

质, 表明 DiI 在 4 °C 条件下能够稳定的包载于 PLGA 和 MePEG-PLGA 纳米粒中, 作为荧光标记物用于纳米粒的细胞摄取及转运实验是可行的。

REFERENCES

- [1] ZHOU S Q, ZHANG Y P. Preparation and surface modification of PLGA nanoparticles [J]. *Chin Hosp Pharm J*(中国医院药学杂志), 2006, 26(1): 72-75.
- [2] LING Y, HUANG Y S, LIANG C Y. Research progress in poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles [J]. *J Clin Rehabil Tiss Eng Res*(中国组织工程研究与临床康复), 2008, 12(10): 1899-1902.
- [3] HE L, HAN R W, TANG X F, et al. Preparation of genistein-loaded MePEG-PLGA nano-micelle and its pharmacokinetics in rats [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2012, 29(6): 477-482.
- [4] ZHANG Y, YUAN C, JIAO J, et al. Preparation of MePEG-PLGA nanoparticles by modified-self-emulsion solvent evaporation method [J]. *J Instrum Anal*(分析测试学报), 2008, 27(9): 960-963.
- [5] FARNAZ E, FATEMEH A, RASSOUL D. Preparation of PLGA nanoparticles using TPGS in the spontaneous emulsification solvent diffusion method [J]. *J Exp Nanosci*, 2007, 2(3): 183-192.
- [6] EINAT C S, MICHAEL C, NICKOLAY K, et al. A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles [J]. *J Control Release*, 2009, 133(2): 90-95.
- [7] NAKANO K, BANDO Y, TOZUK Y A, et al. Cellular interaction of PEGylated PLGA nanospheres with macrophage J774 cells using flow cytometry [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2007, 2(6): 220-226.
- [8] XU H, DENG Y H, CHEN D W, et al. Determination of entrapment efficiency of calcein vesicles using ultrafiltration-UV-VIS method [J]. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2008, 17(2): 150-152.

收稿日期: 2012-01-09

叶酸和聚乙二醇双修饰的壳聚糖纳米粒的制备及其性能表征

谢黎崖¹, 胡权², 吴永良¹, 柯金珍¹, 詹传明², 侯振清^{2*} (1.厦门大学附属第一医院, 福建 厦门 361003; 2.厦门大学生物医学工程研究中心, 福建 厦门 361005)

摘要: 目的 利用离子交联和化学交联相结合的方法制备壳聚糖纳米粒子(NPs), 并对 NPs 分别进行了叶酸(FA)和聚乙二醇(PEG)的修饰。方法 通过红外光谱进行结构验证; 用扫描电镜和粒度分析仪对粒子的微观形态、粒径、电位等进行了表征; 通过与 HeLa 细胞摄取实验对其靶向作用进行验证。结果 离子交联和化学交联相结合的方法制备壳聚糖纳米粒子粒径在 200 nm 左右并且粒径分布窄, 修饰后的 NPs(FA-NPs、PEG-NPs 及 FA+PEG-NPs)粒径不受功能基团修饰的影响。激光共聚焦试验证明 FA-NPs 及 FA+PEG-NPs 能显著提高细胞对粒子的摄取, 而 PEG-NPs 则明显降低其对粒子的摄取。
结论 FA+PEG-NPs 有望成为一种新型的药物载体, 用于抗癌药物对癌细胞的主动靶向。

关键词: 药物释放系统; 壳聚糖; 叶酸; 聚乙二醇; 纳米载体

中图分类号: R943.4 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2013)03-0284-06

Preparation and Characterization of Folic Acid and PEG Conjugated Chitosan Nanoparticles

