

论 著

(药学研究)

酸变性法构建转铁蛋白-姜黄素纳米粒子及其
肿瘤靶向性

朱 庆, 曹燕丽, 徐云燕, 龚光明, 王曙东

【摘要】 目的 提高姜黄素溶解度,改善姜黄素对肿瘤的靶向性。**方法** 以盐酸为变性剂,打开转铁蛋白(Tf)疏水性空腔,转铁蛋白的输水区域与姜黄素结合,制备转铁蛋白-姜黄素(CCM)纳米粒子(NPs-CCM)。通过透射电镜观察纳米粒子的粒径和形貌;通过转铁蛋白及其相关制剂荧光光谱的变化,推测纳米粒子的形成过程中转铁蛋白某些基团极性的变化;通过转铁蛋白水溶液加入盐酸和姜黄素后 8-苯氨基-1-萘磺酸(ANS)荧光光谱的变化,观察纳米粒子形成过程中转铁蛋白表面疏水区域的变化,推测纳米粒子的自组装的过程;通过激光共聚焦检测纳米粒子在细胞中的蓄积情况,考察纳米粒子在体外的靶向性;通过近红外活体成像实验,观察纳米粒子在小鼠肿瘤部位及其他器官的蓄积,考察纳米粒子在体内的靶向性。**结果** NPs-CCM 为直径 40 ~ 150 nm 的球形颗粒。姜黄素的溶解度提高了 200 倍以上。在纳米粒子的形成过程中,转铁蛋白溶液加入盐酸后,酸使转铁蛋白变性,疏水区域暴露,姜黄素与酸变性的转铁蛋白结合后,疏水区域逐渐减少,通过酸对蛋白变性的作用形成转铁蛋白的自组装纳米粒子。在体内和体外的靶向实验中,NPs-CCM 表现出较强的靶向性。**结论** 纳米粒 NPs-CCM 是优良的 CCM 肿瘤靶向药物载体。

【关键词】 姜黄素;转铁蛋白;纳米颗粒;自组装;肿瘤靶向性

【中图分类号】 R285

【文献标志码】 A

【文章编号】 1672-271X(2019)03-0262-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1672-271X.2019.03.009

Construction of transferrin curcumin nanoparticles by acid denaturation and its tumor targeting

ZHU Qing¹, CAO Yan-li², XU Yun-yan², GONG Guang-ming², WANG Shu-dong²

(1.School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, Jiangsu, China; 2.Department of Pharmaceutical Preparation, General Hospital of Eastern Theater Command, PLA, Nanjing 210002, Jiangsu, China)

【Abstract】 Objective To improve the solubility and targeting of curcumin to tumors. **Methods** Hydrochloric acid was used as a denaturing agent to open the hydrophobic cavity of transferrin (Tf). The hydrophobic region of transferrin was combined with curcumin to prepare transferrin-curcumin (CCM) nanoparticles (Nanoparticles, NPs-CCM). The particle size and morphology of the nanoparticles were observed by electron microscopy. The changes of the fluorescence spectra of transferrin and its related preparations were used to predict the polarity of certain groups of transferrin during the formation of nanoparticles. To predict the self-assembly process of nanoparticles, the changes of fluorescence spectra of ANS were used to speculate the hydrophobic region of transferrin. To speculate the targeting of nanoparticles in vitro, the accumulation of nanoparticles in cells was detected by laser confocal, and the nanoparticles were detected by near-infrared imaging including accumulation of NIR-797 and NIR-797 labelled nanoparticles at tumor sites

and other organs in tumor loaded mice in vivo test. **Results** The NPs-CCM were about 40 to 150 nm with spherical shape. The solubility of nanoparticles is increased by more than 200 times. During the formation of the NPs-CCM, the hydrophobic region of Tf was exposed after the Tf solution being added with hydrochloric acid. Curcumin was combined with the acid-dena-

基金项目:国家自然科学基金(31671026)

作者单位:210046 南京,南京中医药大学药学院(朱 庆);210002 南京,东部战区总医院(原南京军区南京总医院)制剂科(曹燕丽、徐云燕、龚光明、王曙东)

通信作者:王曙东, E-mail:sdwamgpharm@126.com

tured transferrin after the acid denatures the transferrin. The hydrophobic region of Tf gradually reduced after the addition of CCM to the acid-denatured Tf solution. Self-assembled NPs-CCM is formed by denaturation of transferrin by hydrochloric acid. In tumor targeted experiments in vivo and in vitro, NPs-CCM showed targeting capability. **Conclusion** NPs-CCM are superior tumor-targeted nanocarrier system for CCM.

