

# 姜黄素纳米胶束的制备、表征及抗酒精性肝病体外活性评价<sup>△</sup>

李禄辉<sup>1\*</sup>, 耿广平<sup>2</sup>, 徐磊<sup>1</sup>, 张志坤<sup>3,4</sup>, 蒲晓辉<sup>3#</sup>(1. 河南应用技术职业学院医药学院, 河南开封 475004; 2. 河南医药健康技师学院医药经贸系, 河南开封 475004; 3. 河南大学药学院, 河南开封 475004; 4. 巩义市人民医院药剂科, 郑州 451200)

中图分类号 R944;R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)10-1203-06  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.10.09



**摘要** 目的 制备并表征姜黄素纳米胶束(简称“Cur/mPEG-PBLA胶束”),并评价其抗酒精性肝病的体外活性。方法 以聚乙二醇-聚天冬氨酸苄酯嵌段共聚物(mPEG-PBLA)为载体,采用透析法制备Cur/mPEG-PBLA胶束;观察其外观和显微形态,检测其粒径、多分散性指数、Zeta电位、包封率及载药量,并进行体外释放、pH稳定性、热稳定性、稀释稳定性、储存稳定性、血浆稳定性考察和溶血实验。以人肝癌细胞、正常肝细胞为对象,以Cur对照品溶液为参照,采用无水乙醇干预建立酒精性肝病细胞模型,评价Cur/mPEG-PBLA胶束对酒精性肝病的体外预防和改善作用。结果 所制Cur/mPEG-PBLA胶束呈淡黄色乳光,呈圆球形且分布均匀,平均粒径约140 nm,多分散性指数 $<0.3$ , Zeta电位为 $(-8.15 \pm 0.05)$  mV;包封率及载药量分别为 $(73.26 \pm 3.16)\%$ 、 $(4.87 \pm 0.42)\%$ 。Cur对照品在10 h时的累积释放率接近80%;Cur/mPEG-PBLA胶束在8 h时的累积释放率仅为28.94%,在48 h时的累积释放率才达48.25%。Cur/mPEG-PBLA胶束的pH稳定性、热稳定性均优于Cur对照品溶液,稀释稳定性、储存稳定性、血浆稳定性均较好,且不会引发溶血现象。Cur对照品溶液和Cur/mPEG-PBLA胶束对2种细胞的酒精性损伤均有不同程度的体外预防和改善作用;且作用48 h时,Cur/mPEG-PBLA胶束的上述作用均显著优于同质量浓度的Cur对照品溶液( $P < 0.05$ )。结论 Cur/mPEG-PBLA胶束可提高Cur的pH稳定性、热稳定性,延缓其释放速度,同时具有更强的体外抗酒精性肝病活性。

**关键词** 姜黄素;纳米胶束;酒精性肝病;预防;改善;体外活性

## Preparation and characterization of curcumin nanomicelles and evaluation of *in vitro* hepatoprotective activity against alcohol liver disease

LI Luhui<sup>1</sup>, GENG Guangping<sup>2</sup>, XU Lei<sup>1</sup>, ZHANG Zhikun<sup>3,4</sup>, PU Xiaohui<sup>3</sup>(1. School of Medicine and Pharmacy, Henan Technical Institute, Henan Kaifeng 475004, China; 2. Dept. of Medicine and Trade, Health Technician College of Medicine and Health, Henan Kaifeng 475004, China; 3. School of Pharmacy, Henan University, Henan Kaifeng 475004, China; 4. Dept. of Pharmacy, Gongyi People's Hospital, Zhengzhou 451200, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To prepare and characterize curcumin nanomicelles (hereinafter referred to as Cur/mPEG-PBLA micelles), and to evaluate the *in vitro* hepatoprotective activity against alcohol liver disease (ALD). **METHODS** Cur/mPEG-PBLA micelles were prepared with the dialysis method using methoxy-poly(ethylene glycol)-poly( $\beta$ -benzyl-L-aspartate) (mPEG-PLGA) as the carrier. The appearance and microscopic morphology of Cur/mPEG-PBLA micelles were observed, and particle size, polydispersity index, Zeta potential, encapsulation efficiency and drug loading content were all detected. The *in vitro* release, pH stability, thermal stability, dilution stability, storage stability, plasma stability tests, and hemolysis experiments were all performed. The cell model of ALD was established with anhydrous ethanol intervention using human liver cancer cells and normal liver cells as objects, Cur reference solution as reference, to evaluate *in vitro* preventive and ameliorative effects of Cur/mPEG-PBLA micelles on ALD. **RESULTS** The prepared Cur/mPEG-PBLA micelles exhibited a pale-yellow milky light, with a spherical shape and uniform distribution. The average particle size was about 140 nm, and the polydispersity index was less than 0.3. Zeta potential was  $(-8.15 \pm 0.05)$  mV; the encapsulation efficiency was  $(73.26 \pm 3.16)\%$ , and the drug loading content was  $(4.87 \pm 0.42)\%$ . The cumulative release of Cur reference substance was close to 80% at 10 h; the cumulative release of Cur/mPEG-PBLA micelles at 8 h was 28.94% and only 48.25% at 48 h. pH stability and thermal stability of Cur/mPEG-PBLA micelles were better

than those of Cur reference solution; Cur/mPEG-PBLA micelles showed good dilution stability, storage stability and plasma stability, and would not cause hemolysis. Cur reference solution and Cur/mPEG-PBLA micelles had varying degrees of *in vitro* preventive and ameliorative effects on ALD in two types of cells; after 48 h of application, the above effects of Cur/mPEG-PBLA micelles were significantly better than those

