新型姜黄素纳米粒在小鼠体内组织分布的研究

俞婷婷¹,郑英¹,丁志山²,郭胜才¹,付再林¹,蒋福升^{2*}(1.中国人民解放军第一一七医院,杭州 310004;2.浙江中医 药大学,杭州 310053)

摘要:目的 制备新型姜黄素油酸复合物肝靶向纳米粒[Cur(OA)₂-NPs],并对其小鼠体内组织分布进行研究。方法 基于 前期工作按最佳工艺,应用改良的溶剂挥发法制备 Cur(OA)₂-NPs 并进行表征;以 25 mg·kg⁻¹ 小鼠尾静脉注射 Cur(OA)₂-NPs,分别于给药后 0.05,0.25,0.75,2,4,6,8,12 h,经眼球取血 200 µL,小鼠解剖后取肝脏、心脏、脾 脏、肺脏、肾脏和脑,经过液-液萃取法提取药物,HPLC 测定姜黄素油酸[Cur(OA)₂]和姜黄素(Cur)的含量,分析 Cur(OA)₂-NPs 体内组织分布和药物释放特性;将 Cur(OA)₂ 和 DiR 荧光染料包裹到 mPEG₅₀₀₀-PLGA 中制得纳米粒,按 Cur 剂量 25 mg·kg⁻¹ 通过静脉注射给予正常小鼠和 H22 荷瘤小鼠,于不同时间点麻醉小鼠,将其置于 785 nm 激发波和 820 nm 发射波形成的活体红外成像系统中扫描成像,研究正常小鼠和 H22 荷瘤小鼠体内纳米粒的肿瘤靶向性特征。结果 纳米 粒呈圆形,大小均匀,平均粒径为(93.39±1.71)nm,载药量为(19.35±0.12)%,包封率为(92.32±3.13)%。血浆中除脑组织外 其余组织均可检测到 Cur(OA)₂分布,分布迅速,Cur(OA)₂浓度4h内从 310.33 µg·mL⁻¹减少到 28.94 µg·mL⁻¹,近 90%从 血管中被清除,肝脏中含量最高可达 368.93 µg·g⁻¹;肝脏、脾脏和肾脏可检测到 Cur,分别为 125.72,33.60,16.81 µg·g⁻¹, 而血浆、肺脏和脑中则无。纳米粒静脉注射后 2h左右出现峰值,其中肝脏 Cur(OA)₂和 Cur 的浓度最高;活体成像结果 也表明,小鼠体内纳米粒主要分布于肝脏和肿瘤部位,肝脏 2h左右达到峰值随后慢慢下降,而肿瘤组织 8h左右可见强 风荧光,并于 12h左右达到峰值,随后缓慢下降,且其荧光强度显著强于肝脏部位。结论 本研究完善了 Cur(OA)₂-NPs 的评价,为进一步研究其体内抗肿瘤作用奠定了良好的基础,也为难溶的、口服生物利用度低的药物开发提供了解决思路。 关键词: 姜黄素油酸复合物; mPEG₅₀₀₀-PLGA;纳米粒;体肉组织分布

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)03-0261-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.03.001

引用本文:俞婷婷,郑英,丁志山,等. 新型姜黄素纳米粒在小鼠体内组织分布的研究[J]. 中国现代应用药学,2019,36(3): 261-268.

Research on Tissue Distribution of Novel Curcumin Nanoparticles in Mice

YU Tingting¹, ZHENG Ying¹, DING Zhishan², GUO Shengcai¹, FU Zailin¹, JIANG Fusheng^{2*}(1.The 117th Hospital of PLA, Hangzhou 310004, China; 2.Zhejiang Traditional Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare the novel liver-targeting $Cur(OA)_2$ nanoparticles ($Cur(OA)_2$ -NPs) and investigate the tissue distribution in mice. **METHODS** $Cur(OA)_2$ loaded mPEG₅₀₀₀-PLGA nanoparticles were prepared by the modified emulsion solvent evaporation method according to the optimized technology and the $Cur(OA)_2$ -NPs were characterized. 25 mg·kg⁻¹ of $Cur(OA)_2$ -NPs was intravenously injected. At the 0.05, 0.25, 0.75, 2, 4, 6, 8, 12 h after administration, 200 µL of blood was taken through the eyeball. The organs(liver, heart, spleen, lung, kidney and brain) were harvested for the measurment of $Cur(OA)_2$ and curcumin(Cur) with HPLC method after extracting the drug by liquid-liquid extraction method, then analysized the tissue distribution and drug released *in vivo*. Nanoparticles were prepared by loading DiR and $Cur(OA)_2$ into mPEG₅₀₀₀-PLGA. Normal and H22 cancer model mice were injected at a dose of 25 mg·kg⁻¹ of Cur intravenously. At different time intervals, the mice were anesthetized and scanned by using an *in vivo* NIR optical imaging system with an excitation bandpass filter at 785 nm and an emission filter at 820 nm. Studied the tumor targeting characteristics of nanoparticles in normal mice and H22 cancer model mice. **RESULTS** The nanoparticles were spherical with uniform size. The average particle size, drug loading and encapsulation efficiency of nanoparticles were (93.39±1.71)nm, (19.35±0.12)% and (92.32±3.13)% respectively. After intravenous injection, the Cur(OA)₂ in the plasma reduced from 310.33 µg·mL⁻¹ to 28.94 µg·mL⁻¹ within 4 h, and 90% of Cur(OA)₂ was cleared from blood vessel rapidly. The results in the tissue distribution showed that Cur(OA)₂ was found in other