[Key words] curcumin; transferrin; nanoparticles; self-assembly; tumor target

0 引言

姜黄素(curcumin, CCM)是从姜科植物根茎中提取的酸性多酚类物质,其毒性低,有广泛的药理作用,具有抗炎、抗氧化、抑制肿瘤细胞的增殖、转移的作用^[1-3],但其水溶性差,生物利用率低,且由于在血清和组织中的浓度偏低,半衰期较短,代谢过于迅速^[4-5],限制了姜黄素的临床疗效。为解决上述问题,本研究尝试以纳米粒子作为药物递送载体。纳米载体体系是一种良好的药物递送工具,通过其靶向性可以增强抗肿瘤药物的药效并逆转肿瘤多药耐药^[6-7]。天然生物分子如蛋白质具有良好的安全性、生物相容性,且用于制备纳米颗粒时无需加入有机溶剂和聚合物材料。此外,以蛋白质稳定的一级结构为基础并基于蛋白质的纳米颗粒为表面修饰,为药物和靶向配体的共价连接提供可能性^[8]。

转铁蛋白(transferrin, Tf)是一种优良的纳米颗粒载体,无毒且非免疫原性。转铁蛋白是广泛分布于人血液中的单链糖蛋白,含有 679 个氨基酸残基,38 个半胱氨酸,形成 19 对二硫键,转铁蛋白二硫键对转铁蛋白结合其受体起重要作用。转铁蛋白不仅参与运输和代谢铁离子,还能调节铁离子平衡和能量平衡^[9]。由于肿瘤细胞生长增殖对铁离子的大量需求,转铁蛋白受体在人体正常细胞表面低表达,而肿瘤细胞表面的转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)数量是正常细胞的 2~7 倍。转铁蛋白与 TfR 相结合,肿瘤细胞表面 TfR 与转铁蛋白的结合率为正常细胞的 10~100 倍^[10]。转铁蛋白相关制剂可迅速在肿瘤部位蓄积并滞留,通过转铁蛋白和转铁蛋白受体的转运途径(Tf-TfR)的主动靶向性,将治疗药物特异性地转运到肿瘤细胞内,从而发挥疗效^[11]。转铁蛋白可以与药物、聚合物、脂质体制备成复合物^[12]。本研究用酸变性法制备了转铁蛋白-姜黄素纳米粒子(transferrin-curcumin nanoparticles, NPs-CCM),并对其进行一系列的表征,研究其靶向性。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器设备 转铁蛋白、近红外-797(NIR-797)和 8-苯氨基-1-萘磺酸(ANS)(购自 Sigma, 美国)。姜黄素购于美仑生物,其余试剂均为国产试剂,现购现用。小鼠肛门纤维肉瘤细胞(S180)和人乳腺癌细胞(MCF-7)购自上海博谷生物公司。ICR 雄性小鼠 6 只,购自南京必凯生物制品销售中心,20~25 g,实验动物许可证号:SCXK(沪)2018-0016。1640 培养液、Gibco 胎牛血清、胰酶-乙二胺四乙酸(EDTA)(购自生兴生物公司)、荧光光谱仪 F-7000(HITACHI)、透视电子显微镜(JEM-2100, 日本)、奥林巴斯 FV1000 激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)、小动物活体成像仪(Caliper, USA)

1.2 方法

1.2.1 NPs-CCM 的制备、载药量检测及形态观察 将 20 mg 转铁蛋白溶于水中配成 4 mg/mL 的溶液,添加 1 mol/L 盐酸溶液 20 μ L。用磁力搅拌器搅拌 5 min 后,加入占转铁蛋白质量分数 10% 的姜黄素。2 min 后,用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调节成中性溶液,制成 NPs-CCM。紫外-可见分光光度法测 NPs-CCM 的载药量。吸取粒子溶液置于 200 目镀碳膜铜网上,用 1% 磷钨酸染色。放置 24 h 后,用透视电子显微镜观察粒子。

1.2.2 荧光光谱 将 5 mg 转铁蛋白溶于水中配成浓度为 1.25 mg/mL 的溶液,置溶液于水浴锅加热至 37 $^{\circ}$ C,加入 1 mol/L 盐酸溶液 5 μ L 作用 2 min 后,加入占转铁蛋白 10% 质量分数的 CCM,置于空气中冷却后,在荧光光谱仪 F-7000 上检测荧光强度的变化,荧光光谱仪分别检测转铁蛋白,酸变性的转铁蛋白溶液, NPs-CCM 制剂和 CCM 溶液的荧光强度,对比得出转铁蛋白及其制剂的荧光光谱变化。激发波长为 295 nm,发射波长为 300~450 nm,狭缝取值 2.5, 2.5 nm。

