

· 工艺与制剂 ·

姜黄素偶联 *O*-羧甲基壳聚糖纳米粒的制备及抗癌活性考察

武莹^{1,2}, 杨建设^{1,3*}

(1. 中国科学院兰州化学物理研究所, 兰州 730000; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039;
3. 西北师范大学, 兰州 730070)

[摘要] 目的: 制备姜黄素偶联 *O*-羧甲基壳聚糖纳米粒 (Cur-OMCS) 并考察其对 HepG2 细胞的抑制能力。方法: 通过酯化反应将姜黄素和 *O*-羧甲基壳聚糖键合在一起, 利用紫外、红外、核磁及透射电镜对 Cur-OMCS 进行表征, 通过 MTT 考察 Cur-OMCS 对肿瘤细胞的抑制效果。结果: Cur-OMCS 在水中自组装成纳米粒, 平均粒径 319 nm, 粒径分布指数 0.488, Zeta 电势 -26.1 mV, 水溶液呈黄色澄清透明, 姜黄素在水中质量浓度提高了 300 倍。姜黄素载药量 1.5%, Cur-OMCS 的临界胶束质量浓度 0.040 g·L⁻¹, Cur-OMCS 对 HepG2 细胞的抑制效果明显优于游离姜黄素, 当 Cur-OMCS 中姜黄素质量浓度 15 mg·L⁻¹ 时, 细胞生长抑制率达 80%。结论: Cur-OMCS 在水中可自组装形成纳米粒子, 极大地提高了姜黄素的肿瘤细胞抑制能力。

[关键词] 姜黄素; *O*-羧甲基壳聚糖; 自组装; 纳米粒子; HepG2 细胞; 临界胶束质量浓度

[中图分类号] R283.6; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)19-0001-04

[doi] 10.11653/syfy2013190001

Preparation and Anticancer Activity Investigation of Curcumin Conjugated *O*-Carboxymethyl Chitosan Nanoparticles

WU Ying^{1,2}, YANG Jian-she^{1,3*}

(1. Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;
2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China;
3. Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare curcumin conjugated *O*-carboxymethyl chitosan nanoparticles (Cur-OMCS) and investigate its ability to inhibit HepG2 cells. **Method:** Curcumin was conjugated to *O*-carboxymethyl chitosan by esterification reaction. Cur-OMCS was measured by UV-Vis, IR, NMR and TEM. Anticancer activity of Cur-OMCS was investigated by MTT. **Result:** Cur-OMCS could form nanoparticles by self-assembly in aqueous media with average particle size of 319 nm, particle size distribution index of 0.488, Zeta potential of -26.1 mV and drug loading of 1.5%. The solution showed clear and transparent with yellow. The concentration of curcumin in aqueous media increased 300 times with critical micelle concentration of 0.040 g·L⁻¹. The inhibitory effect on HepG2 cells of Cur-OMCS was much better than that of free curcumin with the cell proliferation inhibition rate of 80% when the concentration of curcumin reached 15 mg·L⁻¹. **Conclusion:** Self-assembled nanoparticles of curcumin conjugated *O*-carboxymethyl chitosan increased anticancer activity of curcumin.

[Key words] curcumin; *O*-carboxymethyl chitosan; self-assemble; nanoparticles; HepG2 cells; critical micelle concentration

[收稿日期] 20130312(017)

[基金项目] 中国科学院“西部之光”项目(Y00420KXG1)

[第一作者] 武莹, 在读硕士, 从事化学学生物学研究, Tel: 0931-4968094, E-mail: wuying_wy@163.com

[通讯作者] * 杨建设, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 从事纳米生物学研究, Tel: 0931-4968094, E-mail: yangjs@impcas.ac.cn

