

文章编号:2095-0411(2016)06-0014-04

脂质体的粒径大小对二甲基姜黄素 抗癌能力的影响研究

周舒文,徐德锋,杨幸群,马守秀,戈晓爱,冯志刚
(常州大学 制药与生命科学学院,江苏 常州 213164)

摘要:为了考察不同粒径的脂质体包裹二甲基姜黄素对前列腺癌细胞增殖活性的影响,采用薄膜分散法制备脂质体,再通过脂质体挤出器得到 184、215.3、250.5nm 的脂质体,包药二甲基姜黄素后,进行前列腺癌细胞给药。使用 CCK-8 细胞增殖活性检测试剂盒检测不同粒径大小的脂质体包裹二甲基姜黄素对前列腺癌细胞的杀伤效果。通过 CCK-8 测定,得到粒径为 184nm 的二甲基姜黄素脂质体对前列腺癌细胞的杀伤力最大,而粒径为 250.5nm 的二甲基姜黄素脂质体对前列腺癌细胞的杀伤力较小。在一定范围内包药脂质体粒径对二甲基姜黄素抗癌能力随着粒径减小而增强。

关键词:脂质体;粒径;前列腺癌细胞

中图分类号:R 943

文献标志码:A

doi:10.3969/j.issn.2095-0411.2016.06.003

Anti-Tumor Effect Via Different Sizes of Liposomes Encapsulating Dimethyl Curcumin in Vitro

ZHOU Shuwen, XU Defeng, YANG Xingqun, MA Shouxu, GE Xiaoi, FENG Zhigang
(School of Pharmaceutical Engineering & Life Science, Changzhou University, Changzhou 213164, China)

Abstract: This study is to investigate the anti-cancer ability of liposomes encapsulating Dimethyl curcumin with different sizes in prostate cancer cells. Liposomes encapsulating Dimethyl curcumin were prepared using the film dispersion technique, then through liposome extruder and dialysis, 184nm, 215.3nm and 250.5nm liposomes were obtained for prostate cancer cells administration. The results showed that the liposomes encapsulating Dimethyl curcumin with the size of 184nm could more efficiently induce the prostate cancer cells death than the liposomes with the size of 250.5nm. The anti-cancer ability are enhanced with the decrease of particle size.

Key words: liposome; particle size; prostate cancer cells

前列腺癌是对男性的身心健康有着严重危害的恶性肿瘤。我国前列腺癌的发病率虽没有欧美高,但近年来随着我国老龄化趋势的日渐严重,前列腺癌发病率也在逐年递增^[1]。前列腺癌的治疗与患者年龄、健康状况、癌细胞扩散程度、显微镜下的细胞

形态及初期的治疗效果有关,目前还没有较理想的治疗方法。

姜黄素是姜黄根茎药草(姜黄属)中的一种主要成分^[2],现已被广泛用作食品染色剂及调味品。姜黄素通过调节多个分子靶点来表现其抗诱变和抗癌

收稿日期:2016-06-05。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31271002);江苏省高校自然科学研究面上项目(14KJB350001)。

作者简介:周舒文(1982—),女,江苏常州人,博士,主要从事药物制剂研究。

潜能,具有抗肿瘤、抗炎、抗病毒等多种药理作用,且不良反应少而轻微,药源充足,极具开发前景^[3-4]。二甲基姜黄素是姜黄素的衍生物,比姜黄素显示出更高的潜在抗癌活性,并且可以更好的抑制癌细胞的增殖,诱导癌细胞的凋亡,抑制癌细胞的转化、侵袭以及癌细胞的血管形成^[5]。在体外细胞系和体内小鼠研究中,二甲基姜黄素已显示出对治疗前列腺癌和脊髓延髓肌萎缩症具有良好的效果^[6-7]。但由于二甲基姜黄素的水溶性差,生物利用度低,本研究将其包封于脂质体内,以改善二甲基姜黄素的溶解度及其生物利用度。

脂质体是由胆固醇和双亲性小分子磷脂组成的双分子层所形成的囊泡包裹药物而形成的制剂^[8-9],具有靶向性、缓释作用、降低药物毒性和提高药物稳定性等特点。而脂质体的粒径大小对其在体内的分布以及稳定性有一定关系^[10],是影响脂质体在体内发挥作用的主要因素^[11]。而脂质体的粒径对细胞的影响目前还不明确,因此本研究通过制备不同粒径大小的二甲基姜黄素脂质体,考察其粒径大小对二甲基姜黄素杀伤前列腺癌细胞的影响,期待能为脂质体的设计提供新的理念和思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

