

## 姜黄素纳米粒促进药物支架植入后内皮功能恢复的实验研究\*

陆 齐<sup>1</sup>, 顾青青<sup>1#</sup>, 张 剑<sup>1</sup>, 徐海霞<sup>1</sup>, 沈 雳<sup>2△</sup>

(1. 南通大学附属医院心内科, 江苏南通 226001; 2. 复旦大学附属中山医院心内科, 上海 200032)

**[摘要]** **目的** 探讨姜黄素纳米粒在促进药物支架植入后内皮功能恢复的可行性。**方法** 雷帕霉素支架植入后以每周 2 次的频率静脉注射姜黄素纳米粒, 于 4 周后评价内皮功能。**结果** 4 周后联用姜黄素纳米粒的支架组内皮功能明显优于不使用姜黄素纳米粒的支架组。**结论** 姜黄素纳米粒可显著提高支架植入后内皮功能的恢复速度, 有望降低药物支架不良事件的发生率。

**[关键词]** 姜黄素; 纳米粒; 支架; 内皮**[中图分类号]** R318.08**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)24-3334-02

## Experimental study on the effect of curcumin nanoparticles on endothelial function recovery after drug-eluting stent implantation\*

Lu Qi<sup>1</sup>, Gu Qingqing<sup>1#</sup>, Zhang Jian<sup>1</sup>, Xu Haixia<sup>1</sup>, Shen Li<sup>2△</sup>

(1. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China;

2. Department of Cardiology, Zhongshan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200032, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the feasibility of the effect of curcumin nanoparticles on endothelial function recovery after drug-eluting stent implantation. **Methods** Curcumin nanoparticles were administrated intravenously after stent implantation twice a week and endothelium function was evaluated after 4 weeks. **Results** 4 weeks later, the endothelial function of the stent group with the use of curcumin nanoparticles was significantly better than that of the stent group without the use of curcumin nanoparticles. **Conclusion** The recovery rate of endothelial function after stent implantation can be significantly improved by using curcumin, which is expected to reduce the incidence of adverse events of drug stent.

**[Key words]** curcumin; nanoparticle; stent; endothelium

姜黄素为姜科植物的根茎中提取的多酚类二酮化合物。近年来研究表明, 姜黄素具有显著的抑制平滑肌细胞增殖、抗血栓、抗炎、抗氧化、降血脂等功效<sup>[1-3]</sup>, 是一种具有广阔应用前景的心血管候选药物。但口服姜黄素存在严重的肝首过效应, 因此系统生物利用度极低(<1%)<sup>[4]</sup>, 难以充分发挥其生物活性。注射给药是提高姜黄素药效的主要措施, 但姜黄素几乎不溶于水, 且极易被肝脏代谢, 即使采用常规增溶技术制成注射剂仍然难以保持有效的血药浓度<sup>[5-6]</sup>。

本研究以具有良好的生物相容性的可降解高分子甲氧基聚乙二醇-聚丙交酯嵌段共聚物为载体材料, 采用纳米乳化技术成功制备了姜黄素纳米粒。该纳米粒在血液中具有较高的稳定性, 可维持较长时间姜黄素的缓释。支架植入后注射姜黄素纳米粒可有效促进支架部位内皮功能的恢复, 有望提高药物支架使用的安全性。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 姜黄素, 纯度大于 99%, 美国 Sigma 公司; 甲氧基聚乙二醇-聚乳酸嵌段共聚物(mPEG5000-PLA17000)由本实验室自制, 相对分子质量为 5 000~17 000, 相对分子质量分布系数 PDI=1.6; 吐温 80, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 雷帕霉素洗脱支架(SES)由北京美中双合医疗器械有限公司提供, 规格 3 mm×17 mm, 含雷帕霉素 150 μg, 涂层材料为可降解高分子聚乳酸。

## 1.2 方法

**1.2.1 姜黄素纳米粒的制备** 按质量比 1:5 称取姜黄素和 mPEG5000-PLA17000, 用二氯甲烷溶解制成溶液, 吐温 80 用超纯水溶解后配置成 0.2% 溶液。均质器中以 3 500 r/min 的

转速搅拌吐温 80 水溶液, 匀速滴加含有高分子和姜黄素的二氯甲烷溶液, 滴加完成后继续搅拌乳化 5 min。乳化结束后, 于室温下缓慢搅拌挥发溶剂 24 h 后用 450 nm 孔径的 PVDF 滤膜过滤后冻干得到姜黄素纳米粒冻干粉, 冻干粉加注射用水复溶后动态光散射测定纳米粒粒径分布, 高效液相色谱测定载药量和药物包封率。