1.2.3 ANS 与变性前后蛋白结合的荧光光谱变化 分别取转铁蛋白、盐酸变性的转铁蛋白样品, NPs-CCM 纳米制剂,制备方法 1.2.1,配成转铁蛋白浓度

为 1.25 mg/mL 的溶液,加入 ANS(终浓度 30 $\mu\text{mol/L}$),平衡 12 h 后 26 $^{\circ}\text{C}$ 下测量样品;设置无 ANS 的转铁蛋白空白溶液作为对照。荧光光谱仪分别观察转铁蛋白水溶液,酸变性的转铁蛋白溶液,NPs-CCM 纳米制剂中的 ANS 荧光强度,无 ANS 的转铁蛋白空白溶液荧光强度,得出 ANS 与变性前后的蛋白结合的荧光光谱变化。荧光光谱仪激发波长为 390 nm,发射波长为 400 ~ 650 nm,每个样品重复检测 3 次。

1.2.4 细胞摄取 为了表征 NPs-CCM 相比于游离药物的肿瘤靶向性,用激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)观察肿瘤细胞对 CCM 及其制剂的摄取。MCF-7 细胞 1×10^5 /皿接种到共聚焦培养板上,培养 24 h 后移去细胞原培养基。用等量 NPs-CCM 和 CCM(终浓度 50 $\mu\text{mol/L}$)给药分别孵育 1 h、3 h。用磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗去残留药物,加入 500 μL /皿甲醇固定 30 min。PBS 洗净培养板,用 200 μL /皿 4,6-diamidino-2 苯基吡啶(DAPI)染细胞核 15 min。LSCM 观察细胞。DAPI 的激发波长和发射波长分别为 330 nm 和 470 nm,CCM 分别为 388 nm 和 405 nm。

1.2.5 NIR-797-Tf-NPs-CCM 在荷瘤小鼠体内的分布 NIR-797 标记 NPs-CCM 用于评估体内靶向性。制备 NIR-797-Tf-NPs-CCM:将 50 mg 转铁蛋白溶于 5 mL 水,再加入 5 mg NIR-797(溶于 500 μL DMSO),在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中搅拌 8 h 后,用 1000 mL 水透析 12 h,用于制备 NIR-797-Tf-NPs-CCM。

S180 荷瘤小鼠模型的构建:参考 WU 等^[13]的构建方法,将 200 μL 的 S180 细胞悬浮液($2 \times 10^5/\text{mL}$)接种于 ICR 小鼠右下腋以构建荷瘤小鼠模型,1 周后选择肿瘤直径约 1 cm 的小鼠,分为 NIR-797 组和 NIR-797-Tf-NPs-CCM 组,每组 2 只。脱毛膏脱去肿瘤部位及器官处体毛以便成像。

体内示踪: NIR-797 组用 NIR-797(400 $\mu\text{g/mL}$)尾静脉注射小鼠,每只小鼠注射剂量为 125 μL 。NIR-797-Tf-NPs-CCM 组注射制备好的 NIR-797-Tf-NPs-CCM,每只小鼠注射含 50 μg 的 NIR-797 的 NIR-797-Tf-NPs-CCM 溶液。用异氟烷气体麻醉小鼠,1、24、48 h 后,在小动物活体成像仪(IVIS Spectrum)下观察荧光标记的纳米粒子在小鼠体内分布情况,激发波长为 745 nm,发射波长为 850 nm。

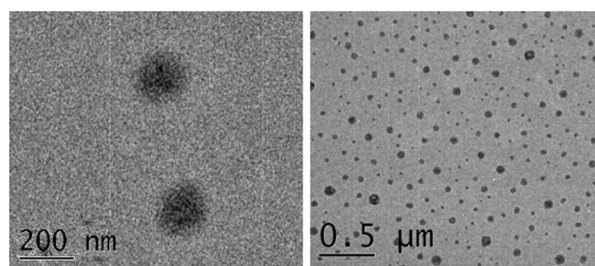
1.2.6 溶血实验 取含不同浓度姜黄素(分别为 5、10、30、50 $\mu\text{mol/L}$)的 NPs-CCM 纳米制剂 2 mL 于离心管中,每支离心管中再加入 2 mL 的 2% 红细胞悬

