

需要特别注意的是,在使用神经导航的情况下,仍然需要熟悉经蝶入路的各种解剖标志,如中鼻甲、蝶窦开口、梨骨、蝶窦腹侧壁、鞍底、鞍结节和斜坡等,不能一味地相信和依靠导航,并且术中C形X线监测仍然是经蝶手术中迅速判断入路方向最常使用的方法,是经蝶手术中必备的仪器设备之一^[6,7]。本组有2例在术中发现导航探针所示的方向和位置与根据解剖标志判断的不相一致,经过仔细辨认并经术中C型臂X线监测确认后,才进一步手术操作,体现了熟悉掌握解剖标志的重要性,不过这种情况只发生在我们初期使用绷带式导航支架的时候,改用三钉头架固定头部和安装导航支架后,未再出现过导航的定位偏差。总之,神经导航可以使经蝶垂体微腺瘤切除手术准确、安全、微创和有效,增强术者的自信,使术者和参与手术人员避免接触X线造成的辐射损害,也在一定程度上扩大了经蝶垂体微腺瘤切除手术的适应证。

参考文献

- 1 王任直. 垂体腺瘤的规范化诊断和治疗[J]. 中华神经外科杂志, 2006, 22(6): 325-326
- 2 卞留贯, 孙青芳, 沈建康, 等. 垂体 Cushing 病的经蝶手术治疗(附 54 例报告)[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2008, 34(7): 393-396
- 3 暴向阳, 丁学华, 卢亦成, 等. 经蝶手术治疗垂体生长激素腺瘤的长期随访[J]. 中国临床神经外科杂志, 2009, 14(2): 69-71
- 4 许志勤, 苏长保. 垂体腺瘤的诊断和治疗进展[J]. 中华外科杂志, 2006, 44(22): 1560-1562
- 5 Kreutzer J, Fahlbusch R. Diagnosis and treatment of pituitary tumors [J]. *Curr Opin Neurol*, 2004, 17: 693-703
- 6 Hardy J. Frameless stereotaxy for transsphenoidal surgery [J]. *Neurosurgery*, 2000, 46: 1269-1270
- 7 Charalampaki P, Reisch R, Ayad A, et al. Image-guided endonasal transsphenoidal microsurgical treatment of recurrent microadenomas of pituitary gland [J]. *Minimal Invasive Neurosurgery*, 2006, 49: 93-97
- 8 郭剑峰, 王占祥, 谭国伟, 等. 神经导航辅助内镜在切除伴有甲介、鞍前型蝶窦的垂体腺瘤手术中的应用[J]. 中华神经医学杂志, 2007, 6(10): 1012-1014
- 9 Dou W, Lin N, Ma W, et al. Transsphenoidal surgery in a patient with acromegaly and McCune-Albright syndrome: application of neuronavigation [J]. *J Neurosurg*, 2008, 108: 164-169
- 10 朱涛, 张建宁, 张大健. 神经导航下经蝶手术切除垂体微腺瘤. 中华神经外科杂志, 2005, 21(9): 575-576
- 11 赵继宗. 神经外科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 405-419
- 12 许志勤, 苏长保, 任祖渊, 等. 102 例垂体泌乳素微腺瘤经蝶显微手术疗效[J]. 中华神经外科杂志, 2007, 23(9): 659-661
- 13 Kreutzer J, Buslei R, Wallaschofski H, et al. Operative treatment of prolactinomas: indications and results in a current consecutive series of 212 patients [J]. *Eur J Endocrinol*, 2008, 158(1): 11-18
- 14 毛志钢, 王海军, 何东升. 影响垂体生长激素腺瘤经蝶手术疗效的因素分析[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2006, 11(4): 151-153

(收稿: 2011-10-05)

(修回: 2011-10-12)

新型姜黄素纳米粒制备、表征及其体外抗肿瘤活性评价

陈小会 蒋福升 马哲龙 俞婷婷 金波 徐秀玲 施宁川 丁志山

摘要 目的 制备高载药量姜黄素纳米粒,并考察其体外稳定性和抗肿瘤活性。方法 用油酸(OA)对姜黄素(Cur)进行化学修饰。采用改良的溶剂挥发法制备聚乙二醇聚乳酸乙酯(mPEG-PLGA)载 Cur-OA₂ 纳米粒(mPEG-PLGA-Cur-OA₂, PPCO)。并以纳米粒载药量(drug loading, DL)、包封率(entrapment efficiency, EN)为指标,通过3因素3水平正交试验对工艺进行优化。采用正交确定工艺制备3批载药纳米粒,应用动态光散射粒度仪和透射电镜测定载药纳米粒的zeta电位、粒径与形态。采用体外37℃水浴降解特性来评价其稳定性。最后利用MTT法对纳米粒体外抗肿瘤活性进行初步评价。结果 正交实验,包封率影响因素为:有机相与水相的量(B) > 超声时间(C) > 药物与材料比(A)。载药量影响因素为:有机相与水相的量(B) > 药物与材料比(A) > 超声时间(C)。利用正交设计筛选出的方法制备纳米粒,其载药量达(24.870 ± 0.029)% ,包封率为

