

- modified with transferrin and folic acid targeting to glioma *in vitro* [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(11): 963-1970.
- [4] VERONESE F M, PASUT G. PEGylation, successful approach to drug delivery [J]. Drug Discov Today, 2005, 10(21): 1451-1458.
- [5] AGNIHOTRI S A, MALLIKARJUNA N N, AMINABHAVI T M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery [J]. J Control Release, 2004, 100(1): 5-28.
- [6] CHEN J, HU Q, HOU Z Q. Preparation of chitosan nanoparticles for targeting and sustained drug delivery system by ion-induced combined with chemical crosslinking [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2010, 45(18): 1400-1403.
- [7] ZHANG B, LI Y Q, FANG C Y, et al. Receptor-mediated cellular uptake of folate-conjugated fluorescent nanodiamonds: a combined ensemble and single- particle study [J]. Small, 2009, 5(23): 2716-2721.
- [8] YOU J, LI X, CUI F D, et al. Folate-conjugated polymer micelles for active targeting to cancer cells: preparation, *in vitro* evaluation of targeting ability and cytotoxicity [J]. Nanotechnology, 2008, 19(4): 1-10.
- [9] MAO H Q, ROY K, TROUNG-LE V L, et al. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency [J]. J Control Release, 2001, 70(3): 399-421.
- [10] NAGAMOTO T, HATTORI Y, TAKAYAMA K, et al. Novel chitosan particles and chitosan-coated emulsion inducing immune response via intranasal vaccine delivery [J]. Pharm Res, 2004, 21(4): 671-674.
- [11] HOSSEIN H, YASUHIKO T. PEGylation enhances tumor targeting of plasmid DNA by an artificial cationized protein with repeated RGD sequences [J]. J Control Release, 2004, 97(1): 157-171.
- [12] ZAHR A S, DAVIS C A, PISHKO M C. Macrophage uptake of core-shell nanoparticles surface modified with poly(ethylene glycol) [J]. Langmuir, 2006, 22(19): 8178-8185.
- 收稿日期: 2012-06-28

姜黄素衍生物体外释放及抗肿瘤作用研究

俞婷婷, 蒋福升, 刘楠楠, 丁志山* (浙江中医药大学, 杭州 310053)

摘要: 目的 研究姜黄素衍生物 mPEG_{2k}-Gly-Cur, mPEG_{2k}-Gly-Cur-OA 和 Cur-OA₂ 的体外释放情况及其体外抗肿瘤作用。方法 采用高效液相色谱法, 进行姜黄素衍生物在人肝癌细胞株 HepG2 培养上清液中水解释放特性的研究; 采用 MTT 法对各姜黄素衍生物体外抗肿瘤细胞活性进行初步评价。结果 建立了姜黄素的 HPLC 检测条件, 在灭活的细胞培养上清液中, mPEG_{2k}-Gly-Cur 和 mPEG_{2k}-Gly-Cur-OA 可以以相对合适的速度缓慢释放姜黄素, 而 Cur-OA₂ 释放非常缓慢; 但在未灭活处理的细胞培养上清液中姜黄素衍生物释放速度均明显加快, 表明衍生物可以通过酶促反应加速释放。体外 MTT 实验证实 3 个姜黄素衍生物具有较好的抗肿瘤作用, 而且 Cur-OA₂ 活性最强, 但相对游离姜黄素均有所下降。结论 姜黄素酚羟基经衍生化后可有效提高水溶液中稳定性, 而油酸双酯化衍生物可能通过肝癌细胞吞噬作用增强药效, 值得进一步深入的系统研究。

关键词: 姜黄素衍生物; 体外释放; 抗肿瘤; 聚乙二醇修饰

中图分类号: R962.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)03-0289-06

Study on Release and Anti-tumor Effect of Curcumin Derivatives *in Vitro*

YU Tingting, JIANG Fusheng, LIU Nannan, DING Zhishan* (Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the release and anti-tumor effect of curcumin derivatives, mPEG_{2k}-Gly-Cur, mPEG_{2k}-Gly-Cur-OA and Cur-OA₂, *in vitro*. **METHODS** The release property of curcumin derivatives in HepG2 cell culture supernatant was studied by HPLC method; furthermore, the antitumor activity of the derivatives *in vitro* was evaluated by MTT method with HepG2 cell lines. **RESULTS** HPLC detection conditions of curcumin were established. In deactivated cell culture supernatant, mPEG_{2k}-Gly-Cur and mPEG_{2k}-Gly-Cur-OA could release curcumin in a rational speed, while the release speed of Cur-OA₂ was too slow to be able to show any potential application, however, the release rate of curcumin from Cur-OA₂ and