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

作者简介:俞婷婷,女,硕士 Tel: 18768157452 E-mail: yutingting.0618@163.com ^{*}通信作者: 蒋福升,男,博士 Tel: 13184220302 E-mail: zjtcmdzs@sohu.com

中国现代应用药学 2019 年 2 月第 36 卷第 3 期

organs besides brain. $\operatorname{Cur}(OA)_2$ reached the highest level of 368.93 $\mu g \cdot g^{-1}$ in liver. There was no Cur detected in plasma, lung and brain, but only detected in the liver(125.72 $\mu g \cdot g^{-1}$), spleen(33.60 $\mu g \cdot g^{-1}$) and kidney(16.81 $\mu g \cdot g^{-1}$). The peak value was found at the 2nd hour after intravenous injection $\operatorname{Cur}(OA)_2$ -NPs, and the $\operatorname{Cur}(OA)_2$ and Cur in the liver were greater than the other organs significantly. *In vivo* NIR optical imaging system provided evidence that $\operatorname{Cur}(OA)_2$ -NPs were accumulated in the liver and tumor, the NIR signal reached the climax at the 2nd hour and decreased slowly as time went by, and we observed a strong NIR signal in the tumor mass at the 8th hour after the administration of nanoparticles. The signal intensity reached the climax in the tumor mass at the 12th hour and decreased follow, and it was stronger than liver significantly. **CONCLUSION** This research completed the evaluation of $\operatorname{Cur}(OA)_2$ -NPs and laid the foundation for research on anti-tumor of $\operatorname{Cur}(OA)_2$ -NPs *in vivo* in future. Meanwhile, it can offer some clue for developing a new drug which is insoluble, easily metabolic or toxic *in vivo*. **KEYWORDS:** $\operatorname{Cur}(OA)_2$; mPEG₅₀₀₀-PLGA; nanoparticles; tissue distribution *in vivo*

肝癌是一种消化系统常见的恶性肿瘤,发病率位居恶性肿瘤的第5位^[1],死亡率居第2位^[2], 我国每年约有40万人死于肝癌,占全球肝癌死亡 人数的50%左右,且呈逐年增长的趋势^[3]。传统抗 肝癌化学药物虽能抑制、杀死癌细胞,但其不良 反应大大限制了疗效,甚至在延长肝癌患者生命 期方面也显得非常有限,更有甚者反倒严重降低 了患者生活质量。

姜黄素(curcumin, Cur)是从姜科姜黄属植物的根茎中提取的一种天然化合物,药理活性广泛、抗癌谱广、不良反应小^[4-5],可诱导肝癌细胞凋亡,抑制其生长、增殖、转移和血管生长等^[6-8],体外抗肿瘤活性非常强,是一种潜在治疗肝癌的化疗药物,但是其体内稳定性、水溶性差,口服生物利用度低^[9],体内抗肿瘤疗效非常有限^[10],在肝脏的代谢尤为迅速^[10]。为克服 Cur 水溶性、稳定性差,Cur 纳米粒制剂包封率低、载药量不高等问题。前期工作中^[11-12]以 mPEG₅₀₀₀-PLGA 为载体将 Cur 经油酸修饰后合成了姜黄素-(油酸)2 复合物[Cur(OA)₂],制备了纳米粒[Cur(OA)₂-NPs],显著提高了 Cur 的稳定性,其载药量较高,释放时间长;且体外药效学研究结果表明所制备的纳米粒仍然具有较好的抗 HepG2 增殖活性。

因此,为了深入探讨 Cur(OA)₂-NPs 的肝靶向性,本研究继续对其体内分布情况进行研究,从而进一步完善对 Cur(OA)₂-NPs 的评价。

1 材料

1.1 仪器

UV-Vis3000 型紫外可见分光光度计(上海迪 诺力泰仪器设备有限公司);磁力加热搅拌器(德国 IKA 集团); SHZ-III 循环水式真空泵(巩仪市英峪 予华仪器厂);冷冻超速离心机(Thermo Electron 公 司); H-7650 透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司); Zetasizer Nano ZS90 激光粒度测定仪(英国 Marlven 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); Odyssey 红外成像系统 (美国 LI-COR 公司)。

1.2 药物与试剂

油酸(杭州双林化工试剂厂,批号: Q/YSH09-93);姜黄素(美国 Sigma 公司,批号: 293963);单甲氧基聚乙二醇-聚(乳酸-乙醇酸)共聚 物[mPEG₅₀₀₀-PLGA,mPEG₅₀₀₀相对分子质量为 5000,mPEG50004%,乳酸-乙醇酸(LA-GA,55: 45),济南岱罡生物科技有限公司];硅胶 H(上海 泸峰生物科技有限公司);DiR 染料,DilC18(7)(美 国 Gene 公司,批号:FP-69084A);四氢呋喃(THF, 天津市永大化学试剂厂,批号:20130229)。

1.3 动物与细胞

昆明种小鼠, ♂, 体质量 18~22 g, 购自浙江 中医药大学实验动物研究中心, 合格证号: SCXK(沪)2013-0016; H22 细胞购自中国科学院细 胞库。

2 方法与结果

2.1 Cur(OA)₂-NPs 的制备及表征

2.1.1 Cur(OA)₂-NPs 的制备 按最佳工艺应用改良的溶剂挥发法制备 Cur(OA)₂-NPs。

2.1.2 纳米粒的粒径及 Zeta 电位的测定 取适量 纳米粒混悬液,用 Nano ZS90 测定纳米粒的粒径 及 Zeta 电位,重复 3 次取平均值。Cur(OA)₂-NPs 平均粒径分布图和透射电子显微镜下纳米粒的形 态图见图 1,粒径、多分散指数(polydispersity index, PDI)和 Zeta 电位见表 1。

