

# 键合紫杉醇和姜黄素的金纳米棒的制备及体外抗肿瘤多药耐药研究<sup>Δ</sup>

徐绍辉<sup>1\*</sup>, 张志鹏<sup>2</sup>, 黄胜堂<sup>2#</sup>, 沈园园<sup>1</sup>, 于坤宏<sup>1</sup> (1. 上海交通大学药学院, 上海 200240; 2. 湖北科技学院药学院, 湖北咸宁 437100)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)15-2031-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.15.04

**摘要** 目的: 制备键合紫杉醇(PTX)和姜黄素(CUR)的金纳米棒(GNR)(PTX/CUR-BPGNR), 并初步研究其体外抗肿瘤多药耐药(MDR)作用及机制。方法: 用晶种生长法制备GNR, 然后经生物素-聚乙二醇修饰制成GNR(BPGNR)。分别合成PTX和CUR的疏辛酸酯(PTXLA和CURLA), 使用核磁共振氢谱(<sup>1</sup>H-NMR)和质谱等手段确定其化学结构。利用金硫键牢固的结合作用, 将PTXLA和CURLA连接到BPGNR表面, 得到键合PTX和CUR的BPGNR(PTX/CUR-BPGNR)。观察其形貌, 考察其载药量和体外释药情况(近红外光照和酯酶条件下)。以阿霉素(ADR)的MDR人乳腺癌细胞MCF-7/ADR为研究对象, 分别经PTX、CUR、PTX/CUR混合物和PTX/CUR-BPGNR处理后, 采用MTT法考察MCF-7/ADR细胞的存活率, 酶联免疫吸附测定法检测细胞中P-糖蛋白(P-gp)表达水平。结果: 成功制得PTX/CUR-BPGNR, 其大小、形状均一, 最大吸收波长为808 nm, 其中PTX和CUR的载药量分别为16.1%、8.4%, 同时给予近红外光照和酯酶能促进PTX和CUR释放, 64 h的累积释放度分别可达37.2%、39.1%。BPGNR、PTX、CUR、PTX/CUR混合物和PTX/CUR-BPGNR处理后MCF-7/ADR细胞的存活率分别为95.8%、71.2%、91.9%、45.8%、22.5%, 细胞中P-gp的相对表达水平分别为105.6%、75.2%、73.8%、51.7%。结论: 成功制得PTX/CUR-BPGNR, 其可提高CUR抑制P-gp表达的能力, 从而增强药物抗MDR的作用。

**关键词** 紫杉醇; 姜黄素; 金纳米棒; 抗肿瘤多药耐药; P-糖蛋白

- 革取得阶段性成果[J]. 中国食品药品监管, 2017(11): 10-11.
- [7] 张晓东, 王宏亮, 杨志敏. 近年我国化药创新药注册申请情况分析[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(18): 2041-2045.
- [8] 国家食品药品监督管理总局药品审评中心. 2013年度药品审评报告[EB/OL]. (2014-03-06)[2018-02-16]. <http://www.cde.org.cn/news.do?method=largeInfo&id=313280>.
- [9] 国家食品药品监督管理总局药品审评中心. 2014年度药品审评报告[EB/OL]. (2015-03-13)[2018-02-16]. <http://www.cde.org.cn/news.do?method=largeInfo&id=313425>.
- [10] 国家食品药品监督管理总局药品审评中心. 2015年度药品审评报告[EB/OL]. (2016-03-03)[2018-02-16]. <http://www.cde.org.cn/news.do?method=largeInfo&id=313528>.
- [11] 国家食品药品监督管理总局药品审评中心. 2016年度药品审评报告[EB/OL]. (2017-03-17)[2018-02-16]. <http://www.cde.org.cn/news.do?method=largeInfo&id=313842>.
- [12] 高磊, 邸云瑞, 黄清竹. 我国药品注册优先审评制度的进展与相关考量[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(22): 2656-2663.
- [13] 陈新, 黄清竹, 温宝书. 药品审评中心解决化学仿制药注册申请积压工作总结及分析[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(18): 2136-2142.
- [14] 樊玉录, 陈玉文. 2005-2016年我国I类新药申报审批情况分析[J]. 中国新药杂志, 2018, 27(2): 142-146.
- [15] 李慧, 孔玫, 吕勇均. 从药品注册专员的角度看药品审评中心的改革与发展[J]. 中国药房, 2013, 24(45): 4231-4234.
- [16] 姚雪芳, 丁锦希, 李鹏辉, 等. 国外新药特殊审评模式比较与借鉴[J]. 中国药学杂志, 2016, 51(19): 1714-1720.
- [17] 邵蓉, 孙海顺, 颜建周. 欧盟的优先药物激励制度研究[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(6): 614-619.
- [18] 马靖, 鲁爽. 提高药品审批时效的借鉴与思考[J]. 中国医药导刊, 2017, 19(5): 535-537.
- [19] 鲁爽, 卓宏, 王涛, 等. 中国与日本对新药注册特殊审批管理的比较[J]. 中国临床药理学杂志, 2012, 28(7): 557-560.
- [20] 李红. 美国的新药审评制度[J]. 中国党政干部论坛, 2016(3): 56-58.
- [21] 白锦表. 药物创新审评机制的分析与改进建议[J]. 中国药房, 2013, 24(21): 1930-1932.

Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81573352); 湖北科技学院药学重点学科专项科研项目(No.2016-18XZY04)

\* 硕士研究生. 研究方向: 纳米给药系统. 电话: 0715-8263260. E-mail: 473241565@qq.com

# 通信作者: 教授, 博士. 研究方向: 药用高分子材料. 电话: 0715-8263260. E-mail: hst6511@163.com

(收稿日期: 2018-05-02 修回日期: 2018-06-12)

(编辑: 刘明伟)

# Study on Chemical Binding of Paclitaxel and Curcumin onto Gold Nanorods: Preparation and *in vitro* Studies on Multidrug Resistant Cancer

XU Shaohui<sup>1</sup>, ZHANG Zhipeng<sup>2</sup>, HUANG Shengtang<sup>2</sup>, SHEN Yuanyuan<sup>1</sup>, YU Kunhong<sup>1</sup> (1.School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China; 2.School of Pharmacy, Hubei University of Science and Technology, Hubei Xianning 437100, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To prepare paclitaxel (PTX) and curcumin (CUR) chemically conjugated gold nanorod (GNR) (PTX/CUR-BPGNR), and to preliminarily study its anti-multidrug-resistant (MDR) tumor effect *in vitro* and mechanisms. METHODS: GNR was prepared by seed growth method and modified with biotin-polyethylene glycol (Biotin-PEG) to obtain BPGNRs. Lipoic acid PTX and CUR (PIXLA and CURLA) were synthesized; <sup>1</sup>H-NMR and MS were used to confirm their chemical structures. PTXLA and CURLA were connected to BPGNR surface to obtain PIX and CUR-bonding BPGNR (PTX/CUR-BPGNR) via strong binding of Au-S bond. The morphology of PTX/CUR-BPGNR was observed, and drug-loading amount and *in vitro* drug release were investigated (under near-infrared illumination and esterase condition). Adriamycin (ADR) MDR breast cancer MCF-7/ADR cells were selected as research objects, and MTT assay was used to investigate the survival rate of cells after treated with BPGNR, PTX, CUR, PTX/CUR mixture and PTX/CUR-BPGNR, and ELISA was used to detect the expression of P-gp. RESULTS: PTX/CUR-BPGNR was prepared successfully with uniform size and shape. The maximum absorption wavelength was 808 nm, and drug-loading amount of PTX and CUR were 16.1% and 8.4%, respectively. The preparations were given near-infrared illumination and esterase to promote the release of PTX and CUR. 64 h accumulative drug release rates were 37.2% and 39.1%. Survival rates of MCF-7/ADR cells after treated with BPGNR, PTX, CUR and PTX/CUR mixture, PTX/CUR-BPGNR were 95.8%, 71.2%, 91.9%, 45.8% and 22.5%, respectively. The relative expressions of P-gp in cells were 105.6%, 75.2%, 73.8%, 51.7%, respectively. CONCLUSIONS: PTX/CUR-BPGNR is successfully prepared and can improve the ability of CUR inhibiting the expression of P-gp so as to strengthen its anti-MDR effects.

**KEYWORDS** Paclitaxel; Curcumin; Gold nanorods; Multidrug resistant cancer; P-gp

多药耐药(MDR)是临床上肿瘤化疗失败的主要原因,其产生机制较为复杂,但最常见的原因是肿瘤细胞表面药物外排转运体如P-糖蛋白(P-gp)过表达,使细胞向外排出抗肿瘤药物,导致细胞内药物浓度维持在较低水平,从而使肿瘤细胞对药物的耐受性增强<sup>[1]</sup>。针对这一原因,目前抗MDR研究主要有两种策略<sup>[2-3]</sup>:(1)使药物避开药物外排转运体的识别,改变药物进入细胞的方式;(2)抑制药物外排转运体的表达或功能。

联合化疗是临床广泛使用的治疗方法,具有减小抗肿瘤药物剂量、减轻耐药风险等优点<sup>[4]</sup>。众多研究<sup>[2-3]</sup>报道,抗肿瘤药物与药物外排转运体抑制剂(如P-gp抑制剂)联用,可以显著逆转肿瘤的MDR。紫杉醇(PTX)是临床上广泛用于治疗乳腺癌、卵巢癌的抗肿瘤药物,其主要通过抑制肿瘤细胞有丝分裂,从而阻止癌细胞分裂增殖。有研究表明,PTX是P-gp的作用底物,P-gp过表达的肿瘤细胞(如MDR细胞MCF-7/DOX)可以减少PTX在细胞内的蓄积<sup>[5-6]</sup>。姜黄素(CUR)是一种具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤等多种药理活性的天然产物,其能抑制核转录因子κB(NF-κB)等通路从而抑制肿瘤生长。近年来许多研究表明,CUR是一种优良的P-gp抑制剂,能够逆转P-gp介导的肿瘤MDR<sup>[7-8]</sup>。鉴于PTX和CUR不同的抗肿瘤机制及CUR的P-gp抑制功能,因此PTX和CUR联用后,不仅有助于减轻PTX带来的毒副作用,也可以在一定程度上克服肿瘤的MDR<sup>[9-10,15]</sup>。