二甲基姜黄素,化学纯 CP(常州大学徐德峰实验室提供);大豆卵磷脂,生物试剂 BR(国药集团化学试剂有限公司);胆固醇,分析纯 AR(国药集团化学试剂有限公司);氯仿,分析纯 AR(国药集团化学试剂有限公司);葡萄糖,分析纯 AR(天津市北辰方正试剂厂);无水乙醇,分析纯 AR(江苏永丰化学试剂有限公司);RPMI1640 培养基,胎牛血清 FBS,双抗,胰蛋白酶(Gibco 公司)。

1.2 脂质体制备方法

称取大豆卵磷脂0.002 3g,胆固醇0.002 7g,分别加入 5mL 氯仿,搅拌使溶解。将大豆卵磷脂和胆固醇溶液混合,旋干溶剂后加入 10mL 5%葡萄糖溶液,超声波细胞清洗机清洗 5min,将溶液倒入 15mL 离心管。用超声波细胞破碎仪超声 30s,停 30s,共 18 次。测粒径。

1.3 二甲基姜黄素标准曲线的绘制

称取 7.5mg 二甲基姜黄素于 100mL 容量瓶

中,加溶剂定容,以空石英皿为空白对照,在 200~600nm 波长处对溶液和溶剂进行扫描,观察其强吸收峰的位置。同理将大豆卵磷脂,胆固醇的波长进行确认,看其对二甲基姜黄素的波长测定是否有影响。取二甲基姜黄素 7.5mg 于 50mL 容量瓶中,加溶剂定容,得到 0.15mg/mL 溶液,分别精确量取 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0mL 溶液移至编号为①~⑤的 10mL 容量瓶中加溶剂定容。对①~⑤号分别测 3 次(取平均值)。在二甲基姜黄素的特定波长,419nm 处进行吸光度的测定。

1.4 脂质体挤出器制备不同大小二甲基姜黄素脂质体

采用薄膜分散法,用电子天平称取大豆卵磷脂 0.006 0g,胆固醇0.006 5g,二甲基姜黄素0.001 6g(物质的量比 4:4:1)于烧杯中,加 50mL 无水乙醇搅拌溶解,倒入梨形瓶中旋干溶剂,加 50mL 5%葡萄糖溶液,全温摇床 0.5h。将上述制备的包药脂质体通过脂质体挤出器 100、200、400nm 的膜,得到 3 种粒径的脂质体,分别测粒径。经透析后,取出脂质体放入离心管,再分别测粒径。

1.5 前列腺癌细胞 DU145 和 C42 的培养

将解冻及灭菌好的胎牛血清(FBS)50mL 和青霉素-链霉素混合溶液(青霉素质量浓度 10kU/mL、链霉素质量浓度 10mg/mL)5mL 倒入 1 瓶 500mLRPMI1640 培养基,作为前列腺癌细胞 DU145 和 C42 的培养基。将 DU145 和 C42 细胞和培养液的混悬液放入细胞培养箱(二氧化碳浓度 5%,温度 37℃)培养。2~3d 传代 1 次。

1.6 细胞给药

将 DU145 和 C42 细胞分别按 10 000 个细胞/穴的浓度放入 96 穴细胞培养板中。在培养箱培养 24h 后,将穴中的液体吸出,每穴各加入 100 μ L PBS 清洗细胞 3 次以后,将透析完的二甲基姜黄素脂质体按 1.98 μ g/穴进行细胞给药。

1.7 细胞增殖活性测定

96 穴细胞培养板加药后放入 CO₂ 培养箱。按照不同实验组及时间加入 10 μ L CCK-8,后使用酶标仪测吸光度。

2 结果与讨论

2.1 二甲基姜黄素脂质体粒径的测定

为了制备不同粒径大小的脂质体,本研究采用薄膜分散法,按大豆卵磷脂 0.006 0 g,胆固醇 0.006 5 g,二甲基姜黄素 0.001 6 g(物质的量比 4:4:1)于烧杯中用无水乙醇搅拌溶解,通过加 50 mL 5% 葡萄糖溶液,在 37℃ 下摇床 0.5 h。再将上述制备的二甲基姜黄素脂质体通过脂质体挤出器 100、200、400 nm 的膜,得到 3 种不同粒径的脂质体。经过透析后,分别测得平均粒径为 184 nm(图 1(a)), 215.3 nm(图 1(b))和 250.5 nm(图 1(c))。