2.1.3 包封率和载药量的测定 分别取浓缩前后 纳米粒混悬液适量,用 THF 溶解,紫外分光光度 计测定得药物总量(*W*_t)。另取纳米粒混悬液经过 20 000 r·min⁻¹超速冷冻离心 40 min 后的上清液进 行测定,得游离药物量(*W*_t),各纳米粒样品重复 3

次。另设制备时加入的药物量为(W_s),则包封 率(%)=(W_t - W_f)/ W_t ×100%;载药量(%)=(W_t - W_f)/ W_s × 100%。计算公式如下:

包封率%= 姜黄素总量-上清液中姜黄素总量 姜黄素总量

载药量%= 姜黄素总量-上清液中姜黄素总量 (姜黄素总量-上清液中姜黄素总量+材料量×100%

浓缩前后 Cur(OA)₂-NPs 的载药量和包封率结 果见表 1。



图1 Cur(OA)₂-NPs 平均粒径分布图和形态图

A-Cur(OA)₂-NPs 所形成的平均粒径分布; B-透射电子显微镜形成的 图形(60 000×)。

Fig. 1 Average size distribution and morphology of Cur(OA)₂-NPs

A-average size distribution of Cur(OA)_2-NPs; B-morphology by transmission electron microscopy(60 000 \times).

表1 浓缩前后 Cur(OA)₂-NPs 的粒径、PDI、Zeta 电位、 载药量和包封率(*x*±*s*, *n*=3)

Tab. 1 Properties of the Cur(OA)₂-NPs before and after condensation($\overline{x} \pm s$, n=3)

组别	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/ mV	载药量/%	包封率/%
浓缩前	93.39±1.71	0.037±0.011	-23.23±2.33	19.35±0.12	92.32±3.13
浓缩后	91.02±1.56	0.036±0.009	-20.18±1.49	18.41±1.02	91.76±1.11

注:浓缩前后 P>0.05。

Note: before and after condensation P>0.05.

2.2 小鼠分组给药及各样本的处理

取小鼠 24 只,体质量 18~22 g,平均分成 8 组, 每组 3 只;每只小鼠按 Cur 剂量 25 mg·kg⁻¹给药, 尾静脉注射,分别于注射后 0.05,0.25,0.75,2, 4,6,8,12 h 取 1 组小鼠,摘眼球取血,放入抗 凝的 EP 管中,3000 r·min⁻¹离心 5 min,取血浆, -80 ℃保存,然后颈椎脱臼处死,解剖取肝、心、 脾、肺、肾和脑,分别称重记录,-80 ℃保存备用。

取 200 μL 血浆放入 EP 管中,加入 400 μL 混 合溶液(氯仿:甲醇=3:7)萃取药物,超声 1 min, 混合均匀,10 000 r·min⁻¹,离心 5 min,取出上清, 将沉淀再加入上述溶剂 400 μL 洗涤,超声 1 min, 10 000 r·min⁻¹,离心 5 min,合并上清液,减压旋 转蒸干,取 200 μL(THF:甲醇=1:1)溶解, 12 000 r·min⁻¹,离心 5 min,取上清液,HPLC 测 定生物样本中的 Cur(OA)₂和 Cur 的含量。各个组

中国现代应用药学 2019 年 2 月第 36 卷第 3 期

织器官加 2 mL PBS 缓冲溶液(pH=7.4),按上述方法提取样品。

2.3 HPLC 测定生物样品中药物含量

2.3.1 色谱条件 HPLC 测定 Cur(OA)₂ 的含量:
Acclaim C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动 相为甲醇-乙酸乙酯(70:30), 流速 1 mL·min⁻¹, 进样体积 10 μL, 检测波长 400 nm, 柱温 30 ℃。

HPLC 测定 Cur 的含量: Acclaim C₁₈色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 µm),流动相为甲醇-0.1%乙 酸水溶液(70:30),流速 1 mL·min⁻¹,进样体积 10 µL; 检测波长 424 nm,柱温 30 ℃。

2.3.2 专属性 按照上述方法处理各样品,进样 后约 9.5 min 出现 Cur(OA)2 色谱峰,约 11.0 min 出现 Cur 色谱峰。血浆以及各组织中物质基本不 干扰 Cur(OA)2 和 Cur 的测定。

2.3.3 Cur(OA)₂ 和 Cur 母液的配制及标准样品的 制备 Cur(OA)₂ 母液的配制:称取 50 mg Cur(OA)₂,用甲醇经超声后溶解,定容至 50 mL, 得浓度 1.0 mg·mL⁻¹母液。工作液的配制:取1.0 mL 母液,稀释定容至 10 mL,得 100 μg·mL⁻¹工作液。 标准样品浓度分别为血浆样本: 22,44,87.5,175, 350,700 μg·mL⁻¹; 肝脏匀浆: 2.75,11,22,44, 220,350 μg·mL⁻¹; 肿脏匀浆: 2.75,11,22,44, 88,220 μg·mL⁻¹; 脾脏匀浆: 2.75,11,22,44, 220,440 μg·mL⁻¹; 肺、肾匀浆: 2,8,16,32, 64,128 μg·mL⁻¹。