金纳米棒(GNR)具有良好的生物相容性和较大的比表面积,是一种优良的药物载体。药物分子、基因等生物大分子能通过静电吸附或化学键合等方式连接到其表面,从而实现靶向药物输送。GNR还具有高效的光热转换效率,能吸收近红外(NIR)光照并将其转换成热量,被广泛用于肿瘤光热治疗<sup>[11]</sup>。

本研究将PTX和CUR分别与硫辛酸(LA)反应合成其对应的硫辛酸酯(PTXLA和CURLA),然后利用金硫键牢固的结合作用,将PTXLA和CURLA连接到经生物素-聚乙二醇(Biotin-PEG)修饰的GNR(BPGNR)表面制成键合PTX和CUR的BPGNR(PTX/CUR-BPGNR),并初步研究其体外抗肿瘤MDR作用及机制。

## 1 材料

### 1.1 仪器

JEM-2100F 透射电子显微镜(日本电子株式会社); U2910 紫外-可见光-NIR 分光光度计(日本日立公司); LENS-808CC-A5 光纤激光连接器(深圳理欧光电科技有限公司); Varioskan Flash 酶标仪(美国 Thermo 公司); Mercury Plus-400M 核磁共振波谱仪(美国 Varian 公司); HC-2066 高速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司); Nano-ZS/ZEN-3600 纳米粒度和 Zeta 电位仪(英国马尔文仪器有限公司); 超高效液相色谱-飞行时间质谱仪(美国 Waters 公司); 1260 高效液相色谱(HPLC)仪和 ZORBAX 色谱柱(美国安捷伦科技有限公司)。

## 1.2 药品与试剂

PTX原料药(云南紫云生物分析公司,批号:Z160115,纯度:99%);CUR原料药(上海笛柏化学品技术有限公司,批号:FN19,纯度:99%);PTX、CUR标准品(上海广锐生物科技有限公司,批号:162-171127、007-150413,纯度:均>98%);十六烷基三甲基溴化铵(CTAB,纯度:99%)、硝酸银(纯度:>99.99%)、猪肝酯酶(PLE)(美国Sigma-Aldrich公司,批号:BCBS5500V、MKBX7704V、SLBK3815V);3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐、胰酶、胎牛血清(FBS)(上海索莱宝生物科技有限公司,批号:303H0510、20150623、140716);Biotin-PEG-LA(上海芃硕生物科技有限公司,批号:C02233);硼氢化钠、氯金酸、抗坏血酸、3-羟基-7-溴-2-萘甲酸(7-BrHNA,纯度:99%)、二氯甲烷(DCM)、LA、四氢呋喃(THF)、三氟乙酸(TFA)、正己烷、聚山梨酯80、石油醚、乙酸乙酯、4-二甲氨基吡啶(DMAP)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl)(国药集团化学试剂有限公司,均为分析纯);人P-gp酶联免疫吸附(ELISA)检测试剂盒(北京百奥莱博科技有限公司,批号:201612)。

## 1.3 细胞

耐阿霉素和PTX的人乳腺癌细胞MCF-7/ADR由上海药物研究所提供。

## 2 方法与结果

### 2.1 BPGNR的制备

按照文献提供的晶种生长法制备GNR<sup>[12]</sup>。首先制备金种子溶液,将5 mL 0.2 mol/L CTAB溶液和5 mL 0.5 mmol/L 氯金酸溶液混合,随后加入0.6 mL冰浴后的0.01 mmol/L 硼氢化钠溶液,上述溶液剧烈搅拌2 min后,接着在30 ℃水浴中静置2 h备用。然后制备生长液,取1.080 g CTAB、0.061 2 g 7-BrHNA溶于30 mL 30 ℃水中,加入0.96 mL 4 mmol/L 硝酸银,静置15 min后,加入30 mL 1 mmol/L 氯金酸溶液、0.1 mL 37%浓盐酸,400 r/min搅拌15 min。随后向其中加入0.3 mL 0.1 mol/L 抗坏血酸溶液,剧烈搅拌1 min后,加入96 μL制备好的金种子溶液,剧烈搅拌30 s后,在30 ℃水浴中静置生长12 h,生长后的GNR溶液,以6 800×g离心30 min,用去离子水洗涤3次,将所得沉淀保存于去离子水中,即得CTAB表面包覆的GNR(CTAB-GNR)。

取2 mL浓缩后的CTAB-GNR,加入4 mg Biotin-PEG-LA,室温搅拌12 h,以6 800×g离心30 min,用去离子水洗涤3次,将所得沉淀保存于去离子水中,即得BPGNR。据文献报道,由于CTAB为带正电荷的阳离子化合物,而Biotin-PEG为带微弱负电荷的高分子,因此可以通过GNR表面电位变化来判断该修饰过程是否完成<sup>[12]</sup>。本试验用Zeta电位仪测定CTAB-GNR和BPGNR