<sup>△</sup>基金项目 河南省科技发展计划(No.232102311178);河南应用技术职业学院中药学教学名师工作室项目(No.应院人[2022]230号);河南应用技术职业学院教学创新团队项目(No.应院教[2022]246号)

\* 第一作者 副教授。研究方向:药物新剂型及质量分析。  
E-mail: liluhui2021@163.com

# 通信作者 教授,博士。研究方向:药物新剂型及质量分析。  
E-mail: pgh425@163.com

of Cur reference solution at the same mass concentration ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSIONS** Cur/mPEG-PBLA micelles can improve pH stability and thermal stability of Cur, delays degradation rate, and have better *in vitro* hepatoprotective activity against ALD.

**KEYWORDS** curcumin; nanomicelles; alcohol liver disease; prevention; improvement; *in vitro* activity

酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)又称为酒精性肝损伤,是因长期大量饮酒而导致的肝损伤,临床极为常见。ALD患者若不能得到有效治疗,将逐渐进展为脂肪性肝炎、肝纤维化、肝硬化、肝癌<sup>[1]</sup>。在西方国家,ALD较为多见,是导致80%~90%患者肝硬化的主要原因,也是导致患者肝移植的主要原因<sup>[2]</sup>;在我国,ALD是仅次于病毒性肝炎的第二大肝脏疾病,患病率为5.15%,且有逐年上升的趋势<sup>[3]</sup>。目前,除戒酒以外,ALD的治疗手段非常有限,常用药物包括糖皮质激素、甘草酸制剂、水飞蓟素类、还原性谷胱甘肽、多烯磷脂酰胆碱、腺苷蛋氨酸、美他多辛等药物<sup>[4]</sup>。因此,继续研发安全、有效的ALD治疗药物具有重要的临床意义。

研究表明,酒精导致的氧化应激和自由基损伤是ALD的重要发病机制<sup>[5-6]</sup>,因此选择适宜的抗氧化剂可能是防治ALD的有效手段。姜黄素(curcumin, Cur)是从姜科植物姜黄 *Curcuma longa* L.根茎中提取的有效成分,具有以抗氧化活性为基础的多种药理作用,如抗炎、清除自由基、降脂、抗肿瘤等<sup>[7]</sup>。目前,Cur对ALD的改善作用已得到学界广泛认可<sup>[8-9]</sup>,但由于该成分存在溶解性低、稳定性差、代谢快、半衰期较短等问题<sup>[10]</sup>,故其在ALD治疗药物研发领域的应用严重受限。

聚合物胶束有改善药物水溶性、保护药物不被降解或延长降解时间、减缓释放速度、提高药物疗效和安全性的特点<sup>[11-12]</sup>,有望成为解决Cur溶解性低、稳定性差、代谢快等问题的有力手段<sup>[13]</sup>。聚乙二醇-聚天冬氨酸苄酯嵌段共聚物[methoxy-poly(ethylene glycol)-poly( $\beta$ -benzyl-L-aspartate), mPEG-PBLA]具有无免疫原性、易降解和生物相容性好等优点,现已被广泛应用于缓控释药物载体和可降解生物医用材料研究领域<sup>[14]</sup>。为了提高Cur的溶解度、稳定性和临床应用价值,本研究拟制备包载Cur的mPEG-PBLA纳米胶束(以下简称“Cur/mPEG-PBLA胶束”),评价其溶解度、稳定性和缓释效果,并通过体外细胞实验考察该纳米胶束对ALD的预防和改善作用,以期Cur的深入开发和ALD的临床治疗提供参考。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括Nano-ZS90 ZetaSizer型激光粒度仪(英国Malvern公司)、H-7650型透射电子显微镜(日本Hitachi公司)、LC-20AT型高效液相色谱(HPLC)仪(日本Shimadzu公司)、UV-2600型紫外-可见分光光度计[尤尼柯(上海)仪器有限公司]、4111型恒温

培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司)、ZNCL-BS型磁力搅拌器(上海亚培实业有限公司)等。