Cur 母液的配制:称取 50 mg Cur,用甲醇溶 解,定容至 50 mL,得浓度 1.0 mg·mL⁻¹母液。工 作液的配制:取 1.0 mL 的母液,稀释定容至 10 mL, 得 100 μg·mL⁻¹工作液。标准样品浓度: 2.00, 8.00, 16.00, 32.00, 80.00, 160.00 μg·mL⁻¹。

2.3.4 空白样本处理 取 1 只正常小鼠,摘取眼 球取血,将血液滴入 1.5 mL 离心管(抗凝), 4 000 r·mL⁻¹,离心 10 min 取血浆,备用。小鼠断 颈处死,解剖,取肝、心、脾、肺、肾,分别称 重,加 2 mL PBS 缓冲溶液(pH=7.4)匀浆。

2.3.5 标准曲线的建立 取上述各个浓度的 Cur(OA)₂和 Cur 标准样品 200 μL 与 200 μL 空白 血浆以及肝、心、脾、肺、肾、脑的匀浆液按"2.2" 项下样本处理方法提取上清液。HPLC 测定 Cur(OA)₂和 Cur 的峰面积,以浓度为横坐标,以 峰面积比为纵坐标,进行线性回归。回归方程见 表 2 和表 3。

表 2 Cur(OA)₂在小鼠血、肝、心、脾、肺、肾中标准曲线 Tab. 2 Standard curve of Cur(OA)₂ in blood and different tissues of mice

组织	线性范围/µg·mL ⁻¹	回归方程	R
血浆	22.00~700.00	<i>y</i> =200.810 0 <i>x</i> -5.151 7	0.991 5
肝脏	2.75~350.00	<i>y</i> =639.550 0 <i>x</i> -9.794 4	0.994 9
心脏	2.75~220.00	<i>y</i> =0.063 1 <i>x</i> +0.128 9	0.996 1
脾脏	2.75~440.00	<i>y</i> =0.050 1 <i>x</i> +0.109 4	0.999 0
肺脏	2.00~128.00	<i>y</i> =0.180 0 <i>x</i> +0.149 9	0.996 5
肾脏	2.00~128.00	<i>y</i> =0.066 8 <i>x</i> -0.087 0	0.997 1

表3 Cur在小鼠肝、脾、肾中标准曲线

 Tab. 3
 Standard curve of Cur in liver, spleen and kidney of mice

组织	线性范围/µg·mL ⁻¹	回归方程	R
肝脏	2.0~160.0	<i>y</i> =1.198 0 <i>x</i> +0.553 3	0.999 5
脾脏	2.0~80.0	<i>y</i> =1.137 6 <i>x</i> -0.156 7	0.992 6
肾脏	2.0~80.0	<i>y</i> =1.642 5 <i>x</i> -0.383 2	0.998 5

2.4 萃取回收率

分别取 Cur(OA)₂和 Cur 低、中、高 3 个浓度, 取 3 个标准品 200 µL 与等体积空白血浆以及各组 织匀浆液混合,萃取 Cur(OA)₂和 Cur,用 HPLC 测其含量,每个浓度制备 5 个样品。另取等量的 3 个浓度的标准溶液,用同法测定含量。将样品的 峰面积与同等浓度未经提取处理的标准品峰面积 相比较,计算萃取回收率。萃取回收率: $R=A_T/A_S$, R 为萃取回收率; A_T 为样品经制备处理后的峰面 积; A_S 为未经制备处理的峰面积,结果见表 4 和 表 5。

2.5 Cur(OA)₂和 Cur 测定方法的日内和日间精密 度测定

日内 RSD(即批内 RSD):选择同一分析批次 内的测定结果,计算其 RSD 值。日间 RSD(即批 间 RSD):选择不同分析批次样本,计算所得测定 结果之间的 RSD。对同一个生物样品,设低、中、 高 3 个浓度,每个浓度测 5 次。最后获得小鼠血 浆和肝、心、脾、肾、肺组织匀浆中 Cur(OA)2测 定方法的日内和日间精密度,以及小鼠肝、脾和 肾组织匀浆中 Cur 测定方法的日内和日间精密度。

本实验条件下,小鼠血浆和各组织器官中 Cur(OA)₂ 的日内和日间精密度分别在 0.98%~9.06%和1.89%~8.67%之间;Cur的日内和 日间精密度分别在0.88%~4.32%和2.76%~6.98%。 Cur(OA)₂日内和日间精密度的测定方法回收率分

别在 93.5%~111.5%和 88%~101.5%范围内, Cur 日内和日间精密度的测定方法回收率分别在 94.5%~105.5%和 88%~100.5%, 精密度 RSD≤ 15%,方法回收率≥70%,所建立的方法准确度高, 重复性较好。

表4 小鼠血浆和各组织中 Cur(OA)₂的萃取回收率(*n*=5) **Tab.4** Extraction recoveries of Cur(OA)₂ from plasma and tissues(*n*=5)

生物样本	标示浓度/µg·mL ⁻¹	回收率 $(\bar{x} \pm s)$ /%	RSD/%
	22.00	87.12±2.3	7.8
血浆	87.50	90.23±4.2	5.4
	700.00	85.44±4.5	8.0
	2.75	80.34±8.7	9.2
肝脏	44.00	83.13±6.5	2.4
	350.00	85.22±7.5	6.5
	2.75	90.34±9.1	7.4
心脏	44.00	92.17±8.4	5.4
	220.00	91.78±7.8	4.2
	2.75	86.78±7.6	7.1
脾脏	44.00	89.43±7.7	5.6
	440.00	83.65±6.8	7.8
	2.00	79.89±8.9	8.1
肺脏	32.00	82.14±7.0	2.5
	128.00	75.90±6.8	6.4
	2.00	79.45±3.2	5.7
肾脏	32.00	77.26±4.1	8.6
	128.00	83.34±6.1	6.9