的电位,分别为+42.15 mV和-5.77 mV。修饰前后电位值的改变表明,GNR表面的CTAB被Biotin-PEG取代,即成功制得BPGNR。

### 2.2 PTXLA和CURLA的合成

2.2.1 PTXLA PTXLA为本试验首次合成。向25 mL圆底烧瓶中加入206.4 mg LA、191.9 mg EDC·HCl、122.1 mg DMAP、15 mL DCM,室温搅拌4 h,加入856.2 mg PTX,继续室温搅拌24 h,旋干后,粗品用硅胶柱层析法进行分离提纯,以乙酸乙酯-正己烷(3:2, V/V)为洗脱剂进行洗脱,得到浅黄色固体837.9 mg,产率为80.1%,测得熔点为193~196 ℃。用<sup>1</sup>H-NMR进行表征,所得核磁数据为:<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>),化学位移( $\delta$ , ppm):8.12(d,  $J$ =7.3 Hz, 2H), 7.72(d,  $J$ =7.4 Hz, 2H), 7.60(t,  $J$ =7.4 Hz, 1H), 7.50(t,  $J$ =8.0 Hz, 3H), 7.37(dt,  $J$ =29.7, 9.3 Hz, 7H), 6.85(d,  $J$ =9.0 Hz, 1H), 6.28(s, 1H), 6.23(d,  $J$ =8.4 Hz, 1H), 5.95(dd,  $J$ =9.1, 2.8 Hz, 1H), 5.67(d,  $J$ =7.0 Hz, 1H), 5.50(d,  $J$ =2.0 Hz, 1H), 4.96(d,  $J$ =8.2 Hz, 1H), 4.43(dd,  $J$ =10.7, 6.7 Hz, 1H), 4.30(d,  $J$ =8.4 Hz, 1H), 4.19(d,  $J$ =8.3 Hz, 1H), 3.80(d,  $J$ =7.1 Hz, 1H), 3.47(dd,  $J$ =13.1, 6.8 Hz, 1H), 3.21~3.02(m, 2H), 2.60~1.30(14H, m), 2.44(s, 3H), 2.22(s, 3H), 1.93(s, 3H), 1.67(s, 3H), 1.23(d,  $J$ =7.6 Hz, 3H), 1.12(s, 3H)。质谱(MS)质荷比( $m/z$ ):1 043.376 0[M+H]<sup>+</sup>。PTXLA的合成路线图见图1A,<sup>1</sup>H-NMR图见图2A。

2.2.2 CURLA CURLA为本试验首次合成。向25 mL圆底烧瓶中加入206.5 mg LA、190.9 mg EDC·HCl、22.1 mg DMAP、15 mL THF,室温搅拌2 h,加入372.6 mg CUR,继续室温搅拌48 h,旋干后,粗品用硅胶柱层析法进行分离提纯,以石油醚-乙酸乙酯(3:2, V/V)为洗脱剂进行洗脱,得到黄色固体425.4 mg,产率为75.3%,测得熔点为175~177 ℃。用<sup>1</sup>H-NMR进行表征,所得核磁数据为:<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ (ppm):7.61(d,  $J$ =2.5 Hz, 1H), 7.57(d,  $J$ =2.5 Hz, 1H), 7.17~7.08(m, 3H), 7.03(d,  $J$ =7.9 Hz, 2H), 6.92(d,  $J$ =8.2 Hz, 1H), 6.51(dd,  $J$ =23.1, 15.8 Hz, 2H), 5.86(s, 1H), 5.82(s, 1H), 3.94(s, 3H), 3.86(s, 3H), 3.64~3.54(m, 1H), 3.15(dtd,  $J$ =17.8, 11.1, 6.7 Hz, 2H), 2.60(t,  $J$ =7.3 Hz, 2H), 2.47(td,  $J$ =12.4, 6.4 Hz, 1H), 1.92(dq,  $J$ =13.7, 7.1 Hz, 1H), 1.76(ddd,  $J$ =22.0, 14.0, 7.6 Hz, 4H), 1.67~1.43(m, 4H)。MS( $m/z$ ):557.166 7[M+H]<sup>+</sup>。CURLA的合成路线图见图1B,<sup>1</sup>H-NMR图见图2B。

### 2.3 PTXLA和CURLA的含量测定

2.3.1 PTXLA的含量测定 PTXLA含量测定的色谱条件为本试验首次建立。色谱柱为安捷伦Zorbax反相色谱柱SB-C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-水(3:1, V/V),流速为1.0 mL/min,柱温为30 ℃,进样量为

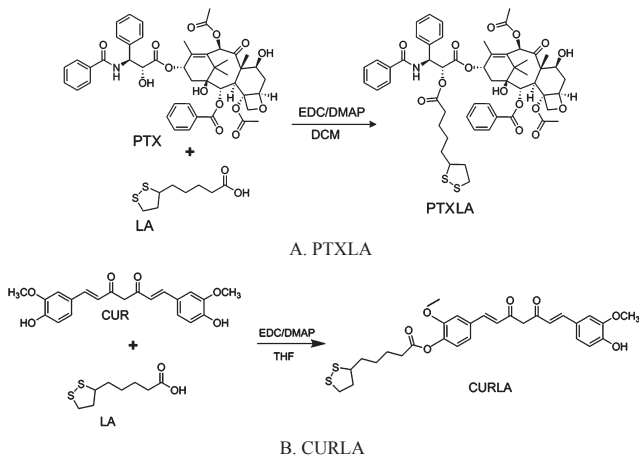
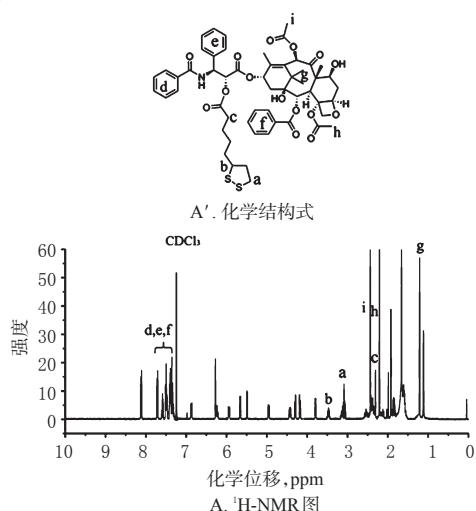