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y206776);浙江省中医药重点项目研究计划(2005Z001);浙江省教育厅科研项目(Y200805067);浙江省中医药青年基金资助项目(B2005Y030)

作者单位:310053 杭州市第二医院血液科(陈小会);310053 杭州 浙江中医药大学生命科学院(蒋福升、马哲龙、俞婷婷、金波、徐秀玲、施宁川、丁志山)

通讯作者:丁志山,教授,博士,电子邮箱:zjtcmdzs@sohu.com

(81.250 ± 0.101)% ζ 电位 -23.9 ± 1.6 mV, 平均粒径 235.0 ± 25.8 nm, 粒度分布均匀, 呈单峰分布。载药纳米粒在 37°C 前 4h 降解了 20%, 而其后的 70h 里, 只降解了 5% 左右, 相比姜黄素稳定性得到了极大提高。纳米粒体外抗肿瘤活性研究表明, 所制备的纳米粒对 HepG₂ 细胞仍然具有较好的抑制作用, 经 48h 处理后, 其 IC_{50} 为 $40.61 \mu\text{mol/L}$, 但相比姜黄素 $15.76 \mu\text{mol/L}$ 有所下降, 表现为减毒效应。结论 PPCO 纳米粒呈均匀球形、载药量高、稳定性好, 并有较好的体外抗肿瘤活性。

关键词 姜黄素 油酸 聚乙二醇聚乳酸乙酸酯 纳米粒 抗肿瘤

Preparation, Characteristic and Anti-tumor Activity Evaluation of Novel Curcumin Nanoparticle *in vitro* Chen Xiaohui, Jiang Fusheng, Ma Zhelong, Yu Tingting, Jin Bo, Xu Xiuling, Shi Ningchuan, Ding Zhishan. The Second Hospital of Hangzhou Zhejiang 310053, China

Abstract Objective To prepare high Drug-loading curcumin nanoparticles, and evaluate its stability and anti-cancer activity *in vitro*. **Methods** Curcumin (Cur) was chemical modified by oleic acid (OA) to obtain conjugate Cur-OA₂. Modified solvent evaporation method was used to prepare mPEG-PLGA nanoparticles containing Cur-OA₂ (mPEG-PLGA-Cur-OA₂, PPCO). Orthogonal test was adopted to optimize the preparation method with drug loading (DL) and entrapment efficiency (EN) as index. Then three batches of nanoparticles were prepared according the optimized method, and the zeta potential, particle size and morphology of the drug-loaded nanoparticles were analyzed by dynamic light scattering particle size analyzer (DLS) and transmission electron microscopy (TEM). Finally, the stability and anti-tumor activity of the PPCO *in vitro* were evaluated by hydrolysis method and MTT assay respectively. **Results** Orthogonal test indicated that the influencing factor of EN was: the amount of the organic and aqueous (B) > ultrasonic time (C) > drug and material ratio (A); and the influencing factor of DL was: the amount of the organic and aqueous (B) > drug and material ratio (A) > ultrasonic time (C). The PPCO was prepared by optimized method. DLS and TEM revealed that the nanoparticle was rounded and single distributed, with drug loading (24.870 ± 0.029)%, entrapment efficiency (81.250 ± 0.101)%, zeta potential (-23.9 ± 1.6) mV and average particle size (235.0 ± 25.8) nm. PPCO was unstable in 4h, and 20% loaded drug was degraded, but it became very stable in the following 70h under 37°C in water. Eventually, MTT confirmed PPCO still with great inhibition effect on HepG₂ cell lines with $\text{IC}_{50} = 40.61 \mu\text{mol/L}$, lower than that of curcumin ($15.76 \mu\text{mol/L}$). **Conclusion** PPCO nanoparticles had even spherical form, high drug-loading, good stability and great anti-tumor activity *in vitro*.

