

## 论 著

(药学研究)

姜黄素诱导转铁蛋白纳米载体体系的组装  
及其抗肿瘤靶向作用

赵志刚, 曹燕丽, 高 茗, 龚光明, 恽时锋

**【摘要】** 目的 增加姜黄素 (CCM) 溶解性及对肿瘤的靶向性。方法 以盐酸为变性剂, 构建转铁蛋白 (Tf)-CCM 纳米粒子 (Nanoparticles, NPs-CCM), 电镜观察其外貌。对体系载药量、稳定性及其靶向性进行考察。结果 盐酸变性法成功构建了转铁蛋白-姜黄素纳米体系。Tf 某些疏水基团充分暴露, 引发了粒子的聚集。电镜观察粒子为 150 nm 左右的球形粒子, 高效液相测定其载药量为 5%, 该纳米体系可使姜黄素的溶解度增加超过 1 万倍。CCM 比 NPs-CCM 更容易降解, 稳定性弱。NPs-CCM (0.05~1 mg/mL) 的溶血效果明显低于游离 CCM ( $P<0.05$ ), 当 NPs-CCM 与 CCM 的浓度在 0.0025~0.001 mg/mL 之间, 两者的溶血性无显著差异。与 CCM 相比, NPs-CCM 靶向性显著提高。结论 NPs-CCM 体系对肿瘤细胞具有良好的靶向性, 具有潜在的临床运用价值。

**【关键词】** 转铁蛋白; 姜黄素; 药物递送; 自组装; 肿瘤靶向

**【中图分类号】** R943 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1672-271X(2023)02-0160-04

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1672-271X.2023.02.010

## Assembly of curcumin-induced transferrin nanocarrier system and its anti-tumor targeting

ZHAO Zhigang<sup>1</sup>, CAO Yanli<sup>2</sup>, GAO Ming<sup>2</sup>, GONG Guangming<sup>2</sup>, YUN Shifeng<sup>1</sup>

(1. Laboratory of Comparative Medicine, 2. Department of Pharmacy, Medical Support Center, General Hospital of Eastern Theater Command, PLA, Nanjing 210002, Jiangsu, China)

**【Abstract】** **Objective** To increase the solubility and targeting capability of curcumin (CCM) in tumor. **Methods** Hydrochloric acid was used as denaturing agent, transferrin (Tf)-CCM was constructed and its appearance was observed under electron microscope. The drug loading, stability and targeting of the system were investigated. **Results** The nanoscale system of Tf-CCM was successfully constructed by hydrochloric acid denaturation method. The spherical particles of about 150 nm were observed by electron microscope, and the drug loading was 5% detected by HPLC. The changes in the fluorescence spectra of Tf and 1-(anilinon)-aphthalene-8-sulfonic acid (ANS) in the NP-CCM preparation indicated that the polarity of certain hydrophobic and hydrophilic groups of Tf changed. The nanosystem increased the solubility of curcumin by more than 10,000 times and improved its targeting ability.

**Conclusion** Transferrin-curcumin system has good targeting activity to tumor cells and has potential clinical application value.

**【Key words】** transferrin; curcumin; drug delivery; assembly; tumor target

## 0 引 言

转铁蛋白 (transferrin, Tf) 是一种无毒性 and 免疫原性<sup>[1]</sup> 的血浆蛋白, 已被用于纳米载体体系的

制备。转铁蛋白由 696 个氨基酸组成, 肿瘤细胞 (食管鳞状细胞癌) 表面的 Tf 受体 (Tf-receptors, Tf-R) 数量是正常细胞<sup>[2]</sup> 表面的 2~10 倍。肿瘤细胞表面 Tf-R 和转铁蛋白的结合率比正常细胞表面<sup>[3]</sup> 的结合率高 10~100 倍。治疗药物通过积极靶向血浆蛋白和血浆蛋白受体介导的内吞作用, 特异性靶向癌细胞、干细胞和脑肿瘤发挥治疗作用<sup>[2,4-7]</sup>。转铁蛋白相关制剂, 包括偶联物<sup>[8-9]</sup>、融合转铁蛋白、转铁蛋白结合纳米载体系统<sup>[10]</sup>、转铁蛋白相关肽和

基金项目: 国家自然科学基金 (31671026)

作者单位: 210002 南京, 东部战区总医院医疗保障中心实验动物室 (赵志刚、恽时锋), 医疗保障中心药剂科 (曹燕丽、高 茗、龚光明)