图1 PTXLA和CURLA的合成路线

Fig 1 Synthesis route of PTXLA and CURLA

PTXLA:



CURLA:

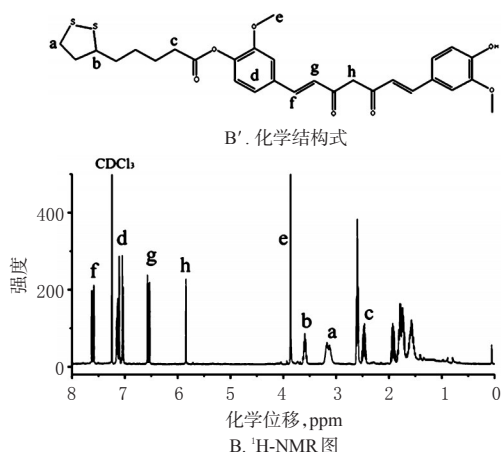


图2 PTXLA和CURLA的<sup>1</sup>H-NMR图

Fig 2 <sup>1</sup>H-NMR spectrum of PTXLA and CURLA

20  $\mu$ L, 检测波长为 227 nm。该色谱条件下, PTX、CUR 和 CURLA 等其他成分和溶剂对 PTXLA 峰测定无干扰; 用峰面积归一化法测得 PTXLA 样品中 PTXLA 的纯度为 99.2%; PTXLA 的定量下限为 0.09  $\mu$ g/mL; 精密密度试验中峰面积的 RSD=1.25% ( $n=5$ ); 24 h 稳定性试验中

峰面积的 RSD=0.96% ( $n=5$ ); 重复性试验中含量的 RSD=1.78% ( $n=5$ )。

2.3.2 CURLA 的色谱条件 CURLA 含量测定的色谱条件为本试验首次建立。色谱柱为安捷伦 Zorbax 反相色谱柱 SB-C<sub>18</sub> (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m), 流动相为乙腈-2% TFA (4:1,  $V/V$ ), 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 30  $^{\circ}$ C, 进样量为 20  $\mu$ L, 检测波长为 426 nm。该色谱条件下, PTX、PTXLA 和 CURLA 等其他成分和溶剂对 CURLA 峰测定无干扰; 用峰面积归一化法测得 CURLA 样品中 CURLA 的纯度为 99.4%; CURLA 的定量下限为 0.07  $\mu$ g/mL; 精密密度试验中峰面积的 RSD=1.65% ( $n=5$ ); 24 h 稳定性试验中峰面积的 RSD=1.13% ( $n=5$ ); 重复性试验中含量的 RSD=1.86% ( $n=5$ )。

## 2.4 PTX/CUR-BPGNR的制备与表征

向 10 mL 圆底烧瓶中加入 5 mL 浓缩的 BPGNR、8.0 mg PTXLA、5.0 mg CURLA, 室温避光搅拌 24 h, 反应结束后, 以 6 800 $\times$ g 离心 30 min, 沉淀即为 PTX/CUR-BPGNR, 将沉淀用超纯水洗涤 3 次后保存于去离子水中。未负载到 GNR 上的 PTXLA 和 CURLA 存在于上清液中, 合并每次洗涤离心后的上清液, 测定上清液中 PTXLA 和 CURLA 的量, 计算 PTX/CUR-BPGNR 的载药量=(加入量-上清液中测得量)/制剂总量 $\times$ 100%。结果显示, PTX/CUR-BPGNR 中 PTX 和 CUR 的载药量分别为 16.1% 和 8.4%。使用透射电子显微镜观察 PTX/CUR-BPGNR 形貌, 发现其大小、形状比较均一, 长径为 51.5 nm, 短径为 12.8 nm。使用紫外-可见光-NIR 分光光度计检测 PTX/CUR-BPGNR 光谱, 可见其最大吸收波长为 808 nm。PTX/CUR-BPGNR 的透射电子显微镜图和紫外-可见光-NIR 吸收光谱图见图 3。

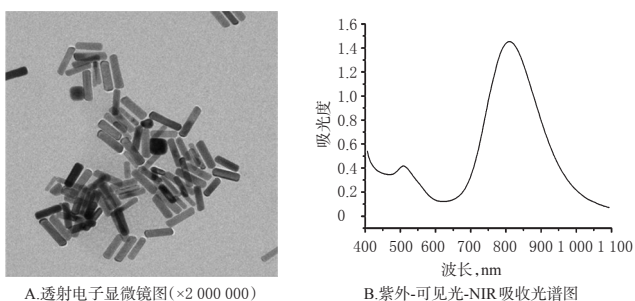


图3 PTX/CUR-BPGNR的透射电子显微镜图和紫外-可见光-NIR吸收光谱图

Fig 3 TEM and UV-Vis-NIR absorption spectra of PTX/CUR-BPGNR

## 2.5 PTX/CUR-BPGNR体外释药试验

2.5.1 PTX的含量测定 PTX的色谱条件为本试验自行建立。色谱柱为安捷伦 Zorbax 反相色谱柱 SB-C<sub>18</sub> (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m), 流动相为乙腈-水(1:1,  $V/V$ ), 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 30  $^{\circ}$ C, 进样量为 20  $\mu$ L, 检测波长为 227 nm。该色谱条件下, CUR、PTXLA 和 CURLA 等其他成分和溶剂对 PTX 峰测定无干扰; 峰面积(A)