Key words Curcumin; Oleic Acid; mPEG-PLGA; Nanoparticles; Anti-cancer

姜黄素类是从姜科姜黄属 (curcuma) 植物姜黄、莪术、郁金等的根茎中提取的一种酚性化合物, 也是其中最重要的活性成分^[1]。由于其基本没有毒性, 已被世界卫生组织等批准, 广泛用作各类糖果、糕点、饮料及酒制品的调色剂^[2]。现代药理学表明, 姜黄素具有较强的抗氧化、抗肿瘤、抗炎、保肝等多种活性。尤其是在抗肿瘤方面, 姜黄素可以影响肿瘤发生、发展的各个阶段, 抑制癌细胞的转移、增殖, 特别是对肺癌、肝癌、胃癌有着很好的抑制作用^[3]。姜黄素的作用越来越受到人们的重视, 美国国立肿瘤研究所已将其列为第 3 代癌化学预防药^[4]。

然而随着研究深入, 却发现姜黄素体内外药效差异很大, 分析其可能原因为姜黄素水溶性差, 口服生物利用度低, 而且体内组织代谢转化迅速, 很难在某一特定组织部位维持有效药物浓度^[5]。为此, 已有诸多学者在姜黄素改性及通过各种剂型以期促进姜黄素临床应用方面做了大量工作, 然而至今未有一个姜黄素新药走向市场, 表明姜黄素制剂研发中仍然存在不少问题有待攻克。本实验室自 20 世纪 90 年代着手姜黄素方面研究, 也同样遇到上述问题, 并试

图通过多种途径, 其中如煎药技术, 解决姜黄素新药研发问题, 但结果也不够如意^[6]。不过经过大量实验研究发现, 姜黄素经简单油酸修饰后可以增加其稳定性, 但由于脂溶性大大增强, 不利于水相中分散, 不过却极易与聚乙二醇-聚乳酸聚乙酸酯 (mPEG-PLGA) 形成较高载药量的纳米颗粒。此外, 有研究表明, 油酸修饰药物可以起到增效减毒作用, 而以 mPEG-PLGA 为载体的纳米粒具有明显的肝脏“靶向性”, 同时肝脏也是各种脂类的主要代谢器官, 为此, 姜黄素油酸复合物结合 mPEG-PLGA 纳米粒技术有望能够解决姜黄素稳定性差及体内靶组织不能维持有效药物浓度等问题^[7-9]。

本研究即对上述姜黄素新型纳米粒制备工艺进行系统考察, 并对其体外抗肿瘤活性进行初步评价, 为深入探讨体内药代动力学及药效学研究奠定扎实基础。

材料与方法

1. 材料: 姜黄素 (购自美国 Sigma 公司); 聚乙二醇聚乳酸乙酸酯 [mPEG-PLGA, mPEG 分子质量 2kDa, mPEG 4%, LA/GA (55:45) 济南岱罡生物科技有限公司]; 顺式-9-十八(碳)烯酸 (油酸, 杭州双林化工试剂厂); N,N-二环乙基碳

酰亚胺(DCC, 苏州永拓医药科技有限公司); 4-二甲氨基吡啶(DMAP, 上海宝曼生物科技有限公司); 硅胶 H(上海沪峰生物科技有限公司) 其余试剂均为分析纯。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); R206D 型旋转蒸发器(上海申生科技有限公司); Bruker-AVANCE III 500 型超导高分辨磁共振谱仪(瑞士 Bruker 公司); 90Plus 型动态光散射激光粒度仪(美国布鲁克海文仪器公司); Tecnai G2 F30 S-Twin 高分辨透射电子显微镜(荷兰 Philips-FEI 公司)。