### 1.2 主要药品与试剂

Cur原料药(货号JZ17062011,纯度95%)及对照品(货号B20614,纯度98%)均购自上海源叶生物科技有限公司;mPEG-PBLA、大鼠血浆均为本实验室自制;红细胞悬液由河南大学药学院张旭教授惠赠;透析袋(截留分子量3 500 Da)购自上海桥星贸易有限公司;MTT试剂(批号705B056)购自美国Amresco公司;RPMI 1640培养基(批号20220928)购自北京索莱宝科技有限公司;甲醇为色谱纯,二甲亚砜(DMSO)等其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

### 1.3 细胞

人肝癌细胞HepG-2、人正常肝细胞7702(批号分别为CL-0103、CL-0111)均购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 纳米胶束的制备

根据前期预实验,本研究采用透析法制备Cur/mPEG-PBLA胶束,具体操作如下:精密称取Cur原料药2 mg、mPEG-PBLA 40 mg,以DMSO 1 mL溶解;在磁力搅拌下(转速1 800 r/min),将上述溶液缓慢滴加至含水2.5 mL的茄形瓶中,继续搅拌30 min后,转移至透析袋中,用水作为透析介质透析24 h(在此过程中换水2次);随后取透析液,以12 000 r/min离心20 min,取上清液,即得Cur/mPEG-PBLA胶束溶液。同时,除不加Cur原料药,其余操作同前,制得mPEG-PBLA胶束溶液。

### 2.2 纳米胶束的表征

#### 2.2.1 纳米胶束外观观察

取水、mPEG-PBLA胶束溶液、Cur/mPEG-PBLA胶束溶液适量,分别置于西林瓶中,观察外观并拍照。结果显示,mPEG-PBLA胶束呈浅蓝色乳光,Cur/mPEG-PBLA胶束溶液澄清透明且呈淡黄色乳光。

#### 2.2.2 纳米胶束粒径、多分散性指数和Zeta电位测定

取mPEG-PBLA胶束溶液和Cur/mPEG-PBLA胶束溶液适量,使用激光粒度仪测定其粒径、多分散性指数(poly-dispersity index, PDI)和Zeta电位,每样品平行测定3份,取平均值。结果(图1A)显示,mPEG-PBLA胶束的平均粒径约100 nm,Cur/mPEG-PBLA胶束的平均粒径约140 nm;mPEG-PBLA胶束和Cur/mPEG-PBLA胶束的PDI均小于0.3,提示两者分布均匀。Cur/mPEG-PBLA胶束的Zeta电位为 $(-8.15 \pm 0.05)$  mV, mPEG-PBLA胶束的Zeta电位为 $(-9.72 \pm 0.12)$  mV。

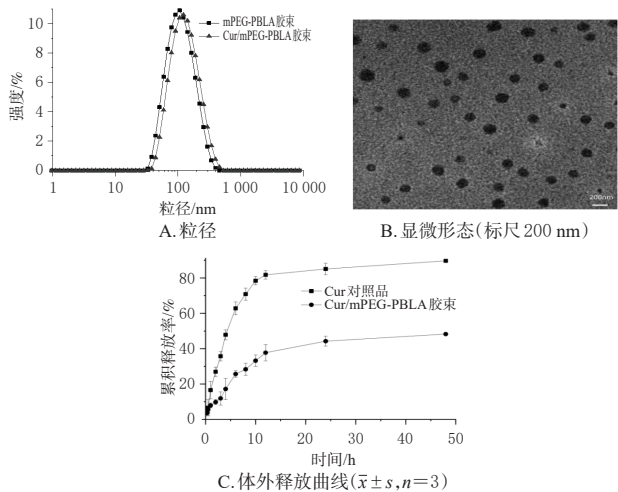


图1 纳米胶束的粒径、显微形态及体外释放曲线

### 2.2.3 纳米胶束显微形态观察

取Cur/mPEG-PBLA胶束溶液适量,用水稀释,用移液枪滴加至铜网上,停留2 min后用滤纸吸去多余的溶液,使用透射电子显微镜观察胶束的微观形态。结果(图1B)显示,Cur/mPEG-PBLA胶束呈圆球形且分布均匀,粒径约100 nm(比“2.2.2”项下实测粒径略小,可能与本样品经干燥失水处理,亲水层收缩有关<sup>[15]</sup>)。

### 2.2.4 纳米胶束中Cur的含量测定

(1)HPLC法:色谱柱为Waters Symmetry C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(55:45, V/V),检测波长为425 nm,柱温为30 °C,流速为1.0 mL/min,进样量为10 μL。以Cur质量浓度为横坐标(X)、对应峰面积为纵坐标(Y),采用最小二乘法拟合得回归方程为 $Y=208\ 727X-78\ 088$ ( $R^2=0.999\ 9$ ),Cur检测质量浓度的线性范围为0.5~20 μg/mL;精密性、稳定性、重复性、回收率等方法学考察结果均符合2020年版《中国药典》(四部)的相关要求。