对PTX质量浓度( $c$ )的回归方程为  $A=34.987c+3.2176$  ( $r=0.9999, n=5$ ), PTX检测质量浓度的线性范围为  $0.1\sim 10.0\ \mu\text{g/mL}$ ; PTX的定量下限为  $0.05\ \mu\text{g/mL}$ ; 加样回收率为  $96.8\%$  ( $n=6$ ); 精密度试验中峰面积的  $\text{RSD}=1.06\%$  ( $n=5$ );  $24\ \text{h}$ 稳定性试验中峰面积的  $\text{RSD}=1.17\%$  ( $n=5$ ); 重复性试验中含量的  $\text{RSD}=1.96\%$  ( $n=5$ )。

**2.5.2 CUR的含量测定** CUR的色谱条件为本试验自行建立。色谱柱为安捷伦 Zorbax 反相色谱柱 SB-C<sub>18</sub> ( $250\ \text{mm}\times 4.6\ \text{mm}, 5\ \mu\text{m}$ ), 流动相为乙腈-2% TFA ( $3:2, V/V$ ), 流速为  $1.0\ \text{mL/min}$ , 柱温为  $30\ ^\circ\text{C}$ , 进样量为  $20\ \mu\text{L}$ , 检测波长为  $426\ \text{nm}$ 。该色谱条件下, PTX、PTXLA 和 CURLA 等其他成分和溶剂对 CUR 峰测定无干扰; 峰面积 ( $A$ ) 对 CUR 质量浓度 ( $c$ ) 的回归方程为  $A=129.94c+3.895$  ( $r=0.9998, n=5$ ), CUR 检测质量浓度的线性范围为  $0.1\sim 10.0\ \mu\text{g/mL}$ ; PTX 的定量下限为  $0.03\ \mu\text{g/mL}$ ; 加样回收率为  $95.2\%$  ( $n=6$ ); 精密度试验中峰面积的  $\text{RSD}=1.32\%$  ( $n=5$ );  $24\ \text{h}$ 稳定性试验中峰面积的  $\text{RSD}=1.78\%$  ( $n=5$ ); 重复性试验中含量的  $\text{RSD}=1.89\%$  ( $n=5$ )。

**2.5.3 体外药物释放考察** 取  $1\ \text{mL}$  的 PTX/CUR-BPGNR 水溶液 (质量浓度为  $40\ \mu\text{g/mL}$ , 以 GNR 计算) 装入透析袋内 (截留分子量  $3\ 500$ ), 放入  $10\ \text{mL}$  以下 4 种释放介质中: ①磷酸盐缓冲液 (PBS)+聚山梨酯 80 ( $0.5\%, m/V$ , 下同); ②PBS+聚山梨酯 80+NIR 光照 (功率为  $5.0\ \text{W/cm}^2$ ,  $20\ \text{min}$  下同); ③PBS+聚山梨酯 80+ $30\ \text{U/mL}$  PLE (模拟肿瘤细胞内高浓度酯酶环境); ④PBS+聚山梨酯 80+NIR 光照+ $30\ \text{U/mL}$  PLE,  $37\ ^\circ\text{C}$  下水浴摇床中  $2\ 000\ \text{r/min}$  振荡, 分别于  $2, 4, 8, 16, 32, 64\ \text{h}$  取出  $0.1\ \text{mL}$  释放介质, 然后补加等体积的相应新鲜释放介质, 在每次补加释放介质后, 对第二组和第四组给予  $20\ \text{min}$  NIR 光照。测定释放液中 PTX 和 CUR 的累积释放度, 绘制释放曲线。4 种介质中 PTX 和 CUR 从 PTX/CUR-BPGNR 中的释放曲线见图 4。

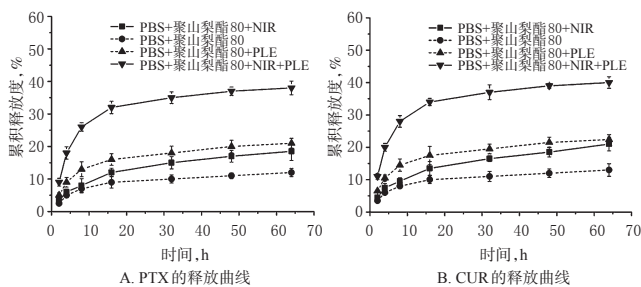


图 4 4 种介质中 PTX 和 CUR 从 PTX/CUR-BPGNR 中的释放曲线

Fig 4 Release curve of PTX and CUR from PTX/CUR-BPGNR in four kinds of medium

由图 4 可以看出, 当分别给予 NIR 照射和 PLE 时, PTX/CUR-BPGNR 释放出游离的 PTX 和 CUR 的速度都加快。此外, 当同时给予 NIR 照射和 PLE 时, PTX 和