液,混匀,作为样品,另取 2 mL 的 2% 红细胞悬液分别加入 2 mL 的蒸馏水和生理盐水,分别作为阳性对照和阴性对照,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 3 h。2000 r/m 离心 10 min,取上清液,紫外分光光度计测其吸光度,计算溶血率。

$$\text{溶血率}(\%) = (\text{样品吸光度值} - \text{阴性对照吸光度值}) / (\text{阳性对照吸光度值} - \text{阴性对照吸光度值}) \times 100\%$$

2 结 果

2.1 NPs-CCM 的直径与外形 NPs-CCM 为直径 40 ~ 150 nm 的球形粒子。NPs-CCM 的直径、形貌见图 1。

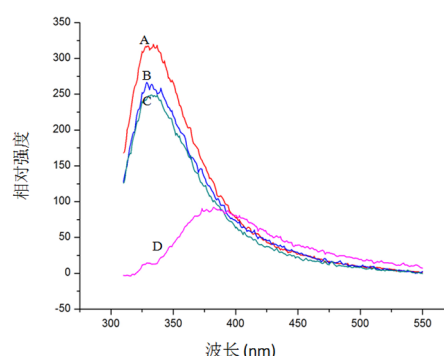


a:200 nm 单位下;b:0.5 μm 单位下

图1 NPs-CCM 纳米粒子的电镜图

2.2 NPs-CCM 水溶性 姜黄素在 425 nm 处有吸收峰,纳米粒水溶液中 CCM 浓度为 80 $\mu\text{g/mL}$ 。CCM 在水中的溶解度为 0.4 $\mu\text{g/mL}$,水溶性提了 200 倍。

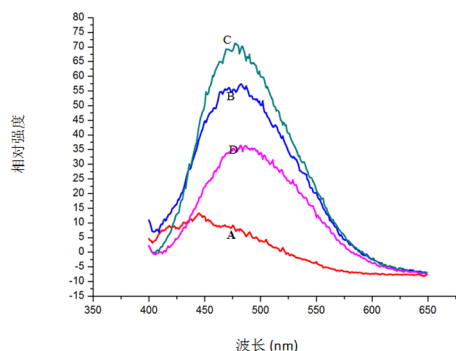
2.3 粒子形成过程中转铁蛋白荧光光谱变化 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,转铁蛋白溶液荧光光谱峰值在 325 nm 左右,峰值随盐酸和姜黄素的加入逐渐降低,见图 2。



A:转铁蛋白水溶液;B:酸变性的转铁蛋白溶液;C:NPs-CCM 纳米制剂;D:CCM 溶液

图2 转铁蛋白及相关制剂的荧光光谱图

2.4 ANS 的荧光光谱变化 转铁蛋白溶液加入盐酸后,ANS 荧光强度变强。加入姜黄素后,易形成 NPs-CCM 纳米制剂,荧光变弱。见图 3。



A: 1.25 mg/mL 的转铁蛋白溶液(无 ANS); B: 转铁蛋白水溶液; C: 酸变性的转铁蛋白溶液; D: NPs-CCM 纳米制剂

图 3 转铁蛋白水溶液加入盐酸和姜黄素后 ANS 荧光光谱的变化

2.5 NPs-CCM 在体内和体外的靶向性 NPs-CCM 和 CCM 可以在 MCF-7 细胞质蓄积,见图 4。近红外成像结果显示,荷瘤小鼠注射 NIR-797 和 NIR-797-Tf-NPs-CCM 后,肿瘤部位的荧光最强,见图 5。24 h 后,NIR-797 组和 NIR-797-Tf-NPs-CCM 组在肿瘤部位蓄积强度接近;48 h 后,NIR-797-Tf-NPs-CCM 组荧光强度强于 NIR-797 组,见图 6。