2.2 二甲基姜黄素脂质体封装率的测定

通过制备二甲基姜黄素的标准曲线,计算得到透析前 184 nm 脂质体的药物总量为 13 μ g; 215.3 nm 脂质体的药物总量为 19 μ g; 250.5 nm 脂质体的药物总量为 41 μ g。经过在 5% 葡萄糖溶液中透析 24 小时后,测得游离药物总量 184 nm 脂质体为 0.85 μ g; 215.3 nm 脂质体为 0.91 μ g; 250.5 nm 脂质体为 0.61 μ g。通过封装率的计算公式:封装率 = $(1 - \frac{\text{游离药物的量}}{\text{脂质体悬液中药物的总量}}) \times 100$, 计算各个粒径脂质体的封装率。计算得到 184 nm 脂质体的封装率为 93.5%; 215.3 nm 脂质体的封装率为 95.2%; 250.5 nm 脂质体的封装率 98.5%。由结果可看出,脂质体封装率随粒径的增大而增大。

2.3 二甲基姜黄素脂质体对前列腺癌细胞的影响

为了考察脂质体粒径大小对细胞的影响,将不同粒径的二甲基姜黄素脂质体 1.98 μ g 加入到前列

腺癌细胞 DU145 和 C42 共培养 6 h 后发现: 250.5 nm 的二甲基姜黄素脂质体给药后,在酶标仪下的吸光度最大(图 2)。由 CCK-8 的原理:活细胞越多,吸光度越大可知,250.5 nm 的二甲基姜黄素脂质体杀死前列腺癌细胞能力相对于粒径小的脂质体较弱。而对于不同种类的癌细胞,其粒径大小的影响也不同。对于 DU145 细胞,随着包药脂质体的粒径增加,其杀灭癌细胞的能力随之减弱(图 2(a), A 组别为阳性对照, B 组别为 184 nm 包药脂质体, C 组别为 215 nm 包药脂质体, D 组别为 250 nm 包药脂质体)。而对于 C42 细胞,184 nm 和 215.3 nm 的包药脂质体对于癌细胞的杀灭能力基本相同,而粒径为 250.5 nm 的包药脂质体对于癌细胞的杀灭能力较弱(图 2(b))。

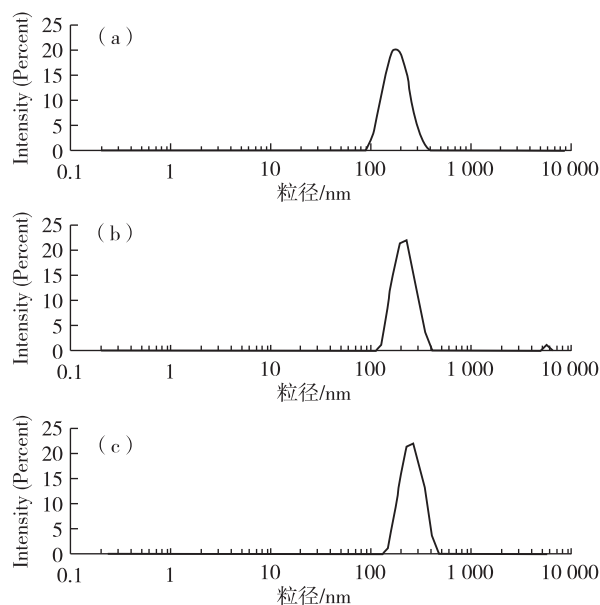
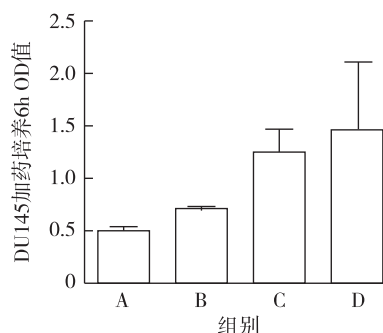
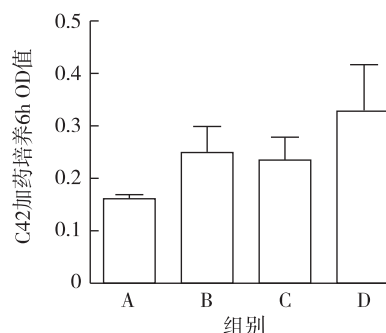