**1.2.2 大鼠药代动力学** 6 只雄性 SD 大鼠分成两组, 每组 3 只。分别经尾静脉给予溶剂型姜黄素(DMSO 溶液, 10 mg/mL)和姜黄素纳米粒悬浮液(2 mg/mL), 给药剂量为 25 mg/kg。于不同时间点眼窝采血后 3 000 r/min 离心后取上清液用相色谱-质谱联用的方法在 425 nm 处测定姜黄素血浆浓度(检测限为 1 ng/mL), 绘制药时曲线。

**1.2.3 支架植入** 健康小型猪共 9 只, 体质量 25~30 kg, 将雷帕霉素洗脱支架随机植入小型猪的左前降支、回旋支和(或)右冠状动脉, 选择无明显迂曲、血管直径符合要求的血管段, 在每只猪冠状动脉内随机植入 2~3 枚支架(视符合植入条件的血管数而定), 共 25 枚支架。植入完毕后将动物分为 3 个组, 每组 3 只动物: (1)雷帕霉素支架组(共 8 枚支架, A 组); (2)雷帕霉素支架+2.5 mg/kg 姜黄素纳米粒(SES+2.5 mg/kg 姜黄素, 共 8 枚支架, B 组); (3)雷帕霉素支架+10 mg/kg 姜黄素纳米粒(SES+10.0 mg/kg 姜黄素, 共 9 枚支架, C 组)。姜黄素纳米粒给药方式为静脉注射, 每周 2 次。

**1.2.4 内皮功能评价** 支架植入前和植入 4 周时经导管于冠状动脉开口处注射乙酰胆碱 60 μg, 每次注射前后做冠状动脉造影比较用药前后的支架外远段血管(5 mm)的收缩率变化[通过计算机定量分析系统(QCA)计算]。然后处死动物并取

\* 基金项目: 2015 年南通市科技局民生示范推广项目(MS32015030)。 作者简介: 陆齐(1973-), 博士, 副主任医师, 主要从事心血管内科工作。 # 共同第一作者: 顾青青(1982-), 博士, 主治医师, 主要从事心血管内科方面的研究。 △ 通讯作者, E-mail: nt\_sunny@163.com。

出支架段血管,剪开支架并用扫描电镜观察支架表面内皮化情况。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS16.0 统计软件进行分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,单因素方差分析组间差异,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 姜黄素纳米粒的制备** 姜黄素纳米粒冻干粉加入注射用水即可快速复溶,形成带有明显乳光的黄色液体,见图 1,动态光散射测定纳米粒的平均粒径为 98 nm,见图 2,粒径分布系数为 0.24。高效液相色谱测定载药量为 17%,药物包封率在 95% 以上。

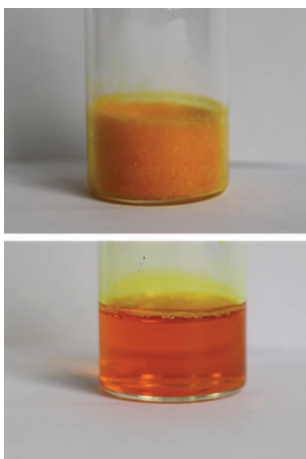


图 1 姜黄素纳米粒冻干粉、复溶后溶液外观

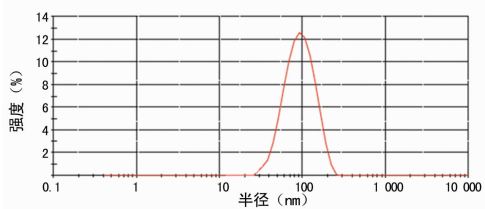


图 2 动态光散射测定粒径分布

**2.2 大鼠药代实验** 相同注射剂量下,姜黄素溶液组 4 h 后血药浓度已降为 3.8 ng/mL,5 h 血药浓度已经低于仪器检测限(1 ng/mL),表现出非常快的体内代谢速度;而姜黄素纳米粒组 10 h 后血药浓度依然保持在 100 ng/mL 以上,药物半衰期显著延长,见图 3。