XIE Liya¹, HU Quan², WU Yongliang¹, KE Jinzhen¹, ZHAN Chuanming², HOU Zhenqing^{2*} (1. First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China; 2. Research Center of Biomedical Engineering of Xiamen University, Xiamen 361005, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE An ionic gelation combined with chemical crosslinking method was developed to prepare chitosan nanoparticles, followed by conjugation with folic acid (FA) and polyethylene glycol (PEG). **METHODS** The structures were verified by infrared spectroscopy. The morphology, diameter and Zeta electric potential of the nanoparticles were assayed by environmental scanning electron microscope and scattering particle analyzer. The specificity of the FA+PEG-NPs targeting cancer cells was demonstrated by human adenocarcinoma HeLa cells. **RESULTS** The chitosan NPs presented a narrow size distribution with an average diameter about 200 nm regardless of the type of functional group. Laser confocal scanning imaging proved that both FA+PEG-NPs and FA-NPs could greatly enhance uptake by HeLa cells. However, the PEG-NPs showed contrary

基金项目: 厦门市科学技术计划资助项目(3502Z20114007)

作者简介: 谢黎崖, 女, 硕士, 副主任药师 Tel: (0592)8851312 E-mail: xly885@163.com *通信作者: 侯振清, 男, 博士, 副教授, 硕导 Tel: (0592)2180686 E-mail: houzhenqing@xmu.edu.cn

results. **CONCLUSION** FA+PEG-NPs can be applied as a new vehicle to actively deliver anticancer drugs to tumor cells.

KEY WORDS: drug release system; chitosan; folic acid; PEG; nanocarriers

恶性肿瘤是严重威胁人类生命的主要疾病。虽然一些小分子抗肿瘤药物具有很高疗效,但也存在很大的不良反应^[1],而传统给药方式通常不能控制释放速率或实现靶向给药,所以寻找合适的材料,选择适当的方法来制备粒径可控、容易功能化的纳米载体,从而得到较好的靶向药物释放体系已成为多领域研究课题。

叶酸(FA)是一种糖基化磷脂肌醇连接的膜糖蛋白,其受体在许多肿瘤细胞中过度表达,而在绝大多数正常组织中几乎不表达,且FA对FA受体具有高度的亲和性,所以可将FA作为抗肿瘤药物的靶向配体^[2]。聚乙二醇(PEG)可以改善载药微粒在体内的停留时间以及稳定性^[3]。PEG接枝可以遮盖部分多肽的抗原决定簇,因此可以降低网状内皮组织的清除率和被免疫系统识别可能性,同时也可以减低被蛋白酶降解的可能性。另一方面PEG化可以提高粒子的粒径,从而降低被肾脏过滤的可能性以及改变在体内的分布^[4]。

壳聚糖(chitosan, CS)作为可降解的高分子生物材料,是制备纳米药物的理想载体。常用的离子凝胶法制备壳聚糖纳米粒(NPs)有着条件温和,操作简单等优点。该法主要是通过CS上质子化的氨基和溶液中的一些阴离子间的静电作用来形成物理交联的纳米粒。其一般不需使用有机溶剂和表面活性剂,影响因素比较简单。但是由于该方法制备的NPs力学强度非常低,限制了其应用^[5]。本研究在离子凝胶法的基础上进行改进,采用离子诱导结合化学交联法,即模板法,先利用三聚磷酸钠(STPP)用离子凝胶法制备物理交联的NPs,然后加入化学交联剂戊二醛(GA)进行固定,对CS进行活性开环聚合和改性,得到稳定的化学交联的纳米粒。之后,进行FA修饰和PEG修饰,再通过必要的表征,确认其结构后,通过激光共聚焦试验验证其基本性能。笔者所在课题组曾发表过其初步研究报告^[6],现将优化后的制备情况作一报道。

1 材料

UV-2550 紫外分光光度计(日本岛津公司); FreeZone 冷冻干燥机(Labconco 公司); JY92-11 细胞破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司); SK8210HP 超

声清洗器(上海汉克科学仪器有限公司); LEO-1530 场发射扫描电镜(德国LEO公司); AVATR 360 红外光谱仪(Nicolet 公司); Nano-zs Zeta 电位-粒度分析仪(Marvent 公司); Leica TCS SP5 激光共聚焦显微镜(德国徕卡显微系统有限公司)。