(2)紫外-可见分光光度法:采用紫外-可见分光光度计于425 nm波长处测定吸光度(A)值。以Cur质量浓度为横坐标(X)、A值为纵坐标(A),采用最小二乘法拟合得回归方程为 $A=0.151X+0.002\ 8$ ( $R^2=0.999\ 8$ ),Cur检测质量浓度的线性范围为0.5~20 μg/mL;精密性、稳定性、重复性、回收率等方法学考察结果均符合2020年版《中国药典》(四部)的相关要求。

### 2.2.5 纳米胶束包封率及载药量测定

取Cur/mPEG-PBLA胶束溶液1 mL,共3份,用甲醇稀释至10 mL后,摇匀,按“2.2.4(1)”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以外标法计算Cur含量,并按下式计算纳米胶束的包封率(encapsulation efficiency, EE)和载药量(drug loading content, DLC): $EE(\%) = \frac{\text{纳米胶束中所载药物的质量}}{\text{初始投药量}} \times 100\%$ ;  $DLC(\%) = \frac{\text{纳米胶束中所载药物的质量}}{\text{纳米胶束的质量}} \times 100\%$ 。结果显示,所制Cur/mPEG-PBLA胶束的EE为(73.26±3.16)%,DLC为(4.87±0.42)%。

### 2.2.6 纳米胶束体外释放研究

首先,制备Cur对照品溶液:取Cur对照品适量,溶于DMSO中,再加水稀释至一定浓度,即得Cur对照品溶液。然后,取Cur对照品溶液和Cur/mPEG-PBLA胶束溶液各2 mL(两者质量浓度相同,以Cur计),各3份,分别装入透析袋中,并置于含释放介质[含0.5%吐温80的pH7.4磷酸盐缓冲液(PBS)]25 mL的烧杯中,于37 °C以100 r/min振荡。分别于释放的0、10、20、30 min和1、2、3、4、6、8、10、12、24、48 h时取样2 mL,并及时补充等体积的新鲜释放介质。取样溶液按“2.2.4(1)”项下色谱条件进样分析,记录峰面积并以外标法计算Cur含量,按下式计算每个时间点的累积释放率并绘制释放曲线:累积释放率(%) =  $\frac{C_n \times V + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times V_0}{W} \times 100\%$ (式中,

$C_n$ 为第n个时间点样品的质量浓度,V为释放介质的体积, $C_i$ 为第i个时间点样品的质量浓度, $V_0$ 为每次取样的体积,W为透析袋中Cur的含量)。结果(图1C)显示,随着时间的延长,2种溶液的释放量均呈上升趋势,其中Cur对照品在10 h时的累积释放率接近80%,呈快速释放;而Cur/mPEG-PBLA胶束在8 h时的累积释放率仅为28.94%,在48 h时的累积释放率才达48.25%。这表明,与Cur对照品相比,Cur/mPEG-PBLA胶束能有效控制药物的释放速度,有利于延长药物在体内的作用时间。

### 2.2.7 纳米胶束化学稳定性研究

(1)pH稳定性:按“2.1”项下方法制备Cur/mPEG-PBLA胶束溶液,按“2.2.6”项下方法制备Cur对照品溶液。取上述2种溶液,分别用pH1.5的盐酸溶液和pH6.8、pH8.0的PBS稀释1倍后静置。分别于静置0、1、2、4、8 h时按“2.2.4(2)”项下方法测定各溶液的A值并以外标法计算Cur含量。以0 h时药物含量为100%,计算药物残留率(药物残留率=各时间点溶液中Cur含量/0 h时溶液中Cur含量×100%);同时,以时间为横坐标、药物残留率为纵坐标绘制药物含量变化曲线。每样品平行操作3次。结果(图2A)显示,在不同pH条件下,Cur对照品溶液和Cur/mPEG-PBLA胶束溶液中的Cur含量都有随时间延长而呈现出下降的趋势;静置8 h时,Cur对照品在pH1.5、6.8、8.0条件下分别降解了42.11%、60.13%、67.55%,Cur/mPEG-PBLA胶束则分别降解了15.04%、27.59%、32.78%。

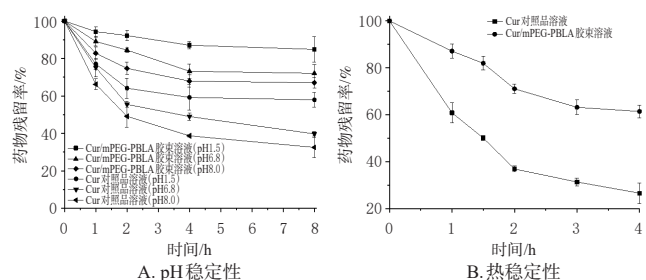


图2 纳米胶束的化学稳定性实验结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

(2)热稳定性:按“2.1”项下方法制备 Cur/mPEG-PBLA 胶束溶液,按“2.2.6”项下方法制备 Cur 对照品溶液。取上述 2 种溶液,置于 85 °C 水浴中,分别于放置 0、1、1.5、2、3、4 h 时按“2.2.4(2)”项下方法测定各溶液的  $A$  值并以外标法计算 Cur 含量,再按“2.2.7(1)”项下方法计算药物残留率,并绘制药物含量变化曲线。每样品平行操作 3 次。结果(图 2B)显示,在 4 h 时, Cur 对照品降解了 73.44%,而 Cur/mPEG-PBLA 胶束仅降解了 38.61%。

