

• 药剂与工艺 •

共载姜黄素及顺铂 pH 敏感脂质体制备及其体外抗乳腺癌活性评价

赵笑雨¹, 陈怡莹^{1,4}, 张海亮^{1,4}, 唐钧泽¹, 喻 锐¹, 潘 蕊^{1,3,4}, 程 欣^{1,2,4*}

1. 云南中医药大学中药学院, 云南 昆明 650500

2. 云南省高校外用给药系统与制剂技术研究重点实验室, 云南 昆明 650500

3. 云南省南药可持续利用研究重点实验室, 云南 昆明 650500

4. 云南省傣医药与彝医药重点实验室, 云南 昆明 650500

摘要: 目的 制备共载姜黄素及顺铂 pH 敏感脂质体 (cisplatin and curcumin co-loaded pH sensitive liposomes, CCL), 初步考察其体外抗乳腺癌活性。方法 半效法筛选两药联用的最佳比例; 薄膜分散法制备 CCL; 单因素考察最佳处方工艺, 并用 Box-Behnken 设计-响应面法优化最优处方; 激光粒度仪、透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 考察 CCL 的粒径、 ζ 电位及形态; HPLC 法测定药物含量; 透析袋法考察体外释放规律; CCK-8 考察 4T1 细胞增殖抑制作用; 细胞划痕、细胞克隆、DAPI 核染细胞实验分别考察 4T1 细胞迁移能力、增殖能力以及细胞凋亡; 溶血实验考察其生物相容性。结果 两药联用的最佳比例为顺铂-姜黄素 1:6; CCL 的最优处方参数为药脂比 1:29.83, 胆脂比 1:11.23, 脱氧胆酸钠的用量 14.08 mg; CCL 在 pH 7.0 和 pH 5.0 条件下的粒径分别为 (156.54 ± 2.56) 、 (318.92 ± 12.82) nm, ζ 电位分别为 (-34.48 ± 2.67) 、 (-11.07 ± 1.05) mV; TEM 下, CCL 在 pH 7.0 条件下形态较规整, 呈类球形, 无明显裂痕, 在 pH 5.0 条件下粒径增大, 形态不规则, 出现裂痕; HPLC 法测定 CCL 中姜黄素和顺铂的包封率和载药量分别为 $(96.45 \pm 0.53)\%$ 、 $(79.85 \pm 0.20)\%$ 和 $(1.43 \pm 0.13)\%$ 、 $(0.30 \pm 0.05)\%$; 体外释放结果显示, CCL 具有一定的缓释作用, 符合一级释放模型; CCK-8 实验结果显示, CCL 对乳腺癌 4T1 细胞具有增殖抑制作用, 并与药物质量浓度呈正相关; 细胞划痕实验结果表明, 同一时间下与对照组和其他给药组比较, CCL 抑制细胞迁移能力显著增强 ($P < 0.001$); DAPI 核染实验结果表明, CCL 组细胞核固缩、细胞数目少于其他给药组; 细胞克隆形成实验结果表明, CCL 组抑制细胞克隆的能力比其他组显著增强 ($P < 0.001$); 溶血实验结果表明, CCL 生物相容性良好。结论 成功制备 CCL, 且姜黄素和顺铂两药联用比其单用的体外抗乳腺癌效果好, 为药物联用治疗乳腺癌的研究提供新思路。

关键词: 姜黄素; 顺铂; pH 敏感脂质体; 薄膜分散法; 乳腺癌; Box-Behnken 设计-响应面法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)01-0052-16

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.01.007

Preparation of pH sensitive liposomes co-loaded with curcumin and cisplatin and evaluation of their anti-breast cancer activity *in vitro*ZHAO Xiaoyu¹, CHEN Yiyi^{1,4}, ZHANG Hailiang^{1,4}, TANG Junze¹, YU Kun¹, PAN Rui^{1,3,4}, CHENG Xin^{1,2,4}

1. College of Traditional Chinese Medicine, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China

2. The Key Laboratory of External Drug Delivery System and Preparation Technology in Universities of Yunnan Province, Kunming 650500, China

3. Yunnan Key Laboratory of Southern Medicinal Utilization, Kunming 650500, China

4. Yunnan Key Laboratory of Dai and Yi Medicine, Kunming 650500, China

收稿日期: 2024-08-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82060723); 云南省科技厅-云南中医药大学应用基础研究联合专项重点项目 (202001AZ070001-008); 云南省科技厅生物医药重大科技专项 (202002AA100007); 云南省科技人才平台计划 (202105AG070012); 云南省傣医药与彝医药重点实验室开放课题 (202210SS2205); 云南省傣医药与彝医药重点实验室开放课题 (202210SS2206); 云南省傣医药与彝医药重点实验室开放课题 (202210ZD2207); 云南省教育厅科学研究基金项目 (2024Y345); 国家中医药管理局“十二五”重点学科——傣药学

作者简介: 赵笑雨, 硕士研究生, 研究方向为中药药剂学。E-mail: 1937196540@qq.com***通信作者:** 程 欣, 副教授, 硕士生导师, 从事纳米医药、药物新剂型等研究。Tel: 15987162031 E-mail: chengxin920@126.com

Abstract: Objective To prepare cisplatin and curcumin co-loaded pH sensitive liposome (CCL) and investigate its anti-breast cancer activity *in vitro*. **Methods** Semi-model screening of the optimal ratio of two drugs combined; CCL was prepared by a thin film dispersion method. Box-Behnken design optimization optimal prescription; The particle size, ζ potential and morphology were investigated by laser particle size analyzer and transmission electron microscope. HPLC was used to determine the drug content. The release of 4T1 cells *in vitro* was investigated by dialysis bag method, and the proliferation inhibition of 4T1 cells was investigated by CCK-8. The migration, proliferation and apoptosis of 4T1 cells were investigated by cell scratch, cell clone and DAPI staining assay. The biocompatibility was investigated by hemolysis test. **Results** The optimal ratio of the two drugs was cisplatin-curcumin 1:6; The optimal prescription parameters of CCL were: drug to lipid ratio 1:29.83, bile to lipid ratio 1:11.23, the dosage of sodium deoxycholate 14.08 mg; The particle size of CCL at pH 7.0 and pH 5.0 were (156.54 ± 2.56) nm and (318.92 ± 12.82) nm, and the ζ potential was (-34.48 ± 2.67) mV and (-11.07 ± 1.05) mV, respectively. Under transmission electron microscope (TEM), CCL was more regular and spheroidal at pH 7.0, without obvious cracks. Under pH 5.0, CCL had larger particle size, irregular shape and cracks. The encapsulation rate and drug loading of Cur and cisplatin were $(96.45 \pm 0.53)\%$, $(79.85 \pm 0.20)\%$, $(1.43 \pm 0.13)\%$, $(0.30 \pm 0.05)\%$, respectively, determined by HPLC. *In vitro* release results showed that CCL had a sustained release effect, which was consistent with the first-order release model. The results of CCK-8 experiment showed that CCL inhibited the proliferation of breast cancer 4T1 cells and was positively correlated with drug concentration. The results of cell scratch test showed that CCL inhibited cell migration significantly ($P < 0.001$) compared with the control group and other groups at the same time. The results of DAPI staining showed that in CCL group the number of cell was less than that in other groups and nucleus pyknosis. The results showed that the inhibition of cell cloning in CCL group was significantly higher than that in other groups ($P < 0.001$). The results of hemolysis test showed that CCL had good biocompatibility. **Conclusion** The pH sensitive liposomes of CCL were successfully prepared, and the anti-breast cancer effect of the two drugs combined was better than that of the single drug, which provided a new idea for the study of drug combined treatment of breast cancer.

Key words: curcumin; cisplatin; pH sensitive liposomes; thin film dispersion method; breast cancer; Box-Behnken design-response surface method

癌症长期以来一直是研究热点,近年来癌症发病率呈年轻化趋势,社会经济负担沉重,2022 年统计数据显示,全球新增癌症病例近 2 000 万例,近 1 000 万例死亡,其中乳腺癌病例数仅次于肺癌,成为威胁人类生命健康的第 2 大疾病,严重影响患者身心健康^[1]。其治疗手段从手术、化疗、放疗,再到内分泌治疗与免疫治疗,不断更新,但化疗仍是晚期乳腺癌的主要临床治疗手段。顺铂(cisplatin)作为治疗乳腺癌的一线化疗药物,通过与 DNA 上的嘌呤碱基相互作用产生 DNA 损伤,激活多种信号转导途径,最终导致细胞凋亡^[2],但因其具有严重的肝、肾等不良反应,易产生耐药性,使其临床应用受到极大限制。其产生耐药性的机制非常复杂,包括 DNA 损伤修复、细胞内顺铂有效浓度降低、细胞自噬、易感基因、免疫反应以及相关信号通路等^[3]。目前,临床上多采用顺铂联合其他药物同时给药,以减轻顺铂不良反应、克服其耐药性,从而提高其抗乳腺癌效果^[4]。

中药具有多成分、多靶点、多通路、低毒、增效、经济等优势,在克服肿瘤耐药性的治疗中发挥着重要作用^[5]。姜黄素是从姜科姜黄属植物姜黄 *Curcuma longa* L.、温郁金 *C. wenyujin* Y. H. Chen et

C. Ling 等根茎中提取得到的一种多酚类化合物^[6],具有抗炎、抗氧化、抗癌、调血脂^[7]等多种药理作用。姜黄素分子结构中含有 α,β -不饱和二酮基,且在 2 个苯环上分别含有酚羟基和甲氧基,酮-烯醇部分可与金属螯合,能够清除活性自由基,使姜黄素可以成为氢离子的供体或受体,从而产生抗炎、抗氧化作用^[8]。姜黄素还可以调节多种信号途径发挥抑制肿瘤细胞增殖、生长、侵袭、转移,阻止肿瘤新生血管生成以及诱导肿瘤细胞凋亡^[9],抗癌谱较广,对多种癌症均有作用,包括乳腺癌、肝癌、结肠癌、前列腺癌、肺癌等^[10]。

近年来对姜黄素抗癌作用研究较多^[11-12],且其在对抗乳腺癌在内的各种肿瘤耐药性方面效果显著,例如,过度表达乳腺癌细胞系的皮瓣内切酶 1,可促进该细胞系对化疗药物顺铂的耐药性,姜黄素可以通过下调皮瓣内切酶 1 的表达,从而提高乳腺癌细胞对顺铂的敏感性^[13]。作为药食同源植物来源的化学药,姜黄素不良反应小^[14],与临床抗肿瘤药物联合应用具有一定的协同作用,能有效地抑制癌细胞生长,降低化疗药物的不良反应,减少化疗药物剂量,达到增效减毒的效果^[15]。但姜黄素存在的水溶性差、生物利用度低和代谢快^[16]等缺点,使其

治疗癌症的效果大大降低。

联合给药能够在一定程度上增强化疗药物的治疗效果,降低不良反应,但不同药物在体内的药动学过程存在差异,使得联合给药后很难以最佳药物比例同步释放到肿瘤部位^[17]。卡铂和紫杉醇联合给药作为临床术后的辅助治疗,治疗初期疗效较好,但治疗后的复发率却高达 70%,因此,增强化疗药物的药效,降低其不良反应成为临床急需解决的问题^[18-20]。

脂质体作为一种优良的药物载体,能够保护药物免受外界因素的影响,提高药物的生物利用度,增强药物的治疗作用、磷脂双分子层结构生物相容性好,能够包裹水溶性或脂溶性药物,增加药物溶解度、具有治疗靶向性,减少药物对正常细胞的损伤,降低药物的不良反应等特点,常作为化疗药物的载体用于癌症的治疗^[21],赵璐丹^[22]将新鱼腥草素钠与顺铂以最佳协同比例共载于脂质体中,可以同步两药的体内过程,使其按最佳比例释放药物,达到较好治疗肺癌的效果。但共载脂质体仍然存在一些问题,如药物包裹在脂质体内,可能导致药物释放缓慢、主动靶向性和稳定性较差,因脂质体在血液中快速清除而导致药物疗效降低,对一些疾病的靶向性不强等^[23-24]。