CUR 的释放速度最快, PTX 和 CUR 的  $64\ \text{h}$  累积释放度分别可达  $37.2\%$ 、 $39.1\%$ 。这表明 PTX/CUR-BPGNR 的药物释放具有 NIR 和酯酶响应性, 能够在 NIR 照射和肿瘤细胞内高浓度酯酶等刺激下加快释放出游离 PTX 和 CUR。

## 2.6 细胞毒性试验

将 MCF-7/ADR 细胞接种于 96 孔板中,  $24\ \text{h}$  后, 弃旧培养基, 分别加入含有 BPGNR、PTX、CUR、PTX/CUR 混合物 ( $2:1, m/m$ )、PTX/CUR-BPGNR (PTX、CUR、BPGNR 质量浓度分别为  $8, 4, 40\ \mu\text{g/mL}$ ) 的培养基, 并在加入药物后  $2, 4, 8, 16, 32, 64\ \text{h}$  对各组细胞分别给予  $20\ \text{min}$  NIR 光照 (功率为  $5.0\ \text{W/cm}^2$ ), 另将不作任何处理的细胞作为阴性对照。所有细胞培养  $48\ \text{h}$  后, 每孔加入  $0.5\ \text{mg/mL}$  的 MTT 溶液  $200\ \mu\text{L}$ , 避光孵育  $4\ \text{h}$  后弃上清液, 每孔加入  $200\ \mu\text{L}$  二甲基亚砷溶解细胞内甲臞晶体。用酶标仪在  $570\ \text{nm}$  波长处测定吸光度, 计算细胞存活率 (以阴性对照为  $100\%$  计)。试验重复 3 次。5 种样品的体外细胞毒性试验结果见图 5。

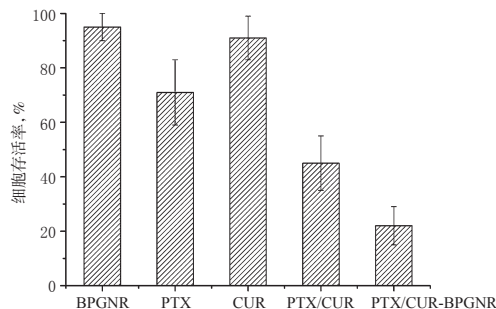


图 5 5 种样品的细胞毒性试验结果

Fig 5 Results of cytotoxicity test of 5 kinds of samples

由图 5 可知, BPGNR 经过 NIR 照射后, 对细胞存活率影响较小, 仍为  $95.8\%$ , 这表明在给定功率 NIR 光照下该质量浓度的 BPGNR 对 MCF-7/ADR 细胞无明显毒性。经 PTX 和 CUR 处理的 MCF-7/ADR 细胞存活率分别为  $71.2\%$  和  $91.9\%$ , 表明 PTX 对 MCF-7/ADR 细胞有较明显毒性, 而 CUR 对 MCF-7/ADR 细胞毒性较小。当细胞暴露在 PTX/CUR 混合物中, 细胞存活率显著降低至  $45.8\%$ , 表明 PTX 和 CUR 联用可增强对 MCF-7/ADR 细胞的杀伤作用。PTX/CUR-BPGNR 处理过的 MCF-7/ADR 细胞存活率仅为  $22.5\%$ , 表明 PTX/CUR-BPGNR 有很强抗 MDR 肿瘤的作用。

## 2.7 对 P-gp 表达的影响

将 MCF-7/ADR 细胞接种于 12 孔板中,  $24\ \text{h}$  后, 弃旧培养基, 加入含 PTX、CUR、PTX/CUR 的混合物 ( $2:1, m/m$ )、PTX/CUR-BPGNR (PTX、CUR、BPGNR 质量浓度分别为  $8, 4, 40\ \mu\text{g/mL}$ ) 培养基, 并在加药后  $2, 4, 8, 16, 32, 64\ \text{h}$  对各组细胞分别给予  $20\ \text{min}$  NIR 光照 (功率为  $5.0\ \text{W/cm}^2$ ), 另将不作任何处理的细胞作为阴性对照。所有细胞培养  $24\ \text{h}$  后, 细胞消化, 离心洗涤, 用反复冻融法裂解细

胞,离心后收集细胞裂解上清液,按照 P-gp ELISA 检测试剂盒操作,测定各组细胞中 P-gp 表达情况。以阴性对照 MCF-7/ADR 细胞的 P-gp 表达为 100% 计,经 PTX、CUR、PTX/CUR 混合物、PTX/CUR-BPGNR 处理后 MCF-7/ADR 细胞中 P-gp 的相对表达水平分别为 105.6%、75.2%、73.8%、51.7%。可见 CUR 能显著抑制 MCF-7/ADR 细胞中 P-gp 的表达,这与文献报道一致<sup>[13-14]</sup>。PTX/CUR-BPGNR 对 P-gp 抑制作用最强,经过其处理的 MCF-7/ADR 细胞中 P-gp 表达水平仅为未经任何处理细胞的 45.2%。这解释了在细胞毒性试验中,经 PTX/CUR-BPGNR 处理过的 MCF-7/ADR 细胞存活率显著降低的原因。