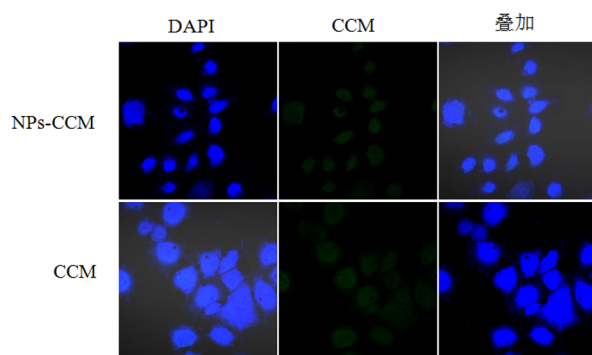


图 4 LSCM 显示 MCF-7 对 NPs-CCM 和 CCM 摄取

2.6 NPs-CCM 的安全性 含 5、10、30、50 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素的 NPs-CCM 纳米制剂的溶血率分别为 $(2.46 \pm 0.32)\%$ 、 $(3.66 \pm 0.59)\%$ 、 $(4.72 \pm 0.41)\%$ 、 $(5.52 \pm 0.29)\%$ 。各 NPs-CCM 纳米制剂的溶血率均小于 6%。

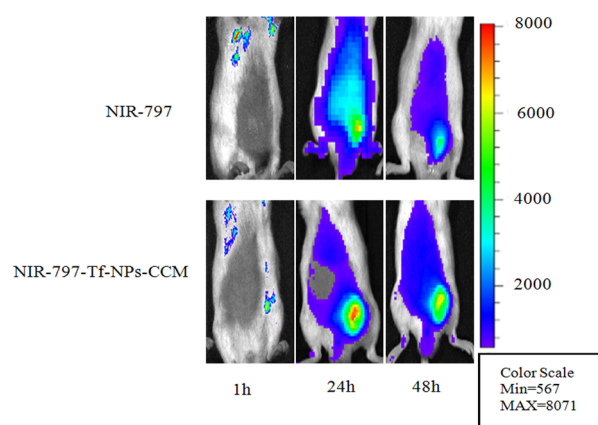


图 5 NIR-797 组和 NIR-797-Tf-NPs-CCM 组的 S180 荷瘤小鼠体内 1、24、48 h 近红外活体成像

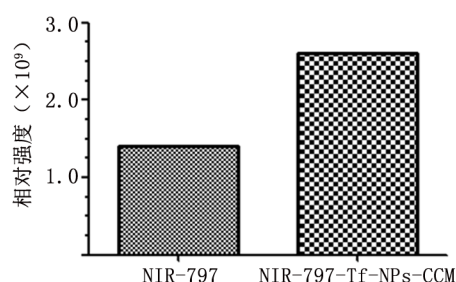


图 6 NIR-797 组和 NIR-797-Tf-NPs-CCM 组的 S180 荷瘤小鼠体内 48 h 后荧光强度对比

3 讨 论

本研究以盐酸为变性剂构建了 NPs-CCM。荧光光谱可用于对转铁蛋白中某些氨基酸的极性环境进行表征,加入盐酸后,姜黄素荧光峰值降低,表明转铁蛋白的某些基团的极性产生了变化。ANS 的吸光度代表疏水区域,ANS 荧光值越高则代表蛋白表面的疏水区域越多^[14],所以被广泛用作检测蛋白表面的疏水区域,该研究中用于检测纳米粒子形成过程中转铁蛋白的表面疏水区域的多少。转铁蛋白表面为亲水性氨基酸,疏水区域隐蔽,ANS 荧光较弱,ANS 转铁蛋白溶液加入盐酸,ANS 荧光变强,表明在盐酸的作用下,转铁蛋白构象发生变化,疏水性空腔被打开,疏水区域暴露并相互靠近^[15],酸使蛋白变性可能是导致疏水区域暴露的原因^[16]。疏水性药物姜黄素与转铁蛋白疏水区域结合作用后,蛋白的疏水性空腔闭合,亲水区域暴露,通过蛋白分子的疏水腔“打开-中间态-闭合”的开关形成 NPs-CCM,姜黄素作为连接桥将变性转铁蛋白分子连接到一起,转铁蛋白与姜黄素之间作用力增强。姜黄素与转铁蛋白作用结合,从而提高姜黄素水溶

性。姜黄素的水溶性提高了 200 倍以上,可能与转铁蛋白形成复合物有关,可以避免乙醇和聚氧乙烯蓖麻油等助溶剂的使用。该研究中 NPs-CCM 制备工艺简便、稳定和重复性好。转铁蛋白无毒,有效避免了姜黄素常规溶解于乙醇和聚氧乙烯蓖麻油等疏水性药物助溶剂带来的溶血等不良反应。