为解决上述问题,本实验根据肿瘤部位癌细胞代谢活性高、血流灌注不足等,引起酸性代谢产物在肿瘤微环境中积聚,使得肿瘤微环境偏酸性的特点^[25-26],制备了共载姜黄素和顺铂的 pH 敏感脂质体 (cisplatin and curcumin co-loaded pH sensitive liposome, CCL),研究两药联用按最佳协同比例同步释药的规律,并对共载脂质体进行修饰,增加了 pH 敏感材料,拟使其在肿瘤偏酸性环境下快速释放药物,增强药物的靶向性,以期改善姜黄素的水溶性差、生物利用度低和顺铂严重不良反应等问题,从而提高体外抗乳腺癌活性。本实验期望能对乳腺癌的治疗提供新的治疗方案,也为后续用于癌症治疗的新型纳米制剂研究提供新思路。

1 仪器与材料

1.1 仪器

MF52-N 型倒置荧光显微镜,广州市明美光电技术有限公司;DMil LED 型倒置显微镜,德国 Leica 公司;Multiskan FC 型酶标仪,赛默飞世尔(上海)仪器有限公司;90Plus PALS 型纳米激光粒度仪,美国布鲁克海文仪器公司;Agilent 1260 型高效液相

色谱仪 (HPLC),安捷伦科技(中国)有限公司;ST8R 型小型台式高速冷冻离心,云南泰比经贸有限公司;Scientz-IID 型超声波细胞粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;RE212-B 型旋转蒸发仪,倍捷科技有限公司;BPN-190CH 型二氧化碳培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;HT7800 型透射电子显微镜 (TEM),武汉金开瑞生物工程有限公司;pHS-25 型实验室 pH 计,上海仪电科学仪器股份有限公司;OHAUS 型分析天平,云南中检测试科技有限公司。

1.2 试剂与材料

磷脂酰乙醇胺 (phosphatidyl ethanolamine, PE, 质量分数 $\geq 80.0\%$,批号 J13IS217327)、姜黄素对照品 (批号 M13GB148382,质量分数 $\geq 98.0\%$)、胆甾醇半琥珀酸酯 (cholesteryl hemisuccinate, CHS, 质量分数 $\geq 97.0\%$,批号 JS240605),均购自上海源叶生物科技有限公司;顺铂对照品/原料药 (质量分数 99.9%,批号 S20230415),昆明贵研药业有限公司;脱氧胆酸钠 (批号 623L021)、姜黄素原料药 (质量分数 95.0%,批号 114G0215)、二甲基亚砜 (批号 3231026003),均购自北京 Solarbio 公司;胎牛血清 (批号 2222094)、青霉素-链霉素 (批号 2233204)、磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered saline, PBS, 批号 2416174),均购自上海达特希尔生物科技有限公司;CCK-8 试剂 (批号 ATWD07091),亚科因(武汉)生物技术有限公司;三氯甲烷 (批号 20211029),云南杨林工业开发区汕滇药业有限公司;0.9%氯化钠注射液 (生理盐水),批号 2308182BD,西安京西双鹤药业有限公司;胰酶 (批号 GA2402007)、DAPI 染色试剂 (批号 CR2307030)、DMEM 培养基 (批号 GP23020040046),均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;甲醇、乙腈色谱纯,默克股份两合公司;丙二醇 (批号 20220901406)、聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 400 (批号 20240201529),均购自天津市致远化学试剂有限公司;聚山梨酯 80,批号 EZ653FAE38,上海久心研生物科技有限公司。

1.3 细胞株

正常肝 L02 细胞、乳腺癌 4T1 细胞,均由云南中医药大学药剂实验室提供。

1.4 动物

SPF 级 KM 小鼠,雄性,体质量 (20 $\pm$ 2) g,购自昆明楚商科技有限公司,本课题经云南中医药大学动物实验伦理委员会批准,伦理编号为 R-

062024008, 饲养于云南中医药大学实验动物中心, 使用许可证号为 SYXK (滇) K2022-0004。

2 方法与结果

2.1 CCK-8 法考察姜黄素和顺铂对 4T1 细胞的增殖抑制作用

2.1.1 单独用药 将贴壁生长的 4T1 细胞置于 CO₂ 培养箱中培养, 待细胞生长至 90% 左右时, 稀释细胞数为 2×10^5 个/mL 并种板, 设置空白组、对照组和给药组, 每组 5 个复孔, 每孔 100 μ L, 继续培养 24 h 后, 吸弃培养基, 空白组加入 PBS 100 μ L, 对照组加入正常培养基 100 μ L, 给药组分别加入 8 个质量浓度梯度的姜黄素和顺铂含药培养基 100 μ L; 继续培养 24 h 后, 用 PBS 清洗 2 遍, 每孔加入 100 μ L/mL 的含 CCK-8 溶液的培养基 100 μ L, 继续培养 2 h 后用酶标仪在 450 nm 处测其吸光度 (A) 值, 并计算其细胞存活率。

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

结果如表 1 所示, 两药单独使用时对于 4T1 细胞增殖抑制具有质量浓度相关性, 质量浓度越高, 细胞存活率越低, 抑制作用越强, 但姜黄素表现出增殖抑制作用的最低质量浓度约为顺铂的 7.5 倍, 表明顺铂对 4T1 细胞的增殖抑制作用比姜黄素强。

2.1.2 联合用药 固定顺铂的质量浓度 (1.75、2.00、

表 2 不同质量浓度不同联用比例姜黄素和顺铂对 4T1 细胞的增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Inhibitory effects of curcumin and cisplatin on proliferation of 4T1 cells at different concentrations and proportions ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	细胞存活率/%					
	0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (对照)	1.75 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	2.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	2.25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	2.50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	3.75 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
顺铂	100.00 $\pm$ 2.11	99.68 $\pm$ 1.12	98.51 $\pm$ 3.68	89.34 $\pm$ 2.76**	72.44 $\pm$ 4.41***	59.25 $\pm$ 2.63***
顺铂-姜黄素 (1:1)	100.00 $\pm$ 2.60	97.53 $\pm$ 2.79	86.24 $\pm$ 2.70***	80.61 $\pm$ 2.85***	70.84 $\pm$ 1.38***	57.10 $\pm$ 0.97***
顺铂-姜黄素 (1:2)	100.00 $\pm$ 3.27	60.22 $\pm$ 3.55***	59.11 $\pm$ 2.14***	55.38 $\pm$ 3.96***	45.67 $\pm$ 2.43***	28.43 $\pm$ 4.32***
顺铂-姜黄素 (1:4)	100.02 $\pm$ 4.76	52.52 $\pm$ 1.72***	50.19 $\pm$ 4.52***	49.08 $\pm$ 5.00***	43.70 $\pm$ 2.25***	26.63 $\pm$ 1.94***
顺铂-姜黄素 (1:6)	100.01 $\pm$ 5.26	43.98 $\pm$ 1.23***	35.87 $\pm$ 2.05***	30.65 $\pm$ 2.76***	28.34 $\pm$ 2.11***	26.58 $\pm$ 2.30***

与对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与同一质量浓度顺铂给药组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$ 。

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$ vs that cisplatin administration group with the same mass concentration.

2.2 半效法筛选姜黄素和顺铂联合用药的最佳比例

根据“2.1.1”和“2.1.2”项下姜黄素和顺铂单用及联用结果, 运用半效法^[27]筛选两药联用的最佳比例。半效法相关计算公式如下。

$$\lg(\text{fa}/\text{fu}) = m \lg D - m \lg D_m$$

fa 为不同药物质量浓度下的细胞增殖抑制率, fu = 1 - fa, D 代表药物质量浓度, D_m 为半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀), m 为斜率

假设 $b = m$, $a = m \lg D_m$, $Y = \lg(\text{fa}/\text{fu})$, $X = \lg D$,

2.25、2.50、3.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 增加姜黄素的量, 设置顺铂-姜黄素的质量浓度比为 1:1、1:2、1:4、1:6, 操作同“2.1.1”项, 计算顺铂-姜黄素不同联用比例的细胞存活率, 结果如表 2 所示。顺铂-姜黄素不同联用比例组均比顺铂单用组的细胞增殖抑制作用强, 且细胞增殖抑制作用强弱与联用比例的大小呈正相关, 表明将 2 种药物联用能起到更好的抗肿瘤作用。

表 1 姜黄素和顺铂单独用药对 4T1 细胞的增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Inhibitory effects of curcumin and cisplatin on 4T1 cells alone ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

姜黄素/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	细胞存活率/%	顺铂/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	细胞存活率/%
0 (对照)	100.68 $\pm$ 2.73	0 (对照)	100.00 $\pm$ 2.11
15	98.41 $\pm$ 4.93	1.75	99.68 $\pm$ 1.12
20	91.88 $\pm$ 4.76*	2.00	98.51 $\pm$ 3.68
25	85.14 $\pm$ 6.17**	2.25	89.34 $\pm$ 2.76**
30	77.10 $\pm$ 3.29***	2.50	72.44 $\pm$ 4.41***
35	76.64 $\pm$ 5.01***	3.75	59.25 $\pm$ 2.63***
40	46.50 $\pm$ 3.76***	5.00	51.51 $\pm$ 2.41***
45	29.32 $\pm$ 5.36***	7.50	42.41 $\pm$ 3.51***
50	10.54 $\pm$ 5.43***	10.00	31.95 $\pm$ 1.15***

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

则 $Y = bX + a$; 以 X 为因变量, Y 为自变量, 建立回归方程。

$$\text{CI} = D_1/D_{x1} + D_2/D_{x2}$$

D_{x1} 、 D_{x2} 分别表示药物姜黄素、顺铂单用时达到一定抑制作用时的药物质量浓度, D_1 、 D_2 表示姜黄素和顺铂联用时达到一定抑制作用时的药物质量浓度

应用 Graphpad 8.0.2 软件计算两药在不同联用比例下的 IC₅₀ 值, 应用 CompuSyn 1.0 软件计算药物联用指数 (combination index, CI), 结果如表 3

表 3 不同给药组的回归方程及 IC_{50} 值Table 3 Regression equation and IC_{50} values of different administration groups

组别	回归方程	r	IC_{50} 值/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
顺铂	$Y=3.053\ 0\ X-2.368\ 3$	0.849 9	5.97
姜黄素	$Y=4.582\ 0\ X-7.196\ 7$	0.967 9	37.21
顺铂-姜黄素 (1:1)	$Y=3.862\ 6\ X-2.147\ 7$	0.870 8	3.60
顺铂-姜黄素 (1:2)	$Y=1.878\ 2\ X-0.693\ 3$	0.980 9	2.34
顺铂-姜黄素 (1:4)	$Y=1.518\ 7\ X-0.463\ 6$	0.975 0	2.02
顺铂-姜黄素 (1:6)	$Y=0.921\ 6\ X-0.033\ 1$	0.858 8	1.09

所示。顺铂的 IC_{50} 值比姜黄素低,表明顺铂对 4T1 细胞的增殖抑制能力比姜黄素强;两药联用后,不同联用比例下的 IC_{50} 值均比顺铂单用的 IC_{50} 值低,且随着顺铂-姜黄素联用比例的增大,对应的 IC_{50} 值呈下降趋势,表明姜黄素能增强顺铂对 4T1 细胞的杀伤能力。

以效应 fa 为横坐标, CI 为纵坐标,绘制出不同联用比例下姜黄素和顺铂的 CI 关于 fa 的曲线,结果见图 1。图中在 $CI=1.0$ 处有一条平行直线,线上方($CI>1.0$)表示 2 种药物联用后产生拮抗作用;线下方($CI<1.0$)表示协同作用, CI 值越小,协同作用越强;线上($CI=1.0$)表示相加作用。结果如图 1 所示,顺铂-姜黄素 (1:4) 的曲线在 $fa>0.7$ 时 $CI>1.0$,在线上方,发挥拮抗作用;顺铂-姜黄素 (1:1、1:2、1:6) 的曲线在 $fa\leq 0.8$ 时 $CI<1.0$,均在线下方,发挥协同作用。