### 3 讨论

PTX 和 CUR 联合治疗用于提高肿瘤治疗效果已有大量文献报道<sup>[9-10,15]</sup>,但有关其肿瘤 MDR 效果评价的研究报道目前较少。本研究首次提出将 PTX 和 CUR 通过 LA 作为桥梁,将二者键合到 GNR 上,制备得到共输送 PTX 和 CUR 的酯酶和 NIR 响应的纳米药物输送系统 PTX/CUR-BPGNR。

接着笔者评价了 PTX/CUR-BPGNR 的体外药物释放行为、细胞毒性及其对 MCF-7/ADR 细胞 P-gp 表达的影响等。该载药系统对较低功率 NIR 和模拟细胞内浓度酯酶具有响应性,在这些条件刺激下能加速释放药物。细胞毒性试验显示,使用空白载体材料 BPGNR 在给定功率 NIR 照射下作用细胞,细胞存活率达到 95.8%,这表明空白载体材料对 MCF-7/ADR 细胞毒性较小。在 NIR 照射下,PTX/CUR-BPGNR 对 MCF-7/ADR 细胞有较强杀伤作用,细胞存活率仅为 22.5%,起到较为显著的抗肿瘤 MDR 效果。P-gp 表达检测则表明,CUR 可抑制 MCF-7/ADR 细胞中 P-gp 表达水平,PTX/CUR-BPGNR 可以提高 CUR 抑制 P-gp 表达的能力,从而起到增强抗 MDR 肿瘤效果。

### 参考文献

[1] RIORDAN JR, DEUCHARS K, KARTNER N, et al. Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines[J]. *Nature*, 1985, 316(6031): 817-819.

[2] ZHANG Y, ZHANG C, CHEN J, et al. A trackable mitochondria-targeting nanomicellar loaded with doxorubicin for overcoming drug resistance[J]. *ACS Appl Mater Inter*, 2017, 9(30): 25152-25163.

[3] LIU J, HE Y, ZHANG J, et al. Functionalized nanocarrier combined seizure-specific vector with P-glycoprotein modulation property for antiepileptic drug delivery[J]. *Biomaterials*, 2016, 74(2): 64-76.

[4] XIAO B, SI X, HAN MK, et al. Co-delivery of camptothecin and curcumin by cationic polymeric nanoparticles for synergistic colon cancer combination chemotherapy[J]. *J Mater Chem B*, 2015, 3(39): 7724-7733.

[5] WANG Z, LI X, WANG D, et al. Concurrently suppress-

ing multidrug resistance and metastasis of breast cancer by co-delivery of paclitaxel and honokiol with pH-sensitive polymeric micelles[J]. *Acta Biomater*, 2017. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.08.027.

[6] ASSANHOU AG, LI W, ZHANG L, et al. Reversal of multidrug resistance by co-delivery of paclitaxel and lisdamine using a TPGS and hyaluronic acid dual-functionalized liposome for cancer treatment[J]. *Biomaterials*, 2015. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.09.022.

[7] SAHU BP, HAZARIKA H, BHARADWAJ R, et al. Curcumin-docetaxel co-loaded nanosuspension for enhanced anti-breast cancer activity[J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2016, 13(8): 1065-1074.

[8] DASH TK, KONKIMALLA VB. Selection of P-glycoprotein inhibitor and formulation of combinational nanoformulation containing selected agent curcumin and DOX for reversal of resistance in K562 cells[J]. *Pharm Res*, 2017, 34(7458): 1-10.

[9] YANG Z, SUN N, CHENG R, et al. pH multistage responsive micellar system with charge-switch and PEG layer detachment for co-delivery of paclitaxel and curcumin to synergistically eliminate breast cancer stem cells[J]. *Biomaterials*, 2017. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2017.09.013.

[10] YAO Q, GUTIERREZ DC, HOANG NH, et al. Efficient co-delivery of paclitaxel and curcumin by novel bottle-brush copolymer-based micelles[J]. *Mol Pharm*, 2017, 14(7): 2378-2389.

[11] ALKILANY AM, THOMPSON LB, BOULOS SP, et al. Gold nanorods: their potential for photothermal therapeutics and drug delivery, tempered by the complexity of their biological interactions[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64(2): 190-199.

[12] ZHANG W, WANG F, WANG Y, et al. pH and near-infrared light dual-stimuli responsive drug delivery using DNA-conjugated gold nanorods for effective treatment of multidrug resistant cancer cells[J]. *J Control Release*, 2016. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.04.001.

[13] CAVACO MC, PEREIRA C, KREUTZER B, et al. Evading P-glycoprotein mediated-efflux chemoresistance using solid lipid nanoparticles[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016. DOI: 10.1016/j.ejpb.2016.10.024.

[14] ZHAO X, CHEN Q, LI Y, et al. Doxorubicin and curcumin co-delivery by lipid nanoparticles for enhanced treatment of diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in mice[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015. DOI: 10.1016/j.ejpb.2015.03.003.

[15] RUTTALA HB, KO YT. Liposomal co-delivery of curcumin and albumin/paclitaxel nanoparticle for enhanced synergistic antitumor efficacy[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2015. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.02.040.

(收稿日期:2018-03-15 修回日期:2018-05-15)

(编辑:邹丽娟)