基金项目: 浙江省自然科学基金资助(Y2111091); 浙江省大学生科技创新项目(2012R410029)

作者简介: 俞婷婷, 女, 硕士生 Tel: (0571)86613666 E-mail: yutingting.0618@163.com *通信作者: 丁志山, 男, 博士, 教授, 博导 Tel: (0571) 86613666 E-mail: zjtcmdzs@sohu.com

other curcumin derivatives was remarkably promoted in the untreated HepG2 cell culture supernatant, which may imply enzyme hydrolysis takes place. Additionally, MTT assay confirmed that three derivatives still had cell growth inhibition activity against HepG2 cell lines, and the derivative Cur-OA₂ with the strongest activity, but all were less efficient than curcumin. **CONCLUSION** Curcumin stability can be effectively improved after modification and the oleic acid double esterification derivative may enhance anti-hepatic carcinoma activity by cell phagocytize way, which deserves further research.

KEY WORDS: curcumin derivatives; *in vitro* release; antitumor; PEGylation

姜黄素(curcumin, Cur)是从姜科植物 *Curcuma longa* L.中提取的一种多羟基化合物,大量研究表明,姜黄素具有抗氧化、抗炎、抗癌、清除自由基、抗微生物以及对心血管系统、消化系统等多方面药理作用,且几乎没有明显不良反应^[1-4]。近年来,姜黄素越来越受到国内外学者的重视,在癌症预防、癌症治疗、抗肿瘤细胞转移^[3]及阿尔茨海默病等神经病变方面^[5]研究尤其被关注,并且在欧美等国家已经开展多项相关临床研究。

本实验室对姜黄素开发应用做了大量科研工作,合成了系列姜黄素衍生物:mPEG_{2k}-Gly-Cur、mPEG_{2k}-Gly-Cur-OA 和 Cur-OA₂^[6],三者均能不同程度延长小鼠体内循环半衰期,其中衍生物 Cur-OA₂ 静脉注射后可在肝脏部位大量富集,并长时间维持较高药效浓度,具有“肝靶向性”特征^[6],极具开发成肝脏相关疾病治疗药潜质;而笔者预实验证实,该衍生物体内对 H₂₂ 移植肿瘤具有较强的抑制活性。为了揭示上述衍生物药效活性变化,为开发新药奠定基础,本实验对其衍生物的体外释放特性及体外抗肿瘤活性等进行考察和评价。

1 仪器与材料

1.1 仪器

AR2130 电子精密天平(Ohaus Corp, USA); AR1140 电子精密天平(Ohaus Corp, USA); DGG-9070A 电热恒温鼓风干燥箱(上海森信实验仪器有限公司); DZG-6050 型真空电热恒温干燥箱(上海森信实验仪器有限公司); UltiMate3000 高效液相色谱仪(Dionex 公司); SW-CJ-1F 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); HEPA CLASS100 型细胞 CO₂ 培养箱(德国 Heraeus 公司); OLYMPUS 倒置荧光显微镜(日本 OLYMPUS 公司); UR-4100 型酶标仪(美国 Dynatech 公司); Thermo Biofuge Primo 型离心机(美国 Thermo 公司)。

1.2 材料与试剂

RPMI1640 培养基(美国 GIBCOBRL 公司,批号: 040616); 胎牛血清(FBS, 杭州四季青生物工程材料研究所,批号: 080614); 胰蛋白酶(杭州宏

博生物工程有限公司, Amresco 分装); 二甲基亚砜(DMSO)(浙江杭州双林化工试剂厂,批号: 070514); 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)(华美生物工程公司进口分装,批号: 041025); 色谱纯乙腈(临海市浙东特种试剂厂,批号: 100118)。

2 方法

2.1 姜黄素衍生物的合成与鉴定

按Jiang 等^[6]方法合成姜黄素衍生物 mPEG_{2k}-Gly-Cur, mPEG_{2k}-Gly-Cur-OA 和 Cur-OA₂, 并对其结构进行鉴定。

2.2 姜黄素衍生物体外释放研究

2.2.1 色谱条件 参照 Ma 等^[7]色谱方法: 戴安 UltiMate 3000 高效液相色谱仪; 戴安 Acclaim 120 C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 柠檬酸缓冲液(1%, pH 3.0)-乙腈(45:55); 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 柱温为 35 °C; 检测波长为 420 nm。