通信作者: 恽时锋, E-mail: yunshifeng1@163.com

(或)受体相关抗体制剂<sup>[11]</sup>,已被用于肿瘤成像、精确检测和肿瘤治疗。姜黄素(curcumin, CCM)是一种从姜黄植物中提取的疏水多酚,无毒,具有多种生物和治疗作用<sup>[12-15]</sup>。该化合物通过调控多个分子靶点的表达和(或)活性,通过多种生物学途径表现出多种抗癌活性,包括突变、细胞周期调控和转移等<sup>[16-17]</sup>。本研究用酸变性法构建转铁蛋白姜黄素纳米载体体系,提高疏水性药物溶解度和靶向性,并进行相关表征。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 转铁蛋白、近红外-797(NIR-797)和姜黄素来自西格玛(美国)。1-(苯胺)-aphthalen-8-磺酸(ANS)购自国药集团(中国)。美国癌症研究所(ICR)小鼠,体重 20~25 g,购自南通大学。动物实验经金陵医院动物实验机构伦理委员会批准(指导编号:2019524)。

### 1.2 方法

**1.2.1 转铁蛋白姜黄素粒子(transferrin-curcumin nanoparticles, Nps-CCM)的制备、形态观察、包封率和载药量** 30 mg 转铁蛋白溶解于 10 mL 纯水(25 ℃)。加入最终浓度为 4 mM 的 HCl,连续搅拌 10 min。加入 2 mg 姜黄素(4 mg/mL,乙醇为溶剂),将溶液 pH 调节为 7.0。将制备好的粒子溶液滴加在 200 目碳膜铜网上。干燥后,用 JEOL 电子显微镜观察粒子的形貌。将 1 体积的 Nps-CCM 溶液加入 9 体积的乙醇中提取姜黄素,然后超声 5 min,离心 10 min。过滤溶液中的姜黄素通过膜过滤,然后用 L-1525 泵、PDA 2996 紫外检测器和 Waters C18 柱通过 HPLC(Waters 1525-2996,美国)进行定量。流动相为乙腈:4%冰醋酸溶液(48:52, v/v)。色谱柱流出液检测波长 430 nm,流速 1.0 mL/min。转铁蛋白用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒(南京建成)进行定量。药物包封率(EE)的计算公式如下:

$$EE = (\text{粒子中姜黄素重量} / \text{滤过液中姜黄素重量} + \text{粒子中姜黄素重量}) \times 100\%$$

$$\text{载药量}(\%) = (\text{粒子中姜黄素的重量} / \text{粒子中姜黄素和转铁蛋白的重量}) \times 100\%$$

**1.2.2 Nps-CCM 的药物释放和降解** 药物释放:将已知重量的 Nps-CCM 纳米颗粒用 pH 7.4 (5 mM)的 2 mL PBS 重新分散后,装入透析袋(截留相对分子量 8000~12 000)中。将透析袋放入 10 mL 释放缓冲液(含 6%乙醇的 Tris 溶液, v/v)中。在 1、

2、4、8、12 h 提取姜黄素释放缓冲液用于高效液相色谱分析。降解:Nps-CCM(均为 100 μg/mL 姜黄素)在磷酸盐缓冲盐水(PBS, pH=7.4)中通过测量姜黄素在 25 ℃的吸光度变化进行检测。将游离的姜黄素(100 μg/mL)和 Nps-CCM(等效姜黄素浓度)置于 PBS 中孵育 24 h,间隔 2 h,用紫外-可见分光光度计检测吸光度(425 nm),检测常温下, Nps-CCM 和 CCM 溶液稳定性。

**1.3 CCM 制剂诱导小鼠溶血** 眼眶后血液样本采集红细胞(RBC)。然后,将 1 mL 细胞沉淀重悬于 100 mL PBS 中制备 1% RBC 悬液,并将 RBC 悬液与不同浓度(1、0.5、0.25、0.1、0.01 或 0.001 mg/mL)的姜黄素按 1:1 的比例在 37 ℃下混合 0.5、4、24 h。通过离心分离沉淀物,用分光光度计(瑞士)在 570 nm 处检测上清液中的游离血红蛋白。以纯水或 PBS 孵育红细胞的溶血率为阳性(Abs100)和阴性(Abs0)对照。用下式计算 CCM 配方的溶血率。

$$\text{溶血率}(\%) = (\text{OD}_{570} \text{ 的 Abs} - \text{Abs}_0) / (\text{Abs}_{100} - \text{Abs}_0) \times 100\%$$