### 2.2.8 纳米胶束物理稳定性研究

(1)稀释稳定性:取 mPEG-PBLA 胶束溶液、Cur/mPEG-PBLA 胶束溶液各 1 mL,用水分别稀释 0、5、10、25、50、100 倍,采用激光粒度仪测定其粒径。每样品平行操作 3 次。结果(图 3A)显示,经稀释后,2 种胶束的平均粒径均在  $\pm 15$  nm 内波动,表明胶束制剂经过稀释后仍具有良好的稳定性。

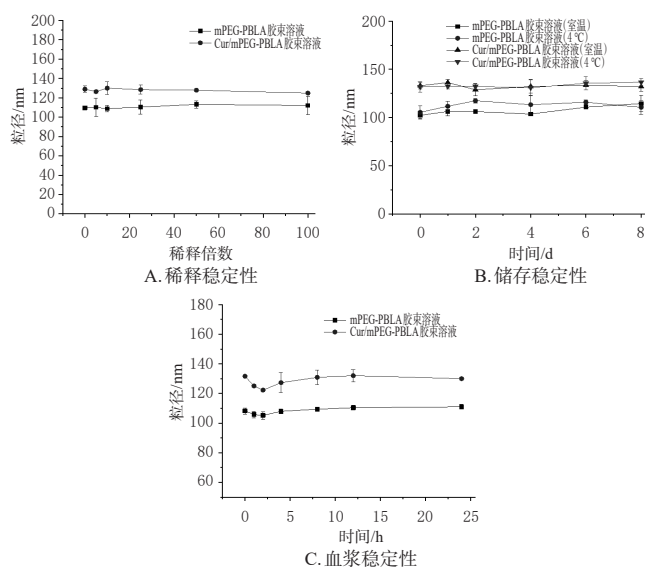


图 3 纳米胶束的物理稳定性实验结果( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

(2)储存稳定性:取 mPEG-PBLA 胶束溶液、Cur/mPEG-PBLA 胶束溶液各 15 mL,分别于室温和 4 °C 下储存,并于放置 0、1、2、4、6、8 d 时取样,采用激光粒度仪测定其粒径。每样品平行操作 3 份。结果(图 3B)显示,2 种胶束的粒径在上述储存条件下的变化不大,表明其在 8 d 内的储存稳定性良好。

(3)血浆稳定性:取 mPEG-PBLA 胶束溶液、Cur/mPEG-PBLA 胶束溶液各 2 mL,置于含 10% 大鼠血浆的 PBS 2 mL 中,在 37 °C 下以 100 r/min 振荡孵育 24 h,分别于 0、1、2、4、8、12、24 h 时取样,采用激光粒度仪测定其粒径。每样品平行操作 3 次。结果(图 3C)显示,2 种胶束的粒径变化不大,表明其血浆稳定性良好。

### 2.3 纳米胶束溶血实验

取 Cur/mPEG-PBLA 胶束溶液适量,用水稀释成 25、50、100、200  $\mu\text{mol/L}$  (以 Cur 计)。取上述样品各 400  $\mu\text{L}$

至 1.5 mL EP 管中,同时取水 400  $\mu\text{L}$  为阳性对照溶液、生理盐水 400  $\mu\text{L}$  为阴性对照溶液;随后,各 EP 管中再分别加入 2% 红细胞悬液 400  $\mu\text{L}$ ,于 37 °C 恒温培养箱中孵育 2 h 后,以 1 500 r/min 离心 10 min,观察外观颜色并拍照,取上清液按“2.2.4(2)”项下方法测定  $A$  值。与此同时,为了避免胶束本身颜色对结果的影响,取上述 4 个浓度的 Cur/mPEG-PBLA 胶束溶液各 400  $\mu\text{L}$  至 1.5 mL EP 管中,以水替代 2% 红细胞悬液,进行平行实验。按下式计算溶血率:溶血率(%) =  $(A_t - A_{nc} - A_s) / (A_{px} - A_{nc}) \times 100\%$  (式中,  $A_t$  为在测溶液  $A$  值,  $A_{nc}$  为阴性对照溶液  $A$  值,  $A_{px}$  为阳性对照溶液  $A$  值,  $A_s$  为平行实验中相同浓度 Cur/mPEG-PBLA 胶束溶液  $A$  值)。外观观察结果(图 4A)显示, Cur/mPEG-PBLA 胶束溶液和阴性对照溶液都没有发生溶血现象;而阳性对照溶液呈橙红色,出现了溶血现象。溶血率检测结果(图 4B)显示,4 个浓度 Cur/mPEG-PBLA 胶束溶液的溶血率均低于 5%,表明该纳米胶束静脉给药后不会引发溶血现象<sup>[16]</sup>。