表	5	小	鼠	血头	浆和.	各组	织中	Cur	的萃	取回	收率	(<i>n</i> =5)	

Tab.	5	Extraction	recoveries	of	Cur	from	plasma	and
tissue	es(n=	=5)						

生物样本	标示浓度/µg·mL ⁻¹	回收率 $(\bar{x} \pm s)$ /%	RSD/%
	2	89.12±2.3	8.9
肝脏	32	84.78±4.6	4.4
	160	80.67±6.9	6.3
	2	90.45±8.1	2.5
脾脏	16	89.47±6.1	6.5
	80	85.33±7.2	7.9
	2	88.85±8.1	9.0
肾脏	16	85.76±9.3	2.4
	80	92.14±3.2	4.7

2.6 含量测定

小鼠尾静脉注射 Cur(OA)₂-NPs 溶液后取出各时间点的样品,设空白对照,按"2.2"项下生物样本处理方法提取处理后分别进样,测定Cur(OA)₂和Cur小鼠体内血浆和各组织中的浓度,结果见表 6 和表 7。

表 6 静脉注射 Cur(OA)₂-NPs 后小鼠各个组织中 Cur(OA)₂ 的浓度($\bar{x} \pm s$, n=5)

Tab. 6		Mean concentration of Cur(C	$(A)_2$	in the	plasma and	tissues a	fter iv	nanoparticles i	njection	in mice($\overline{x} \pm s$,	<i>n</i> =5)
--------	--	-----------------------------	---------	--------	------------	-----------	---------	-----------------	----------	----------	------------------------	--------------

时间/b	Cur(OA) ₂ 浓度/µg·g ⁻¹								
HJ [HJ/II	血浆	肝脏	心脏	脾脏	肺脏	肾脏			
0.05	310.33±25.90	209.83±32.21	6.33±1.13	9.91±1.25	95.10±4.89	48.02±3.67			
0.25	245.18±28.39	238.94±43.37	$10.94{\pm}1.00$	32.47±11.58	73.57±17.52	68.22±0.03			
0.75	158.60 ± 8.75	299.75±9.35	23.95±2.82	105.33±8.53	65.60±29.01	81.74±3.88			
2	88.36 ± 8.90	368.93 ± 23.82	13.02 ± 1.72	233.41±9.98	88.36±9.90	87.34±9.95			
4	28.94±1.55	227.80±6.42	10.48 ± 2.20	174.63 ± 8.89	109.75±9.59	28.20±1.14			
6	26.14±0.04	182.83±3.41	6.35 ± 0.90	143.39 ± 6.99	77.46±5.67	22.39±6.72			
8	25.78±0.04	177.80±10.73	$2.89{\pm}0.23$	102.26±5.97	72.88±4.37	18.10±3.01			
12	15.78±0.07	162.14±10.23	1.98±0.42	66.43±6.90	55.04±7.46	15.52±1.24			

表 7 静脉注射 Cur(OA)₂-NPs 后 Cur 在小鼠肝、脾、肾中的浓度($\bar{x} \pm s$, n=5)

Tab. 7 Mean concentration of Cur in the liver, spleen and kidney after iv nanoparticles injection in mice($\overline{x} \pm s$, n=5)

时间ル	Cur 浓度/µg·g ⁻¹						
р ј пј/П —	肝脏	脾脏	肾脏				
0.05	4.12±0.76	$2.96{\pm}0.47$	19.44±0.24				
0.25	6.14±4.20	6.96±1.98	24.78±1.77				
0.75	23.68±12.44	8.43 ± 0.69	28.40±1.30				
2	125.72 ± 7.91	16.81±1.71	33.60±4.39				
4	101.46 ± 8.88	$14.94{\pm}0.28$	10.56±0.84				
6	$62.00{\pm}24.63$	12.76 ± 2.03	9.04±1.65				
8	48.83±4.93	9.43±1.89	8.39±1.28				
12	5.14±1.69	8.32±1.29	5.75±1.24				
			-201000				

2.7 相对分布率的测定

将所测脏器同一时间点的药物含量视为100%,分别计算不同脏器中药物占测得药物的百分比。Cur(OA)₂和 Cur 的相对分布率结果如图 2。



图 2 血浆和各脏器 Cur(OA)₂和 Cur 的相对分布率 Fig. 2 Relative distribution percentage of Cur(OA)₂ and Cur in the plasma and tissues

2.8 Cur(OA)₂-NPs 在正常和荷瘤小鼠体内靶向性 分析

2.8.1 溶液配制 D-Hanks 液配制:称取 NaCl 8.00 g; KCl 0.40 g; Na₂HPO₄·7H₂O 0.06 g; KH₂PO 40.06 g; NaHCO₃ 0.35 g; 酚红 0.02 g,依次溶于

中国现代应用药学 2019 年 2 月第 36 卷第 3 期

约 700 mL 双蒸水中, 定容至 1 000 mL, 充分混匀, 分装入瓶, 包扎, 121 ℃高压灭菌 30 min。

RPMI 1640 培养液的配制:将粉状培养基缓慢 加入约 400 mL 双蒸水中,水温 15 ℃左右,并不 时搅拌使之溶解,同时加入 2 g NaHCO₃,加入双 抗 (终浓度为青霉素 100 U·mL⁻¹ 和链霉素 100 U·mL⁻¹),最后定容至 1 L,用 0.22 μ m 微孔滤 膜过滤除菌,无菌条件下分装入瓶,-20 ℃冰箱保 存 备 用 。使用时 加入 胎 牛 血 清 (终浓度为 10%~20%)。