姜黄素是从姜黄根茎中提取的一种脂溶性酚,具有抗肿瘤、抗氧化、保肝、降血脂等药理作用^[1],且对人体无毒副作用^[2]。但姜黄素难溶于水、易被氧化、口服不易吸收,体内生物利用度较低,极大地限制了临床应用^[3-4]。为提高姜黄素的生物利用度,曾将其制备成纳米颗粒^[5]、环糊精包合物^[6]及各种前药^[7-8]。*O*-羧甲基壳聚糖(OMCS)为壳聚糖^[9-10]羧甲基化反应的产物,水溶性大大增加,且保留了壳聚糖的生物黏附性和促吸收性质,作为药物载体材料可达到缓释、控释、靶向给药的目的^[11]。本实验拟制备姜黄素-*O*-羧甲基壳聚糖纳米粒(Cur-OMCS),姜黄素与 OMCS 通过酯化反应键合在一起,形成具有两亲性的聚合物,在水中自组装成纳米粒子,增大姜黄素的水溶性,并提高其抗癌活性,为姜黄素的临床推广提供实验依据。

1 材料

T6 型新世纪紫外-可见分光光度计(北京普析通用公司),IFS120HR 型付里叶变换红外光谱仪(德国 Bruker 公司),INOVA 600MHz 型液体超导核磁共振波谱仪(美国 Agilent 公司),Tecni G² F20 型透射电镜(美国 FEI 公司),Nano ZS 3600 型激光动态散射仪(英国 Malvern 公司),LS-55 型荧光分光光度计(美国 PE 公司),85-2 型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器公司),OKPURE 型实验室超纯水器(上海涑科公司),1500 型全波长酶标仪(美国 Thermo 公司),CKX31SF 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司),SW-CJ-2FD 型洁净工作台(苏州苏净安泰公司)。

O-羧甲基壳聚糖(OMCS,浙江澳兴生物科技有限公司),姜黄素(Cur,阿拉丁试剂公司,批号 44775),4-二甲氨基吡啶(DMAP,国药集团化学试剂有限公司),二环己基碳二亚胺(DCC,上海科丰化学试剂有限公司),二甲基亚砜(DMSO,天津利安隆博华公司),类胎牛血清(兰州荣晔生物科技有限公司),RPMI1640 培养基、磷酸缓冲液(PBS)、胰酶(美国 Hyclone 公司),四甲基偶氮唑蓝(MTT,甘肃鹏程生物公司),其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 Cur-OMCS 的制备^[12] 称取 OMCS 100 mg 溶于 10 mL 水中,加入 DMSO 10 mL,搅拌均匀,分别加入 DCC 和 DMAP 200,20 mg,室温下搅拌 1 h,慢慢滴加姜黄素的 DMSO 溶液 16 mL,在 N₂ 保护下,于 60 °C 加热反应 6 h,冷却至室温,用大量丙酮沉淀并洗涤,得土黄色固体,反应过程见图 1。紫外吸收光谱见图 2A,显示 OMCS 在 400~430 nm 处无吸收

峰,游离姜黄素和 Cur-OMCS 分别在 425,400 nm 处有较强的吸收峰。与 OMCS 的红外吸收光谱(图 2B)相比,Cur-OMCS 在 1 730($\sigma_{C=O}$),2 980(σ_{Ar-H}),1 600,1 500,1 450($\sigma_{ArC=C}$),1 282(σ_{Ar-O})的吸收峰明显增强,说明酯键的形成及 Cur-OMCS 中含有姜黄素。¹H-NMR 谱图(图 3)中 OMCS 的信号为 2.40~2.55(H₂),3.22~3.82(H₁,H₃,H₄,H₅),Cur-OMCS 的峰在 6.29~7.91(ArH)有明显信号,应归属于姜黄素,表明姜黄素与 OMCS 成功的键合在一起。