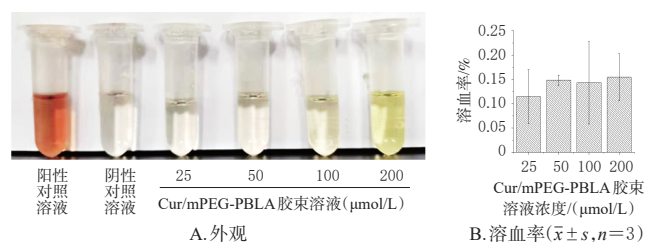


图 4 纳米胶束的溶血实验结果

### 2.4 纳米胶束的体外药效学研究

#### 2.4.1 Cur/mPEG-PBLA 胶束对 ALD 的预防作用

将 HepG-2、7702 细胞分为对照组、模型组、不同质量浓度 Cur 对照品溶液组、不同质量浓度 Cur/mPEG-PBLA 组,每组设置 5 个复孔。各药物组细胞加入相应药液(质量浓度分别为 1、2、4、8、10  $\mu\text{g/mL}$ ,以 Cur 计;按前期预实验结果设置,下同),对照组和模型组细胞加入等体积培养基,分别培养 24、48 h。随后,除对照组外,其余各组细胞均加入终浓度为 400 mmol/L 的无水乙醇干预 12 h(造模方法参考相关文献<sup>[17]</sup>,无水乙醇浓度和干预时间均根据前期预实验确定,下同)以构建 ALD 模型。收集各组细胞,以 MTT 法测定其存活率,实验重复 3 次。采用 Origin 软件对数据进行统计分析,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用  $t$  检验。检验水准  $\alpha = 0.05$  (下同)。

针对 HepG-2 细胞的实验结果(图 5A、5B)显示,预处理 24 h 时,对照组细胞的平均存活率为 100.24%,模型组细胞的平均存活率为 64.92%;与模型组比较,各药物组细胞的存活率(1  $\mu\text{g/mL}$  Cur/mPEG-PBLA 胶束组除外)均有所提高,并有一定的浓度依赖趋势,但相同质量浓度的 Cur 对照品溶液组与 Cur/mPEG-PBLA 胶束组比

较差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。预处理48 h时,各药物组细胞的存活率相较于模型组亦有所升高,且Cur/mPEG-PBLA胶束组细胞的存活率均显著高于同质量浓度Cur对照品溶液组( $P<0.05$ )。针对7702细胞的实验也得出相似的结果(图5C、5D),即预处理48 h时,Cur/mPEG-PBLA胶束组细胞的存活率均显著高于同质量浓度Cur对照品溶液组( $P<0.05$ )。

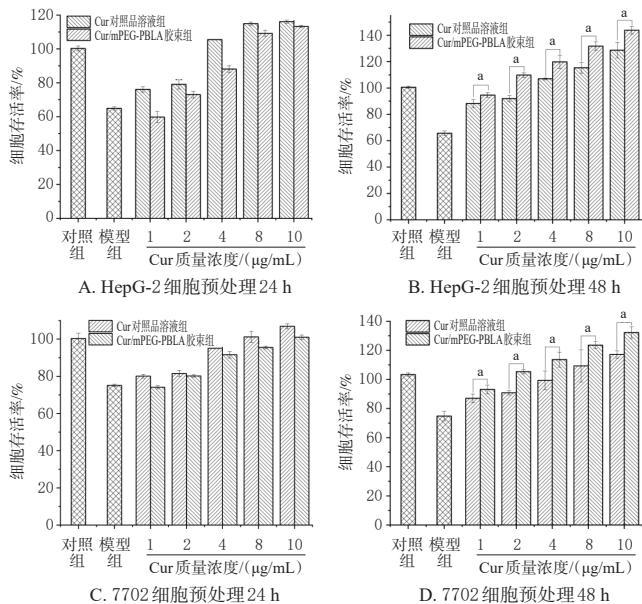
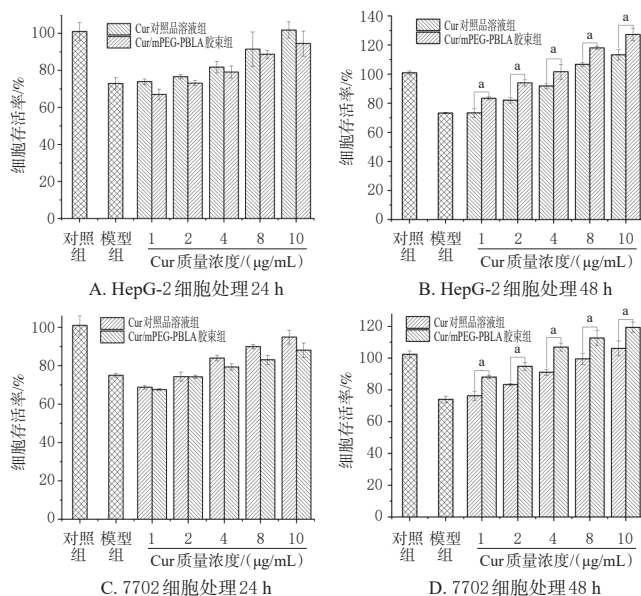