一般选用 fa 在 0.5~0.8 的区域来评价 2 种药物联用抗肿瘤的效果^[28]。从图 1 中可以看出,顺铂-姜黄素 (1:1、1:2、1:6) 的曲线 fa 在 0.5~0.8 时 CI 值均在平行线下方,且除 $fa=0.5$ 外,顺铂-姜黄

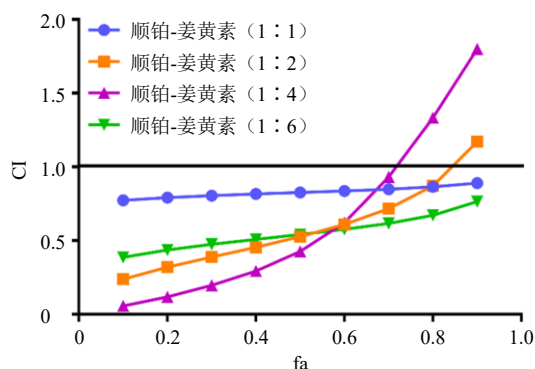


图 1 姜黄素和顺铂不同联用比例作用于 4T1 细胞时不同 fa 的 CI 曲线

Fig. 1 CI curves of different fa in 4T1 cells treated with different combination ratios of curcumin and cisplatin

素 (1:6) 的曲线 fa 在该区域内对应的 CI 值均最小,表明该联用比例能发挥最佳的抗肿瘤作用。故选择顺铂-姜黄素 (1:6) 制备 CCL。

2.3 CCL 的制备

采用薄膜分散法制备 CCL。精密称取处方量的 PE、CHS 和 3 mg 姜黄素溶于三氯甲烷中,超声完全溶解后,置于旋转蒸发仪上 45 °C、70 r/min 条件下减压蒸发至圆底烧瓶内壁出现黄色均匀薄膜;精密称取处方量脱氧胆酸钠和 0.5 mg 顺铂溶于生理盐水中作为水化液;将水化液加入上述圆底烧瓶中,水化后超声,滤过,即得 CCL 混悬液 5 mL;4 °C 冰箱避光保存。除不加顺铂外,同上述方法制备姜黄素脂质体 (curcumin liposomes, Cur-L);除不加姜黄素外,同上述方法制备顺铂脂质体 (cisplatin liposome, Cis-L);除不加姜黄素和顺铂外,同上述方法制备空白脂质体 (blank liposome, B-L)。

2.4 顺铂和姜黄素含量测定方法的建立

2.4.1 色谱条件

(1) 姜黄素:色谱柱为 Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 柱 [250 mm×4.6 mm, 5 μm , 安捷伦科技 (中国) 有限公司];流动相为乙腈-4%冰醋酸水溶液 (56:44);体积流量 1.0 mL/min;检测波长 425 nm;进样量 10 μL ;柱温 30 °C^[29]。

(2) 顺铂:色谱柱为 NuovaSil NH₂ (250 mm×4.6 mm, 5 μm , 谱立科技有限公司) 柱;流动相为乙腈-甲醇-0.9%氯化钠水溶液 (65:25:10);体积流量 0.6 mL/min;检测波长 220 nm;进样量 10 μL ;柱温 30 °C^[30]。

2.4.2 线性关系考察 精密称取姜黄素对照品 4.16 mg、顺铂对照品 3.20 mg,分别置于 5 mL 量瓶中,姜黄素加甲醇定容至刻度,得到质量浓度为 832 $\mu\text{g/mL}$ 的姜黄素对照品溶液;顺铂加生理盐水定容至刻度,得到质量浓度为 640 $\mu\text{g/mL}$ 的顺铂对照品溶液;分别稀释至不同质量浓度,滤过,按照“2.4.1”项下色谱条件进行测定,绘制峰面积 (Y) 对质量浓度 (X) 的标准曲线,进行线性回归,得到姜黄素回归方程 $Y=92.627\ X+10.818$, $R^2=0.999\ 8$,顺铂回归方程 $Y=8.871\ X+4.340\ 7$, $R^2=1.000\ 0$;结果表明姜黄素在 1.625~208.000 $\mu\text{g/mL}$,顺铂在 1.000~320.000 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.4.3 精密度试验 分别将“2.4.2”项下姜黄素对照品溶液稀释为低 (3.25 $\mu\text{g/mL}$)、中 (13.00 $\mu\text{g/mL}$)、高 (52.00 $\mu\text{g/mL}$) 3 个质量浓度,顺铂对照品溶液

稀释为低 (5 $\mu\text{g/mL}$)、中 (20 $\mu\text{g/mL}$)、高 (80 $\mu\text{g/mL}$) 3 个质量浓度; 分别滤过后进样, 1 d 内重复测定 3 次, 计算日内精密度的 RSD 分别为 0.18%、0.26%、0.08%, 日间精密度的 RSD 分别为 0.43%、0.18%、0.19%; 顺铂日内精密度的 RSD 分别为 2.38%、1.50%、0.70%, 日间精密度的 RSD 分别为 2.44%、1.70%、0.25%; 结果表明该仪器精密性良好。

2.4.4 稳定性试验 精密吸取 1 mL 的 CCL 混悬液置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容至 10 mL, 超声破乳 10 min, 0.22 μm 微孔滤膜滤过后作为供试品溶液。分别于制备后 0、2、4、6、8、10、12、24 h, 进样检测, 记录峰面积, 姜黄素峰面积的 RSD 为 0.26%, 顺铂峰面积的 RSD 为 1.23%, 结果表明供试品溶液在室温放置 24 h 内基本稳定。

2.4.5 重复性试验 取同一批制备的 CCL 混悬液, 按“2.4.4”项下方法分别制备成 6 份供试品溶液, 进样检测, 记录峰面积, 结果表明, 姜黄素质量分数的 RSD 为 0.17%, 顺铂质量分数的 RSD 为 1.30%, 结果表明此法重复性良好。

2.4.6 加样回收率试验 分别精密量取姜黄素对照品溶液 (26 $\mu\text{g/mL}$) 和顺铂对照品溶液 (40 $\mu\text{g/mL}$) 0.5、1.0、1.5 mL, 加入到 0.5 mL B-L 混悬液中, 各平行 3 组; 用甲醇破乳定容至 10 mL, 得到姜黄素质量浓度分别为 1.30、2.60、3.91 $\mu\text{g/mL}$, 顺铂质量浓度分别为 2、4、6 $\mu\text{g/mL}$ 。分别测定峰面积, 计算加样回收率。姜黄素低、中、高质量浓度的平均加样回收率分别为 97.18%、96.15%、97.79%, RSD 分别为 0.88%、0.80%、0.66%, 顺铂低、中、高质量浓度的平均加样回收率分别为 100.33%、99.75%、98.11%, RSD 分别为 1.52%、1.64%、2.32%; 表明该法测定姜黄素和顺铂含量, 回收率高, 准确可靠。

2.5 CCL 包封率及载药量测定

取 CCL 混悬液 2 份, 1 500 r/min 低速离心 15 min, 使未包封进脂质体的药物通过离心沉淀除去; 取上层液体 2 份, 1 份加浓硝酸使其充分溶解, 离心, 取上清液进样分析, 测定包封进 CCL 中的顺铂含量 ($W_{\text{顺铂}}$)^[28]; 1 份加甲醇使其充分破乳, 离心, 取上清液进样分析, 测定包封进 CCL 中的姜黄素含量 ($W_{\text{姜黄素}}$)^[31]。直接取 CCL 混悬液 2 份, 分别加入硝酸和甲醇进行溶解和破乳, 分别测定顺铂和姜黄素总含量 ($W_{\text{总顺铂}}$ 和 $W_{\text{总姜黄素}}$)。

根据“2.2”项下筛选出的顺铂和姜黄素最佳联

用比例, 计算 CCL 中姜黄素和顺铂的综合包封率和载药量, 其中姜黄素包封率占综合包封率的 85.71% (6/7), 顺铂包封率占综合包封率的 14.29% (1/7)。

综合包封率 = $W_{\text{姜黄素}}/W_{\text{总姜黄素}} \times 85.71\% + W_{\text{顺铂}}/W_{\text{总顺铂}} \times 14.29\%$

载药量 = $W_{\text{顺铂或姜黄素}}/(W_{\text{总姜黄素}} + W_{\text{总顺铂}} + W_{\text{辅料}})$

$W_{\text{辅料}}$ 为制备 CCL 时加入的辅料量

2.6 CCL 制备处方工艺优化

2.6.1 单因素考察 参照“2.3”项下方法制备, 分别考察药脂比、胆脂比、膜软化剂种类、脱氧胆酸钠用量、水化液种类、超声功率、超声时间、水化时间对 CCL 粒径、 ζ 电位、多分散指数 (polydispersity index, PDI) 和综合包封率的影响。

药脂比考察时, 固定姜黄素 3 mg、顺铂 0.5 mg, 分别在药脂比为 1:5、1:10、1:20、1:30、1:40、1:50 条件下制备 CCL, 结果如表 4 所示, 药脂比为 1:30 时综合包封率最高, 继续增加药脂比, 综合包封率降低, 故选择药脂比 1:30。

表 4 不同药脂比制备 CCL 指标参数 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

药脂比	综合包封率/%	粒径/nm	ζ 电位/mV	PDI
1:5	62.00 $\pm$ 1.11	127.51 $\pm$ 2.16	-34.45 $\pm$ 2.10	0.24 $\pm$ 0.03
1:10	69.99 $\pm$ 0.39	124.36 $\pm$ 2.99	-43.89 $\pm$ 5.45	0.17 $\pm$ 0.02
1:20	85.23 $\pm$ 1.29	136.52 $\pm$ 3.17	-45.47 $\pm$ 0.76	0.05 $\pm$ 0.03
1:30	94.64 $\pm$ 0.34	107.47 $\pm$ 2.62	-40.84 $\pm$ 2.12	0.23 $\pm$ 0.03
1:40	90.40 $\pm$ 0.71	118.72 $\pm$ 1.97	-44.04 $\pm$ 3.16	0.21 $\pm$ 0.04
1:50	87.42 $\pm$ 1.33	120.69 $\pm$ 3.12	-44.80 $\pm$ 2.17	0.21 $\pm$ 0.03

胆脂比考察时, 固定药脂比为 1:30, 分别在胆脂比为 1:3、1:5、1:7、1:10、1:15 条件下制备 CCL, 结果如表 5 所示, 胆脂比为 1:10 时, 综合包封率最高, 继续增加胆脂比, 综合包封率降低, 故选择胆脂比 1:10。

膜软化剂种类考察时, 固定药脂比为 1:30、胆脂比为 1:10, 分别用脱氧胆酸钠、丙二醇、聚山梨

表 5 不同胆脂比制备 CCL 指标参数 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

胆脂比	综合包封率/%	粒径/nm	ζ 电位/mV	PDI
1:3	82.51 $\pm$ 0.68	57.24 $\pm$ 18.31	-50.24 $\pm$ 3.17	1.62 $\pm$ 1.05
1:5	90.40 $\pm$ 0.59	100.57 $\pm$ 1.97	-40.91 $\pm$ 3.39	0.19 $\pm$ 0.03
1:7	92.50 $\pm$ 0.65	105.07 $\pm$ 1.65	-43.02 $\pm$ 1.52	0.09 $\pm$ 0.08
1:10	94.63 $\pm$ 0.60	114.35 $\pm$ 1.16	-41.56 $\pm$ 0.65	0.06 $\pm$ 0.04
1:15	92.27 $\pm$ 0.89	126.35 $\pm$ 1.90	-47.84 $\pm$ 2.57	0.07 $\pm$ 0.05