### 1.4 体内靶向性

**1.4.1 Nps-CCM 荷瘤小鼠的制备** 将肉瘤株 S180 细胞培养液注入 ICR 小鼠左腋窝制备荷瘤小鼠。1 周后选肿瘤长径和短径在 0.5~1 cm 之间的成瘤小鼠 8 只,分成 2 组,4 只/组,分别用于 NIR-797 和 NIR-797-Nps-CCM 成像。

**1.4.2 体内靶向能力** Nps-CCM 和游离 NIR-797 溶液(0.1 mg NIR-797)注射到 S180 肿瘤小鼠(雄性, ICR, 30~32 g, n=4, iv),静脉注射后的 1、28、48、120 和 168 h 后使用 IVIS 光谱仪器(Caliper, 美国),在 800~900 nm 监测近红外荧光成像,时间为 2 s。成像后,取肿瘤和心、肝、脾、肾和肺等主要器官进行成像,以评估 NIR-797 和 NIR-797 Nps-CCM 的聚集。

**1.5 统计学分析** 所有实验均重复 3 次,计量资料结果以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。组间比较采用学生 t 检验(Excel 自带程序);以  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Nps-CCM 的制备** Nps-CCM 的形成过程中,溶液逐渐变成淡黄色。透射电镜观察粒子大小约为 140~150 nm,见图 1。

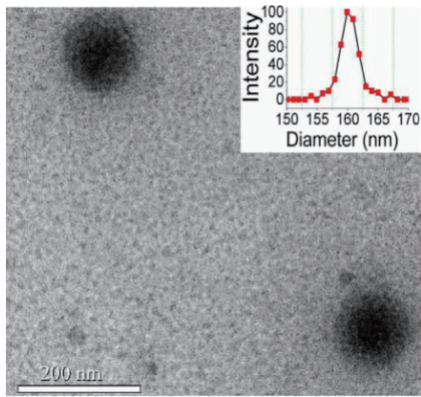
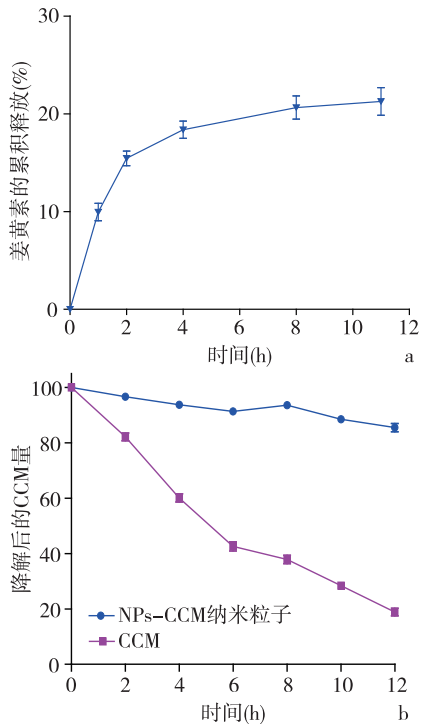


图 1 高分辨率透射电镜观察 Nps-CCM 纳米颗粒的尺寸、形状和形貌及动态光散射仪观察粒子大小

**2.2 纳米粒子的姜黄素包封率 (EE) 和 载药量** 经检测, NPs-CCM 粒子大小为  $(162 \pm 6.7)$  nm, 包封率和载药量分别为  $(92.57 \pm 5.4)\%$  和 5.2%。

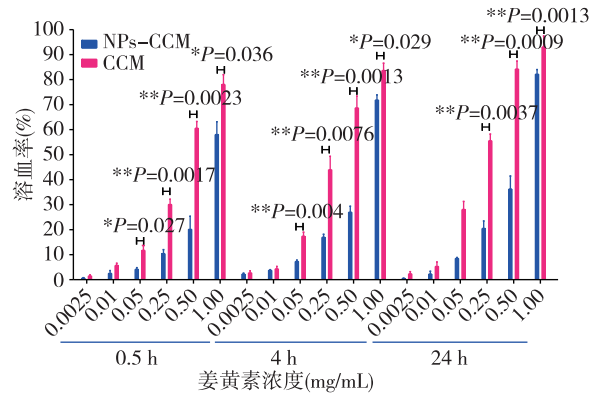
**2.3 NPs-CCM 释药和稳定性** 图 2a 显示了 NPs-CCM 在缓冲液中长达 11 h 的累积 CCM 释放曲线, 在  $37^\circ\text{C}$ , 11 h 后, 释放溶液形成沉淀。5.2% 的载药量下, 11 h, CCM 的释放量为纳米粒的 21%。CCM 和 NPs-CCM 溶液在  $37^\circ\text{C}$  下孵育 12 h, 2 h 间隔取样, 用紫外可见分光光度计测量吸光度结果表明, 游离的 CCM 降解速度比 NPs-CCM 快, 见图 2b。



a: NPs-CCM 在 PBS (6% 乙醇) 中,  $37^\circ\text{C}$ , 12 h 内的体外释放;  
b: pH 7.4 的 PBS 中降解 NPs-CCM 和游离 CCM