CS(脱乙酰度>95%,分子量7万,浙江澳兴生物科技有限公司); 三聚磷酸钠(分析纯,西陇化工股份有限公司); 硼氢化钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司); 罗丹明B异硫氰酸酯(生化试剂,上海生工生物工程技术有限公司); FA(分析纯,国药集团化学试剂有限公司); 戊二醛(生化试剂,国药集团化学试剂有限公司); 聚乙二醇-琥珀酰亚胺丙酸酯(PEG-SPA)(分子量2000,嘉兴博美生物技术有限公司); 盐酸碳二亚胺(EDC)(生化试剂,阿拉丁公司)。

2 方法

2.1 空白 NPs 的制备

取 $25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 壳聚糖溶液,调节 pH 到 4.9,剧烈搅拌下,缓慢加入 18 mL, $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 STPP 溶液,按 GA 与氨基 0.6 的比例加入 5% 的 GA 水溶液,搅拌均匀后,放置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 的恒温振荡箱中反应 12 h,反应结束后, $13\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min。收集得到的纳米粒用细胞破碎仪分散到 10 mL 水中,分批加入过量的硼氢化钠反应 10 h,得到稳定的 NPs。离心分离、超声分散、透析,去掉硼氢化钠和 STPP。取 1 mL 的粒子,冷冻干燥,计算粒子浓度。将粒子浓度调节到 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 备用。

2.2 NPs 表面氨基的测定

NPs 表面富含大量氨基,方便于进行纳米粒的功能化和载药,其对制剂的药效起到关键作用,是重要的评价指标。

2.2.1 标准曲线的建立 配制各浓度标准组氨酸溶液,加入 pH 5.4, $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸缓冲液和茚三酮显色液,在 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中加热搅拌 15 min 后,立即用自来水冷却。放置 5 min 后,加入 4 mL 60% 乙醇稀释,充分摇匀,用 60% 乙醇稀释 10 倍后用分光光度计测定光密度 OD 570 nm^[7]。绘制标准曲线。

2.2.2 氨基数量的测定 取 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 待测 NPs 加入 pH 5.4, $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸缓冲液和茚三酮显色液,在 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中加热搅拌 15 min 后,立即用

自来水冷却。放置 5 min 后, 移出至 10 mL 离心管中, 用 1 mL 60%乙醇洗涤圆底烧瓶两次, 合并溶液至离心管中, 13 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收集上清液至烧杯中, 沉淀用 2 mL 60%乙醇清洗 1 次, 离心后合并上清液。最后用 60%乙醇稀释 10 倍后用分光光度计测定(OD 570 nm)。通过标准曲线计算出粒子表面氨基数量。

2.3 NPs 的 FA 修饰

取 5 mL, 10 mg·mL⁻¹ 的 NPs, 加入 1 mL, 5 mg·mL⁻¹ 的 FA 溶液, 然后加入 25 mg 的 EDC 反应 1 h, 得到 FA 修饰的纳米粒。将该粒子溶液于 13 000 r·min⁻¹ 转速下, 离心 30 min。沉淀重新超声分散后备用。

2.4 NPs 的 PEG 修饰

2.4.1 PEG 修饰空白 NPs 取 5 mL, 10 mg·mL⁻¹ 的 NPs, 加入 50 mg 的 PEG-SPA, 室温下反应 4 h。使用截留分子量为 14 000 的透析袋透析, 去掉未反应的 PEG。得到 PEG 修饰的纳米粒。

2.4.2 PEG 修饰 FA 修饰的 NPs 取 2.5 mL, 10 mg·mL⁻¹ FA 修饰的 NPs, 加入 25 mg 的 PEG-SPA, 室温下反应 4 h。使用截留分子量为 14 000 的透析袋透析, 去掉未反应的 PEG。得到 PEG 和 FA 修饰的 NPs。