麻醉剂: 10%水合氯醛溶液,称取 10 g 的水 合氯醛,生理盐水定容至 100 mL。

2.8.2 H22 荷瘤模型(肝癌模型)建立

2.8.2.1 H22 细胞复苏 从液氮中取出 H22 细胞 冻存管、迅速置于 37 ℃温水中不断搅动。使冻存 管中的冻存物在 1 min 内融化。打开冻存管,将细 胞悬液吸至离心管中。1 000 r·min⁻¹离心 10 min, 弃去上清液。沉淀加 2 mL 培养液,吹打均匀,再 离心 10 min,弃上清液。加适当培养基后将细胞 转移至培养瓶中,37 ℃培养,第 2 天观察细胞培 养情况。

2.8.2.2 H22 细胞换液 细胞培养至第 3 天时,培养液颜色变黄,打开培养瓶,将细胞悬液吸至离心管中,1000 r·min⁻¹离心 10 min,弃去上清液。 沉淀加 2 mL 培养液,吹打均匀,加适当培养基后将细胞转移至培养瓶中,37 ℃培养。

2.8.2.3 腹腔培养 将细胞悬液吸到离心管中, 1000 r·min⁻¹离心 10 min,弃去上清液,用生理盐 水稀释调整到 0.6 mL,取 3 只小鼠,每只腹腔注 射细胞悬液 0.2 mL,观察小鼠腹腔培养情况。

2.8.2.4 接种 取腹腔内接种 H22 细胞株 8 d 的小鼠,无菌条件下用 5 mL 注射器抽吸 1~2 mL 牛奶状、较黏稠的腹水,先用 0.4%苔盼蓝染色,计活

细胞率>90%,再用白细胞稀释液计数瘤细胞数, 然后以生理盐水液稀释调整肿瘤细胞浓度为 1.0×10⁷·mL⁻¹,小鼠右前肢腋窝皮下接种每只 0.1 mL。

2.8.2.5 [DiR+Cur(OA)₂]-NPs 的制备及给药 按照 Cur(OA)₂-NPs 的制备方法制备[DiR+Cur(OA)₂]-NPs[用 DiR 和 Cur(OA)₂ 替换 Cur(OA)₂],分别取 1 只正常和荷瘤小鼠,用脱毛膏将腹部的毛发脱去,腹腔注射 10%水合氯醛溶液后,通过静脉按 2 mL·kg⁻¹分别给正常小鼠和 H22 荷瘤小鼠注射 [DiR+Cur(OA)₂]-NPs 0.2 mL,纳米粒中 Cur 浓度 为 25 mg·kg⁻¹。经过不同时间点,将麻醉后的正常 小鼠和 H22 荷瘤小鼠在 785 nm 激发波和 820 nm 发射波形成的活体红外成像系统下扫描。扫描结 束后将小鼠脊柱脱臼处死。

2.8.3 实验结果 正常小鼠:在注射 [DiR+Cur(OA)₂]-NPs后,分别于0.05,0.25,0.75, 2,4,6,8,12h在线检测小鼠肝脏的荧光分布, 肝脏中的荧光强度随着时间的延长,先增强后减弱,另外,肝脏中的相对荧光强度值的变化与 Cur(OA)₂的相对分布率是一致的。结果见图 3~4。

H22 荷瘤小鼠: 在注射[DiR+Cur(OA)₂]-NPs 后,分别于0,8,12,24 h内,在线检测小鼠体 内肝脏和肿瘤部位的荧光强度。发现8h后在肿瘤 部位和肝脏中出现很强的荧光信号,而在12 h肿 瘤部位荧光强度增强,肝脏中荧光强度减弱。活 体成像结果表明随着时间的积累,Cur(OA)₂-NPs 在肿瘤部位会慢慢聚集,而肝脏内则慢慢减少。 结果见图 5~6。



图3 注射[DiR+Cur(OA)₂]-NPs 后 12 h 内正常小鼠体内荧 光图像

Fig. 3 In vivo NIR Fluorescence images of normal mice in 12 h after injection of [DiR+Cur(OA)₂]-NPs



图4 正常小鼠肝脏中相对荧光强度值

Fig. 4 Relative fluorescence intensity values in liver of normal mice



图 5 0, 8, 12, 24 h 内荷瘤小鼠肝脏和肿瘤部位荧光图像 Fig. 5 *In vivo* NIR Fluorescence images of H22 tumor mice in 0, 8, 12, 24 h



图 6 荷瘤小鼠肝脏和肿瘤部位中相对荧光强度值 Fig. 6 Relative fluorescence intensity values in liver and tumor in H22 tumor mice

3 讨论

国内外已有不少有关聚合物纳米粒子制备方 法的报道,包括:溶剂蒸发法、纳米沉淀法、乳 化/溶剂扩散法、盐析法、透析法、超临界流体技 术法等^[13]。但这些方法由于各种原因在实际应用 中受到较大的限制,如盐析法时盐溶液往往与生 物活性分子不相容,制备中有毒有机溶剂的使用, 胶束形成法很难用于聚合物纳米粒的大规模制备 等等^[14]。改良自乳化溶剂挥发方法由 Murakami 等^[15]首次报道,此法将 PLGA 溶于丙酮与乙醇的 混合溶液,替代了原方法中常用的丙酮、二氯甲 烷混合溶液。这种纳米粒子制备过程既避免了二 氯甲烷的使用,降低了毒性,又不使用高能设备,因此聚合物纳米粒子的大规模制备成为可能。本研究在 Murakami 等方法的基础上,以mPEG₅₀₀₀-PLGA 作为载体,用改良的溶剂挥发方法制备纳米粒,包封率较高且粒径均一。