2. 方法: (1) 姜黄素油酸复合物 [Curcumin - (Oleic Acid)₂, Cur - (OA)₂] 的合成: 称取油酸 690.05mg (2.443mmol), 加入适量甲苯, 共沸除水后, 加入姜黄素(Cur) 300mg (0.8144mmol), 并加入干燥 CH₂Cl₂, 避光条件下冰浴搅拌一段时间后, 加入事先干燥的 CH₂Cl₂ 溶解好的 DCC (505.05mg 2.443mmol) 和 DMAP (355.78mg 2.443mmol), 并用干燥 CH₂Cl₂ 润洗。冰浴条件下搅拌反应 30min 后, 转入室温(25℃左右) 反应过夜。产物在 -20℃ 析晶, 过滤。滤液减压浓缩至干。加乙醚析晶, 过滤。滤液减压挥发得产物 (1.348g)。所得产物用石油醚溶解上 120 目活化硅胶柱, 用石油醚洗脱除去油酸, 再改用石油醚-乙酸乙酯(7:0.3) 洗脱收集产物, 浓缩, 真空干燥得淡黄色物质。TLC 检测(石油醚: 乙酸乙酯 7:0.5、石油醚: 氯仿 6:0.5) 均呈一个斑点。(2) Cur - (OA)₂ 结构鉴定: ①紫外光谱鉴定: 取纯化的各反应产物, 用四氢呋喃溶解, 并以四氢呋喃为溶剂空白, 做全波长扫描; ②核磁共振鉴定: 取纯化的各反应产物适量, 用 CDCl₃ 为溶剂, 于 Bruker-AVANCE III 500 型超导高分辨磁共振谱仪上测定化合物氢谱。(3) Cur - (OA)₂ 纳米粒制备: 应用有机溶剂注入法制备姜黄素油酸纳米粒。将一定量的 Cur - (OA)₂ 与适量的 mPEG-PLGA 材料用四氢呋喃溶解, 缓慢注入室温(25℃) 的双蒸水中, 快速搅拌 30min。35℃ 减压挥发四氢呋喃, 用双蒸水定容至体积。间歇超声(超声 3s, 停止 2s) 适当时间后滤过即得。(4) 纳米粒制备工艺正交试验设计: 采用正交试验法, 以载药量、包封率相结合的综合指标为考察指标, 选择 3 因素 3 水平正交试验设计进行试验, 因素安排见表 1。(5) 纳米粒载药量、包封率测定: ①Cur - (OA)₂ 浓度与吸光度线性曲线绘制: 精密取 4.5mg 姜黄素油酸(纯度 98% 以上), 用 10.0ml 四氢呋喃溶解。用移液枪分别吸取(20、30、40、50、60、70) μl, 四氢呋喃稀释至 1ml。用紫外-可见分光光度法测吸光度, 绘制浓度与吸光度的线性曲线; ②高速离心法测纳米粒载药量、包封率。将制备得到的载药纳米粒混悬液 1ml, 15000r/min、4℃ 离心 30min 收集上清液, 用四氢呋喃稀释至 2.5ml, 超声处理。用紫外分光光度计测吸光度, 带入线性曲线计算含量。再带入下列公式计算包封率和载药量。包封率(%) = (姜黄素油酸修饰物的总量 - 上清液中姜黄素油酸修饰物总量) ÷ 姜黄素油酸修饰物的总量 × 100%; 载药量(%) = (姜黄素油酸修饰物总量 - 上清液中姜黄素油酸修饰物总量) ÷ [(姜黄素油酸修饰物总量 - 上清液中姜黄素油酸

修饰物总量) + 材料量] × 100%。(6) 纳米粒粒径与 zeta 电位测定: 取 1ml 纳米粒混悬液用双蒸水稀释至适当体积, 将其倒入检测皿, 置于动态光散射粒度测定仪进行检测。(7) 纳米粒形态测定: 取适量纳米粒混悬液, 滴于铜网上, 用 1% 磷钨酸染色, 自然干燥后, 置高分辨率透射电子显微镜下观察纳米粒形态。(8) 载药纳米粒体外稳定性考察: 取最优工艺制备的载药纳米粒悬浮水溶液和姜黄素水溶液(2.0mg 姜黄素用 300μl DMSO 溶解, 用双蒸水稀释至 20ml, 溶液澄清无混浊), 分别置 37℃ 中避光放置。在每个时间点, 精密移取 1ml, 四氢呋喃超声定容。用紫外分光光度法测定吸光度来分别考察纳米粒和姜黄素在 72h 内的降解速率。描绘体外降解曲线。(9) MTT 法测定纳米粒体外抗肿瘤作用: 1) 体外 HepG₂ 细胞培养: 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 法对纳米粒体外抗肿瘤活性进行考察分析: 即取对数生长期的上述细胞, 用胰酶消化后稀释成 4 × 10⁴ 个/毫升, 按每孔 100μl 接种于 96 孔培养板中, 静置培养 24h 后使用。2) MTT 法测载药纳米粒 IC₅₀: ①样品配制: 取最优工艺制备的载药纳米粒悬浮液 5ml, 15000r/min 4℃ 离心 30min。弃上清液, 沉淀用 D-Hanks 溶液悬浮至 1ml。取微量用紫外分光光度法检测其吸光度, 带入线性曲线计算纳米粒悬浮液含药浓度备用。姜黄素对照品用 DMSO 配制成 10mg/ml, 12000r/min, 离心 10min 除菌。用移液枪吸取 500μl D-Hanks 溶液于 1.5ml 离心管中再加入 15μl 姜黄素药液, 用 D-Hanks 溶液稀释至 1ml 备用; ②MTT 测抗肿瘤活性: 在 96 孔板上分别加入配制的载药纳米粒样品。每个样品加 5、10、15、20、25μl 5 个药物浓度, 相当于含姜黄素 11.81、24.13、36.10、48.32、59.07μmol/L。姜黄素对照品也相应设置系列浓度梯度, 每个药物浓度 6 个复孔, 每孔用 RPMI1640 培养基补加至 200μl, 然后再将细胞板放置 CO₂ 培养箱继续培养 44h 后每孔加入 20μl 0.5% MTT 溶液, 继续培养 4h。终止培养, 小心吸去孔内培养液, 每孔加入 150μl DMSO, 置摇床上低速振荡 15min, 使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪上测量 570nm 的吸光度值(A) 根据公式计算药物对肿瘤细胞的生长抑制率。细胞生长抑制率(%) = (试剂空白对照组平均 A 值 - 药物处理平均 A 值) ÷ 试剂空白对照组平均 A 值 × 100%。