2.5 不同修饰的壳聚糖纳米粒的表征

2.5.1 红外表征 分别取 1 mL 不同修饰的 NPs 及相关物质于 2 mL 离心管中, 冷冻干燥后经 KBr 压片, 进行红外表征。

2.5.2 粒径和 Zeta 电位表征 取制备好的 NPs, 于纯水中, 稀释到 1 mg·mL⁻¹。进行粒径和电位分析。

2.6 细胞摄取实验

2.6.1 罗丹明 B 标记的纳米粒制备 取 5 mg 罗丹明 B 异硫氰酸酯溶解到 1 mL 无水二甲基亚砜中, 取 200 μL 的该溶液分别加入到 1 mL, 10 mg·mL⁻¹ 的不同修饰的 NPs 溶液中, 然后再加入 1 mL, 2 mol·L⁻¹, pH 9.0, Na₂CO₃/NaHCO₃ 缓冲液, 在 4 °C 冰箱中, 避光反应 12 h。反应结束后, 避光透析去掉未反应的罗丹明 B。最终得到罗丹明标记的纳米粒。

2.6.2 HeLa 细胞对不同修饰的壳聚糖纳米粒的摄取 收集对数期的 HeLa 细胞, 调整细胞浓度至 1 × 10⁵ 个·mL⁻¹。将 HeLa 细胞接种在预处理好的盖玻片上(于 6 孔板中), 将 6 孔培养板置于 37 °C、

5% CO₂ 培养箱中, 待细胞贴壁生长良好时, 用 PBS 洗涤 3 次, 每孔分别加入 0.9 mL 无血清培养基, 再加入 100 μL(1 mg·mL⁻¹)罗丹明标记的纳米粒悬液, 混匀。培养箱共培养 12 h。除去旧培养液, PBS 洗涤 3 次。每孔加入 1 mL 4%多聚甲醛以固定细胞, 室温反应 30 min。除去固定溶液, 使用 DAPI 标记细胞核, PBS 洗涤 3 次。在载玻片加上 1 滴抗淬灭剂, 将上述盖玻片放置于载玻片上, 固定后待测。

3 结果与讨论

3.1 空白 NPs 的制备

制备得到的空白纳米粒子是淡黄色带乳光溶液。虽然制备的纳米粒不是十分规则, 但是扫描电镜中粒径都在 200 nm 以下。结果见图 1。

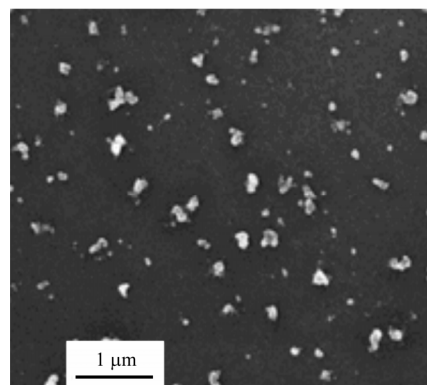


图 1 制备的壳聚糖纳米粒扫描电镜照片
Fig 1 SEM image of chitosan nanoparticles

在使用 STPP 的物理交联阶段, CS 的分子量对粒径有很大的影响, 相同条件下, 分子量大的, 粒径也大。但是, 高分子量的 CS(30 万)随 STPP 的用量急剧增大, 中等分子量的 CS(15 万)变化较小, 而低分子量的 CS(7 万)却是减小。从实际应用上来说, 希望纳米粒子能尽量小, 同时从操作上来说, 希望粒径随 STPP 用量变化不能太剧烈, 所以笔者使用分子量为 7 万的 CS 来制备纳米粒子。pH 对 NPs 的制备也具有很大的影响, 低 pH 条件下, 有利于制备小粒径的 NPs 子, 同时也对粒径随 STPP 用量变化趋势有一定的影响。在使用 GA 的化学交联阶段, 化学交联的引入, 会导致 NPs 粒径的降低, 并且随着 GA 的增加, 粒子收缩的速率也有显著的提高; 在对粒子微观形态的研究中发现, 投入更多的 GA 能减少 NPs 的相互粘连; 在对 NPs 的 pH 敏感性研究中, 发现低度交联的 NPs 就有明显的 pH 敏感性, 并且这种敏感性随交联度

