DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.03.024

姜黄素-槲皮素无载体复合纳米颗粒用于抗肿瘤的实验研究

阮明月,李加玲,董昱男,陈宛灵,张海桐,苗雅秋,韩宁,杜守颖,吴凯
(北京中医药大学中药学院,北京 102488)

摘要:目的 为了实现难溶性抗肿瘤中药成分的共同递送并提高其抗肿瘤效果,采用无载体药物自组装技术将天然多酚类物质姜黄素(Curcumin,Cur)和槲皮素(Quercetin,Que)制备成姜黄素-槲皮素复合纳米颗粒。方法 利用药物液相自组装方法,将姜黄素-槲皮素复合溶液加入至水性体系中,二者共组装得到姜黄素-槲皮素复合纳米颗粒(Cur-Que NPs),通过扫描电子显微镜(Scanning electron microscopy,SEM)、X射线粉末衍射法(X-ray powder diffraction,XRPD)和差示扫描量热法(Differential scanning calorimetry,DSC)对Cur-Que NPs的形貌、粒径、物相性质及其稳定性进行研究;并进一步采用傅里叶变换红外光谱仪(Fourier transform infrared spectroscopy,FTIR)探究姜黄素与槲皮素的组装机制;在MTT法考察Cur-Que NPs对4T1细胞的毒性基础上,建立4T1荷瘤小鼠模型研究Cur-Que NPs在体内的联合抗肿瘤效果。结果 Cur-Que NPs为无定型球形颗粒,粒径为(44.33±12.18)nm。将Cur-Que NPs冻干粉体在水中进行再分散后,其颗粒仍为球形,粒径为(44.53±10.08)nm,说明Cur-Que NPs水再分散性良好。SEM、XRPD与DSC结果表明,冻干后的纳米颗粒在6个月的储存过程中形貌、粒径以及存在状态均未发生明显变化,具有较好物理稳定性。FT-IR结果表明,姜黄素和槲皮素自组装主要依靠氢键相互作用。细胞毒性实验表明,与其他治疗组相比,Cur-Que NPs组具有更强的细胞杀伤效果($P<0.001$)。体内药效实验结果表明,与姜黄素原料药组或槲皮素原料药组相比,Cur-Que NPs组对肿瘤生长的抑制效果最为显著($P<0.05$)。结论 姜黄素-槲皮素无载体复合纳米颗粒能够实现药物的共同递送,显著提高抗肿瘤疗效。

关键词:姜黄素;槲皮素;纳米;自组装;抗肿瘤
中图分类号:R285.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2026)03-0129-08

Carrier-free Nanoparticles Composed of Curcumin-Quercetin for Anti-Tumor Treatment

RUAN Mingyue,LI Jialing,DONG Yunan,CHEN Wanling,ZHANG Haitong,MIAO Yaqiu,HAN Ning,DU Shouying,WU Kai
(School of Chinese Materia Medica,Beijing University of Chinese Medicine,Beijing 102488,China)

Abstract:*Objective* To achieve the co-delivery of water insoluble anti-tumor herbal components and enhance their anti-tumor efficacy,the natural polyphenolic compounds curcumin(Cur) and quercetin(Que) were co-assembled into curcumin-quercetin nanoparticles by carrier-free drug self-assembly technology. *Methods* The organic solution containing Cur and Que was added to an aqueous system by a drug liquid-phase self-assembly method to finally prepare curcumin-quercetin nanoparticles(Cur-Que NPs). The morphology,particle size,phase properties and the stability of Cur-Que NPs were investigated by scanning electron microscopy(SEM),X-ray powder diffraction(XRPD) and differential scanning calorimetry(DSC). The self-assembly mechanism of Cur-Que was studied by Fourier transform infrared spectroscopy(FTIR). The cytotoxicity of Cur-Que NPs on 4T1 cells was investigated by MTT assay. A 4T1 tumor-bearing mice model was established to study the combined anti-tumor efficacy of Cur-Que NPs *in vivo*. *Results* The prepared Cur-Que NPs were amorphous and spherical with the particle size at (44.33±12.18)nm. The lyophilized-treated Cur-Que NPs also remained spherical and the particle size was (44.53±10.08)nm in SEM,indicating that the Cur-Que NPs had good stability. From the SEM,XRPD and DSC results,the morphology,particle size as well as existing forms of the lyophilized Cur-Que NPs remained unchanged for 6 months of storage at room temperature away from light,indicating that the Cur-Que NPs had good physical stability. From FTIR result,hydrogen bonding interaction was the driving force for the self-assembly of Cur-Que. Compared to other treatment groups,the Cur-Que NPs group showed significantly enhanced cytotoxicity($P<0.001$). Also,the Cur-Que NPs group had the most significant inhibitory effect on tumor growth compared with the Cur API group or the Que API group($P<0.05$). *Conclusion* Carrier-free Cur-Que NPs for self-assembly could achieve co-delivery for drugs and significantly improve anti-tumor efficacy.