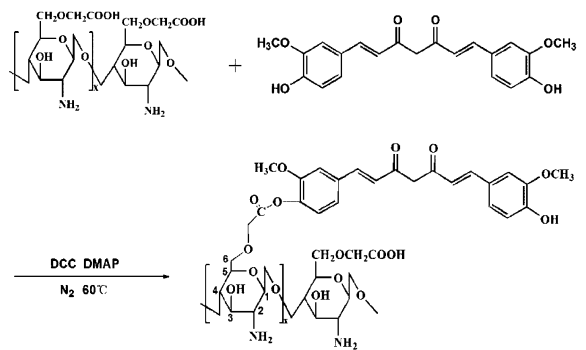


图 1 姜黄素与 OMCS 的反应过程

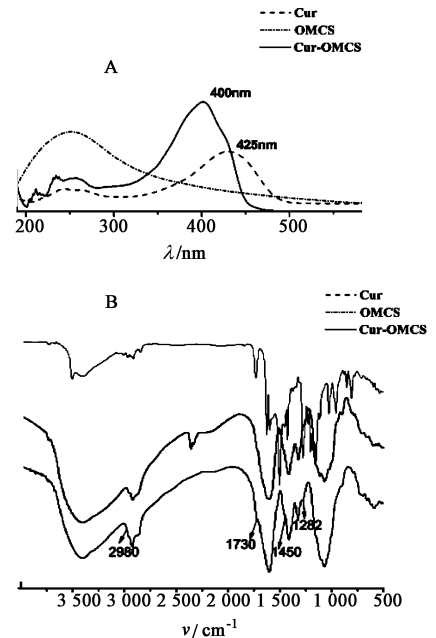
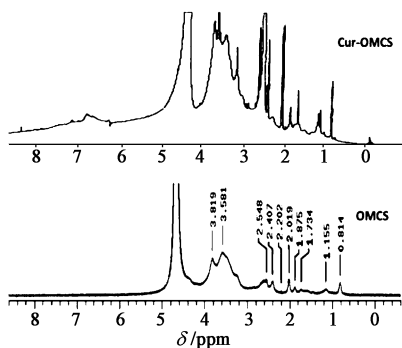


图 2 姜黄素,OMCS 与 Cur-OMCS 的紫外(A)、红外(B)吸收光谱

2.2 姜黄素的含量测定 取一定量姜黄素用丙酮溶解,配置系列质量浓度的姜黄素对照品溶液,于 425 nm 处测定吸光度(A),以质量浓度为横坐标,A 为纵坐标,得回归方程 $Y = 0.136X + 0.01$ ($r = 0.9999$),表明姜黄素在 2~8 mg·L⁻¹与 A 呈良好线性关系。取一定量 Cur-OMCS 溶于一定体积水中,

图3 Cur-OMCS 与 OMCS 的¹H-NMR(D₂O)

于 400 nm 处测定 A , 计算载药量。确定 OMCS 投入量为 100 mg, 考察姜黄素投入量 (100, 250, 500, 500 mg) 及反应时间 (6, 6, 6, 12 h) 对载药量的影响, 结果载药量分别为 0.10%, 0.12%, 0.44%, 1.50%, 与文献中结果基本相同^[12-13]。

2.3 Cur-OMCS 的形态及粒径分布

2.3.1 Cur-OMCS 的分散性 分别取一定量的 Cur-OMCS 与姜黄素溶于水, 观察到 Cur-OMCS 的水溶液呈黄色澄清透明。姜黄素溶液浑浊, 有黄色颗粒悬浮于水中, 水溶性较差。取 Cur-OMCS 5 mg 分散在 0.75 mL 水中, Cur-OMCS 完全溶解, 质量浓度 $6.67 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 相当于姜黄素在水中质量浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 远远大于游离姜黄素在水中的溶解度 ($0.27 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)^[7]。

2.3.2 Cur-OMCS 的形态学考察 配置适当质量浓度的 Cur-OMCS 溶液, 取少量滴加于铜网, 自然晾干, 用透射电子显微镜观察其形态, 见图 4, 显示 Cur-OMCS 的轮廓几乎都是球形, 粒径约 150 nm, 形貌均一。利用激光动态散射仪对 Cur-OMCS 的粒径进行动力学统计, 结果 Cur-OMCS 粒径 319 nm, 粒径分布指数 (PDI) 0.488, 呈正态分布。透射电子显微镜测量样品时, 由于样品的干燥而导致缩水, 故激光动态散射仪测得的纳米粒径明显大于透射电子显微镜中观测的。同时测得 Cur-OMCS 在水中自聚集产生的纳米粒 Zeta 电势 -26.1 mV , 说明 OMCS 中未被姜黄素取代的羧甲基分散在粒子外面, 因而提高了 Cur-OMCS 的水溶性, 使姜黄素在水中质量浓度提高了 300 倍。