2.2.2 姜黄素衍生物在灭活的 HepG2 细胞培养上清液中的释放研究 取指数生长期人肝癌细胞株 HepG2, 胰酶消化后接种于 50 mL 细胞培养瓶中(铺板率 30%左右), 于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中静置培养 2 d, 取上清液, 12 000 r·min⁻¹ 4 °C 离心 10 min, -80 °C 保存备用。

取适量 HepG2 细胞培养上清液置于 100 °C 水浴中灭活 30 min, 10 000 r·min⁻¹ 4 °C 离心 15 min, 得灭活的细胞培养上清液。

准确称取各药物, 用灭活的细胞培养上清液溶解(Cur-OA₂ 用吐温-80 助溶), 置于 37 °C 恒温水浴中, 分别于 0.17, 0.50, 2, 4, 8, 16, 24, 36 h 取样 400 μL; 采用顾吉晋等^[8]报道的萃取方法稍加改进, 即 400 μL 样品用乙酸乙酯涡旋, 离心(5 000 r·min⁻¹, 10 min)萃取, 萃取 3 次, 每次 800 μL, 合并乙酸乙酯, 30 °C 避光、减压蒸干, 残余物用 400 μL 色谱纯甲醇溶解, 进样 20 μL 分析, 每个样品进行 3 次重复水解实验。

2.2.3 姜黄素衍生物在 HepG2 细胞培养上清液中的释放研究 准确称取上述各药物, 用未灭活的

HepG2 细胞培养上清液稀释(Cur-OA₂ 用吐温-80 助溶),置于 37℃ 恒温水浴中,分别于 0.17, 0.33, 0.67, 1, 1.5, 2, 4, 8 h 取样 400 μL; 采用顾吉晋等^[8]报道的萃取方法稍加改进,即 400 μL 样品用乙酸乙酯涡旋,离心(5 000 r·min⁻¹, 10 min)萃取,萃取 3 次,每次 800 μL,合并乙酸乙酯,30℃ 避光、减压蒸干,残余物用 400 μL 色谱纯甲醇溶解,进样 20 μL 分析,每个样品进行 3 次重复水解实验。

2.3 姜黄素衍生物体外抗肿瘤活性研究

人肝癌细胞株 HepG2 用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基,于 37℃、5% CO₂ 条件下常规培养传代。然后采用 MTT 法对各药物体外抗肿瘤细胞活性进行考察分析:即取对数生长期的上述细胞,用胰酶消化后稀释成 5×10⁴ 个·mL⁻¹,按每孔 100 μL 接种于 96 孔培养板中;静置培养 24 h 后以空白培养液为试剂对照,以姜黄素为对照,用不同浓度的各药处理细胞,并于 48 h 后观察、测定药物作用情况。药物处理完毕后,每孔加入 20 μL MTT(5 g·L⁻¹),继续培养 4 h 后小心弃去上清,然后每孔加入 DMSO 150 μL,于酶标板振荡器上振摇 10 min 后 570 nm 处测定各孔吸光度值(A 值)。根据公式计算药物对肿瘤细胞的生长抑制率,重复实验 3 次。

细胞生长抑制率(%)=

$$\frac{\text{试剂空白对照组平均值}A - \text{药物处理组平均值}A}{\text{试剂空白对照组平均值}A} \times 100\%$$

2.4 统计学分析

采用组间 *t* 检验及方差分析,利用 SPSS 13.0 统计软件包进行分析,统计学结果 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果与分析

3.1 姜黄素衍生物色谱条件下分离情况

取各样品少许,用色谱纯甲醇溶解后过 0.22 μm 滤膜,进样 20 μL。由色谱图可知,各样品峰形正态,分离度好,且样品纯度较高。由于姜黄素经油酸双酯化后脂溶性非常强,RP18 色谱柱上呈强保留,纯甲醇也无法洗脱,必需加脂溶性洗脱剂才能洗脱,因此该色谱条件同前述 3 个样品有所不同。方法学考察结果表明:按“2.2.1”项下色谱条件,辅料及 HepG2 条件培养液成分对姜黄素的测定无干扰,回收率、精密度考察符合要求。姜黄素的峰面积(*A*)与药物浓度(*C*)的回归方程为: $C = 0.003\ 600A - 0.034\ 70$ ($r = 0.999\ 7$),线性范围为: 0.005 600~3.136 μg·mL⁻¹。