表 1 纳米粒制备工艺正交试验

水平	A 药材/材料(m/m)	B 有机相/水相(v/v)	C 超声时间(min)
1	1/4	10/10	0
2	2/4	10/20	1
3	3/4	10/40	4

结 果

1. Cur - (OA)₂ 结构鉴定: (1) 紫外光谱鉴定: 各样品用四氢呋喃溶解, 以四氢呋喃为试剂空白做全波长扫描, 得结果见图 1。从图中可以看出, 油酸(OA)

在 210nm 有较明显吸收,而 300nm 上基本没有紫外吸收。游离姜黄素则在 424nm 存在较明显的吸收峰。对比曲线 4 与 2,可以发现 2 较 4 吸收峰紫移了 10nm,表明姜黄素一个羟基被油酸修饰生成产物 Cur-OA。对比曲线 2 与 3 发现曲线 3 较曲线 2 吸收峰又紫移了 10nm,表明姜黄素另一个羟基也被油酸修饰生成产物 Cur-(OA)₂。曲线 3 与游离姜黄素相比总共紫移了 20nm,变成了 400nm。这是因为油酸羧基与 Cur 酚羟基成酯后,其中的氧原子与油酸羰基形成 P-π 共轭,并由于羰基的吸电子效应致使 Cur 大共轭体系电子云密度降低,吸收峰发生紫移。表明已经合成了预期产物。(2)核磁氢谱鉴定结果:产物 Cur-(OA)₂氢谱中在 δH6~8 之间明显存在姜黄素苯环特征峰,在 δH1~3 之间存在油酸脂肪链上氢峰,同时 Cur 低场区的羟基氢吸收峰和油酸低场区的羧基氢吸收峰消失,而且 δH3.8 姜黄素甲氧基和 δH0.8 油酸末端甲基氢积分比基本为 1:1,表明 Cur 的两个羟基与两分子油酸的羧基通过缩合作用形成了酯键,这和对应的紫外光谱推测结果一致;表明已经合成了预期产物 Cur-(OA)₂。

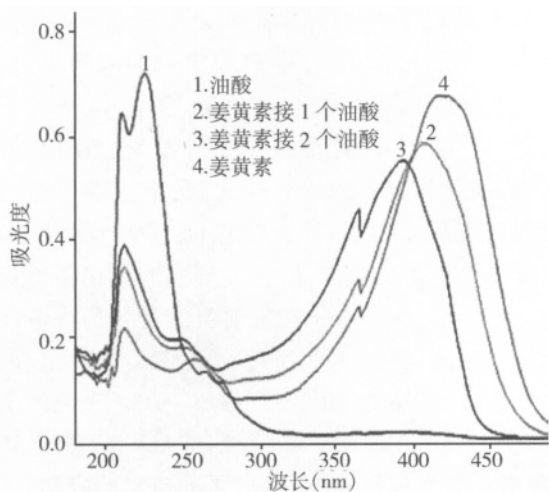


图1 姜黄素油酸复合物紫外吸收图谱

2. 纳米粒正交试验结果: (1) Cur-(OA)₂ 吸光度与浓度线性曲线绘制: Cur-(OA)₂ 在 400 nm 左右有最大吸收。在 0.009~0.0315mg/ml 范围内浓度与吸光度呈良好的线性关系($r=0.9991$)。(2) 载药量、包封率影响: 通过正交试验及方差分析结果可见影响载药量各因素依次为: B>A>C。固定材料用量后,载药量随着投药量的增加而增加,到一定程度后,则载药量稳定在一个水平范围。而随着有机相与水相的比值增大,载药量依次出现先增大后减小的变化趋