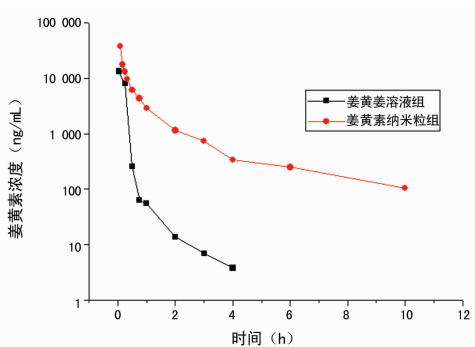


图 3 姜黄素溶液和姜黄素纳米粒血药浓度-时间变化曲线

**2.3 内皮功能评价** 3 组支架 4 周时支架表面内皮化情况如图 4 所示。从图上可以看出,4 周时支架表面均被内皮细胞完全覆盖,但 B、C 组支架表面内皮细胞排列更紧密,细胞从外形

看更为铺展,细胞轮廓也更为清晰,显示其成熟度较高。

在支架植入前,血管的收缩率大约在 15%~20%,SES 支架植入 4 周时,支架远段血管收缩率达到了 40%左右,明显高于支架植入前( $P < 0.05$ ),说明雷帕霉素支架的植入会显著影响内皮的功能。在雷帕霉素支架植入后配合静脉注射姜黄素纳米粒,结果显示 B、C 组远段血管的收缩率均在 20%左右,明显低于 A 组( $P < 0.05$ ),但 B、C 组差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图 5。

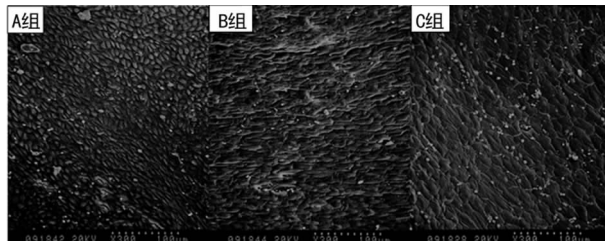
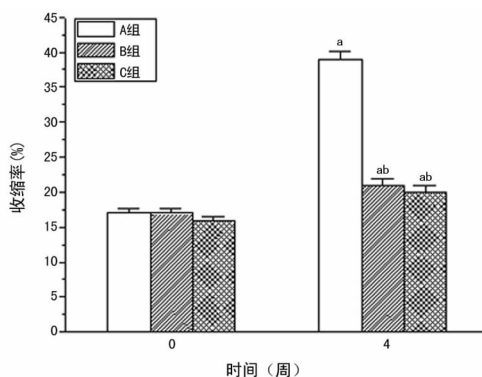


图 4 支架内皮扫描电镜(×300)



<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ ,与同组支架植入前比较;<sup>b</sup>:  $P < 0.05$ ,与支架植入 4 周时 A 组比较。

图 5 植入 4 周后支架远段血管收缩率(60  $\mu$ g 乙酰胆碱)

**3 讨论**

作为一种天然的多酚类物质,姜黄素已在大量的实验中证实其抗平滑肌细胞增殖、抗炎、抗氧化、降血脂、抗血栓等特殊功效,而且其本身对人体无毒无害,因此被认为是一种具有广阔应用前景的心血管候选药物。但姜黄素一直不能真正成为药物主要面临的问题是其极低的水溶性及快速的体内代谢速度,由此造成其生物利用度不到 1%。采用高分子纳米技术可从根本上解决上述两个问题。本研究中采用具有良好生物相容性和可降解性的甲氧基聚乙二醇-聚乳酸嵌段共聚物为载体高分子,通过纳米乳化技术制备的姜黄素纳米粒。该方法具有制备方法工艺简单、工艺的可重复性好、药物包封率高等优点。该纳米粒载药量在 15% 以上,药物的包封率在 95% 以上,姜黄素的溶解度可达到 5 mg/mL 以上,完全可满足动物实验要求。

本研究中的高分子聚合物 mPEG-PLA 两嵌段的相对分子质量为 5 000~17 000,由于疏水链相对分子质量较大,在形成纳米粒以后疏水链之间形成牢固的缠绕,从而使纳米粒在体内表现出很高的稳定性。大鼠药代实验表明姜黄素纳米粒能显著降低姜黄素在体内的清除速度,显著提高了血药浓度并延长药物的半衰期。纳米粒的药时曲线下面积(AUC)较姜黄素的 DMSO 溶液提高了 10 倍以上,从而使姜黄素的生物利用度大大提高。关于姜黄素纳米粒如何通过血液循环达到支架部位并持续释放携带药物发挥生物活性的机制,本研究认为和肿瘤的增强渗透效应(enhanced permeability and retention effect, EPR 效应)类似。由于肿瘤部位血管生长迅速,外(下转第 3339 页)

表达,对其信号通路的深入研究可通过阻断剂进一步阻滞 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路来观察 KLT 联合 PTX 对乳腺癌细胞增殖、侵袭及 C-myc、CyclinD1、VEGF 表达的变化情况。