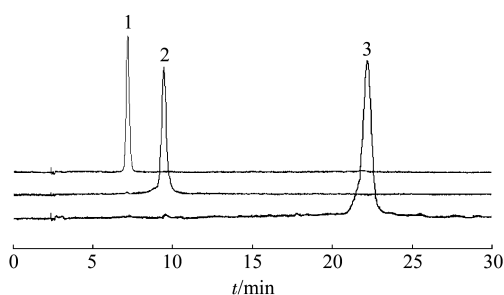


图1 姜黄素衍生物高效液相色谱图

1-样品 Cur; 2-mPEG_{2k}-Gly-Cur; 3-mPEG_{2k}-Gly-Cur-OA

Fig 1 HPLC chromatograms of curcumin derivatives

1-Cur; 2-mPEG_{2k}-Gly-Cur; 3-mPEG_{2k}-Gly-Cur-OA

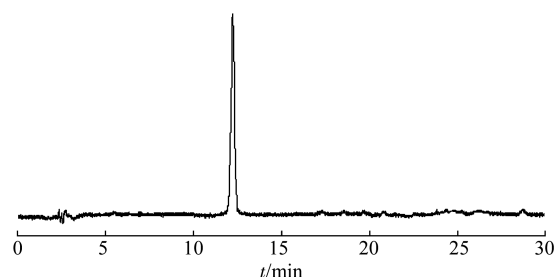


图2 样品 Cur-OA₂ 高效液相色谱图

色谱条件: 100% 甲醇开始洗脱, 5 min 梯度变化至甲醇/乙酸乙酯 (68/32), 并保持该比例继续洗脱 25 min, 流速 1 mL·min⁻¹, 检测波长 420 nm, 柱温 35℃

Fig 2 HPLC chromatograms of curcumin derivative Cur-OA₂

Chromatographic condition: at first 100% methanol was used to elute, then mobile phase was gradually changed into methanol/acetic ester (68/32) in 5 minute, and kept the proportion to elution for 25 min, flow rate: 1 mL·min⁻¹, detection wavelength: 420 nm; column temperature: 35℃

3.2 姜黄素衍生物体外释放实验结果

3.2.1 姜黄素衍生物在灭活的 HepG2 细胞培养上清液中的释放结果 各药物在灭活的 HepG2 细胞培养上清液中 37℃ 孵育后均能够缓慢释放出姜黄素; 其中 mPEG_{2k}-Gly-Cur 和 mPEG_{2k}-Gly-Cur-OA 释放明显较 Cur-OA₂ 快, 且 15 h 内几乎呈线性递增, 24 h 后开始进入平稳期; 相对而言, mPEG_{2k}-Gly-Cur 又比 mPEG_{2k}-Gly-Cur-OA 释放快, 36 h 检测前者释放率将近达到 91.5%, 而后者仅为 59.2% 左右, Cur-OA₂ 则只有 29.8% 左右, 可见, 油酸修饰可以明显“减缓姜黄素释放”。结果见图 3。

3.2.2 各药物在 HepG2 细胞培养上清液中释放结果 将各药物溶于 HepG2 细胞培养上清液中, 37℃ 孵育后于不同时间测定姜黄素释放率, 结果见图 3。由结果可知, 相对在灭活的 HepG2 细胞培养上清液条件下, 各药物在细胞培养上清液中的姜黄素释放速率显著提高; 其中 mPEG_{2k}-Gly-Cur 和 mPEG_{2k}-Gly-Cur-OA 在孵育 90 min 后即有超过 50% 的姜黄素得到释放, 4 h 左右绝大部分已经释

放, 相比之下, 4 h 前前者姜黄素释放速率稍比后者快些, 但此后两者无明显差异。然而, Cur-OA₂ 仍然明显比前两者慢, 但比在灭活的 HepG2 细胞培养上清液条件下有显著提高, 8 h 左右已有 50% 左右释放, 而在灭活的 HepG2 细胞培养上清液中孵育 16 h, 释放率不到 17%。显然, 细胞培养上清液中相关酶促水解作用, 对各药物姜黄素释放起到了明显促进作用。

