

脂质体姜黄素在 Lewis 肺癌中的抗肿瘤和抗血管作用

王力强¹, 石华山², 王永生^{3△}

1. 四川大学生命科学院 细胞生物学教研室(成都 610064); 2. 四川大学华西医院 生物治疗国家重点实验室(成都 610041);
3. 四川大学华西医院 胸部肿瘤科(成都 610041)

【摘要】 目的 制备水溶性的脂质体姜黄素,研究其抗肿瘤和抗血管生成的作用。方法 采用乙醇注入法制备脂质体姜黄素。MTT 法检测脂质体姜黄素对小鼠肺癌细胞 LL/2 的抑制作用,流式细胞术检测脂质体姜黄素对细胞周期和细胞凋亡的影响。建立小鼠 Lewis 肺癌模型,检测脂质体姜黄素的抗肿瘤作用。采用藻酸盐实验检测脂质体姜黄素的抗血管生成作用。**结果** 在体外,脂质体姜黄素可以抑制小鼠肺癌细胞 LL/2 的增殖,阻滞细胞周期,并引起细胞凋亡;在体内,脂质体姜黄素抑制了小鼠 Lewis 肿瘤的生长,藻酸盐实验验证了脂质体姜黄素能抑制肿瘤内的血管生成。**结论** 脂质体姜黄素能抑制 LL/2 细胞的增殖并诱导细胞凋亡,通过静脉给药能有效抑制 Lewis 肺癌在小鼠体内的生长。

【关键词】 脂质体姜黄素 肿瘤 血管生成

Liposomal Curcumin Inhibits Tumor Growth and Angiogenesis in Lewis Lung Cancer WANG Li-qiang¹, SHI Hua-shan², WANG Yong-sheng^{3△}. 1. Department of Cell Biology, College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China; 2. State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Department of Thoracic Oncology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: wangys@scu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To prepare water soluble curcumin liposome and investigate its anti-tumour and anti-angiogenic effects. **Methods** Liposomal curcumin was prepared by alcohol injection method. Proliferation inhibition to murin Lewis lung cancer cell line LL/2 of curcumin liposome was evaluated by MTT assay. Apoptosis and cell cycle arrest induced by liposomal curcumin were analysed by flow cytometry. Anti-tumour effects were investigated in a murine lung cancer model, and the anti-angiogenic effect was determined by aginate encapsulation assay. **Results** *In vitro*, liposomal curcumin inhibits the proliferation of LL/2 cells and induces apoptosis and cell cycle arrest. *In vivo*, the systemic administration of liposomal curcumin resulted in the inhibition of tumour. Aginate encapsulation assay revealed angiogenesis was decreased by curcumin liposome. **Conclusion** The curcumin liposome treatment can significantly inhibit tumour growth *in vivo*.

【Key words】 Liposomal curcumin Tumour Angiogenesis

姜黄素具有多方面的药理作用,如抗炎、抗氧化、抗增殖等^[1],其抗肿瘤作用也日益引起人们的重视。姜黄素已被报道能抗结肠癌^[2]、前列腺癌^[3]、胰腺癌^[4]、宫颈癌^[5]等。在对姜黄素的临床研究中发现姜黄素对患者的肿瘤有良好的治疗效果,并且没有明显的毒副作用,但是姜黄素口服给药的生物利用度较低,限制了它在多种非胃肠道肿瘤中的应用^[6,7]。这可能与姜黄素水溶性差和在消化液中不稳定等因素有关^[8]。

脂质体制剂可以很好的提高药品的水溶性,并且提高药物的生物利用度^[9]。我们制备了脂质体姜黄素,以期探讨其抗肿瘤和抗血管生成作用。虽然姜黄素的抗血管和抗肿瘤作用已被某些研究证明,但对脂质体姜黄素还没有足够的研究,尤其是在其

静脉给药后的体内抗肿瘤效果方面。本研究从体内和体外两方面探讨脂质体姜黄素对小鼠 Lewis 肺癌的抑制作用和抗血管生成的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

姜黄素(98%)购自四川省成都市曼斯特生物技术有限公司;DMEM、胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco BRL 公司;其他试剂均为进口或国产分析纯产品。小鼠肺癌细胞系 LL/2 购自 American Type Culture Collection(ATCC),加入含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,放入 37 °C 饱和湿度下、5% CO₂ 培养箱中培养。6 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠购自四川大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 乙醇注入法制备脂质体姜黄素 按处方量