势。超声时间延长则使载药量有降低的趋势。而影响包封率的各因素为 B>C>A。当材料量固定时,随着投药量的增加,包封率逐渐增加。而当溶剂比增加时,包封率则出现先升高后降低的趋势。随着超声时间的延长,包封率呈升高的趋势。载药量、包封率试验结果见表 2、表 3。

综合载药量、包封率两指标及成本考虑选择 A3B2C1 方案为纳米粒制备方法。

表2 纳米粒载药量正交试验表(n=3)

数组	A	B	C	D(空白)	载药量(%)
1	1	1	1	1	2.6
2	1	2	2	2	10.7
3	1	3	3	3	11.4
4	2	1	2	3	3.4
5	2	2	3	1	16.9
6	2	3	1	2	11.9
7	3	1	3	2	5.4
8	3	2	1	3	24.7
9	3	3	2	1	24.1
K1	8.23	2.80	13.07	14.53	
K2	10.73	17.43	12.73	9.33	
K3	18.07	15.80	11.23	13.17	
R	9.83	13.63	1.83	5.20	

表3 载药纳米粒包封率正交试验表(n=3)

数组	A	B	C	D(空白)	包封率(%)
1	1	1	1	1	56.9
2	1	2	2	2	69.0
3	1	3	3	3	78.6
4	2	1	2	3	63.8
5	2	2	3	1	81.7
6	2	3	1	2	59.0
7	3	1	3	2	66.1
8	3	2	1	3	80.6
9	3	3	2	1	83.2
K1	68.17	62.27	65.50	73.93	
K2	68.17	77.10	72.00	64.70	
K3	76.63	73.60	75.47	74.33	
R	8.47	14.83	9.97	9.63	

3. 纳米粒粒径及 zeta 电位测定: 以正交试验筛选出的方法制备 3 批药物,分别测定了其粒径、zeta 电位、包封率、载药量等参数。纳米粒颗粒均匀,呈单峰分布,zeta 电位表明纳米粒较稳定,不易发生聚集。并且带负电荷,静脉注射不易产生溶血现象。纳米粒载药量包封率均较高[其纳米粒粒径为(235±25.8)nm,包封率为(81.25±0.101)% ,载药量为(24.87±0.029)% ,zeta 电位为(-23.9±1.6)mV,n=3,

$\bar{x} \pm s$]。

4. 纳米粒形态: 通过磷钨酸负染, 透射电镜观察, 结果如图 2 所示, 纳米粒形态为均匀的球形结构。

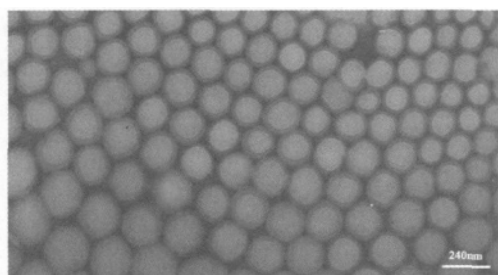


图 2 透射电镜下载药纳米粒形态

5. 纳米粒体外稳定性试验: 从图 3 结果可以看出, 载药纳米粒在 37℃ 避光水浴环境中较姜黄素稳定性显著提高。游离姜黄素处理 1h 即有 80% 左右降解, 而纳米粒处理 4h 才降解了 20%, 且随后的 70h 内只有不到 5% 被降解; 纳米粒的这种降解趋势可能与所选材料及所形成的微观结构有关。载体材料 mPEG_{2k} - PLGA, 其中 PLGA 分子质量约为 50kDa, mPEG 分子质量约为 2kDa, 只占 4%; 当形成纳米粒时, PLGA 趋向与 Cur - (OA)₂ 形成疏水核, 而 mPEG 则覆盖在纳米粒外侧, 形成水化层, 使纳米粒子间能够稳定存在; 然而, 由于 mPEG 在整个纳米粒中所占比例很小, 为此有不少纳米粒表面并没有被 mPEG 所覆盖; 此外, 纳米粒载药量较高, 在 PLGA 和 Cur - (OA)₂ 相互作用形成疏水核时, 可能有不少姜黄素位于疏水核表面, 其脂肪酸链则朝向疏水核内侧; 而这部分姜黄素因为没有 mPEG 覆盖保护, 直接与水分子接触, 容易降解, 导致纳米粒在 4h 内呈现快速降解趋势; 而当这部分暴露的姜黄素降解后, PLGA 骨架暴露在纳米粒外侧, 并对内部疏水核形成保护, 因此纳米粒在其后 70 h 内表现为非常稳定。