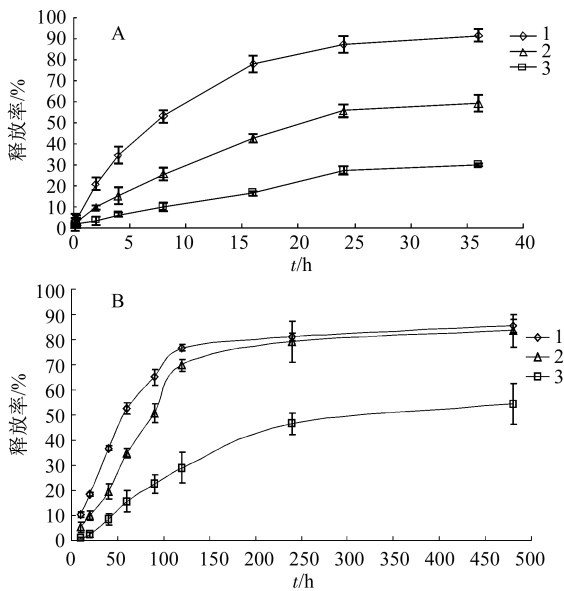


图 3 姜黄素衍生物在灭活(A)和未灭活(B)HepG2 细胞培养上清液中释放曲线($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

1-mPEG_{2k}-Gly-Cur; 2-mPEG_{2k}-Gly-Cur-OA; 3-Cur-OA

Fig 3 Drug release profile of different curcumin derivatives in deactivated (A) and untreated (B) HepG2 cell culture supernatant($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

1-mPEG_{2k}-Gly-Cur; 2-mPEG_{2k}-Gly-Cur-OA; 3-Cur-OA

3.3 姜黄素衍生物对人肝癌细胞株 HepG2 细胞增殖抑制作用

细胞经各药物处理 48 h 后 MTT 法测定抑制率, 结果见图 4 和表 1。结果表明, 各药物体外对 HepG2 抑制作用相比游离姜黄素均有显著下降, 表现为“减毒”效应; 显然, 这与上述缓释作用有关, 与大量类似文献报道一致^[9-10]。由各药物 IC₅₀ 可知, 药物 Cur-OA₂ IC₅₀ 比另外两者稍小, 也即相对表现出较好的细胞增殖抑制效果, 这与前述体外药物释放实验结果相矛盾。但是, 为何药物释放快, 反而抑制作用相对较弱, 从表面数据难以得到合理解释。不过图 5 所显示的现象在一定程度上说明了上述结果的可能原因, 从该图中可以看出, 药物 Cur-OA₂ 呈颗粒聚集, 并大量吸附于细胞表面, 大部分细胞已经变圆、皱缩。从加药

开始跟踪观察发现, 药物 Cur-OA₂ 用吐温-80 助溶加药时颗粒及其细小, 光镜下难以分辨, 但随着孵育时间延长, 颗粒开始聚集变大, 并大量吸附在细胞表面, 随后细胞开始慢慢变圆、皱缩、死亡。

表 1 姜黄素衍生物作用 48 h 后对 HepG2 细胞株的半数抑制浓度($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab 1 The hemi-inhibitory concentration of curcumin derivatives to the HepG2 cells after 48 h($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

药 物	半数抑制浓度 IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹
mPEG _{2k} -Gly-Cur	13.26±2.12 ¹⁾
mPEG _{2k} -Gly-Cur-OA	12.76±1.12 ¹⁾
Cur-OA ₂	11.17±3.41 ¹⁾
Cur	7.08±1.43

注: 与 Cur 比较, ¹⁾ $P<0.05$

Note: Compared with Cur, ¹⁾ $P<0.05$

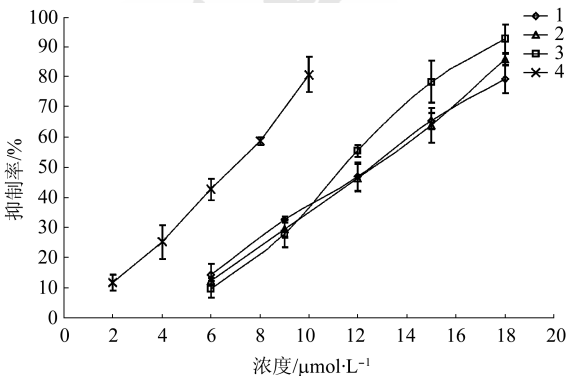


图 4 姜黄素衍生物作用 48 h 后对 HepG2 细胞株增殖抑制曲线($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

1-mPEG_{2k}-Gly-Cur; 2-mPEG_{2k}-Gly-Cur-OA; 3-Cur-OA₂; 4-Cur

Fig 4 Proliferation inhibition curve of curcumin derivatives to HepG2 cells after 48 h($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