图 2 NPs-CCM 纳米粒子体外释放和降解

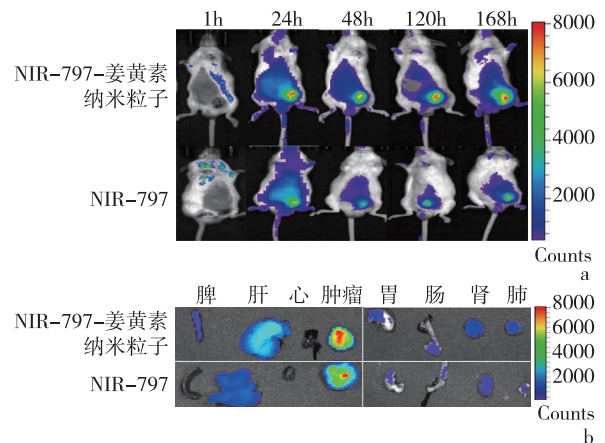
**2.4 CCM 游离药物和 CCM 纳米粒子诱导体外小鼠红细胞溶血率** 游离 CCM 和 CCM 粒子对红细胞溶血率结果显示: CCM 在  $0.05 \sim 1$  mg/mL 之间时, 两者的溶血率有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); 随浓度逐渐降低, 差异不显著 ( $P > 0.05$ )。见图 3。



NPs-CCM 与相同浓度的 CCM (聚氧乙烯蓖麻油和乙醇) 比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

图 3 CCM 游离药物和 CCM 纳米粒子诱导体外小鼠红细胞溶血率 ( $n=3$ )

**2.5 NPs-CCM 的体内和靶向能力** NIR-797-NPs-CCM 对 S180 肿瘤移植小鼠的靶向能力结果显示, NIR-797 在前 24 h 内分布在小鼠全身, 大部分 NIR-797 在腹部聚集, 后逐渐在肿瘤部位富集。48 和 120 h, NIR-797-NPs-CCM 在肿瘤部位比 NIR-797 富集更多, 见图 4a。组织的离体图像显示, NIR-797-Nps-CCM 在肿瘤、肝和肾中积累, NIR-797 结合的 NPs-CCM 在肿瘤中的荧光强度强于 NIR-797, 见图 4b。这些结果表明, NPs-CCM 比游离 NIR-797 具有更好的肿瘤靶向性。



a: S180 移植小鼠静脉注射 NIR-797 标记的 Nps-CCM 和游离 NIR-797 后 24、48、120 和 168 h 的体内图像; b: 给药后 168 h 小鼠组织 (肿瘤、肝、胃、肺、肾、肠、心和脾) 体外 NIR-797 荧光图像

图 4 NPs-CCM 荷瘤小鼠体内和靶向能力



### 3 讨 论

临床研究中,疏水性抗肿瘤药物的溶解度一直是亟待解决的难题。本研究通过盐酸变性方法将转铁蛋白的疏水区域与姜黄素的疏水区域结合后制备了 NPs-CCM,其载药量为 5.2%,尺寸约为 160 nm(水合半径)。推测盐酸分子使转铁蛋白疏水基团完全暴露,疏水姜黄素的加入使姜黄素与转铁蛋白聚集,形成稳定的 NPs-CCM 纳米载体体系。水溶液中,NPs-CCM 仍然在胶束核心内,不溶于水的 CCM 被亲水蛋白壳包围。这种胶束结构在很大程度上保护 CCM 不被降解,并使颗粒在水介质中非常稳定。姜黄素的溶解度增加了 1 万倍以上,NPs-CCM (0.05~1 mg/mL)的溶血效果明显低于游离姜黄素 ( $P<0.05$ ),当 NPs-CCM 与姜黄素的浓度在 0.0025~0.001 mg/mL 之间时,两者的溶血性无显著差异。本实验避免了类似紫杉醇、多系紫杉醇临床运用时,需用吐温、乙醇、聚氧乙烯蓖麻油作为溶剂存在的引起机体副反应、给药时间长、靶向性低的缺点,因此,NPs-CCM 实现姜黄素有效增溶的同时,可显著降低溶血风险。另外,姜黄素的降解时间延长。靶向性试验表明,相较于游离姜黄素,NPs-CCM 具有更好的肿瘤靶向能力,可能与注射后体内长时间循环,不断在肿瘤部位富集有重要关系。因此,NPs-CCM 是一种有效、安全的姜黄素递送载体,具有潜在的临床运用价值。