图 1 二甲基姜黄素脂质体的粒径分布

Fig.1 Particle size distribution of liposomes encapsulating dimethyl curcumin



(a) 二甲基姜黄素脂质体对DU145细胞的影响



(b) 二甲基姜黄素脂质体对C42细胞的影响

图 2 二甲基姜黄素脂质体对 C42 和 DU145 细胞的影响

Fig.2 Effect of liposomes encapsulating dimethyl curcumin on C42 and DU145 cells

3 结 论

包药脂质体粒径大小会影响药物到达肿瘤组织的过程。粒径的不同会影响其在肿瘤组织的积聚和停滞时间,从肿瘤毛细管中的渗漏也会不同。较小的包药脂质体比较容易进入肿瘤细胞。孙维彤等人^[12-13]发现脂质体后期释药缓慢,粒径小的包药脂质体释药速度和累计释放药物的百分数提高了,这可能是由于粒径小的包药脂质体在介质中的溶解度更大,药物释放完全。Chithrani 等人^[14]研究了14nm、50nm 和 74nm 的金纳米颗粒被海拉细胞系吸收的情况,研究发现吸收的动力学以及饱和浓度因纳米颗粒的大小而不同,并且细胞吸收 50nm 的颗粒最有效,表明了纳米颗粒被有效地吸收到细胞中存在一个最佳大小值。还有研究了一系列的纳米颗粒分别与多种细胞培养,例如海拉细胞,小鼠 264.7 巨噬细胞,结果发现相同的纳米颗粒在不同细胞的吸收存在差异。包药脂质体通过内吞等方式进入细胞后,粒径小的包药脂质体,其包裹的药物分散度提高,在介质中的溶解度也提高,因而小粒径的包药脂质体释放药物较快。并且粒径小的包药脂质体稳定性更强,更能杀死前列腺癌细胞,药物不会在未进细胞前泄露。所以在药量相同的情况下,相对粒径较大的 250.5nm 的包药脂质体进入癌细胞、杀灭细胞的能力较其他粒径小的弱。而对于癌细胞的种类不同,包药脂质体的粒径大小对其杀灭的能力就不同。这在一定程度上为二甲基姜黄素在抗癌治疗的运用以及减小包药脂质体粒径来促进抗癌能力提供了理论基础。而本研究中药物与细胞的作用时间,以及粒径大小对不同种类癌细胞的影响还有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] LAI K P, HUANG C K, CHANG Y J, et al. New therapeutic approach to suppress castration-resistant prostate cancer using ASC-J9 via targeting androgen receptor in selective prostate cells [J]. American Journal of Pathology, 2013, 182(2): 460-473.
- [2] ANAND P, KUNNUMAKKARA A B, SUNDARAM C, et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes [J]. Pharmaceutical Research, 2008, 25: 2097-2116.
- [3] ANANK P, SUNDARAM C, JHURANI S, et al. Curcumin and cancer: An “old-age” disease with an “age-old” solution [J]. Cancer Letters, 2008, 267: 133-164.
- [4] CUI J, ZHAI G X, LOU H X. Research progress of Curcumin [J]. Central South Pharmacy, 2005, 3(2): 108-111.
- [5] DAI H S, SHAN T Y, GAO Y, et al. Extraction of Curcumin from Turmeric and study of its methylating [J]. Nat Prod Res Dev, 2008, 20: 254-256.
- [6] WEI X, DU Z Y, ZHENG X, et al. Synthesis and evaluation of curcumin-related compounds for anticancer activity [J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2012, 53: 235-245.
- [7] SHU F S, CHIUNG-KUEI H, SOO O L, et al. Determination of androgen receptor degradation enhancer ASC-J9[®] in mouse sera and organs with liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014, 88: 117-122.
- [8] 陆彬. 药物新剂型与新技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 230-232.
- [9] 平其能. 现代药剂学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1995: 607-608.
- [10] 叶兆伟, 承伟. 脂质体包封率测定方法及影响因素 [J]. 中国生物制品学杂志, 2007, 20(10): 789-792.
- [11] GOYAL P, GOYAL K, KUMAR S G V, et al. Liposomal drug delivery systems-Clinical applications [J]. Acta Pharm, 2005, 55(1): 1-25.
- [12] 孙维彤, 李爱国, 张娜, 等. 论文题目[J]. 脂质体粒径对促进托氟啉口服吸收的影响. 山东大学学报, 2007, 45(6): 640-642.
- [13] SUN W T, ZOU W W, HUANG G H, et al. Pharmacokinetics and targeting property of TFu-loaded liposomes with different sizes after intravenous and oral administration [J]. J Drug Target, 2008, 16(5): 357-365.
- [14] CHIRTHRANI D B, GHAZANI A A, CHAN W C W. Dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cell [J]. Nano Letters, 2006, 6(4): 662-668.

(责任编辑:殷丽莉)