1-mPEG_{2k}-Gly-Cur; 2-mPEG_{2k}-Gly-Cur-OA; 3-Cur-OA₂; 4-Cur

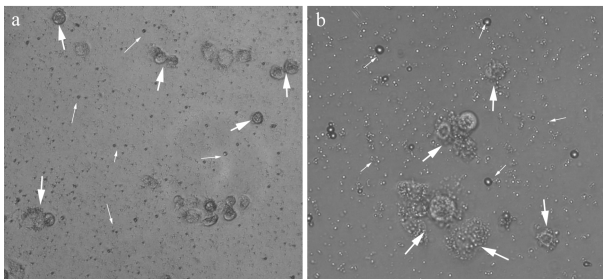


图 5 姜黄素衍生物 Cur-OA₂ 处理后细胞形态变化图

a 图为放大 200 倍, b 图为放大 400 倍拍摄; 图中白色大箭头指示细胞摄取大量药物颗粒后皱缩, 白色小箭头指示为药物自组装形成的细小颗粒; 16 μmol·L⁻¹ 处理 48 h

Fig 5 Morphology changes of cells after the exposure to curcumin derivative Cur-OA₂

graph a is taken at ×200 magnification, so as ×400 magnification to the graph b. In Diagram, big white arrow indicated cells absorbed a large number of drug particles and with significant morphology change(shrinkage); small white arrow showed that the drug self-assembled into tiny particles; pictures were taken after 48 hours treatment with 16 μmol·L⁻¹ Cur-OA₂

4 讨论

姜黄素具有抗肿瘤、抗炎、抗动脉粥样硬化、抗病毒、抗老年痴呆等多种药理活性,但由于存在诸多不足,限制了其进一步临床开发应用^[11]。为促进姜黄素的临床应用,不少学者对其结构进行了修饰和改造,所制备的衍生物或类似物相比姜黄素,稳定性有所提高,但在活性方面大多仍然不及原姜黄素^[12],所以,至今仍然未见姜黄素及其衍生物新药批准进入临床。

从姜黄素相关代谢文献资料看,致使姜黄素无法发挥药效主要与以下几方面相关:①稳定性差:37℃,pH 7.2 的 PBS 中,30 min 即有 90% 左右被降解^[13];②口服吸收差:大鼠口服姜黄素 1 g·kg⁻¹,其中 75% 经粪便排出,尿液中几乎检测不到姜黄素^[14];③代谢转化迅速:人肝细胞或肝脏和肠微粒体可在几分钟内完全转化姜黄素^[15]。大鼠口服姜黄素,其血浆中几乎检测不到姜黄素,但检测到高浓度的姜黄素葡萄糖醛酸和磺酸化衍生物^[16]。Shoba 等^[17]研究发现,苯哌丙烷可以通过抑制外源微生物产生的葡萄糖醛基转移酶活性,使姜黄素口服生物利用度提高 154%。另外有研究表明,姜黄素酚羟基对姜黄素稳定性起关键作用^[13],而姜黄素体内代谢转化产物,大部分也是通过酚羟基葡萄糖醛酸化或磺酸化等而被清除^[16]。因此,对其酚羟基进行适当修饰加以保护有可能可以增加其稳定性,延长体内循环半衰期。而酚羟基又是姜黄素发挥药效的重要基团^[12],姜黄素修饰物必需在合适的时间地点,以合适的速度释放出姜黄素方能发挥疗效。

为此,本研究合成了 3 个姜黄素衍生物,并对其在人肝癌细胞培养上清液中的药代动力学进行了初步考察;3 个衍生物均为载体通过酯键与姜黄素相连,而机体内尤其肝脏组织存在大量酯酶,理论上可以通过酶解释放姜黄素。结果表明,3 个衍生物在上述条件培养液中均能得到有效释放,其中 mPEG_{2k}-Gly-Cur 和 mPEG_{2k}-Gly-Cur-OA 在孵育 90 min 后即有超过 50% 的姜黄素得到释放,4 h 左右绝大部分已经释放;但 Cur-OA₂ 8 h 才 50% 左右释放,这可能是因为助溶剂吐温-80 和 Cur-OA₂ 形成微粒,使得酯酶难以接近,致使其释放速度仍然较慢有关;而对比分析灭活细胞培养上清液中各药物释放情况,可知酶促反应对姜黄素释放起到了重要作用。