酯 80、PEG 400 为膜软化剂制备 CCL，结果如表 6 所示，膜软化剂为脱氧胆酸钠时综合包封率最高，在制备过程中发现，膜软化剂为丙二醇和 PEG 400 时，圆底烧瓶内形成的薄膜并未被完全水化下来，膜软化剂为聚山梨酯 80 时，其制剂 ζ 电位和 PDI 均比膜软化剂为脱氧胆酸钠时的 ζ 电位及 PDI 大，综合考虑，选择膜软化剂为脱氧胆酸钠。

表 6 不同膜软化剂种类制备 CCL 指标参数 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 CCL index parameters prepared by different types of membrane softeners ($\bar{x} \pm s, n=3$)

膜软化剂	综合包封率/%	粒径/nm	ζ 电位/mV	PDI
脱氧胆酸钠	92.77 $\pm$ 0.89	141.22 $\pm$ 5.28	-35.87 $\pm$ 2.81	0.18 $\pm$ 0.01
丙二醇	84.43 $\pm$ 1.17	125.47 $\pm$ 4.13	-42.62 $\pm$ 4.50	0.19 $\pm$ 0.00
聚山梨酯 80	89.46 $\pm$ 1.21	88.12 $\pm$ 3.55	-16.80 $\pm$ 2.08	0.24 $\pm$ 0.02
PEG 400	91.59 $\pm$ 1.20	132.34 $\pm$ 4.00	-31.65 $\pm$ 2.02	0.20 $\pm$ 0.01

脱氧胆酸钠用量考察时，固定药脂比为 1:30、胆脂比为 1:10，分别在脱氧胆酸钠用量为 5、10、20、30、40、50 mg 条件下制备 CCL，结果如表 7 所示，脱氧胆酸钠用量为 10 mg 时，其综合包封率最高，继续增加其用量，综合包封率有所降低，且粒径增大到一定程度后会突然减小，PDI 变大，制剂不稳定，故选择脱氧胆酸钠用量为 10 mg。

水化液种类考察时，固定药脂比为 1:30、胆脂比为 1:10，脱氧胆酸钠用量为 10 mg，分别用纯化水、PBS、生理盐水为水化液制备 CCL，结果如表 8 所示，水化液为生理盐水时，综合包封率最高，

表 7 不同脱氧胆酸钠用量制备 CCL 指标参数 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 CCL index parameters prepared by different dosage of sodium deoxycholate ($\bar{x} \pm s, n=3$)

脱氧胆酸钠 用量/mg	综合包 封率/%	粒径/nm	ζ 电位/mV	PDI
5	83.56 $\pm$ 0.85	150.92 $\pm$ 5.71	-26.21 $\pm$ 2.85	0.28 $\pm$ 0.02
10	95.98 $\pm$ 0.15	126.61 $\pm$ 4.28	-41.87 $\pm$ 4.11	0.15 $\pm$ 0.02
20	90.85 $\pm$ 0.33	137.44 $\pm$ 3.85	-40.26 $\pm$ 2.57	0.10 $\pm$ 0.01
30	90.59 $\pm$ 3.20	173.44 $\pm$ 4.81	-45.12 $\pm$ 4.21	0.06 $\pm$ 0.02
40	83.81 $\pm$ 1.03	204.59 $\pm$ 5.44	-53.32 $\pm$ 3.49	0.22 $\pm$ 0.02
50	83.25 $\pm$ 2.46	50.53 $\pm$ 2.76	-38.41 $\pm$ 0.77	0.33 $\pm$ 0.02

表 8 不同水化液种类制备 CCL 指标参数 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 CCL index parameters prepared by different hydration solutions ($\bar{x} \pm s, n=3$)

水化液	综合包封率/%	粒径/nm	ζ 电位/mV	PDI
纯化水	91.41 $\pm$ 0.87	78.54 $\pm$ 3.74	-40.22 $\pm$ 1.91	0.18 $\pm$ 0.02
PBS	93.80 $\pm$ 0.39	197.65 $\pm$ 2.54	-45.12 $\pm$ 7.33	0.13 $\pm$ 0.03
生理盐水	96.23 $\pm$ 0.58	142.05 $\pm$ 3.95	-55.25 $\pm$ 4.13	0.19 $\pm$ 0.02

故选择生理盐水作为水化液。

超声功率考察时，固定药脂比为 1:30、胆脂比为 1:10，脱氧胆酸钠用量为 10 mg，水化液为生理盐水，分别在超声功率为 150、200、250、300、350 W 条件下制备 CCL，结果如表 9 所示，超声功率为 250 W 时，综合包封率最高， ζ 电位绝对值最大，表明该条件下制剂最稳定，故选择超声功率为 250 W。

表 9 不同超声功率制备 CCL 指标参数 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 9 CCL index parameters prepared by different ultrasonic power ($\bar{x} \pm s, n=3$)

超声功率/W	综合包封率/%	粒径/nm	ζ 电位/mV	PDI
150	92.82 $\pm$ 0.79	161.40 $\pm$ 2.64	-19.85 $\pm$ 1.56	0.31 $\pm$ 0.02
200	93.83 $\pm$ 0.33	151.07 $\pm$ 1.22	-28.78 $\pm$ 1.84	0.25 $\pm$ 0.01
250	95.86 $\pm$ 0.24	142.98 $\pm$ 2.38	-42.83 $\pm$ 3.25	0.18 $\pm$ 0.01
300	90.81 $\pm$ 0.56	153.03 $\pm$ 2.54	-36.84 $\pm$ 1.47	0.18 $\pm$ 0.01
350	89.76 $\pm$ 0.91	160.84 $\pm$ 2.56	-35.68 $\pm$ 1.80	0.19 $\pm$ 0.01

超声时间考察时，固定药脂比为 1:30、胆脂比为 1:10，脱氧胆酸钠用量为 10 mg，水化液为生理盐水，超声功率为 250 W，分别在超声时间为 2、6、10、15 min 条件下制备 CCL，结果如表 10 所示，虽然超声时间在 6 min 时，综合包封率并不是最高，但与 2 min 相比，差别不大，且超声时间为 6 min 时的 PDI 值比超声时间 2 min 的 PDI 值明显减小，故选择超声时间为 6 min。

水化时间考察时，固定药脂比为 1:30、胆脂比为 1:10，脱氧胆酸钠用量为 10 mg，水化液为生理盐水，超声功率为 250 W，超声时间为 6 min，分别在水化时间为 30、45、60 min 条件下制备 CCL，结果如表 11 所示，水化时间为 30 min 时，综合包封

表 10 不同超声时间制备 CCL 指标参数 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 10 CCL index parameters prepared by different ultrasonic time ($\bar{x} \pm s, n=3$)

超声时间/min	综合包封率/%	粒径/nm	ζ 电位/mV	PDI
2	91.43 $\pm$ 0.39	152.96 $\pm$ 3.50	-29.35 $\pm$ 1.55	0.28 $\pm$ 0.01
6	90.61 $\pm$ 0.29	144.25 $\pm$ 2.89	-29.46 $\pm$ 3.73	0.19 $\pm$ 0.02
10	88.79 $\pm$ 0.46	137.69 $\pm$ 2.61	-40.77 $\pm$ 2.69	0.20 $\pm$ 0.01
15	85.67 $\pm$ 0.76	162.75 $\pm$ 2.90	-35.81 $\pm$ 3.08	0.19 $\pm$ 0.01

表 11 不同水化时间制备 CCL 指标参数 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 11 CCL index parameters prepared by different hydration time ($\bar{x} \pm s, n=3$)

水化时间/min	综合包封率/%	粒径/nm	ζ 电位/mV	PDI
30	94.48 $\pm$ 0.98	135.23 $\pm$ 4.10	-38.63 $\pm$ 2.03	0.18 $\pm$ 0.01
45	89.99 $\pm$ 0.37	136.60 $\pm$ 3.52	-25.12 $\pm$ 1.41	0.20 $\pm$ 0.01
60	89.26 $\pm$ 1.19	128.47 $\pm$ 2.23	-20.57 $\pm$ 1.09	0.21 $\pm$ 0.01

率最大, 且 ζ 电位绝对值最大, 比水化时间为 45、60 min 条件下制备的制剂更稳定, 故选择水化时间为 30 min。

2.6.2 Box-Behnken 设计结合响应面法(Box-Behnken design combined with response surface method, BBD-RSM) 优化 根据“2.6.1”项下单因素考察实验结果, 药脂比 (X_1)、胆脂比 (X_2) 及脱氧胆酸钠用量 (X_3) 对药物的综合包封率影响较大, 故选择此 3 个单因素作为主要考察对象, 以两药的综合包封率为响应值进行进一步的 BBD-RSM 交互效应考察, 实验设计与结果见表 12。

用 Design-Expert 13 软件进行回归拟合, 得到拟合方程 $Y=95.700+0.0188X_1+0.2250X_2+2.020X_3+0.2525X_1X_2-0.5500X_1X_3+0.4575X_2X_3-2.350X_1^2-2.770X_2^2-4.890X_3^2$, $R^2=0.9746$, $P<0.05$, 表明该模型显著, 无失拟因素存在, 真实可信, 实验误差较小, 能较好地反映各因素与响应值之间的关系。用 Design-Expert 13 软件绘制各因素与综合包封率的效应面图与等高线图, 结果如图 2

表 12 BBD-RSM 实验设计与结果
Table 12 Design and results of BBD-RSM

序号	X_1	X_2	X_3/mg	包封率/%		综合包封率/%
				姜黄素	顺铂	
1	30 (0)	15 (+1)	20.0 (+1)	93.10	78.71	91.07
2	30	15	5.0 (-1)	87.01	73.87	85.16
3	20 (-1)	11 (0)	5.0	88.90	74.06	86.80
4	40 (+1)	7 (-1)	12.5 (0)	92.10	80.10	90.42
5	30	11	12.5	98.18	81.14	95.77
6	40	11	20.0	90.95	77.33	89.03
7	30	11	12.5	98.98	75.72	95.69
8	40	11	5.0	89.10	74.50	87.04
9	30	11	12.5	97.66	76.89	94.72
10	20	15	12.5	91.94	79.90	90.25
11	20	11	20.0	93.51	75.64	90.99
12	20	7	12.5	90.90	84.30	89.99
13	30	11	12.5	99.22	80.70	96.60
14	30	7	20.0	92.08	77.47	90.02
15	30	11	12.5	99.20	74.75	95.73
16	30	7	5.0	88.10	72.77	85.94
17	40	15	12.5	93.50	80.63	91.69

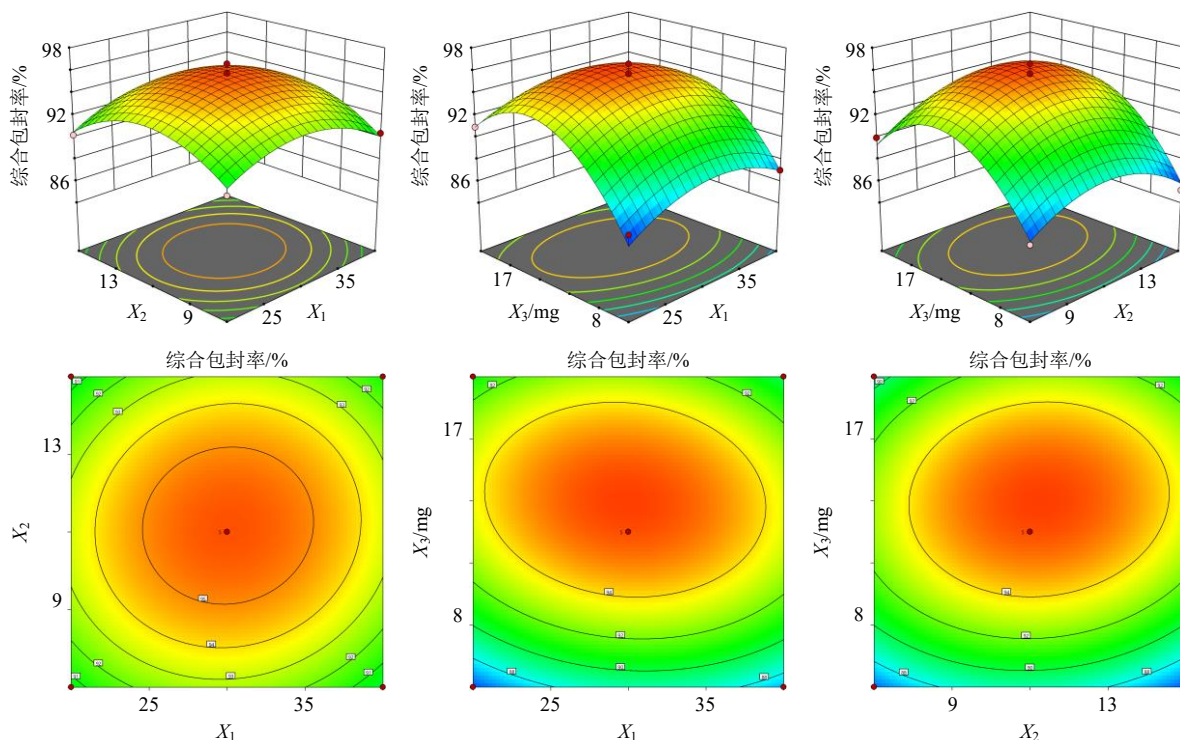


图 2 不同影响因素相互作用的响应面图与等高线图

Fig. 2 Response surface diagram and contour map of interaction of different influence factors