精密称取卵磷脂、胆固醇及聚乙二醇于西林瓶中,加入姜黄素无水乙醇溶液,超声使之溶解;所得的类脂溶液缓慢匀速注入恒温 60 °C 的磷酸缓冲盐溶液中,快速搅拌 30 min,油相(含有脂质的乙醇溶液)被大量的水相(磷酸缓冲盐溶液)稀释,继续恒温搅拌后减压旋蒸至乙醇完全除尽,得到脂质体姜黄素,过 220 nm 滤膜,4 °C 保存。

1.2.2 MTT 实验 LL/2 单细胞悬液接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μL (3000 个细胞),培养 24 h 之后,加入用培养基稀释的不同浓度的脂质体姜黄素至终浓度分别为 5、10、20、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作为实验组,对照组加入等量的培养基作为对照(每组设置 4 个复孔,实验重复 3 次)。培养 48 h,在结束培养前 4 h,加入 MTT 20 μL ,继续培养 4 h。最后彻底弃去培养上清液,每孔加入 150 μL DMSO,37 °C 下摇床低速晃动 10 min,使结晶物充分溶解。在酶标仪上,设定 570 nm 波长下检测每孔细胞的吸光度 A_{570} 值,按下列公式计算细胞存活率:细胞存活率(%) = 实验组 A_{570} 值/对照组 A_{570} 值 $\times 100\%$ 。

1.2.3 流式细胞术分析凋亡和细胞周期 取对数生长期的 LL/2 细胞,按细胞密度为 10^5 /孔接种于 6 孔板内,待 24 h 细胞贴壁后,加入不同浓度的脂质体姜黄素至终浓度 5、10、20、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$,同时设对照组(同 1.2.2),处理细胞 48 h 后,收集细胞,1800 r/min 离心 3 min,弃上清,PBS 清洗 2 次,用 0.2 mL PBS 将细胞沉淀混匀,70% 冷乙醇固定 24 h,1 mL 碘化丙啶(PI)染液(含 50 mg/L PI,10% TritonX-100 和 10 mg/L RNaseA),4 °C 避光染色 30 min,用 ESP 型流式细胞仪(美国 Coulter 公司)检测凋亡率与细胞周期。

1.2.4 肿瘤模型的建立和肿瘤抑制实验 6 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠右后肢接种 5×10^5 个 LL/2 细胞。7 d 后,小鼠随机分为 2 组,每组 6 只。实验组用脂质体姜黄素 200 μL (10 mg/kg) 静脉给药,每天给药 1 次,共 2 周;对照组注射等量的生理盐水。肿瘤体积每 3 d 用游标卡尺测量 1 次。肿瘤体积(mm^3) = 宽(mm)² \times 长(mm) $\times 0.52$ 。

1.2.5 藻酸盐实验^[10] 在小鼠肿瘤中的抗血管生成作用使用藻酸盐包裹实验来加以证明。血管生成量用每个珠子吸收的 FITC-dextran 的量来定量。收集培养的 LL/2 细胞,将细胞沉淀重悬于 1.6% (W/V) 藻酸钠溶液中,将上述 200 mL 肿瘤细胞悬浮液缓慢滴入磁力搅拌的 10 mL 250 mmol/L CaCl_2 溶液中,形成乳白色的藻酸盐小珠,静置 30

min。16 只 6 周龄雌性 C57BL/6J 小鼠麻醉后在背部皮下植入 4 粒藻酸盐包裹颗粒,随机分为 2 组,实验组每只小鼠用脂质体姜黄素 200 μL (10 mg/kg) 每天 1 次静脉给药,对照组注射等量的生理盐水作为对照。14 d 以后,每组各取 3 只小鼠,小心剥离背部皮肤,暴露藻酸盐微球,于解剖显微镜下观察微球表面血管生成情况。所余每组 5 只小鼠经尾静脉注入 0.1 mL(100 mg/kg) FITC 标记的葡聚糖(FITC-dextran)。20 min 后处死动物,迅速照相并取出藻酸盐颗粒,常温下加入 2 mL 生理盐水,剪碎研磨颗粒,放置 1 h,1500 r/min 离心 5 min。取上清液用荧光酶标仪测定荧光强度。用不同浓度的 FITC-dextran 制备标准曲线,计算每组摄取 FITC-dextran 的量。

1.2.6 统计学方法 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量资料采用 student's *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脂质体姜黄素对细胞生存能力的影响