在体外的靶向实验中,NPs-CCM 和姜黄素都在肿瘤细胞的细胞质蓄积。体内的靶向实验中,相比 NIR-797 组,NIR-797-Tf-NPs-CCM 组表现出较强的靶向性能,可能与转铁蛋白载体体系能将药物运送至肿瘤部位,在肿瘤组织中滞留更长时间,并通过受体-配体转运的主动靶向途径将药物转运至细胞内有关。递送抗肿瘤药物到肿瘤部位,是纳米粒子发挥其杀伤肿瘤作用的基础。纳米载体体系在肿瘤部位以外的器官,如肾、肝及其他部位蓄积较少或不蓄积。符合肿瘤靶向载药纳米粒子的特征:肿瘤靶向性增加。

纳米粒子的溶血毒性直接决定其是否能通过静脉注射给药,溶血实验显示 NPs-CCM 的溶血率小于 6%,对红细胞影响较小,没有明显的溶血效应,具有较好的生物安全性,是一种安全的纳米药物载体。

因此,本方法制备的 NPs-CCM 是良好的 CCM 递送系统,具有较好的临床开发价值。

[参考文献]

- [1] Nahar PP, Slitt AL, Seeram NP. Anti-Inflammatory Effects of Novel Standardized Solid Lipid Curcumin Formulations [J]. *J Med Food*, 2015, 18(7):786.
- [2] Vallianou NG, Evangelopoulos A, Schizas N, *et al.* Potential Anti-cancer Properties and Mechanisms of Action of Curcumin [J]. *Anticancer Res*, 2015, 35(2):645.
- [3] 朱国华,张琦,戴海萍,等.姜黄素抑制 RPMI8226 细胞增殖时丝裂原活化蛋白激酶及基质金属蛋白酶的表达[J]. *医学研究生学报*, 2014, 27(10):1016-1019.
- [4] Kurita T, Makino Y. Novel curcumin oral delivery systems [J]. *Anticancer Res*, 2013, 33(7):2807-2821.
- [5] Prasad S, Tyagi AK, Aggarwal BB. Recent Developments in Delivery, Bioavailability, Absorption and Metabolism of Curcumin: the Golden Pigment from Golden Spice [J]. *Cancer Res Treat*, 2014, 46(1):2.
- [6] Fang RH, Hu CM, Luk BT, *et al.* Cancer cell membrane-coated nanoparticles for anticancer vaccination and drug delivery [J]. *Nano Lett*, 2014, 14(4):2181-2188.
- [7] 章磊,流小舟,孙畅,等.多途径靶向给药系统在骨肉瘤治疗中的研究进展[J]. *东南国防医药*, 2016, 18(6):632-635.
- [8] Lohcharoenkal W, Wang L, Chen YC, *et al.* Protein nanoparticles as drug delivery carriers for cancer therapy [J]. *Biomed Res Int*, 2014, doi:10.1155/2014/180549.
- [9] Tortorella S, Karagiannis TC. Transferrin Receptor-Mediated Endocytosis: A Useful Target for Cancer Therapy [J]. *J Membr Biol*, 2014, 247(4):291-307.
- [10] Kano A, Moriyama K, Yamano T, *et al.* A Grafting of poly(ethylene glycol) to poly-lysine augments its lifetime in blood circulation and accumulation in tumors without loss of the ability to associate with siRNA [J]. *J Control Release*, 2011, 149(1):2-7.
- [11] Tortorella S, Karagiannis TC. Transferrin receptor-mediated endocytosis: a useful target for cancer therapy [J]. *J Membr Biol*, 2014, 247(4):291-307.
- [12] 刘苒.转铁蛋白修饰的新型多聚物载药纳米粒的研制及靶向逆转白血病多药耐药的体外研究[D].东南大学,2015.
- [13] Wu D, Gao Y, Chen L, *et al.* Anti-tumor effects of a novel chimeric peptide on S180 and H22 xenografts bearing nude mice [J]. *Peptides*, 2010, 31(5):850-864.
- [14] Horowitz PM, Hua S, Gibbons DL. Hydrophobic surfaces that are hidden in chaperonin Cpn60 can be exposed by formation of assembly-competent monomers or by ionic perturbation of the oligomer [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(4):1535-1542.
- [15] 龚光明,陈美惠,王曙东,等.人血浆蛋白多烯紫杉醇纳米粒子的自组装及对肿瘤的靶向性[J]. *东南国防医药*, 2016, 18(5):468-471.
- [16] Bezkorovainy A, Grohlich D. The behavior of native and reduced-alkylated human transferrin in urea and guanidine-HCl solutions [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1967, 147(3):497-510.

(收稿日期:2018-09-06; 修回日期:2019-03-17)

(责任编辑:叶华珍; 英文编辑:朱一起)