图5 Cur对照品溶液和Cur/mPEG-PBLA胶束对2种细胞ALD的预防作用( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

#### 2.4.2 Cur/mPEG-PBLA对ALD的改善作用

将HepG-2、7702细胞分为对照组、模型组、不同质量浓度Cur对照品溶液组、不同质量浓度Cur/mPEG-PBLA组,每组设置5个复孔。除对照组外,其余各组细胞均加入终浓度为400 mmol/L的无水乙醇干预12 h以构建ALD模型。随后,各药物组细胞加入相应药液(质量浓度分别为1、2、4、8、10 μg/mL,以Cur计),对照组和模型组细胞加入等体积培养基,分别培养24、48 h。收集各组细胞,以MTT法测定其存活率,实验重复3次。

针对HepG-2细胞的实验结果(图6A、6B)显示,处理24 h时,对照组细胞的平均存活率为100.95%,模型组细胞的平均存活率为72.95%;与模型组比较,各药物组细胞的存活率(1、2 μg/mL Cur/mPEG-PBLA胶束组除外)均有所提高,并有一定的浓度依赖趋势,但相同质量浓度的Cur对照品溶液组与Cur/mPEG-PBLA胶束组比较差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。处理48 h时,各药物组细胞的存活率相较于模型组亦有所升高,且Cur/mPEG-PBLA胶束组细胞的存活率均显著高于同质量浓度Cur对照品溶液组( $P<0.05$ )。针对7702细胞的实验也得出相似的结果(图6C、6D),即处理48 h时,Cur/mPEG-PBLA胶束组细胞的存活率均显著高于同质量浓度Cur对照品溶液组( $P<0.05$ )。



a: 与同质量浓度Cur对照品溶液组比较, $P<0.05$ 。

图6 Cur对照品溶液和Cur/mPEG-PBLA胶束对2种细胞ALD的改善作用( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

### 3 讨论

本课题组前期分别采用超声法、溶剂挥发法、薄膜分散法、透析法4种方法试制了Cur/mPEG-PBLA胶束,结果显示,以透析法所制胶束的平均粒径最小,且粒径分布均匀,因此本研究选择透析法制备Cur/mPEG-PBLA胶束。此外,本课题组前期还对透析法中聚合物-药物质量比、水化用水量、透析时间、换水次数、离心转速及时间等参数进行了优化,最终确定了“2.1”项下最优制备方法。

本研究结果显示,所制Cur/mPEG-PBLA胶束不仅粒径较小、粒径分布均匀,而且DLC、EE较高,改善了Cur水溶性差的问题,为Cur制剂的后续开发提供了有力的技术支撑。物理、化学稳定性实验结果表明,在不同pH和高温环境下,Cur对照品均极易降解,与已有文献结果基本一致<sup>[18]</sup>;而制成Cur/mPEG-PBLA胶束后,不管是在不同pH环境中,还是在高温环境下,其粒径均无明显变化,且具有良好的血浆稳定性,不会引发溶血反应。体外释放实验结果显示,与Cur对照品相比,Cur/mPEG-PBLA胶束能有效控制药物的释放速度,有利于延长药物在体内的作用时间,以实现药物的长效作用<sup>[19-20]</sup>。由此可见,本研究所制Cur/mPEG-PBLA胶束可在一定程度上解决Cur溶解性低、稳定性差、代谢快、半衰期较短等问题,可为Cur的制剂研发及临床应用提供新的研究思路。

本研究的体外药效学实验结果显示,Cur/mPEG-PBLA胶束和Cur对照品溶液对HepG-2、7702细胞损伤都有不同程度的体外预防和改善作用,且有一定的浓度依赖趋势;同时,随着干预时间的延长,Cur/mPEG-PBLA胶束对ALD模型细胞的预防和改善效果均显著

优于同质量浓度 Cur 对照品溶液,提示该胶束的药效作用时间更长。

综上所述,本研究所制 Cur/mPEG-PBLA 胶束不仅可有效提高 Cur 的溶解性和 pH 稳定性、热稳定性,还能延缓其释放速度;同时,Cur/mPEG-PBLA 胶束具有一定的体外抗 ALD 活性,且随着干预时间的延长,其活性强于 Cur 对照品溶液。