的增加而减弱。

3.2 NPs 表面氨基的测定

根据标准曲线测定发现,随着 GA 用量的增加,粒子表面氨基数量会降低。为了方便实验后续粒子表面的功能修饰和载药,理论上讲,粒子表面氨基数量越多越好。结合 GA 用量对粒子形貌的影响的结果,为了得到相互交联少、表面氨基数量多的纳米粒子,综合考虑,GA 与氨基的摩尔比为 0.6 时为反应最优条件。检测结果表明,该条

件下制备的粒子表面有足够的氨基便于后续的修饰与载药,其氨基浓度为 $9.34 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3.3 FA 和 PEG 修饰

在 EDC 的作用下,FA 分子很容易偶联到纳米粒的氨基上^[8];而 PEG 经过活化,转变为琥珀酰亚胺酯(NHS 酯)以后,在水溶液中,就可以和粒子表面的氨基进行反应^[9]。NPs 溶液与 FA 和 PEG 反应生成 FA-NPs 和 FA+PEG-NPs 的合成路线见图 2。

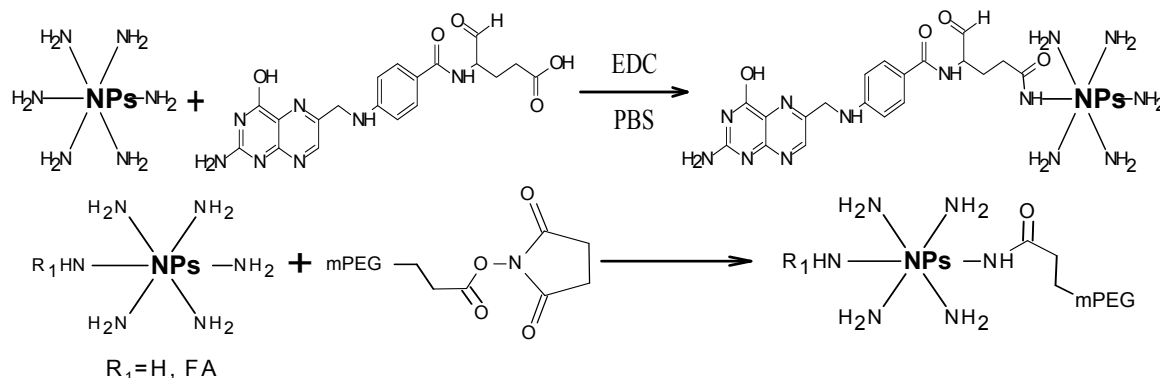


图 2 FA-NPs 及 FA+PEG-NPs 合成路线图

Fig 2 Synthetic route of FA-NPs and FA+PEG-NPs

3.4 不同修饰的 NPs 的表征

3.4.1 红外表征 PEG 修饰的 NPs 及其相关物质的红外图谱见图 3。由结果可知,PEG 修饰的 NPs 红外光谱图基本都保留了 PEG 和空白 NPs 的特征峰。值得注意的是 PEG 在 1740 cm^{-1} 的吸收峰,即 NHS 酯上的羰基峰在 PEG 修饰的 NPs 上消失,显示出 PEG 活性酯有了明显的变化。纳米粒子接枝后的图谱中出现了 PEG 在 1467 cm^{-1} 的 $\delta_{\text{C-H}}$ 特征峰和 1343 cm^{-1} 的酰胺键 $\nu_{\text{C=O}}$ 特征峰,说明 PEG 成功接枝到纳米粒上。