结果见附表。20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度组的细胞存活率与对照组相比,存活率下降($P < 0.05$)。5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度组的细胞存活率与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$),40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组存活率低于 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组($P < 0.05$)。可见随药物浓度增加,LL/2 细胞的存活率逐渐下降。

附表 不同浓度脂质体姜黄素作用 48 h 后对 LL/2 细胞存活率和凋亡率的影响

Table Effect of different concentration of liposomal curcumin on survival rate and apoptosi rate of LL/2 cells treated for 48 h

Group	Survival rate (%) , $n=12$	Rate of apoptosis (%) , $n=3$
Control	100	2.1 \pm 0.7
5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	95.45 \pm 8.23	1.3 \pm 0.6
10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	92.25 \pm 5.34	1.2 \pm 0.2
20 $\mu\text{g}/\text{mL}$	77.58 \pm 4.85*	3.3 \pm 1.1
40 $\mu\text{g}/\text{mL}$	64.97 \pm 6.82*·#	11.6 \pm 1.6 Δ

* $P < 0.05$, compared with control group; # $P < 0.05$, compared with 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group; Δ $P < 0.05$, compared with other groups

2.2 脂质体姜黄素对细胞凋亡的影响

结果见附表。5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度组的细胞凋亡率与对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度组细胞凋亡率高于其余各组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 脂质体姜黄素对细胞周期的影响

结果见图 1。40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度组的 S 期细胞分布百分率 $[(43.6 \pm 1.3)\%]$ 与对照组 $[(51.3 \pm 2.1)\%]$ 相比减少($P < 0.05$), G_2/M 期细胞分布百分率 $[(19.1 \pm 0.4)\%]$ 与对照组 $[(10.3 \pm 0.87)\%]$ 相比增加($P < 0.05$)。其他浓度组的 G_1 、S 期和 G_2/M 的细胞分布百分率与对照组相比, 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。可见较低浓度的脂质体姜黄素不能阻止 LL/2 细胞的分裂, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 脂质体姜黄素可以使细胞停滞于 G_2/M 期。

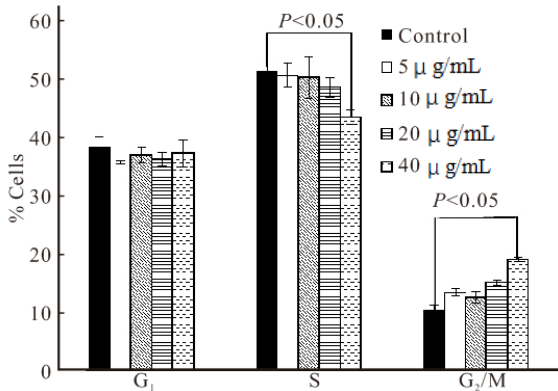


图 1 不同浓度的脂质体姜黄素处理 48 h 后 LL/2 的细胞周期分布
Fig 1 Cell cycles distribution of LL/2 cells after treated with liposomal curcumin at different concentrations for 48 h

2.4 脂质体姜黄素体内抑制 Lewis 肿瘤的生长

结果见图 2。与对照组相比, 脂质体姜黄素治疗抑制了肿瘤的生长。在接种后第 13 d、第 16 d、第 19 d, 实验组和对照组间肿瘤体积的差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

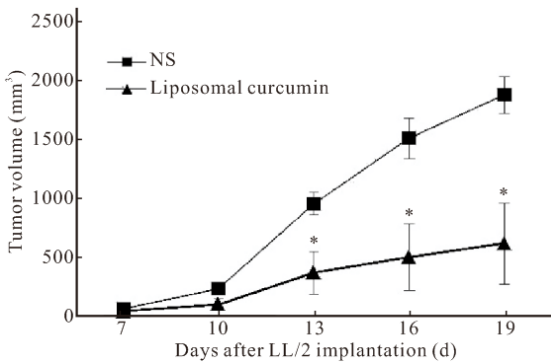


图 2 脂质体姜黄素对 LL/2 肿瘤模型中肿瘤生长的抑制作用
Fig 2 Inhibition of tumour growth in the LL/2 model by treated with liposomal curcumin (* $P < 0.05$, vs. NS group)

2.5 脂质体姜黄素体内抗肿瘤血管的生成

从图 3 中可以看出, 与对照组相比, 实验组的血管生成明显减少。通过 FITC-dextran 定量分析得出对照组 FITC-dextran 摄入量 $[(8.1 \pm 0.4) \mu\text{g}]$ 与实验组 $[(3.2 \pm 0.3) \mu\text{g}]$ 的差异具有统计学意义($P <$