3.1 纳米粒在小鼠体内组织分布特性分析

经静脉注射后,血浆中 Cur(OA)₂在4h内从 310.33 µg·mL⁻¹减少至28.94 µg·mL⁻¹。将近90% 的 Cur(OA)₂从血管中被清除,表明纳米粒在小鼠 体内分布较为迅速。Cur(OA)₂在各个脏器中的分 布是随着时间的延长,先增大后减小,而从注射 后 0.25~12 h内肝脏中 Cur(OA)₂的含量均高于其 他器官,表明了 Cur(OA)₂-NPs 经静脉注射后,大 量分布在肝脏,而其他脏器则少量分布。

Cur(OA)₂分布在肝脏和肾脏的原因可能是这 2个器官是药物代谢和排泄的场所[16]。而有相当一 部分的 Cur(OA); 在脾脏和肺中分布, 因为内皮网 状系统的吞噬细胞可将 Cur(OA)2-NPs 摄取进入脾 脏,而 Cur(OA)2.NPs 经静脉注射后在肺内积累则 由于肺毛细血管床滤过作用[17]。脑组织中没有检 测到 Cur(OA)₂ 的存在,可能是因为血脑屏障 (Blood-Brain Barrier, BBB)阻止了其进入脑组织。 BBB 是介于血液和脑组织之间的对物质通过有选 择性阻碍作用的动态界面,由脑的连续毛细血管 内皮及其细胞间的紧密连接、完整的基膜、周细 胞以及星形胶质细胞脚板围成的神经胶质膜构 成。在生理学方面, BBB 的独特构造只允许对大 脑机能起到重要作用的微粒进入, 它能有效地阻 止水溶性微粒从血液循环进入中枢神经系统[18]。所 用载体 mPEG₅₀₀₀-PLGA 的分子量大,且能溶于水, 因此, Cur(OA)₂-NPs 不能通过 BBB 进入脑组织。 3.2 纳米粒中 Cur 在小鼠体内释放特性分析

从 Cur 释放看, Cur 只在肝脏、肾脏和脾脏中 被检测到,其对应的最高浓度分别为 125.72, 33.60,16.81 μg·g⁻¹;在血浆、肺和脑中检测不到, 这表明肝脏、脾脏和肾脏是主要降解和排泄 Cur(OA)₂的器官。Cur 的浓度在第 2 个小时达到了 最高点(125.72±7.91)μg·g⁻¹,同时 Cur(OA)₂也达到 了最高浓度(368.93±23.82)μg·g⁻¹。这可能是因为肝 脏是脂代谢的中心,在肝脏中酶的作用下油酸从 Cur(OA)₂ 中脱落,释放出 Cur。 3.3 Cur(OA)₂-NPs在正常和H22荷瘤小鼠体内靶 向性分析

在本次实验中,制备的[DiR+Cur(OA)₂]-NPs 用于正常和 H22 荷瘤小鼠体内纳米粒的靶向性分 析,结果表明,正常小鼠体内纳米粒随着时间延 长,会在肝脏中慢慢累积,第2小时达到峰值, 随后荧光强度下降,见图 4。而 H22 荷瘤小鼠体 内,第8小时在肝脏和肿瘤部位均出现较强的荧 光信号,随后肿瘤部位的荧光信号增强,而肝脏 中荧光信号减弱,见图 5,纳米粒表现肿瘤靶向性。 分析其原因,当肿瘤增长到一定程度,氧气和营 养物质供应不足, 会刺激肿瘤释放很多细胞因子 和其他信号分子,能够使肿瘤部位的血管再生。 再生的血管与正常组织的紧密新生血管不同,肿 瘤组织中的再生血管在相邻内皮细胞间有 600~800 nm 的间隙^[19-20],有间隙的血管结构加上 微弱的淋巴引流诱使其渗透和保留效应(enhanced permeability and retention effect, EPR)增强^[21-22]。 通过这些缝隙,纳米粒可以选择性地积累到肿瘤 间质中,从而进入肿瘤实质部位,发挥抗肿瘤作 用^[23]。本研究中所制备的纳米粒是被动靶向制剂, 根据 EPR 效应,纳米粒慢慢累积到肿瘤部位,释 放出 Cur,发挥抗肿瘤活性。

总体上看, 纳米粒主要分布和释放于肝脏、 脾脏和肾脏,且分布和释放浓度峰值均为静脉注 射后 2 h 左右,其中肝脏中浓度显著高于其他脏 器,并有望达到药效浓度。体内组织分布实验证 明, Cur(OA)₂-NPs 经尾静脉注射后, 经过血液循 环迅速分布到各个组织器官。其中,肝脏中含量 最多,其他组织相对少量分布,并且在肝脏中还 检测到相当含量的 Cur。表明 Cur(OA)2修饰后, 在肝脏中能释放出 Cur, 使肝脏中游离 Cur 浓度达 到 125.72 $\mu g \cdot g^{-1}$, 也是 Cur 有望发挥药效的组织浓 度,为下一步体内抗肿瘤作用奠定了基础。从组 织分布特性看,该纳米粒制剂很好地解决了 Cur 口服生物利用度低和体内组织代谢过于迅速的问 题,为进一步研究 Cur(OA)₂-NPs 体内抗肿瘤作用 奠定了良好基础。同时,也为难溶的、口服生物 利用度低的药物开发提供解决思路。

REFERENCES

- [1] MOGHADAM F F. Using Nanoparticles in medicine for liver cancer imaging [J]. Oman Med J, 2017, 32(4): 269-274.
- [2] CASTELLI G, PELOSI E, TESTA U. Liver cancer: molecular

characterization, clonal evolution and cancer stem cells [J]. Cancers(Basel), 2017, 9(9): E127.