2.3.3 Cur-OMCS 的荧光光谱检测 以芘作为荧光探针, 考察 Cur-OMCS 的自聚集行为。取一定量的芘用甲醇溶解, 加至试管中, 真空干燥除去甲醇。将各质量浓度的 Cur-OMCS 水溶液加至含有芘并蒸干甲醇的试管中, 使各试管中芘的终止摩尔浓度为 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。于 $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 下避光加热 3 h, 室温

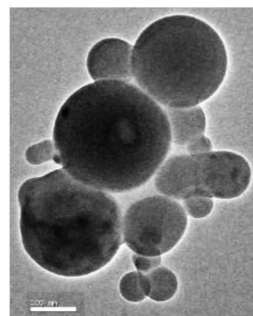
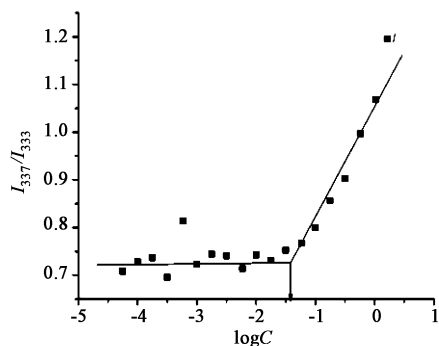


图4 Cur-OMCS 的 TME

下放置过夜, 用荧光分光光度计对上述样品进行荧光强度检测, 结果发现随 Cur-OMCS 质量浓度增加, 芘的荧光强度增加, 且荧光信号峰由 333 nm 迁移至 337 nm。芘的激发光谱中 337 nm 和 333 nm 下的荧光强度比值 (I_{337}/I_{333}) 对应 Cur-OMCS 质量浓度的对数值曲线见图 5, 显示在低质量浓度区域, 芘的荧光强度无明显变化, 当质量浓度超过临界胶束质量浓度后, 荧光强度随聚合物质量浓度增加而呈线性增强, 两条直线交点为 Cur-OMCS 的临界胶束质量浓度 ($0.040 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。

图5 荧光强度比值 (I_{337}/I_{333}) 与 Cur-OMCS 质量浓度的对数值关系曲线

2.4 Cur-OMCS 对 HepG2 细胞的抑制效果 采用 MTT 检测。人肝癌 HepG2 细胞培养在含有 10% 胎牛血清的 1640 培养液中, 在 5% CO_2 , $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 及饱和湿度条件下培养。取对数期细胞, 经消化后用培养液稀释至细胞密度 4×10^4 个/mL, 吹匀后各取细胞悬液 200 μL 于 96 孔板, 置培养箱孵育 24 h 使其贴壁。试验组分别加入不同质量浓度的姜黄素、OMCS 和 Cur-OMCS, 对照组加入等体积培养液, 每组设 5 个平行孔, 在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 的细胞培养箱中培养 24 h。弃去培养液, 用 PBS 200 μL 离心洗涤 1 次, 每孔加入 1640 培养基 190 μL 及 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTT 溶液 10 μL , 继续培养 4 h, 离心去除上层培养液, 在避光条件下, 每孔加入 DMSO 150 μL , 震荡 10 min, 用全自动酶标仪检测 570 nm 处的吸光度 (A_{570}), 计

算细胞生长抑制率,见图 6。

$$\text{细胞生长抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{试验}}) / A_{\text{对照}} \times 100\%$$