0.05)。这表明实验组的血管生成受到了抑制。

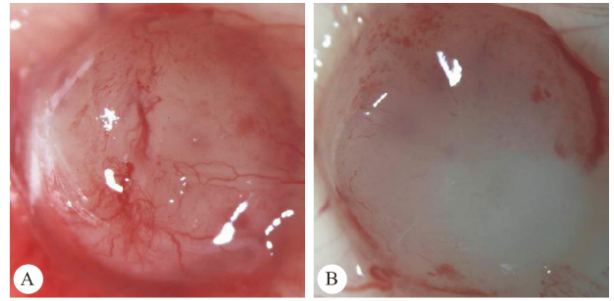


图 3 藻酸盐包被珠中的血管生成情况

Fig 3 Inhibition of angiogenesis estimated by alginate encapsulation assay

A: Control (NS) group; B: Treatment (liposomal curcumin) group

3 讨论

虽然已有多种药物被证实可以抑制肿瘤生长, 但是大多数因较强的毒性和较高的价格限制了它们的应用。姜黄素作为一种天然的植物成分, 至今没有报告显示其对人体有明显的毒性, 联合国世界卫生组织食品药品管理局已批准姜黄素为天然食品添加剂。并且姜黄素的价格低廉, 取材方便, 因此姜黄素作为抗肿瘤药物有很大的优势。

目前, 对姜黄素的抗肿瘤和抗血管作用均有报道^[11], 但是由于姜黄素的水溶性差, 大多数研究采用了灌胃等方式来进行体内研究, 药物的生物利用度较低。在本研究中我们使用乙醇注入法制备的脂质体姜黄素水溶性良好, 粒度分布均匀, 使得姜黄素可以通过静脉注射给药的方式来进行体内研究。

本研究首先检测了脂质体姜黄素的体外抗肿瘤作用, MTT 结果显示只有较高浓度的脂质体姜黄素才能抑制 LL/2 肿瘤细胞的增殖, 对细胞周期和细胞凋亡的分析也发现高浓度药物处理后的细胞才发生细胞凋亡和 G_2/M 周期停滞。可见 LL/2 肿瘤细胞对脂质体姜黄素并不敏感。我们建立了 LL/2 荷瘤小鼠模型, 用与体外 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 相当剂量的脂质体姜黄素 (10 mg/kg) 静脉给药治疗后发现脂质体姜黄素具有较强的抗肿瘤作用, 显著抑制了 LL/2 肿瘤的生长, 这与体外的实验结果存在一定差异, 原因可能与脂质体的靶向性和姜黄素的抗血管作用等多种因素有关, 具体原因还需进一步研究。

血管生成是指从已经存在的血管上长出新生的血管, 病理性的血管生成是大多数实体肿瘤的重要标志^[12]。靶向血管内皮细胞的肿瘤 (下转第 75 页)

者 eGFR 的预测, 而 CKD-EPI 公式可能在早期肾损伤时具有较好的稳定的预测性能; 联合患者蛋白尿出现情况有利于提高 eGFR 预测公式的诊断效能, 而准确定量蛋白尿检测有利于考察研究人群 eGFR 下降的具体程度。

参 考 文 献

- 1 Hoefield RA, Kalra PA, Baker PG, *et al.* The use of eGFR and ACR to predict decline in renal function in people with diabetes. *Nephrol Dial Transplant*, 2011; 26(3): 887-892.
- 2 吕瑞雪, 李一松, 黄亨建等. 基于血清半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 的肾小球滤过率预测模型的建立和评价. *四川大学学报(医学版)*, 2012; 43(1): 104-107.
- 3 National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation classification, and stratification. *Am J Kidney Dis*, 2002; 39(2 Suppl 1): S1-S266.
- 4 Levey AS, Greene T, Kusek JW, *et al.* A simplified equation to predict glomerular filtration rate from serum creatinine. *J Am Soc Nephrol*, 2000; 11(Suppl 15): A0828.
- 5 Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, *et al.* A new equation to

- estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*, 2009; 150(9): 604-612.
- 6 Christine W, Ayub A, Naser H, *et al.* Chronic kidney disease stage in renal transplantation-classification using cystatin C and creatinine equations. *Nephrol Dial Transplant*, 2007; 22(10): 3013-3020.
- 7 Ahmed Z, Mabood Q, Ahmed S. Comparison between creatinine and cystatin C-based GFR equations in renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant*, 2007; 22(9): 2659-2668.
- 8 Dharnidharka VR, Kwon C, Stevens G. Serum cystatin C is superior to creatinine as a marker of kidney function; a meta-analysis. *Am J Kidney Dis*, 2002; 40(2): 221-226.
- 9 Laterza OF, Price CP, Scott MG. Cystatin C: an improved estimator of glomerular filtration rate? *Clin Chem*, 2002; 48(5): 699-707.
- 10 Meguro S, Shigihara T, Kabeya Y, *et al.* Increased risk of renal deterioration associated with low e-GFR in type 2 diabetes mellitus only in albuminuric subjects. *Intern Med*, 2009; 48(9): 657-663.