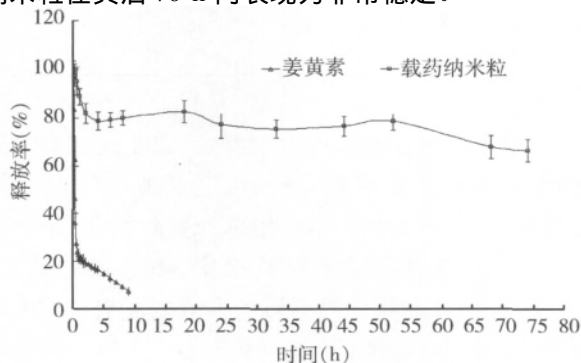


图 3 体外载药纳米粒稳定性试验 (37℃, n = 3)

6. 载药纳米粒体外抗肿瘤实验结果: 经 48h 处理后, 姜黄素对 HepG₂ 呈现出较强的抑制作用, 其在 5 ~ 25 μmol/L 范围内几乎呈线性增加, IC₅₀ 约为 15.76 μmol/L (图 4); 虽然纳米粒对 HepG₂ 仍然具有抑制作用, 并且也与剂量呈正相关, 但抑制强度显然较游离姜黄素有所下降, IC₅₀ 约为 40.61 μmol/L。上述结果与绝大部分纳米粒制剂体外药效结果相似, 表现为“减毒”效应。

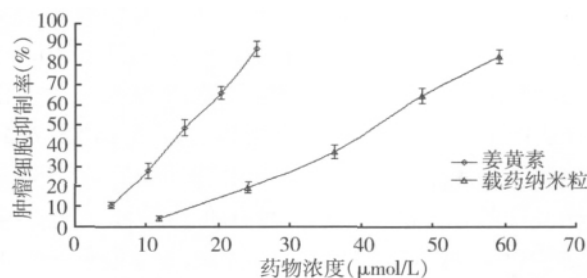


图 4 载药纳米粒对体外肝癌细胞的抑制作用 (n = 6)

讨 论

目前, 已有较多学者通过制剂方式 (固体分散体、脂质体、环糊精复合物、生物可降解微球等) 来改善姜黄素的水溶性, 或者提高姜黄素稳定性以便促进其临床应用。然而, 单纯提高姜黄素的水溶性, 促进其胃肠道吸收也很难提高其疗效, 因为其一, Cur 在胃肠道中代谢严重; 其二, 首关效应显著, 且存在肝肠循环, 所以姜黄素未到达病灶之前, 绝大部分就已经被代谢清除掉了。所以只有通过脂质体、微球、前药技术增强姜黄素的稳定性, 让其到达病灶部位再进行药物释放, 才能保证 Cur 在靶部位的有效药物浓度。

针对上述问题, 本文通过油酸修饰技术, 合成了 Cur - (OA)₂ 衍生物, 并结合 mPEG - PLGA 载体制备了纳米粒。结果表明, Cur 被油酸修饰后稳定性提高, 在制备纳米粒过程中, 减少了姜黄素的降解; 并且 Cur - (OA)₂ 非常容易被 mPEG - PLGA 所负载, 形成球形、高载药量纳米粒, 其可能为 Cur - (OA)₂ 复合物易与 mPEG - PLGA 疏水部分相互作用形成致密疏水核, 而 mPEG 覆盖在外侧形成稳定颗粒。所制备的纳米粒过于“稳定”而不能在适当的时间内释放出药物, 势必也影响其疗效; 而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; 对比分析纳米粒体外稳定性实验结果, 提示体外细胞培养药物处理过程中, 可能存在酶解作用, 即肝癌细胞分泌相关酯酶, 降解载体材料 mPEG - PLGA 及 Cur - OA₂ 复合物, 及时释放出有效浓度的姜黄素