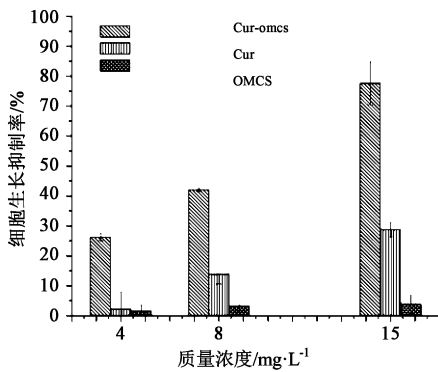


图 6 不同质量浓度 Cur-OMCS、姜黄素和 OMCS 对 HepG2 细胞的生长抑制率

由图 6 可知,OMCS 对 HepG2 细胞几乎无生长抑制作用。姜黄素与 Cur-OMCS 在 3 种质量浓度下对 HepG2 细胞均有生长抑制作用,且在同一质量浓度下, Cur-OMCS 对 HepG2 细胞生长的抑制作用明显优于游离姜黄素,在 Cur-OMCS 含有姜黄素 15 mg·L⁻¹时,细胞生长抑制率达 80%,说明姜黄素肿瘤细胞生长抑制能力得到提高。

3 讨论

姜黄素作为抗癌药物具有很好的应用前景,但其在 水中溶解度较小,导致体内抗肿瘤活性偏低,生物利用度低,极大地限制了临床推广。O-羧甲基壳聚糖的羧基与姜黄素的活性酚羟基在 DMAP 催化下发生酯化反应而键合在一起。Cur-OMCS 既具有姜黄素的疏水部分,又具有壳聚糖亲水骨架,与表面活性剂类似,可在 水中发生自组装,形成粒径 319 nm 的纳米粒,且姜黄素在 水中质量浓度提高了 300 倍。此外,酚羟基为姜黄素的活性基团,酚羟基与 O-羧甲基壳聚糖的偶联未影响姜黄素对肿瘤细胞的抑制能力。Cur-OMCS 水溶性提高,更容易透过细胞膜,通过细胞内吞或其他方式进入细胞后,与细胞内溶酯酶作用,重新释放出游离的姜黄素,从而极大地提高了姜黄素对 HepG2 细胞的生长抑制能力。

[参考文献]

[1] Aggarwal B B, Harikumar K B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41(1):40.

[2] Lao C D, Ruffin M T, Normolle D, et al. Dose escalation of a curcuminoid formulation [J]. *BMC Complementary Altern Med*, 2006, 6(1):10.

[3] Anand P, Kunnumakkara A B, Newman R A, et al. Bioavailability of curcumin; problems and promises [J]. *Mol Pharmacol*, 2007, 4(6):807.

[4] Bar-Sela G, Epelbaum R, Schaffer M. Curcumin as an anti-cancer agent: review of the gap between basic and clinical applications [J]. *Curr Med Chem*, 2010, 17(3):190.

[5] Anand P, Nair H B, Sung B K, et al. Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity *in vitro* and superior bioavailability *in vivo* [J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 79(3):330.

[6] Yallapu M M, Jaggi M, Chauhan S C. Beta-cyclodextrin-curcumin self-assembly enhances curcumin delivery in prostate cancer cells [J]. *Colloids Surf B*, 2010, 79(1):113.

[7] Safavy A, Raisch K P, Mantena S, et al. Design and development of water-soluble curcumin conjugates as potential anticancer agents [J]. *J Med Chem*, 2007, 50(24):6284.

[8] ZHANG F, Koh G Y, Jeansonne D P, et al. A novel solubility-enhanced curcumin formulation showing stability and maintenance of anticancer activity [J]. *J Pharm Sci*, 2011, 100(7):2778.

[9] 林晓洁, 张华, 金少钢, 等. 盐酸青藤碱壳聚糖纳米粒的制备及体外释放性能的研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(4):22.

[10] 童文婷, 刘波, 张睿, 等. 雷公藤甲素叶酸-壳聚糖纳米粒的制备及其释药性能考察 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(22):49.

[11] Upadhyaya L, Singh J, Agarwal V, et al. Biomedical applications of carboxymethyl chitosans [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 91(1):452.

[12] Manju S, Sreenivasan K. Conjugation of curcumin onto hyaluronic acid enhances its aqueous solubility and stability [J]. *J Colloid Interface Sci*, 2011, 359(1):318.

[13] WANG Y S, YANG X Y, YANG J R, et al. Self-assembled nanoparticles of methotrexate conjugated O-carboxymethyl chitosan: preparation, characterization and drug release behavior *in vitro* [J]. *Carbohydr Polym*, 2011, 86(4):1665.

[责任编辑 全燕]