#### 【参考文献】

- [1] Zhang YD, Huang QW, Ma C, *et al.* Magnetic fluorescent molecularly imprinted nanoparticles for detection and separation of transferrin in human serum[J]. *Talanta*, 2018, 188: 540-545.
- [2] Chan KT, Choi MY, Lai KK, *et al.* Overexpression of transferrin receptor CD71 and its tumorigenic properties in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(3): 1296-304.
- [3] Tortorella S, Karagiannis TC. Transferrin receptor-mediated endocytosis; a useful target for cancer therapy[J]. *J Membr Biol*, 2014, 247(4): 291-307.
- [4] Abouzeid AH, Patel NR, Sarisozen C, *et al.* Transferrin-targeted polymeric micelles co-loaded with curcumin and paclitaxel; efficient killing of paclitaxel-resistant cancer cells[J]. *Pharm Res*, 2014, 31(8): 1938-1945.
- [5] Choudhury H, Pandey M, Chin PX, *et al.* Transferrin receptors-targeting nanocarriers for efficient targeted delivery and transcytosis of drugs into the brain tumors; a review of recent advancements and emerging trends[J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2018, 8(5): 1545-1563.
- [6] Cui Y, Xu Q, Chow PK, *et al.* Transferrin-conjugated magnetic silica PLGA nanoparticles loaded with doxorubicin and paclitaxel for brain glioma treatment[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(33): 8511-8520.
- [7] 耿怀成, 陈龙邦. 抗体介导的抗肿瘤血管治疗[J]. *医学研究生学报*, 2001, 14(6): 535-537.
- [8] Hu Q, Wang Y, Xu L, *et al.* Transferrin Conjugated pH- and Redox-Responsive Poly (Amidoamine) Dendrimer Conjugate as an Efficient Drug Delivery Carrier for Cancer Therapy[J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 2751-2764.
- [9] Wigner P, Zielinski K, Labieniec-Watala M, *et al.* Doxorubicin-transferrin conjugate alters mitochondrial homeostasis and energy metabolism in human breast cancer cells[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 4544.
- [10] Du W, Fan Y, He B, *et al.* Correction to "Bionano Interactions of MCF-7 Breast Tumor Cells with a Transferrin Receptor Targeted Nanoparticle"[J]. *Mol Pharm*, 2021, 18(5): 2104.
- [11] Zhu M, Sheng Z, Jia Y, *et al.* Correction to "Indocyanine Green-holo-Transferrin Nanoassemblies for Tumor-Targeted Dual-Modal Imaging and Photothermal Therapy of Glioma"[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13(21): 25574.
- [12] Mirzaei H, Naseri G, Rezaee R, *et al.* Curcumin: A new candidate for melanoma therapy? [J]. *Int J Cancer*, 2016, 139(8): 1683-1695.
- [13] Momtazi AA, Derosa G, Maffioli P, *et al.* Role of microRNAs in the Therapeutic Effects of Curcumin in Non-Cancer Diseases[J]. *Mol Diagn Ther*, 2016, 20(4): 335-345.
- [14] Sahebkar A, Cicero AFG, Simental-Mendia LE, *et al.* Curcumin downregulates human tumor necrosis factor- $\alpha$  levels; A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Pharmacol Res*, 2016, 107: 234-242.
- [15] Sahebkar A. A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials investigating the effects of curcumin on blood lipid levels. *Clin Nutr*, 2014, 33(3): 406-414.
- [16] Perrone D, Ardito F, Giannatempo G, *et al.* Biological and therapeutic activities, and anticancer properties of curcumin[J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10(5): 1615-1623.
- [17] Mahmood K, Zia KM, Zuber M, *et al.* Recent developments in curcumin and curcumin based polymeric materials for biomedical applications: A review[J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 81: 877-890.

(收稿日期: 2023-01-17; 修回日期: 2023-02-28)

(责任编辑: 叶华珍; 英文编辑: 朱一超)