体外药效是评价体内疗效的重要参考依据。MTT 结果表明,3 个姜黄素衍生物体外对 HepG2 均具有较好的生长抑制作用,但在相同浓度,处理相同时间条件下,其抑制作用不如游离姜黄素,表现为减毒效应,这和类似文献报道一致^[18]。理论而言,释放药物速度越快,体外对细胞生长抑制越明显,然而事实并未完全如此。在加药后 12 h 观察,只有 Cur 6 μmol·L⁻¹ 以上浓度处理组细胞形态发生明显变化;24 h 后观察 Cur 4 μmol·L⁻¹ 以上浓度及 mPEG_{2k}-Gly-Cur 和 mPEG_{2k}-Gly-Cur-OA 15 μmol·L⁻¹ 以上浓度已表现出明显的生长抑制现象,而衍生物 Cur-OA₂ 只有最高浓度处理组有一定生长抑制作用;36 h 后观察,前 3 种药物各浓度对 HepG2 细胞生长抑制明显,并呈现浓度梯度效应,而此时,衍生物 Cur-OA₂ 12 μmol·L⁻¹ 以上浓度才开始表现出明显的生长抑制和细胞形态变化;上述各处理组细胞数目及形态变化基本和理论药物释放速度及前述各药物在细胞培养上清液中的释放曲线有一定的对应关系,但药物处理 48 h 后观察,发现前 3 组药物作用变化不大,但衍生物 Cur-OA₂ 各浓度处理组均表现出了明显的生长抑制作用,并且 12 μmol·L⁻¹ 以上浓度处理组细胞形态变化非常明显,而残余细胞数也明显少于姜黄素另外两个 PEG 衍生物,此时,衍生物 Cur-OA₂ 反而表现出比 mPEG_{2k}-Gly-Cur 和 mPEG_{2k}-Gly-Cur-OA 更好的抑制活性,这一点是难以用药物释放曲线得到解释的。显微跟踪观察发现,Cur-OA₂ 加药 24 h 后开始出现大量极细小黄色药物颗粒,并开始吸附于细胞表面,随着处理时间延长,药物颗粒明显增大、变多,并大量吸附于细胞表面(见图 5),预计这些颗粒可以通过细胞吞噬摄取,并在细胞内释放出姜黄素而发挥药效,从而表现出上述效应;这可能也与肝脏是脂质代谢中枢,油酸酯化后易于被肝细胞转化释放出姜黄素发挥药效有关;而这一特性正好在一定程度上说明了 Cur-OA₂ 在小鼠体内肝脏中大量富集并长时间维持较高姜黄素浓度的原因。当然,为何 Cur-OA₂ 不能在短时间处理时发挥药效,可能是由于其水溶性太差,吐温助溶后加药,药物并非以单分子状态分散在培养液中,而极可能和吐温自组装形成普通光镜下难以看到的极细小的药物颗粒形式存在,而吐温末端的 PEG 链使得肝癌细胞不能立即对其摄取;随着培养时间延长,在培养液中各

种因素的作用下,颗粒慢慢聚集变大,因此在 24 h 后显微镜下可见大量细小黄色药物颗粒,并开始沉降吸附在肝癌细胞表面,48 h 后这一现象更为明显,然后在细胞吞噬作用下大量摄取药物颗粒,并在细胞内相关酶系统作用下瞬间释放出大量游离姜黄素,而表现出强烈的细胞杀伤效应,或许这一观点可以解释衍生物 Cur-OA₂ 上述作用现象。