所示, 交互因素中 X_1 与 X_2 的效应面较平缓, 椭圆形不明显, 而 X_1 与 X_3 、 X_2 与 X_3 的等高线均呈明显椭圆形, 说明后 2 者交互作用更为突出, 对综合包封率影响更显著。Design-Expert 13 软件优化的结果

为药脂比 1 : 29.83, 胆脂比 1 : 11.23, 脱氧胆酸钠用量 14.08 mg, 预测综合包封率为 95.92%。

2.6.3 最优处方工艺确定及验证实验 以药脂比、胆脂比、脱氧胆酸钠用量为单因素, 两药的综

合包封率为响应值进行 BBD-RSM 实验, 优化出 CCL 最佳制备处方工艺为姜黄素 3 mg、顺铂 0.5 mg、PE 104.41 mg、CHS 9.30 mg、脱氧胆酸钠用量 14.08 mg、水化液为生理盐水、超声功率为 250 W、超声时间为 6 min、水化时间为 30 min, 按“2.3”项下方法制备 CCL。对最佳处方工艺进行验证实验, 结果 CCL 中姜黄素和顺铂的综合包封率为 $(94.09 \pm 0.46) \%$ ($n=3$), 载药量分别为 $(1.43 \pm 0.13) \%$ 、 $(0.30 \pm 0.05) \%$ ($n=3$)。验证结果显示, RSD 值均小于 1%, 且综合包封率与预测值 95.92% 接近, 表明响应面优化的参数条件准确可靠。

2.7 CCL 的表征

2.7.1 粒径、 ζ 电位及 PDI 测定 将按最优处方工艺制备好的 CCL, 在 pH 7.0 条件下稀释数倍后转移至比色皿中, 用激光粒度仪测定其在该条件下的粒径、 ζ 电位和 PDI; 将 CCL 在 pH 5.0 条件下稀释数倍后, 在磁力搅拌器中 37 °C 恒温搅拌 30 min 后测定其粒径、 ζ 电位和 PDI。结果如图 3 所示, CCL 在 pH 7.0 条件下的粒径为 $(156.54 \pm 2.56) \text{ nm}$, ζ 电位为 $(-34.48 \pm 2.67) \text{ mV}$, PDI 为 0.21 ± 0.03 ; 在 pH 5.0 条件下的粒径为 $(318.92 \pm 12.82) \text{ nm}$, ζ 电位为 $(-11.07 \pm 1.05) \text{ mV}$, PDI 为 0.33 ± 0.03 。

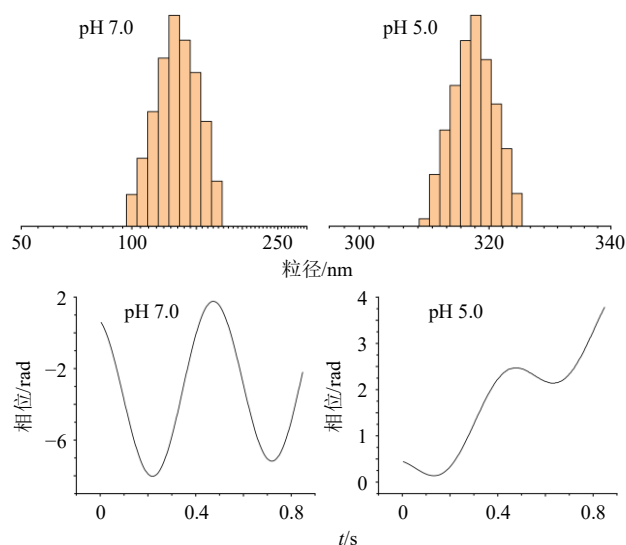


图 3 CCL 在不同 pH 值条件下的粒径分布和 ζ 电位
Fig. 3 Particle size and ζ potentiogram of CCL at different pH values

2.7.2 储存稳定性考察 将按最优处方工艺制备好的 CCL 在第 0、1、5、10、15、20、30 天时分别测定其粒径、 ζ 电位和 PDI, 考察 CCL 的储存稳定性。结果 (表 13) 显示, CCL 在 1 个月内的粒径、 ζ 电位和 PDI 均无明显变化, 表明该处方工艺制备

表 13 CCL 在 30 d 内稳定性考察结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

储存时间/d	粒径/nm	ζ 电位/mV	PDI
0	147.08 ± 1.01	-38.66 ± 0.39	0.11 ± 0.01
1	151.58 ± 6.26	-39.55 ± 4.82	0.19 ± 0.02
5	149.49 ± 5.40	-38.11 ± 1.54	0.18 ± 0.03
10	154.36 ± 2.66	-38.44 ± 0.57	0.15 ± 0.05
15	162.43 ± 4.75	-40.62 ± 4.01	0.21 ± 0.01
20	167.89 ± 0.96	-38.23 ± 0.52	0.20 ± 0.06
30	166.45 ± 5.43	-39.35 ± 2.70	0.22 ± 0.04

的 CCL 储存在 4 °C 条件下 30 d 内稳定性良好。

2.7.3 形态观察 将按最优处方工艺制备好的 CCL 稀释 1.5 倍后滴加到碳膜铜网的覆膜面上, 上膜 5 min, 吸水纸吸去多余液体, 用 2% 磷钨酸染色后, 晾干铜网, TEM 下观察。结果如图 4-A 所示, 在 pH 7.0 条件下, TEM 下 CCL 的形态较规整, 呈现类球形, 边缘光滑圆整, 无裂纹, 分散均匀。

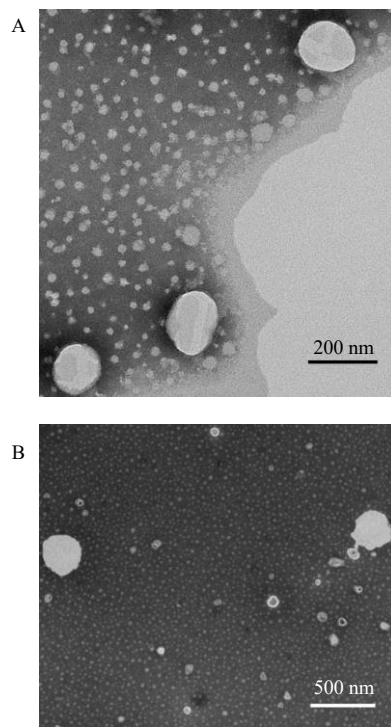


图 4 CCL 在 pH 7 (A) 和 pH 5 (B) 条件下的 TEM 图

Fig. 4 TEM diagram of CCL at pH 7 (A) and pH 5 (B)

2.7.4 pH 敏感性测试 将制备好的 CCL 在 pH 5.0 条件下稀释 1.5 倍后, 在磁力搅拌器中 37 °C 恒温搅拌 30 min 后进行 TEM 拍摄, 结果如图 4-B 所示, TEM 下 CCL 形态不规则, 边缘出现裂痕, 综合“2.7.1”项下结果, 将 pH 5.0 与 pH 7.0 条件下 CCL 粒径、 ζ 电位绝对值进行比较, 发现在 pH 5.0 时, CCL 粒径增大, 约为 pH 7.0 条件下的 2 倍; ζ 电位

绝对值减小,表明 CCL 在 pH 5.0 条件下具有敏感性,粒径容易增大甚至破裂。

2.8 体外释放实验

采用透析袋法^[32]考察 CCL 体外释放情况,精密量取制备好的游离姜黄素及顺铂混合液 (free cisplatin and curcumin, FCC, 投药总量及其比例均同 CCL, 顺铂-姜黄素 1:6)、CCL 各 2 mL,放入已活化的相对分子质量为 3 000 的透析袋中,配制含有 1%聚山梨酯 80^[33]和 25%乙醇的 PBS 20 mL 作为体外透析液,调节 pH 值为 5.0 和 7.0,将 FCC 和 CCL 放入透析液中,瓶口密闭,在 37 ℃、100 r/min 磁力搅拌器中搅拌,分别于 1、2、4、6、8、12、24、48、72 h 取样 1 mL,同时补加 1 mL 新鲜介质,滤过后用 HPLC 法测定姜黄素和顺铂的含量,计算累积释放率,结果如图 5 所示。

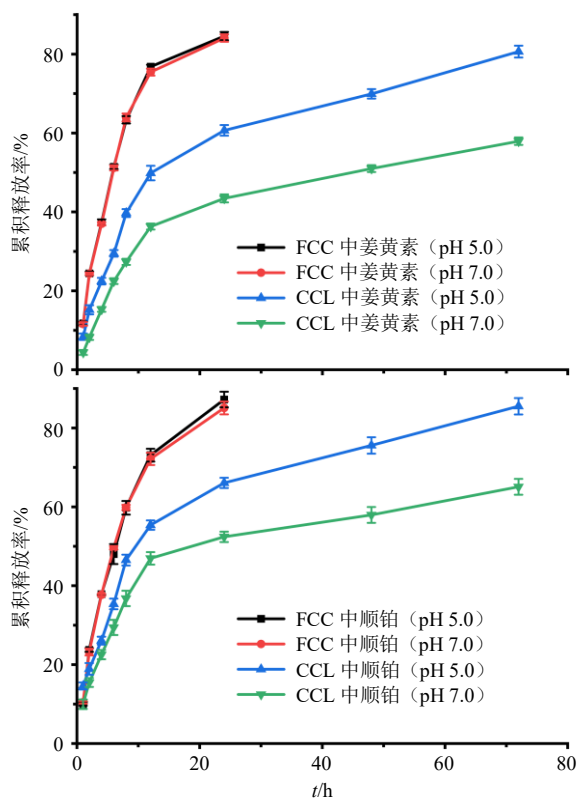


图 5 CCL 的体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Release curve of CCL *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n=3$)

FCC 中姜黄素在 pH 5.0 和 pH 7.0 条件下 24 h 内累积释放率分别为 (84.08±0.94)%、(84.08±0.94)%; 顺铂在 pH 5.0 和 pH 7.0 条件下 24 h 内累积释放率分别为 (87.21±1.99)%、(85.07±1.63)%; 在不同 pH 条件下 FCC 中同一药物累积释放率基本一致,基本不受 pH 环境影响 ($P>0.05$)。CCL 中姜黄素在 pH 5.0 和 pH 7.0 条件下 72 h 内累积释放

率分别为 (80.64±1.5)%、(57.93±0.95)%; 顺铂在 pH 5.0 和 pH 7.0 条件下 72 h 内累积释放率分别为 (85.5±2.07)%、(65.07±2.01)%, 在 pH 7.0 条件下两药均释放较少,表明 CCL 在近生理环境下具有缓释作用;与 pH 7.0 比较, CCL 在 pH 5.0 条件下两药均释放较多 ($P<0.001$),表明 CCL 具有一定的 pH 敏感性。对其进行零级释放、一级释放、Higuchi、Ritger-Peppas 模型拟合,结果如表 14 所示,不同释放曲线均符合一级动力学模型方程。

$$\text{累积释放率} = (C_n V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V_i) / W$$