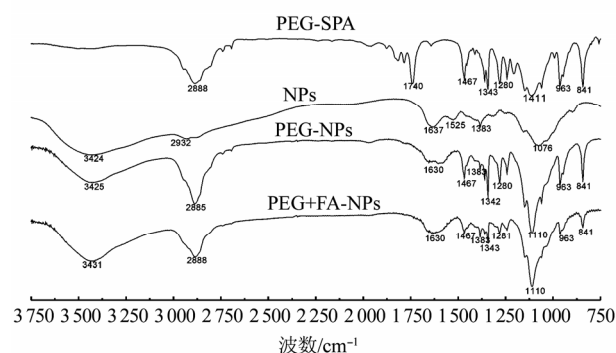


图 3 不同修饰纳米粒子的红外光谱

Fig 3 The FTIR spectroscopy of different modified nanoparticles

3.4.2 粒径和 Zeta 电位表征 不同修饰的 NPs 的粒径分布图见图 4。一些文献报道 PEG 修饰会显著增加粒子的水化半径^[10],而由本试验结果可知,PEG 修饰的 NPs 只是稍微比原来的 NPs 增加了 10 nm 左右。试验中发现水化半径在 220 nm 左右的粒子干燥后在扫描电镜下不足 100 nm,这说明 NPs 在水溶液中是高度扩展的。PEG 的修饰可能会让 NPs 本身做出适当的调整,但不能简单的看作纳米粒子的水化半径和 PEG 的水化半径的加合。

但是 PEG 修饰却对 Zeta 电位产生了强烈的影响,PEG 修饰后 Zeta 电位有了十分明显的下降。PEG 分子连上没有可以电离的基团,其修饰后一般只能使 Zeta 电位的绝对值下降^[11]。这也从另外一个侧面暗示 PEG 修饰是成功的。不同修饰的 NPs 的 Zeta 电位分布图见图 5。

3.5 细胞摄取实验

Hela 细胞对不同修饰的 NPs 的摄取情况见图 6,利用罗丹明 B 标记 NPs,用 DAPI 标记细胞核,其中亮度表示粒子含量的多少。由结果可知,FA+PEG 和 FA 修饰的 NPs 在细胞内部的浓度比单纯 PEG 修饰的和无修饰的 NPs 都要高,而其中以 FA+PEG 修饰的最高。这可能是由于 Hela 细胞表