### 参考文献

- [1] 潘家姝,喻晓,邢练军. 中医药治疗酒精性肝病的相关研究进展[J]. 中西医结合肝病杂志,2022,32(10):957-960.
- PAN J S, YU X, XING L J. Research progress on treatment of alcoholic liver disease with traditional Chinese medicine[J]. Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis, 2022, 32(10):957-960.
- [2] SHAFIEE M, MOHAMADZADE E, SHAHIDSALES S, et al. Current status and perspectives regarding the therapeutic potential of targeting EGFR pathway by curcumin in lung cancer[J]. Curr Pharm Des, 2017, 23(13):2002-2008.
- [3] TIAN C H, ASGHAR S, WU Y F, et al. Improving intestinal absorption and oral bioavailability of curcumin via taurocholic acid-modified nanostructured lipid carriers[J]. Int J Nanomedicine, 2017, 12:7897-7911.
- [4] WANG Y L, JU B, ZHANG Y Z, et al. Protective effect of curcumin against oxidative stress-induced injury in rats with Parkinson's disease through the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 43(6):2226-2241.
- [5] SOHILAIT M R, PRANOWO H D, HARYADI W. Molecular docking analysis of curcumin analogues with COX-2[J]. Bioinformation, 2017, 13(11):356-359.
- [6] CHU J Y, YAN R, WANG S, et al. Sinapic acid reduces oxidative stress and pyroptosis via inhibition of BRD4 in alcoholic liver disease[J]. Front Pharmacol, 2021, 12:668708.
- [7] SAADATI S, SADEGHI A, MANSOUR A, et al. Curcumin and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease: a randomized, placebo controlled clinical trial[J]. BMC Gastroenterol, 2019, 19(1):133.
- [8] KIM S G, SUH H J, HAN S H, et al. Encapsulated curcumin enhances intestinal absorption and improves hepatic damage in alcoholic liver disease-induced rats[J]. Prev Nutr Food Sci, 2019, 24(4):410-417.
- [9] 戴伊繁. 河蚬多肽与姜黄素对酒精性肝损伤保护作用的研究及其护肝固体饮料的研制[D]. 广州:华南理工大学,2021.
- DAI Y F. Protective effects of *Corbicula fluminea* polypeptide and curcumin on alcoholic liver injury and preparation of liver protecting solid beverage[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2021.
- [10] DENG Y Q, JIN Y, HE C Y, et al. Preparation and characterization of intestine PepT1-targeted calcium carbonate nanoparticles[J]. J Chin Pharm Sci, 2018, 27(6):397-407.
- [11] 邓薇,张洪,高洁芳,等. 大蒜素聚合物胶束的制备及质量评价[J]. 中国药师,2019,22(4):759-763.
- DENG W, ZHANG H, GAO J F, et al. Preparation and quality evaluation of diallyl trisulfide polymeric micelles [J]. China Pharm, 2019, 22(4):759-763.
- [12] ZUCKERMAN J E, DAVIS M E. Clinical experiences with systemically administered siRNA-based therapeutics in cancer[J]. Nat Rev Drug Discov, 2015, 14(12):843-856.
- [13] YALLAPU M M, NAGESH P K, JAGGI M, et al. Therapeutic applications of curcumin nanoformulations[J]. AAPS J, 2015, 17(6):1341-1356.
- [14] 陈永超,蒲晓辉,宗兰兰,等. 两性性嵌段共聚物聚乙二醇-聚天冬氨酸苄酯的合成与表征[J]. 河南大学学报(自然科学版),2015,45(4):410-416.
- CHEN Y C, PU X H, ZONG L L, et al. Synthesis and characterization of amphiphilic block copolymer of poly(ethylene glycol)-poly( $\beta$ -benzyl-L-aspartic)[J]. J Henan Univ Nat Sci, 2015, 45(4):410-416.
- [15] ZONG L L, WANG Y L, SONG S Y, et al. Formulation and evaluation on synergetic anti-hepatoma effect of a chemically stable and release-controlled nanoself-assembly with natural monomers[J]. Int J Nanomedicine, 2023, 18:3407-3428.
- [16] ZONG L L, WANG H Y, HOU X Q, et al. A novel GSH-triggered polymeric nanomicelles for reversing MDR and enhancing antitumor efficiency of hydroxycamptothecin [J]. Int J Pharm, 2021, 600:120528.
- [17] LI G L, YE Y, KANG J J, et al. L-theanine prevents alcoholic liver injury through enhancing the antioxidant capability of hepatocytes[J]. Food Chem Toxicol, 2012, 50(2):363-372.
- [18] TAPAL A, TIKU P K. Complexation of curcumin with soy protein isolate and its implications on solubility and stability of curcumin[J]. Food Chem, 2012, 130(4):960-965.
- [19] YANG Q L, XU W W, CHENG M, et al. Controlled release of drug molecules by pillararene-modified nanosystems[J]. Chem Commun, 2022, 58(20):3255-3269.
- [20] WEST K H J, GAHAN C G, KIERSKI P R, et al. Sustained release of a synthetic autoinducing peptide mimetic blocks bacterial communication and virulence *in vivo*[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2022, 61(24):e202201798.

(收稿日期:2023-10-12 修回日期:2024-03-28)

(编辑:张元媛)