- [3] 王峰, 饶伟, 臧运金. 肝癌肝移植的研究现状和进展[J]. 临 床外科杂志, 2017, 25(3): 165-168.
- [4] ANIRUDHAN T S, BINUSREEJAYAN. Dextran based nanosized carrier for the controlled and targeted delivery of curcumin to liver cancer cells [J]. Int J Biol Macromol, 2016, 88: 222-235.
- [5] ZHANG Y J, XIANG H, LIU J S, et al. Study on the mechanism of AMPK signaling pathway and its effect on apoptosis of human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells by curcumin [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(5):1144-1150.
- [6] 张丽君,吴清,张超.姜黄素治疗原发性肝癌作用机制研究 进展[J]. 实用中医药杂志,2017,33(2):209-211.
- [7] TORK O M, KHALEEL E F, ABDELMAQSOUD OM. Altered cell to cell communication, autophagy and mitochondrial dysfunction in a model of hepatocellular carcinoma: potential protective effects of curcumin and stem cell therapy [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(18): 8271-8279.
- [8] ZHENG R, YOU Z, JIA J, et al. Curcumin enhances the antitumor effect of ABT-737 via activation of the ROS-ASK1-JNK pathway in hepatocellular carcinoma cells [J]. Mol Med Rep, 2015, 13(2):1570-1576.
- [9] STROJNY B, GRODZIK M, SAWOSZ E, et al. Diamond nanoparticles modify curcumin activity: *in vitro* studies on cancer and normal cells and in ovo studies on chicken embryo model [J]. PLoS One, 2016, 11(10): e0164637.
- [10] SHARMA R A, GESCHER A J, STEWARD W P. Curcumin: the story so far [J]. Eur J Cancer, 2005, 41(13): 1955-1968.
- [11] LIU N N, JIANG F S, YU T T, et al. Preparation of curcumin-(oleic acid)₂ loaded mPEG₅₀₀₀-PLGA nanoparticles by modified solvent evaporation method [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2013, 44(16): 2223-2229.
- [12] YU T T, JIANG F S, LIU N N, et al. Study on Release and Anti-tumor Effect of Curcumin Derivatives in vitro [J]. Chin J Appl Pharm(中国现代药学杂志), 2013, 30(3): 289-293.
- [13] NAGAVARMA B V N, YADAV H K S, AYAZ A, et al. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles-a review [J]. Pharm Clin Res, 2012, 5(3): 16-23.

- [14] ASL M N, HOSSEINZADEH H. Review of pharmacological effects of Glycyrrhiza sp. and its bioactive compounds [J]. Phytother Res, 2008, 22(6):709-724.
- [15] NEGISHI M, IRIE A, NAGATA N, et al. Specific binding of glycyrrhetinic acid to the rat liver membrane [J]. Biochim Biophys Acta, 1991, 1066(1): 77-82.
- [16] ISHIDA S, SAKIYA Y, ICHIKAWA T, et al. Uptake of glycyrrhizin by isolated rat hepatocytes [J]. Bio pharm bull, 1993, 16(3): 293-297.
- [17] HUANG Y, LIN A H, ZHANG X, et al. Targeting binding of chitosan nanoparticles with glycyrrhizin surface modification to hepatic parenchymal cells *in vitro* [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharm(中药新药与临床药理), 2008, 19(6): 495-498.
- [18] ZU Y G, MENG L, ZHAO X H, et al. Preparation of 10-hydroxycamptothecin-loaded glycyrrhizic acid-conjugated bovine serum albumin nanoparticles for hepatocellular carcinoma-targeted drug delivery [J]. Internat J nanomed, 2013, 8: 1207-1222.
- [19] ZHANG L, ZHOU J P, YAO J. Preparation and properties of paclitaxel-loaded glycyrrhetinic acid-modified hyaluronic acid nanoparticles [J]. J China Pharm Univ(中国药科大学学报). 2012, 43(3):226-230.
- [20] HUANG W, WANG P, WANG WEI, et al. Preparation of glycyrrhetinic acid-modified PEG-PLGA nanoparticles and the affinity evaluation on hepatoma cells [J]. Chem J Chin Univ(高等学校化学学报), 2011, 32(2):416-420.
- [21] GREUPINK R, BAKKER H I, REKER-SMIT C, et al. Studies on the targeted delivery of the antifibrogenic compound mycophenolic acid to the hepatic stellate cell [J]. J hepatol, 2005, 43(5): 884-892.
- [22] ADRIAN J E, KAMPS J A, SCHERPHOF G L, et al. A novel lipid-based drug carrier targeted to the non-parenchymal cells, including hepatic stellate cells, in the fibrotic livers of bile duct ligated rats [J]. Biochim Biophy Acta, 2007, 1768(6): 1430-1439.
- [23] XIE B, JIN S L, TANG C, et al. Effect of Peptide-galactoside-ADM liposome on target therapy of human hepatocellular carcinoma [J]. Progress Mod Biomed(现代生物 医学进展), 2008, 8(3): 441-444.

收稿日期: 2018-05-09 (本文责编: 李艳芳)