C_i 和 C_n 分别表示第 i 次取样和第 n 次取样时,释放介质中姜黄素或顺铂的质量浓度; V 表示释放介质的体积,即 20 mL; V_i 表示第 i 次的取样体积,即 1 mL; W 表示 FCC 和 CCL 中姜黄素或顺铂的总质量

2.9 体外抗肿瘤活性研究

2.9.1 细胞增殖抑制能力检测

4T1 细胞种板与给药按照“2.1”项下方法操作,分别设置空白组、对照组、B-L 组、游离姜黄素 (free curcumin, F-Cur) 组、Cur-L 组、游离顺铂 (free cisplatin, F-Cis) 组、Cis-L 组、FCC 组和 CCL 组,通过 CCK-8 试剂盒测定 A 值,计算细胞存活率,并与其相应的游离药物组进行比较,结果如表 15 所示。

B-L 组不同质量浓度与其未给药组比较无显著性差异 ($P>0.05$),表明 B-L 质量浓度在 15~35 $\mu\text{g/mL}$ 对 4T1 细胞未产生增殖抑制作用。不同给药组的 4T1 细胞存活率均随着质量浓度的增加而降低,表明 4T1 细胞存活率与药物质量浓度呈现相关性; F-Cur、Cur-L、F-Cis、Cis-L、FCC、CCL 的 IC_{50} 值分别为 (44.49±0.72)、(37.00±0.06)、(5.56±0.04)、(3.44±0.06)、(1.11±0.04)、(0.92±0.03) $\mu\text{g/mL}$,各药物脂质体组与其游离药物组比较, IC_{50} 值均降低,表明制备成脂质体后药物对 4T1 细胞的增殖抑制作用增强,且 FCC 组和 CCL 组的 IC_{50} 值均比其他组单用的 IC_{50} 值低,进一步表明姜黄素和顺铂两药联用杀伤癌细胞的能力更强。

2.9.2 细胞迁移能力考察

种板前将 6 孔板底部平分为 3 等份,取对数生长期的 4T1 细胞稀释到 2×10^5 个/mL,种板与给药按“2.9.1”项下方法操作,分为对照组、F-Cur、Cur-L、F-Cis、Cis-L、FCC 和 CCL 组,每孔加入 2 mL,待细胞长到 90%左右,用枪头在孔内划痕,使划痕与底部所划直线垂直,拍摄不同组的 0 h 照片;然后用含 2%血清的培养基配制不

表 14 释药模型拟合方程结果
Table 14 Results of fitting equation of drug release model

组别	成分	模型	拟合方程	
			pH 5.0	pH 7.0
FCC	姜黄素	零级释放	$Q=4.08 t+18.07, R^2=0.790\ 2$	$Q=3.53 t+18.68, R^2=0.769\ 2$
		一级释放	$Q=90.73 (1-e^{-0.15 t}), R^2=0.994\ 9$	$Q=87.60 (1-e^{-0.15 t}), R^2=0.990\ 7$
		Higuchi	$Q=8.16 t^{1/2}+18.07, R^2=0.790\ 2$	$Q=7.07 t^{1/2}+18.68, R^2=0.769\ 2$
		Ritger-Peppas	$Q=2.38 t^{2.38}, R^2=0.504\ 5$	$Q=2.31 t^{2.31}, R^2=0.163\ 2$
	顺铂	零级释放	$Q=5.15 t+15.91, R^2=0.708\ 0$	$Q=4.98 t+13.01, R^2=0.758\ 8$
		一级释放	$Q=90.71 (1-e^{-0.14 t}), R^2=0.993\ 6$	$Q=89.54 (1-e^{-0.14 t}), R^2=0.998\ 2$
		Higuchi	$Q=10.30 t^{1/2}+15.91, R^2=0.708\ 0$	$Q=9.97 t^{1/2}+13.61, R^2=0.758\ 8$
		Ritger-Peppas	$Q=2.97 t^{2.97}, R^2=0.181\ 7$	$Q=2.67 t^{2.67}, R^2=0.477\ 8$
CCL	姜黄素	零级释放	$Q=1.02 t+19.73, R^2=0.778\ 7$	$Q=0.73 t+14.05, R^2=0.736\ 5$
		一级释放	$Q=73.57 (1-e^{-0.09 t}), R^2=0.982\ 7$	$Q=54.20 (1-e^{-0.09 t}), R^2=0.989\ 2$
		Higuchi	$Q=2.05 t^{1/2}+19.73, R^2=0.778\ 7$	$Q=1.47 t^{1/2}+14.05, R^2=0.736\ 5$
		Ritger-Peppas	$Q=1.22 t^{1.22}, R^2=0.141\ 7$	$Q=1.03 t^{1.03}, R^2=0.216\ 3$
	顺铂	零级释放	$Q=1.11 t+25.50, R^2=0.679\ 5$	$Q=0.81 t+20.58, R^2=0.667\ 8$
		一级释放	$Q=75.86 (1-e^{-0.11 t}), R^2=0.955\ 7$	$Q=58.50 (1-e^{-0.13 t}), R^2=0.9757$
		Higuchi	$Q=2.21 t^{1/2}+25.50, R^2=0.679\ 5$	$Q=1.61 t^{1/2}+20.58, R^2=0.667\ 8$
		Ritger-Peppas	$Q=1.35 t^{1.35}, R^2=0.397\ 3$	$Q=1.15 t^{1.15}, R^2=0.295\ 9$

表 15 不同给药组对 4T1 细胞增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=5$)
Table 15 Inhibitory effect of different administration groups on proliferation of 4T1 cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	细胞存活率/%					
	0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (对照)	15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	35 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
B-L	100.66 $\pm$ 3.04	105.87 $\pm$ 3.70	103.21 $\pm$ 2.61	104.97 $\pm$ 2.48	105.82 $\pm$ 1.98	105.81 $\pm$ 3.72
F-Cur	100.68 $\pm$ 2.73	98.41 $\pm$ 4.93	91.88 $\pm$ 4.76*	85.14 $\pm$ 6.17**	77.10 $\pm$ 3.29***	76.64 $\pm$ 5.01***
Cur-L	100.70 $\pm$ 3.06	74.78 $\pm$ 2.08****	69.50 $\pm$ 1.42****	65.54 $\pm$ 2.83****	58.99 $\pm$ 1.48****	47.72 $\pm$ 1.36****

组别	细胞存活率/%					
	0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (对照)	1.75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	2.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	2.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	2.50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	3.75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
F-Cis	100.00 $\pm$ 2.11	99.68 $\pm$ 1.12	98.51 $\pm$ 3.68	89.34 $\pm$ 2.76**	72.44 $\pm$ 4.41***	59.25 $\pm$ 2.63***
Cis-L	100.01 $\pm$ 4.28	70.78 $\pm$ 2.22****	67.20 $\pm$ 4.93****	64.22 $\pm$ 2.25****	63.39 $\pm$ 1.36****	45.86 $\pm$ 2.53****
FCC	100.01 $\pm$ 5.26	43.98 $\pm$ 1.23***	35.87 $\pm$ 2.05***	30.65 $\pm$ 2.76***	28.34 $\pm$ 2.11***	26.58 $\pm$ 2.3***
CCL	100.02 $\pm$ 5.04	41.61 $\pm$ 1.81***	34.41 $\pm$ 2.66***	26.43 $\pm$ 2.76***	18.07 $\pm$ 2.51****	12.89 $\pm$ 3.1****

与对照组比较: ** $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$; 与同一质量浓度下各游离组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ 。
* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs each free group at the same mass concentration.

同组的药物, 分别于给药 24、48 h 时拍照, 结果见图 6。采用 Image J 1.8.0 软件处理划痕面积, 计算细胞划痕面积恢复率, 考察细胞迁移能力。结果如表 16 所示, 同一时间下不同给药组与对照组, 以及同一时间下不同药物脂质体组与其游离药物组间均存在显著性差异 ($P<0.001$), 表明不同给药组均能抑制细胞迁移, 且 CCL 组与其他给药组比较, 划痕面积恢复率较低, 表明 CCL 组抑制细胞迁移的能力比其他给药组更强。

细胞划痕面积恢复率=(0 h 划痕面积-24 h 或 48 h 划

痕面积)/0 h 划痕面积

2.9.3 细胞克隆实验 取对数生长的 4T1 细胞, 分为对照、F-Cur、Cur-L、F-Cis、Cis-L、FCC 和 CCL 组, 种于 6 孔板中, 2×10^3 个/孔, 待细胞完全贴壁后给药, 继续培养 24 h 后, 吸弃含药培养基, PBS 清洗 2 遍, 换成不含药的完全培养基, 继续培养, 待看到有明显的克隆团形成时, 终止培养, 加入 4%多聚甲醛固定 15 min 后, 用 0.1%结晶紫染色, 拍照, 采用 Image J 1.8.0 软件处理细胞克隆个数。结果如图 7 和表 17 所示, 不同给药组与对照组, 以及不同

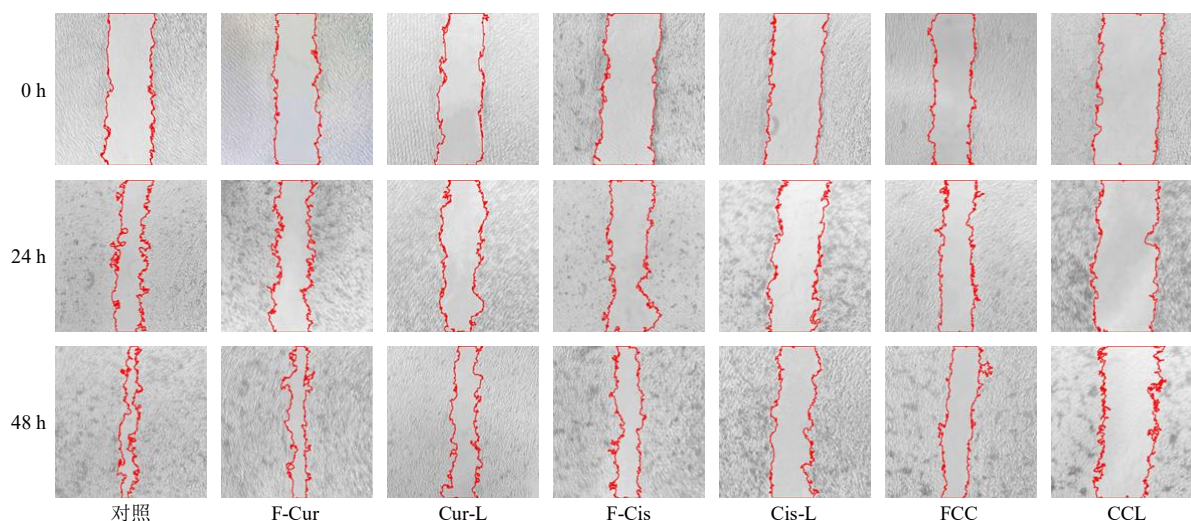


图 6 不同给药组对 4T1 细胞迁移能力的影响 (×4)

Fig. 6 Effects of different administration groups on migration ability of 4T1 cells (×4)

表 16 不同给药组处理 4T1 细胞的划痕面积恢复率

($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 16 Recovery rates of scratch area of 4T1 cells in different administration groups ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	药物质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	划痕面积恢复率/%	
		24 h	48 h
对照	0	40.70 ± 4.27	78.11 ± 2.24
F-Cur	15	25.81 ± 1.57***	64.75 ± 0.96***
Cur-L	15	13.66 ± 1.31***###	36.52 ± 5.87***###
F-Cis	1.75	25.88 ± 5.34***	57.57 ± 1.87***
Cis-L	1.75	9.73 ± 5.2***###	29.82 ± 2.06***###
FCC	1.75	21.51 ± 3.23***	26.95 ± 4.11***
CCL	1.75	5.31 ± 4.02***###	13.60 ± 1.97***###

与同一时间下对照组比较: *** $P < 0.001$; 与同一时间下同一质量浓度游离药物组比较: ### $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group at the same time; ### $P < 0.001$ vs the same concentration at the same time were compared with their free drug groups.