#### 参考文献

- [1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008; GLOBOCAN 2008 [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12):2893-2917.
- [2] Si W, Li Y, Han Y, et al. Epidemiological and clinicopathological trends of breast cancer in Chinese patients during 1993 to 2013: a retrospective study [J]. *Medicine*, 2015, 94(26):e820.
- [3] 董庆华, 钟献, 郑树. 康莱特注射液对肺癌 A549 细胞环氧化酶作用的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2005, 30(20):61-63, 73.
- [4] Pan P, Wu Y, Guo ZY, et al. Antitumor activity and immunomodulatory effects of the intraperitoneal administration of Kanglaite in vivo in Lewis lung carcinoma [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 143(2):680-685.
- [5] Nwabo Kamdje AH, Seke Etet PF, Vecchio L, et al. Signaling pathways in breast cancer: therapeutic targeting of the microenvironment [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(12):2843-2856.
- [6] 练祖平, 陆运鑫, 侯恩存, 等. 康莱特联合化疗治疗中晚期非小细胞肺癌 [J]. *中国肺癌杂志*, 2006, 9(1):74-77.
- [7] Lee SH, Kim MH, Han HJ. Arachidonic acid potentiates

hypoxia-induced VEGF expression in mouse embryonic stem cells; involvement of Notch, Wnt, and HIF-1 $\alpha$  [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, 297(1):207-216.

- [8] Miller JR. The Wnts [J]. *Genome Biol*, 2001, 3(1):3001-3014.
- [9] Howe LR, Brown AM. Wnt signaling and breast cancer [J]. *Cancer Biol Ther*, 2004, 3(1):36-41.
- [10] 徐蕾, 罗荣城. 紫杉醇、吉西他滨分别联合顺铂治疗晚期乳腺癌的临床研究 [J]. *重庆医学*, 2005, 34(3):440-441.
- [11] 汪进, 何放亭, 曾志雄, 等. 紫杉醇诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞周期阻断及调亡的基因表达谱分析 [J]. *药理学报*, 2005, 20(12):45-50.
- [12] Dziadyk JM, Sui M, Zhu X, et al. Paclitaxel-induced apoptosis may occur without a prior G<sub>2</sub>/M-phase arrest [J]. *Anticancer Res*, 2004, 24(1):27-36.
- [13] 张小平, 陶永辉, 陈其亮, 等. 人乳腺癌细胞 MCF-7 紫杉醇耐药株的建立及其生物学特性研究 [J]. *中国药理学通报*, 2008, 24(6):804-809.
- [14] Lu Y, Li CS, Dong Q. Chinese herb related molecules of cancer-cell-apoptosis: a minireview of progress between Kanglaite injection and related genes [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2008, 27(1):31.
- [15] 李大鹏. 康莱特注射液抗癌作用机理研究进展 [J]. *中药新药与临床药理*, 2001, 12(2):122-124.

(收稿日期:2016-02-18 修回日期:2016-06-27)

(上接第 3335 页)

膜细胞缺乏,基底膜变形,淋巴管道汇流系统缺损,大量血管渗透性调节剂(缓激肽、血管内皮生长因子、一氧化氮、前列腺素和基质金属蛋白酶等)生成。这些生理特征有利于迅速增长的肿瘤组织获取大量营养物质。同时,这也导致了肿瘤血管渗透性的增加<sup>[7]</sup>。因此,一般粒径在 10~500 纳米范围内的纳米粒子对肿瘤内皮具有较强的选择渗透性。在支架扩张过程中内皮遭到损伤,由此大大提高了纳米粒子对支架部位内皮的选择渗透能力。本研究中制备的姜黄素纳米粒的平均粒径在 98 nm,正好符合这一机制。在姜黄素纳米粒子渗透进入支架血管壁后,药物随着高分子的降解缓慢释放,持续发挥生物活性。因此,本研究中虽然姜黄素的用药频率仅仅为每周 2 次,但是实验结果依然体现了明显的药效,这很可能和药物的长时间缓释有关。

#### 参考文献

- [1] Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41(1):40-59.
- [2] 任玲, 王进, 唐家驹, 等. 含姜黄素的(丙交酯-乙交酯)共

聚物薄膜对血管平滑肌细胞增殖的影响 [J]. *生物医学工程学报*, 2008, 25(4):874-878.

- [3] 唐家驹, 王进, 潘长江, 等. 姜黄素/聚乳酸-乙醇酸共聚物复合薄膜的制备及抗凝血研究 [J]. *生物医学工程学报*, 2008, 25(1):113-116.
- [4] Anand P, Kunnumakkara AB, Newman RA. Bioavailability of curcumin: problems and promises [J]. *Mol Pharm*, 2007, 4(6):807-818.
- [5] Pan MH, Huang TM, Lin JK. Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice [J]. *Drug Metab Dispos*, 1999, 27(5):486-494.
- [6] Sharma RA, Euden SA, Platton SL, et al. Phase I clinical trial of oral curcumin; biomarkers of systemic activity and compliance [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(30):6847-6854.
- [7] Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy; mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs [J]. *Cancer Res*, 1986, 46(12 Pt 1):6387-6392.

(收稿日期:2016-03-05 修回日期:2016-05-11)