发挥抗肿瘤药效;另外,也有可能是纳米粒整体被细胞吞噬,经细胞内酶解释放出姜黄素发挥药效,其确切机制还有待深入研究。

研究表明,mPEG-PLGA 载体材料所制备的纳米粒具有肝组织靶向性,而肝脏也是脂质代谢中心,为此,本文研究为进一步探讨该姜黄素纳米粒肝靶向性及姜黄素浓度与体内药效之间关系奠定了良好基础。

参考文献

- 1 鲍华英,陈荣华.姜黄素的研究进展[J].国外医学:儿科学分册,2003,30(5):254
- 2 刘国信.良好的天然色素研究[J].中草药,2000,22(3):140-143
- 3 Chun KS,Keum YS,Han SS,et al. Curcumin inhibits phorbol ester-induced expression of cyclooxygenase-2 in mouse skin through suppression of extracellular signal-regulated kinase activity and NF-kappaB activation[J]. Carcinogenesis,2003,24(9):1515
- 4 许实波,唐孝礼.姜黄素的药理作用研究概况[J].中草药,2003,20(3):140-141
- 5 余美容,蒋福升,丁志山.姜黄素的研究进展[J].中草药,2009,5(40):828-831
- 6 蒋福升,徐秀玲,金波,等.水溶性姜黄素前药制备及其体外抗肿瘤实验研究[J].中国药理学杂志,2009,44(19):1492-1496
- 7 Matthews B,Nigel W. Tumor targeting by covalent conjugation of a natural fatty acid to paclitaxel[J]. Clinical Cancer Research,2001,7(8):3229-3238
- 8 Marina A. Dobrovolskaia,parag aggarwal. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution[J]. Mol Pharm,2008,5(4):487-495
- 9 Jean CP. Drug transport to brain with targeted nanoparticles[J]. Experimental Neuro Therapeutics,2005,2(12):108-119

(收稿:2011-12-01)

(修回:2012-04-16)

rhBMP-2 对兔下颌骨放疗后骨延长的影响

麻益可 沈国芳 王丽珍

摘要 目的 兔下颌骨放疗后骨延长的新生骨形成受到轻微抑制,本研究旨在初步了解 rhBMP-2 对其促进成骨疗效。方法 50Gy 组(对照组)和 rhBMP-2 组(实验组)各兔 6 只,均在术前 1 个月接受 50Gy 放射,间歇 8 天后,以 0.4 毫米/次、2 次/天的速度进行牵引,固定期 6 周。实验组在截骨线内同期置入 2.0mg rhBMP-2。结果 标本和 X 线均显示两组成骨均良好,与周围骨质无明显的界限;HE 组织学切片可见两组骨小梁稀疏、细小,并存在成片状致密纤维结缔组织。图像分析软件结果是:50Gy 组和 BMP 组的骨小梁面积比分别为 0.445 ± 0.054 和 0.459 ± 0.036 。经方差分析,两组间差异无统计学意义。结论 本研究中的 rhBMP-2 不能促进兔下颌骨放疗后骨延长的新生骨形成。

关键词 骨延长 兔 放射治疗 下颌骨 BMP-2

Effect of rhBMP-2 on Bone Lengthening in Irradiated Rabbit Mandible. Ma Yike, Shen Guofang, Wang Lizhen. Department of Stomatology, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To study the effect of rhBMP-2 on new bone formation of bone lengthening which was impaired by radiation in irradiated rabbit mandible. **Methods** A total of 12 rabbits were randomly divided into 2 groups: An rhBMP-2 group ($n=6$) and a 50Gy group ($n=6$). Each rabbit received irradiation of 50Gy. One month after irradiation, the operations were completed. The 2.0mg rhBMP-2 was implanted in the rhBMP-2 group at the same time. After a latency of 8 days, distraction was activated at a rate of 0.4mm, twice a day. The mandibles were harvested 6 weeks after consolidation. **Results** The specimens and radiographs showed good bone formation. However, the HE stain histology found the sparse, thin bone trabecula and the dense fibrous connective tissue. The bone trabecula area ratio of the rhBMP-2 group was 0.459 ± 0.036 and the 50Gy group was 0.445 ± 0.054 ($P>0.05$). **Conclusion** The rhBMP-2 could not promote new bone formation in this study.

Key words Bone lengthening; Rabbit; Radiotherapy; Mandible; BMP-2

基金项目:上海市重点学科(优势学科)建设项目(Y0203)

作者单位:325000 温州医学院附属第一医院口腔科(麻益可);上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔颌面外科(沈国芳、王丽珍)

通讯作者:沈国芳,教授,博士生导师,电子邮箱:maxillofac Surg@163.com