药物脂质体组与其游离药物组间均存在显著性差异 ($P < 0.01, 0.001$), 表明不同给药组均能抑制 4T1 细胞克隆, 且 CCL 组抑制 4T1 细胞克隆能力与其他组比较最强 ($P < 0.001$)。

2.9.4 DAPI 核染细胞凋亡的细胞形态学分析 利用 DAPI 对细胞核进行染色, 定性考察细胞凋亡的形态学变化^[34]。将 4T1 细胞稀释至 1×10^5 个/mL, 种于 12 孔板中, 每孔 1 mL, 分为对照组、F-Cur 组、Cur-L 组、F-Cis 组、Cis-L 组、FCC 组和 CCL 组, 培养 24 h 后给药, 继续培养 24 h, 吸弃培养基, 加入 4% 多聚甲醛固定 30 min, 每孔加入 500 μL DAPI (2 $\mu\text{g/mL}$) 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min, 在荧光倒置显微镜下观察细胞凋亡情况, 结果如图 8 所示。对照组的细胞核结构完整, 染色均一, 呈现均匀蓝色荧光; 其他不同给药组均出现细胞核固缩、变形或破碎, 核染色质边缘化趋势, 呈现蓝色荧光; 其中, CCL 组

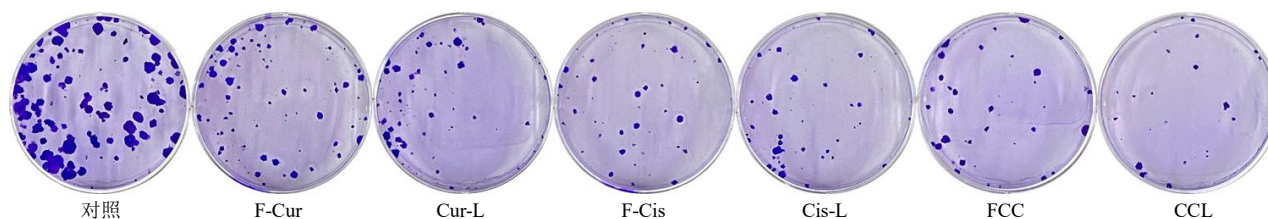


图 7 不同给药组对 4T1 细胞克隆能力的影响

Fig. 7 Effect of different administration groups on cloning ability of 4T1 cells

与 F-Cur、Cur-L、F-Cis、Cis-L 及 FCC 组比较, 不仅出现明显的细胞核固缩或变形情况, 细胞数目也明显减少, 表明姜黄素和顺铂两药联用比其单用体外抗乳腺癌效果好, 且制备成 CCL 后, 能进一步增强抗乳腺癌效果。

2.10 体外安全性评价

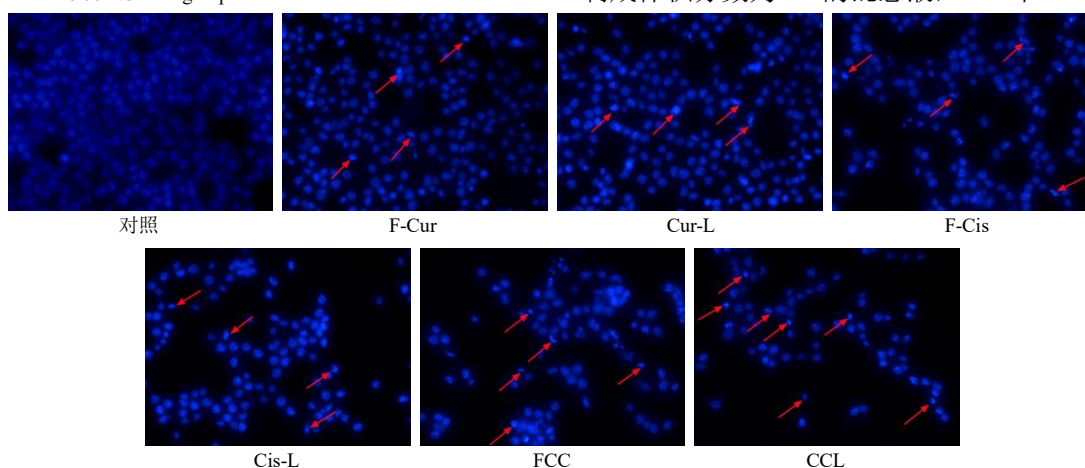
2.10.1 对正常肝 L02 细胞的增殖抑制实验 取对数生长的正常肝 L02 细胞, 培养条件、种板数目、给药质量浓度与乳腺癌 4T1 细胞保持一致, 分为 FCC 组和 CCL 组, 计算各组药物处理后 L02 细胞存活率,

表 17 不同给药组处理 4T1 细胞的克隆数 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 17 Clones of 4T1 cells in different drug administration groups ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	药物质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	细胞克隆数/个
对照	0	106.33 $\pm$ 1.53
F-Cur	15	65.33 $\pm$ 1.53***&&&
Cur-L	15	49.67 $\pm$ 1.53***####&&&
F-Cis	1.75	44.67 $\pm$ 1.53***&&&
Cis-L	1.75	35.33 $\pm$ 2.08***####&&&
FCC	1.75	32.33 $\pm$ 1.53***&&&
CCL	1.75	19.00 $\pm$ 1.00***###

与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与各游离组比较: ### $P < 0.01$ #### $P < 0.001$; 与 CCL 组比较: &&& $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.01$ #### $P < 0.001$ vs their free groups; &&& $P < 0.001$ vs CCL group.

图 8 不同给药组 DAPI 核染实验 (红色箭头所指为细胞核固缩、变形或破碎现象, $\times 10$)Fig. 8 DAPI staining experiment in different administration groups (red arrows indicate nuclear contraction, distortion, or fragmentation, $\times 10$)表 18 FCC 和 CCL 对正常肝 L02 细胞和 4T1 细胞增殖抑制作用的比较 ($\bar{x} \pm s, n=5$)Table 18 Comparison of FCC and CCL on proliferation inhibition of normal L02 hepatocytes and 4T1 cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	细胞种类	细胞存活率/%					
		0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	1.75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	2.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	2.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	2.50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	3.75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
FCC	L02	101.11 $\pm$ 1.32	99.78 $\pm$ 3.13	99.72 $\pm$ 1.48	97.92 $\pm$ 1.84	97.19 $\pm$ 1.18	86.03 $\pm$ 1.58**
	4T1	100.01 $\pm$ 5.26	43.98 $\pm$ 1.23***###	35.87 $\pm$ 2.05***###	30.65 $\pm$ 2.76***###	28.34 $\pm$ 2.11***###	26.58 $\pm$ 2.3***###
CCL	L02	100.07 $\pm$ 4.49	99.07 $\pm$ 1.73	96.31 $\pm$ 1.87	92.68 $\pm$ 2.59	89.72 $\pm$ 3.18**	75.68 $\pm$ 1.56***
	4T1	100.02 $\pm$ 5.04	41.61 $\pm$ 1.81***###	34.41 $\pm$ 2.66***###	26.43 $\pm$ 2.76***###	18.07 $\pm$ 2.51***###	12.89 $\pm$ 3.1***###

与同一给药组同一细胞未给药组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与同一给药组同一质量浓度 L02 细胞比较: ### $P < 0.001$ 。

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs the same cell group without drug administration; ### $P < 0.001$ vs L02 cells of the same mass concentration in the same administration group.

盐水配成 1.75、2.00、2.25、2.50、3.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 加入体积分数 2% 的红细胞混悬液与其混合, 阴性对照为生理盐水与体积分数 2% 的红细胞混悬液混合, 阳性对照为纯水与体积分数 2% 的红细胞混悬液混合, 1 800 r/min, 离心半径为 7.6 cm, 离心 10 min, FCC 和 CCL 不同质量浓度均配制 1 组不加红

并与 4T1 细胞存活率进行比较, 结果如表 18 所示。不同质量浓度的 FCC 和 CCL 对正常肝 L02 细胞存活率影响较小, 对 L02 细胞的增殖抑制作用比 4T1 细胞弱, 且 FCC 对 4T1 细胞和 L02 细胞的 IC_{50} 值分别为 (1.11 $\pm$ 0.04) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 (4.83 $\pm$ 0.04) $\mu\text{g}/\text{mL}$, 而 CCL 对 4T1 细胞和 L02 细胞的 IC_{50} 值分别为 (0.92 $\pm$ 0.03) $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 (4.50 $\pm$ 0.02) $\mu\text{g}/\text{mL}$, FCC 和 CCL 对 L02 细胞的 IC_{50} 值均比对 4T1 细胞的 IC_{50} 值大, 表明 FCC 和 CCL 对 L02 细胞在 1.75~3.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 安全性较好。

2.10.2 溶血实验 KM 小鼠眼球取血, 装入含有肝素钠的离心管中, 用生理盐水轻柔清洗 3 次, 并配制成体积分数为 2% 的混悬液, FCC 和 CCL 用生理

细胞混悬液, 作为空白组, 用于扣除姜黄素背景, 于 545 nm 处测其 A 值, 计算其溶血率。

$$\text{溶血率} = (A_{\text{样品}} - A_{\text{阴性}}) / (A_{\text{阳性}} - A_{\text{阴性}})$$

结果如图 9 及表 19 所示。FCC 随着药物质量浓度的增加, 溶血率有所降低, 因为姜黄素中的酚羟基可以通过捐赠 H 原子给自由基, 从而清除自由



从左到右依次为阴性对照组、阳性对照组、FCC 质量浓度 1.75、2.00、2.25、2.50、3.75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，CCL 质量浓度 1.75、2.00、2.25、2.50、3.75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

From left to right were negative control group, positive control group, FCC concentration 1.75, 2.00, 2.25, 2.50, 3.75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; CCL concentration 1.75, 2.00, 2.25, 2.50, 3.75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

图 9 不同给药组的溶血实验结果

Fig. 9 Hemolysis experiment result of different drug administration groups

表 19 不同给药组的溶血率 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 19 Hemolysis rate in different administration groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	溶血率/%						
	阴性对照	阳性对照	1.75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	2.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	2.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	2.50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	3.75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
FCC	0.09 $\pm$ 0.25	100.06 $\pm$ 0.34	0.78 $\pm$ 0.10	0.95 $\pm$ 0.10	0.56 $\pm$ 0.10	0.56 $\pm$ 0.10	0.27 $\pm$ 0.09
CCL	0.00 $\pm$ 0.29	100.00 $\pm$ 0.18	0.31 $\pm$ 0.03	0.45 $\pm$ 0.26	0.61 $\pm$ 0.26	0.84 $\pm$ 0.17	1.17 $\pm$ 0.17

基，姜黄素中的烯醇羟基也能还原自由基，碳链上的羟基也有利于姜黄素稳定红细胞膜^[35]，FCC 和 CC 溶血率最高的组分别为 0.95%、1.17%，溶血率均低于 5%，表明 FCC 和 CCL 在 1.75~3.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 生物相容性良好。

3 讨论

近年来随着纳米制剂的发展，可以选择纳米载体负载多种抗癌药物，以降低单独用药的毒性，提高治疗效果^[36]。药物联用的协同作用机制可能与药物影响了程序性细胞死亡的子程序有关，研究表明，程序性细胞死亡 (programmed cell death, PCD) 与多种类型的癌症治疗相关^[37]，PCD 可以分为许多不同的子程序，包括自噬依赖性细胞死亡、凋亡、有丝分裂障碍、坏死性凋亡、铁凋亡、焦凋亡和失巢凋亡等，用小分子化合物靶向 PCD 的子程序已经成为一种有前景的治疗策略，其在乳腺癌的治疗中迅速取得进展，但小分子药物单用容易产生耐药性，药物联用可以增强疗效，降低耐药性，可能与调节 PCD 子程序相关，深入研究 PCD，更准确地确定 PCD 各子程序的复杂分子机制，并进一步探讨它们之间的关系，对靶向治疗的发展具有重要意义。