REFERENCES

- [1] SHARMA R A, GESCHER A J, STEWARD W P. Curcumin: the story so far [J]. *Eur J Cancer*, 2005, 41(13): 1955-1968.
- [2] YU M R, JIANG F S, DING Z S. Advances in studies on curcumin [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2009, 40(5): 828-831.
- [3] BACHMEIER B E, KILLIAN P, PFEFFER U, et al. Novel aspects for the application of curcumin in chemoprevention of various cancers [J]. *Front Biosci* (Schol Ed), 2010(2): 697-717.
- [4] ZHENG S S, LI X Y, WANG Z S. Curcumin loaded PCL-PEG-PCL nanoparticle: preparation, characterization and *in vitro* release study [J]. *China J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2012, 29(6): 513-516.
- [5] LI Y, WANG P. Neuroprotective effects of curcumin [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2009, 34(24): 3173-3175.
- [6] JIANG F S, YU T T, LIU X, et al. Biodistribution of curcumin and its derivatives new aspects for curcumin administration. 2011 International Conference on Remote Sensing, Environment and Transportation Engineering [C]. IEEE, 2011: 3878-3881.
- [7] MA Z, SHAYEGANPOUR A, BROCKS D R, et al. High-performance liquid chromatography analysis of curcumin in rat plasma: application to pharmacokinetics of polymeric micellar formulation of curcumin [J]. *Biomed Chromatogr*, 2007, 21(5): 546-552.
- [8] GU J J, DENG Y J, WANG H, et al. Determination of curcumin in rat plasma by RP-HPLC [J]. *J Chengdu Med Col*(成都医学院学报), 2009, 4(4): 241-244.
- [9] SCHIAVON O, PASUT G, MORO S, et al. PEG-Ara-C conjugates for controlled release [J]. *Eur J Med Chem*, 2004, 39(2): 123-133.
- [10] WANG Y, LI L, JIANG W, et al. Synthesis and evaluation of a DHA and 10-hydroxycamptothecin conjugate [J]. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13(19): 5592-5599.
- [11] ANAND P, KUNNUMAKKARA A B, NEWMAN R A, et al. Bioavailability of curcumin: problems and promises [J]. *Mol Pharm*, 2007, 4(6): 807-818.
- [12] WEI X CH, DU Z Y, TU Z Q, et al. Advances in the research of structure-activity relationship of curcumin derivatives and analogues [J]. *Chem Res Appl*(化学研究与应用), 2010, 22(5): 527-538.
- [13] WANG Y J, PAN M H, CHENG A L, et al. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 1997, 15(12): 1867-1876.
- [14] WAHLSTRÖM B, BLENNOW G. A study on the fate of curcumin in the rat [J]. *Acta Pharmacol Toxicol*, 1978, 43(2): 86-92.
- [15] IRESON C R, JONES D J, ORR S, et al. Metabolism of the cancer chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine [J]. *Cancer Epidem Biomar Prevent*, 2002, 11(1): 97-104.
- [16] IRESON C, ORR S, JONES D J, et al. Characterization of metabolites of the chemopreventive agent curcumin in humans and rat hepatocytes and in the rat *in vivo*, and evaluation of their ability to inhibit phorbol ester-induced prostaglandin E₂ production [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(3): 1058-1064.
- [17] SHOBA G, JOY D, JOSEPH T, et al. Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers [J]. *Planta Med*, 1998, 64(4): 353-356.
- [18] SCHIAVON O, PASUT G, MORO S, et al. PEG-Ara-C conjugates for controlled release [J]. *Eur J Med Chem*, 2004, 39(2): 123-133.

收稿日期: 2012-06-12

溴吡斯的明血药浓度的 HPLC-MS/MS 测定及其在人体的药动学研究

张照伟, 周虹云* (浙江省金华市中心医院, 浙江 金华 321000)

摘要: 目的 建立 HPLC-MS/MS 测定人血浆中溴吡斯的明的药物浓度, 并研究溴吡斯的明片在健康人体内的药动学。方法 采用 HPLC-MS/MS 检测法, 用乙腈沉淀蛋白法处理血浆样本。采用 Shimadzu Shim-Pack VP-ODS 色谱柱(150 mm×2.0 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水(含 5 mmol·L⁻¹ 醋酸铵和 0.1% 甲酸), 梯度洗脱; 流速: 0.2 mL·min⁻¹; 采用三重四级杆质谱仪, 电喷雾离子源, 正离子模式, 选择性离子检测, 溴吡斯的明和内标新斯的明的检测离子分别为 *m/z* 181.1→72.2, *m/z* 223.1→208.1。20 名健康受试者口服溴吡斯的明片 60 mg 后, 在不同时间点采集血浆样品, 采用建立的 HPLC-MS/MS 条件测定溴吡斯的明血药浓度, 计算药动学参数。结果 溴吡斯的明血药浓度在 0.5~100 ng·min⁻¹ 内样品峰面积比与浓度线性关系良好(*r*=0.996 9), 绝对回收率, 日内、日间精密度, 冷冻、冻融、室温稳定性均符合生物样品分析要求。20 名

作者简介: 张照伟, 女, 硕士, 药师 Tel: 15058504824 E-mail: quhaizhijia@163.com *通信作者: 周虹云, 男, 主管药师 Tel: (0579)82552138 E-mail: hongyunzhou74@163.com