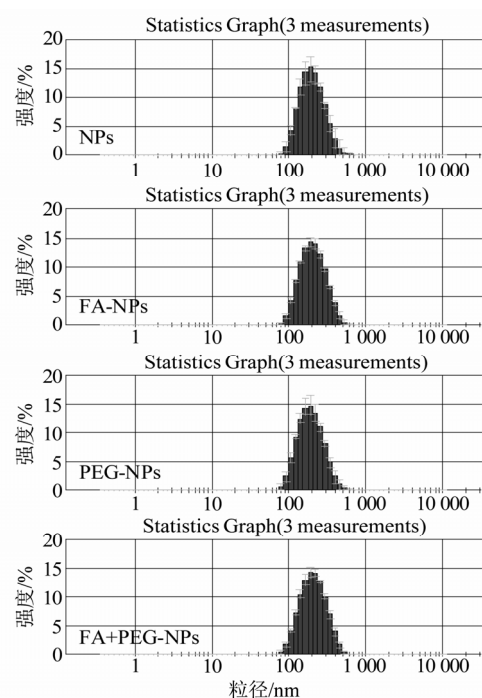


图 4 不同纳米粒子的粒径分布
Fig 4 The size distributions of different nanoparticles

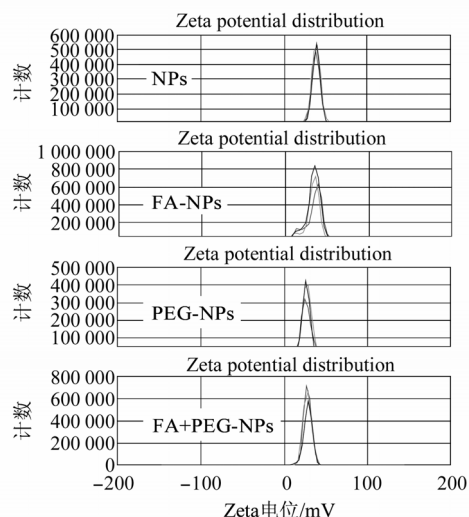


图 5 不同修饰的纳米粒子的 Zeta 电位
Fig 5 The Zeta potential of different nanoparticles

面丰富的 FA 受体与粒子表面的 FA 特异性结合促进了细胞对粒子的摄取。另外，只有 FA 修饰的 NPs 在溶液中容易聚集，而细胞的表面通常是多个 NPs 结合在一起，这就妨碍了细胞对 NPs 的吸收，由于 PEG 的存在使得双修饰的 NPs 不容易聚集，从而更容易被细胞摄取。由结果可知，PEG 修饰的纳米粒子虽然在细胞膜外面具有明显的聚集，但是在细胞核周围的细胞质中的分布却很少，表明 PEG 修饰并不利于细胞对纳米粒子的摄取，这

和 Alisar 之前报道的类似^[12]。对于 CS 的生物相容性，有很多文献资料都验证了其基本没有细胞毒性，在本试验中，经过 12 h 的培养，所有视野中的细胞结构都很完整。

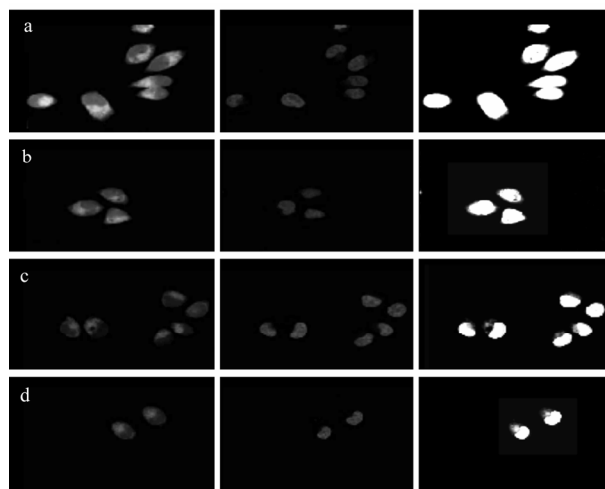


图 6 HeLa 细胞对不同修饰的 NPs 的摄取共聚焦照片，24 h，粒子使用罗丹明 B 标记；细胞核使用 DAPI 标记
a-FA+PEG-NPs; b-FA-NPs; c-NPs; d-PEG-NPs
Fig 6 Confocal images of HeLa cells after incubated 24 h with different modified nanoparticles. The nuclei were stained by DAPI, and the nanoparticles are labeled by Rhodamine B
a-FA+PEG-NPs; b-FA-NPs; c-NPs; d-PEG-NPs

由结果可知，离子诱导结合化学交联法可以制备粒径可控的、具有良好力学性质的 NPs，细胞摄取实验验证了 FA 修饰能显著提高 HeLa 细胞对 NPs 的摄取，但是单纯的 PEG 修饰能降低细胞对粒子的摄取。PEG 的修饰目的主要有 2 个：①增加 NPs 的水溶性使其在溶液中的分散性更好；②注射到体内后可以逃避巨噬细胞的捕获，具有长循环作用。FA 修饰的目的主要是增加肿瘤细胞的摄取。

这一研究结果预示着 FA+PEG-NPs 有望成为一种新型的给药载体，用于载各类抗癌药物，实现对肿瘤细胞的定位传输，为临床癌症治疗提供新的选择。

REFERENCES

- [1] TU Z W, TAO Y F, DONG J, et al. Cytotoxic drugs and its anti-angiogenesis [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(7): 618-622.
- [2] LEAMON C P, LOW P S. Folate-mediated targeting: from diagnostics to drug and gene delivery [J]. Drug Discov Today, 2001, 6(1): 44-51.
- [3] LÜ Q, HAN M, LI L M, et al. Study of doxorubicin liposome

- 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