(2012-07-11 收稿, 2012-11-01 修回)

编辑 汤 洁

(上接第 48 页)

治疗策略是一个很好的抗肿瘤研究方向^[13]。我们选用了肿瘤细胞藻酸盐包被珠移植模型来观察脂质体姜黄素对肿瘤细胞在体内诱导的血管生成的抑制作用。由藻酸盐形成的包被珠具有良好的透明度和通透性, 新生血管长入其中易于观察。本研究不仅观察了实验组和对照组的外观差异, 而且对各组包被珠中血管生成的密度差异进行了定量分析。研究结果表明脂质体姜黄素可明显抑制 LL/2 细胞诱导的肿瘤新生血管形成。

综上所述, 脂质体姜黄素通过静脉给药有效地抑制了小鼠 LL/2 肿瘤在体内的生长, 抑制了肿瘤诱导的血管生成, 脂质体姜黄素具有抗肿瘤和抗血管的双重作用, 有望开发成一种新型、高效的抗肿瘤药物。

参 考 文 献

- 1 Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipati J, *et al.* Multiple biological activities of curcumin; a short review. *Life Sci*, 2006; 78(18): 2081-2087.
- 2 Li L, Ahmed B, Mehta K, *et al.* Liposomal curcumin with and without oxaliplatin: effects on cell growth, apoptosis, and angiogenesis in colorectal cancer. *Mol Cancer Ther*, 2007; 6(4): 1276-1282.
- 3 Thangapazham RL, Puri A, Tele S, *et al.* Evaluation of a nanotechnology-based carrier for delivery of curcumin in prostate cancer cells. *Int J Oncol*, 2008; 32(5): 1119-1123.
- 4 Mach CM, Mathew L, Mosley SA, *et al.* Determination of minimum effective dose and optimal dosing schedule for liposomal curcumin in a xenograft human pancreatic cancer

- model. *Anticancer Res*, 2009; 29(6): 1895-1899.
- 5 Sreekanth CN, Bava SV, Sreekumar E, *et al.* Molecular evidences for the chemosensitizing efficacy of liposomal curcumin in paclitaxel chemotherapy in mouse models of cervical cancer. *Oncogene*, 2011; 30(28): 3139-3152.
- 6 Cheng AL, Hsu CH, Lin JK, *et al.* Phase I clinical trial of curcumin, a chemopreventive agent, in patients with high-risk or pre-malignant lesions. *Anticancer Res*, 2001; 21(4B): 2895-2900.
- 7 Dhillon N, Aggarwal BB, Newman RA, *et al.* Phase II trial of curcumin in patients with advanced pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, 2008; 14(14): 4491-4499.
- 8 Takahashi M, Uechi S, Takara K, *et al.* Evaluation of an oral carrier system in rats; bioavailability and antioxidant properties of liposome-encapsulated curcumin. *J Agric Food Chem*, 2009; 57(19): 9141-9146.
- 9 Allen TM, Cullis PR. Drug delivery systems; entering the mainstream. *Science*, 2004; 303(5665): 1818-1822.
- 10 Hoffmann J, Schirner M, Menrad A, *et al.* A highly sensitive model for quantification of *in vivo* tumor angiogenesis induced by alginate-encapsulated tumor cells. *Cancer Res*, 1997; 7(17): 3847-3851.
- 11 Yadav VR, Aggarwal BB. Curcumin; a component of the golden spice, targets multiple angiogenic pathways. *Cancer Biol Ther*, 2011; 11(2): 236-241.
- 12 Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 2000; 407(6801): 249-257.
- 13 Gasparini G, Longo R, Toi M, *et al.* Angiogenic inhibitors; a new therapeutic strategy in oncology. *Nat Clin Pract Oncol*, 2005; 2(11): 562-577.

(2012-06-15 收稿, 2012-10-25 修回)

编辑 余 琳