为了增强药物的靶向性，本实验在脂质体中加入了 pH 敏感辅料 CHS，酸性条件下脂质体粒径变大甚至破裂，促进药物在肿瘤部位释放，降低化疗药物对正常细胞的毒性^[38]。目前含 PE 的 pH 敏感

脂质体药物输送系统已经广泛用于癌症的靶向治疗，Fan 等^[39]研究发现 PE 作为一种天然的不饱和磷脂，可形成双层相和六方晶相，两相间转化能量较低。在中性 pH 值下极易发生相变，形成的脂质体表现出弱的 pH 敏感性和较低的结构稳定性。含有 PE 的脂质体中加入 pH 敏感辅料 CHS 后，由于 CHS 具有胆固醇样结构，中性 pH 条件下可以稳固 PE 脂质体的磷脂双分子层结构，防止药物泄露，增加脂质体的稳定性；同时 CHS 的甾体刚性结构在酸性环境下使 PE 脂质体表面形态由双层相向六方晶相转变，磷脂双分子层结构被破坏，药物释放增加，展现出较好的 pH 敏感性。

这可能与以下机制有关：(1) 当 pH 值降低时，PE 的氨基和磷酸基团以及 CHS 均被质子化，减弱了 CHS 与 PE 之间的相互作用力，因此消除了 CHS 对 PE 的稳定作用。(2) 酸性 pH 值下，CHS 的水溶性下降，而 PE 的水溶性增强，CHS 和 PE 在水中不相混溶性增加。(3) 酸性 pH 值下，CHS 的头基脱水会使其几何形状从圆锥形变为圆柱形，对 PE 的磷脂双分子层的稳固作用减弱，使 PE 的表面形态由双层相向六方晶相变化。

本实验根据姜黄素-顺铂两药最佳联用比例 (6:1)，采用薄膜分散法制备 CCL，期望两药在最佳协同比例条件下能产生较好的抗癌效果。采用 HPLC 法检测两药含量的过程中，曾参考文献采用

Agilent C₁₈ 反相色谱柱测定 2 种药物的含量^[22], 在检测过程中发现顺铂出峰时间很快, 与溶剂峰不能完全分开, 尝试用酸性、碱性流动相后, 出峰时间几乎不变, 猜测可能是顺铂的极性较大, 且 C₁₈ 柱作为固定相, 极性是非极性或弱极性, 根据同性相吸原理, 非极性或弱极性的化合物更容易被色谱柱吸附, 而极性大的物质更容易被流动相带走, 导致出峰时间提前, 后期换为氨基柱对顺铂进行含量测定, 目标峰与溶剂峰能分开, 最终确定采用氨基柱测定顺铂含量。

对 CCL 进行表征以及体外抗肿瘤活性评价, CCL 的粒径在 100~200 nm, 能够避免或减少单核巨噬细胞的吞噬, 增加其在靶部位的蓄积, 进而增加其治疗作用, 同时减少对正常细胞的损伤, PDI 小于 0.3, 粒径分布均匀, 放置 1 个月内较稳定, 证实 CCL 符合后期体内药效学评价的 iv 的条件^[40]。细胞克隆实验的对照组显示, 4T1 细胞克隆能力较强, 后期体内药效学实验种植皮下瘤时, 在小鼠体内较容易成瘤^[41]。在细胞划痕实验过程中发现, 用不含血清的培养基培养细胞时^[42], 细胞存活时间较短, 猜测可能由于癌细胞种类不同, 对血清的依赖程度可能也不同, 本实验 4T1 细胞存活时间短的原因可能是不含血清的培养基几乎没有营养, 加入药物后, 药物对细胞产生了一定的增殖抑制作用, 导致细胞快速死亡, 后续加入 2% 血清后, 实验可以正常进行。本研究仅对 CCL 的制备、表征和体外药效学进行评价, 后续会对 CCL 进行体内药效学、组织分布等做进一步研究, 为其更深入地开发应用提供完整的实验数据。

综上所述, 本研究制备的 CCL 安全性良好, 对 4T1 细胞的增殖抑制效果较其他组好, 有望为药物联用治疗乳腺癌的研究提供思路和依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Bray F, Laversanne M, Sung H, *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-263.
- [2] Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug [J]. *Bioorg Chem*, 2019, 88: 102925.
- [3] 魏青, 张丽娜. 卵巢癌顺铂耐药机制研究进展 [J]. 广东化工, 2023, 50(17): 89-91.
- [4] 湛洪媛, 刘大权, 陈思维, 等. 顺铂联合用药治疗乳腺癌的研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(13): 1775-1782.
- [5] 徐瑞雪, 王宇. 紫草素联合化疗药物逆转肿瘤耐药性的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2024, 39(8): 2154-2161.
- [6] 刘婷, 高飞云, 张转红, 等. 姜黄素抗结肠癌作用机制的研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(24): 7933-7940.
- [7] 侍慧慧, 周美玲, 柳晔, 等. 载姜黄素 pH 敏感聚合物胶束的制备、表征及体内外抗非小细胞肺癌研究 [J]. 中草药, 2023, 54(19): 6264-6275.
- [8] 陈榕, 颜烨, 何梓炫, 等. 提升姜黄素疗效的策略及技术研究进展 [J]. 中草药, 2024, 55(15): 5315-5330.
- [9] 江晨, 佟茜, 马会园, 等. 姜黄素抗乳腺癌药理作用相关机制研究进展 [J]. 癌症进展, 2024, 22(8): 813-816.
- [10] 廖谊芳, 饶浪, 张云娇. 负载姜黄素的工程化细胞膜纳米颗粒的制备及其用于小鼠乳腺癌治疗的研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2024, 40(7): 1173-1181.
- [11] Cacciola N A, Cuciniello R, Petillo G D, *et al.* An overview of the enhanced effects of curcumin and chemotherapeutic agents in combined cancer treatments [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(16): 12587.
- [12] Peng Y, Ao M Y, Dong B H, *et al.* Anti-inflammatory effects of curcumin in the inflammatory diseases: Status, limitations and countermeasures [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 4503-4525.
- [13] 张琪, 何龙希, 郑鑫, 等. 姜黄素抗肿瘤作用的研究进展 [J]. 华西药理学杂志, 2023, 38(4): 473-476.
- [14] 杨春红, 潘琳, 唐茜, 等. 辅助降血糖功能的药食同源原料的应用概况 [J]. 中药与临床, 2022, 13(1): 103-107.
- [15] 刘文清, 杨莎, 刘明松, 等. 姜黄素与抗肿瘤药物联合应用的研究进展 [J]. 河北大学学报: 自然科学版, 2024, 44(1): 50-59.
- [16] Martinez-Cifuentes M, Weiss-Lopez B, Santos L S, *et al.* Heterocyclic curcumin derivatives of pharmacological interest: Recent progress [J]. *Curr Top Med Chem*, 2015, 15(17): 1663-1672.
- [17] 叶鹏. 叶酸受体靶向伊马替尼脂质体及阿霉素-伊马替尼复方脂质体的研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2014.
- [18] Boyd L R, Muggia F M. Carboplatin/paclitaxel induction in ovarian cancer: The finer points [J]. *Oncology*, 2018, 32(8): 418-420, 422-424.
- [19] Cortez A J, Tudrej P, Kujawa K A, *et al.* Advances in ovarian cancer therapy [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2018, 81(1): 17-38.
- [20] Davis A, Tinker A V, Friedlander M. "Platinum resistant" ovarian cancer: What is it, who to treat and how to measure benefit? [J]. *Gynecol Oncol*, 2014, 133(3): 624-631.
- [21] Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A. Advanced

- targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015, 93: 52-79.
- [22] 赵璐丹. 新鱼腥草素钠联合顺铂抗肺癌活性研究及其共载脂质体的制备 [D]. 郑州: 郑州大学, 2021.
- [23] Belfiore L, Saunders D N, Ranson M, *et al.* Towards clinical translation of ligand-functionalized liposomes in targeted cancer therapy: Challenges and opportunities [J]. *J Control Release*, 2018, 277: 1-13.
- [24] Maples D, McLean K, Sahoo K, *et al.* Synthesis and characterisation of ultrasound imageable heat-sensitive liposomes for HIFU therapy [J]. *Int J Hyperthermia*, 2015, 31(6): 674-685.
- [25] Boedtkjer E, Pedersen S F. The acidic tumor microenvironment as a driver of cancer [J]. *Annu Rev Physiol*, 2020, 82: 103-126.
- [26] 李禄辉, 郭允, 侯先巧, 等. 包载三苯基膦-阿霉素和槲皮素的还原敏感性抗肿瘤耐药纳米混合胶束的制备及评价 [J]. *药物评价研究*, 2024, 47(7): 1563-1571.
- [27] Chou T C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies [J]. *Pharmacol Rev*, 2006, 58(3): 621-681.
- [28] Cheng Y, Zhao P X, Wu S P, *et al.* Cisplatin and curcumin co-loaded nano-liposomes for the treatment of hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Pharm*, 2018, 545(1/2): 261-273.
- [29] 董博宇. β -榄香烯-姜黄素复方脂质体的制备与联用多西他赛抗肺癌作用的研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [30] 张登山, 刘留成. 共载伊立替康-顺铂复合脂质体的制备及质量评价 [J]. *中国药师*, 2020, 23(2): 280-284.
- [31] 范兴风, 王德才, 高瑞, 等. 奥沙利铂-姜黄素脂质体复合物的制备及质量评价 [J]. *药学与临床研究*, 2017, 25(1): 1-5.
- [32] 潘蕊, 张海亮, 赵笑雨, 等. 叶酸修饰的克班宁聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸共聚物纳米粒的制备及其体外抗肿瘤活性研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(20): 6643-6656.
- [33] 石玮玮. 姜黄素 pH 敏感脂质体的制备及其理化性质评价 [J]. *药物生物技术*, 2016, 23(2): 108-111.
- [34] 尤雨桐, 贺小琼, 陆地, 等. 松萝烟酰胺对胃癌 SGC-7901 细胞增殖、凋亡、细胞周期及迁移的影响 [J]. *中草药*, 2020, 51(4): 1024-1030.
- [35] 冷怡林. 姜黄素胶束的制备与体内外抗肿瘤活性研究 [D]. 开封: 河南大学, 2020.
- [36] Min S H, Lei W, Jun C J, *et al.* Design strategy and research progress of multifunctional nanoparticles in lung cancer therapy [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2023, 32(8): 723-739.
- [37] Liao M R, Qin R, Huang W, *et al.* Targeting regulated cell death (RCD) with small-molecule compounds in triple-negative breast cancer: A revisited perspective from molecular mechanisms to targeted therapies [J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 44.
- [38] Wang M, Yuan Y, Gao Y, *et al.* Preparation and characterization of 5-fluorouracil pH-sensitive niosome and its tumor-targeted evaluation: *in vitro* and *in vivo* [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2012, 38(9): 1134-1141.
- [39] Fan Y, Chen C, Huang Y H, *et al.* Study of the pH-sensitive mechanism of tumor-targeting liposomes [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, 151: 19-25.
- [40] Penoy N, Grignard B, Evrard B, *et al.* A supercritical fluid technology for liposome production and comparison with the film hydration method [J]. *Int J Pharm*, 2021, 592: 120093.
- [41] 赵欣. 双硫仑联合铜通过调控 GNL3 的表达影响结直肠癌细胞增殖、迁移与耐药 [D]. 济南: 山东大学, 2023.
- [42] 杜文娟, 王孝慈, 周小红, 等. 芦荟大黄素纳米脂质体联合 5-氟尿嘧啶对人舌鳞癌 CAL-27 细胞增殖、凋亡、侵袭及迁移的影响 [J]. *现代肿瘤医学*, 2023, 31(9): 1626-1631.

[责任编辑 郑礼胜]