 Cur/IR780-NPs 用于 HepG2 细胞化疗-光热治疗的可行性和应用潜力,为进一步肝癌细胞的靶向联合治疗奠定了基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] Guan Q, Zhou L L, Li Y N, *et al.* Nanoscale covalent organic framework for combinatorial antitumor photodynamic and photothermal therapy [J]. *ACS Nano*, 2019, 13(11): 13304-13316.
- [3] Huang X Q, Wu J R, He M Y, *et al.* Combined cancer chemo-photodynamic and photothermal therapy based on ICG/PDA/TPZ-loaded nanoparticles [J]. *Mol Pharm*, 2019, 16(5): 2172-2183.
- [4] Wang Y F, Meng H M, Li Z H. Near-infrared inorganic nanomaterial-based nanosystems for photothermal therapy [J]. *Nanoscale*, 2021, 13(19): 8751-8772.
- [5] 陈瑞, 王晶晶, 乔宏志. 有机光热转换材料及其在光热疗法中的应用 [J]. *化学进展*, 2017, 29(2/3): 329-336.
- [6] 李璟, 伍旭, 彭倩, 等. 基于装载白藜芦醇的脂质体包裹介孔碳纳米管用于靶向及近红外激光触发的化疗/光热协同肿瘤治疗 [J]. *激光生物学报*, 2020, 29(6): 550-560.
- [7] Pan Q Q, Tian J J, Zhu H H, *et al.* Tumor-targeting polycaprolactone nanoparticles with codelivery of paclitaxel and IR780 for combinational therapy of drug-resistant ovarian cancer [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2020, 6(4): 2175-2185.
- [8] 崔明花, 付二花, 林贞花, 等. 姜黄素抗肿瘤药理作用的研究进展 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2021, 37(02): 186-188.
- [9] Wang H J, Zhang K, Liu J, *et al.* Curcumin regulates cancer progression: Focus on ncRNAs and molecular signaling pathways [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 660712.
- [10] 徐露, 张闰哲, 姚庆华. 姜黄素联合氟尿嘧啶对结肠癌细胞增殖凋亡迁移作用 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(2): 1030-1033.
- [11] 张惜琴, 范媛媛, 梁靓靓, 等. 姜黄素纳米制剂抗消化系统肿瘤的药理作用研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2022, 45(7): 1440-1445.
- [12] 彭一凡, 王荣荣, 庄笑梅, 等. 姜黄素纳米混悬液的制备及体内药理学 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2022, 36(1): 54-61.
- [13] Alves C G, Lima-Sousa R, de Melo-Diogo D, *et al.* IR780 based nanomaterials for cancer imaging and photothermal, photodynamic and combinatorial therapies [J]. *Int J Pharm*, 2018, 542(1/2): 164-175.
- [14] Wang L, Niu C C. IR780-based nanomaterials for cancer imaging and therapy [J]. *J Mater Chem B*, 2021, 9(20): 4079-4097.
- [15] Kapoor D N, Bhatia A, Kaur R, *et al.* PLGA: A unique polymer for drug delivery [J]. *Ther Deliv*, 2015, 6(1): 41-58.
- [16] Sadat Tabatabaei Mirakabad F, Nejati-Koshki K, Akbarzadeh A, *et al.* PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(2): 517-535.
- [17] Mir M, Ahmed N, Rehman A U. Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, 159: 217-231.
- [18] 岳武恒, 梅瑞, 蔡娟, 等. 胡桃醌-PLGA 纳米粒制备及对 A375 恶黑细胞的体外抗肿瘤作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(4): 87-93.
- [19] Sai N, Dong X, Huang P Q, *et al.* A novel gel-forming solution based on PEG-DSPE/solutol HS 15 mixed micelles and gellan gum for ophthalmic delivery of curcumin [J]. *Molecules*, 2019, 25(1): 81.
- [20] Zhou Z G, Wang J, Liu W, *et al.* PEGylated nickel carbide nanocrystals as efficient near-infrared laser induced photothermal therapy for treatment of cancer cells *in vivo* [J]. *Nanoscale*, 2014, 6(21): 12591-12600.
- [21] 寇龙发, 高利芳, 姚倩, 等. 乳化溶剂挥发法制备紫杉醇 PLGA 纳米粒及其体外评价 [J]. *中国药理学杂志: 网络版*, 2014, 12(2): 33-42.
- [22] Luo L, Zheng S S, Huang Y F, *et al.* Preparation and characterization of Chinese yam polysaccharide PLGA nanoparticles and their immunological activity [J]. *Int J Pharm*, 2016, 511(1): 140-150.

- [23] Gu P F, Xu S W, Zhou S Z, *et al.* Optimization of *Angelica sinensis* polysaccharide-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles by RSM and its immunological activity *in vitro* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 107(Pt A): 222-229.
- [24] 尹元元, 耿燕娜, 范明松. Box-Behnken 设计-效应面法优化延胡索乙素聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒处方和体外释药行为研究 [J]. 中草药, 2021, 52(22): 6806-6815.
- [25] 魏永鸽, 黄贺梅, 齐园圃, 等. Box-Behnken 设计-效应面法优化吴茱萸碱-羟基乙酸共聚物纳米粒处方及体外释药研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(23): 2416-2422.
- [26] 管庆霞, 夏昭睿, 王艳宏, 等. 包载马钱子碱聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒处方工艺优化及其特性研究 [J]. 中草药, 2021, 52(4): 951-961.
- [27] 吴斯宇, 曾盈蓉, 唐聘, 等. RGD 环肽修饰的姜黄素/黄芩苷靶向共递送纳米脂质体的制备工艺优化及表征 [J]. 中草药, 2021, 52(22): 6834-6844.
- [28] 洪峰, 周荣苹, 陈梦思. 疏水性姜黄素和 IR780 经纳米靶向载药系统改性后的肿瘤细胞联合杀伤性能研究 [J]. 中国中医药科技, 2020, 27(3): 384-389.
- [29] 崔馨月. IR780 与姜黄素在三阴性乳腺癌联合治疗中的效果研究 [D]. 北京: 北京工业大学, 2019.

[责任编辑 郑礼胜]