Keywords:curcumin;quercetin;nanoparticles;self-assembly;anti-tumor

基金项目:国家自然科学基金项目(82204632)
作者简介:阮明月(2000-),女,湖北天门人,硕士在读,研究方向:中药学-中药新剂型与新技术。
通讯作者:杜守颖(1960-),女,山西大同人,教授,博士研究生导师,博士,研究方向:中药学-中药制剂。E-mail:dusy@bucm.edu.cn。
吴凯(1989-),男,吉林吉林人,讲师,博士,研究方向:药物递送系统。E-mail:wukailx@163.com。

癌症严重影响着人类的健康发展，2022 年全球约有 1997.6 万新发病例以及 974.4 万死亡病例[1]。传统的癌症治疗方法包括手术、放疗与化疗，但是手术与放疗难以成功治疗转移性癌症病变，化疗存在着生物利用度差、剂量要求高、不良反应大、产生多重耐药性以及非特异性靶向等问题[2]。因此，越来越多的学者致力于寻求更安全、有效天然活性成分作为有前途的癌症治疗药物。

姜黄素（Curcumin，Cur）是一种从姜黄 *Curcuma longa* L. 根茎中提取的天然多酚类化合物，已被证明在宫颈癌、结肠癌和乳腺癌等多种癌症中具有抗癌特性[3-4]。研究表明，姜黄素能够参与抑制肿瘤细胞周期的各个阶段（M/G1、G1/S、S、G2/M），并通过诱导活性氧（reactive oxygen species，ROS）的相关信号通路或者激活细胞周期依赖性激酶抑制因子 1A（cyclin - dependent kinase inhibitor 1A，p21）和肿瘤抑制蛋白（tumor protein 53，p53）相关的分子靶点，诱导细胞凋亡，同时具有抑制 P - 糖蛋白（P - Glycoprotein，P - gp）对大多数药物的外排作用[3,5-6]。同样，槲皮素（Quercetin，Que）是一种存在于众多中草药中的天然多酚类黄酮，可通过不同机制对多种癌症显示出显著治疗效果[7-8]，比如，通过靶向细胞周期蛋白以及周期蛋白依赖性激酶（cyclin - dependent kinases，CDK）等信号分子，进而干扰细胞周期过程；通过降低线粒体膜电位和抗凋亡蛋白（B - cell lymphoma - 2，Bcl - 2）的表达，增加胞质钙浓度和促凋亡蛋白（BCL - 2 - associated X protein，Bax）的表达，以及调控 Fas、肿瘤坏死因子受体 1（tumor necrosis factor receptor 1，TNFR1）和肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体（TNF - related apoptosis - inducing ligand，TRAIL）等受体，诱导细胞凋亡；通过调控蛋白或通过下调上皮标志物，诱导间质蛋白过表达来抑制血管生成[7,9-10]。随着联合用药策略的提出，研究人员发现将姜黄素与槲皮素联合应用，能够通过增强乳腺癌 1 型易感蛋白（breast cancer susceptibility protein 1，BRCA1）的表达，从而抑制三阴性乳腺癌（triple - negative breast cancer，TNBC）细胞系的细胞存活和迁移[11]。另外，姜黄素和槲皮素联合给药可通过下调 Wnt/β - catenin 信号通路蛋白包括转导蛋白 2（Dishevelled segment polarity protein 2，DVL2）、β - 连环蛋白（β - catenin）、细胞周期素 D1（cyclin D1）、环氧合酶 2（cyclooxygenase - 2，Cox2）和轴蛋白 2（Axis Inhibitor 2，Axin2）协同抑制黑色素瘤细胞 A375 的细胞增殖，并通过下调 Bcl - 2 和诱导半胱天冬酶 3/7（Caspase 3/7）进而诱导黑色素瘤细胞 A375 的细胞凋亡[12]，故姜黄素与槲皮素联合应用能够发挥协同抗肿瘤作用。然而，姜黄素和槲皮素均具有水溶性差、半衰期短以及生物利用度低的缺点[3,13]。因此开发适宜的制剂形式来提高姜黄素和槲皮素的溶解度和生物利用度，实现姜黄素和槲皮素共同递送是提高其抗肿瘤作用的关键。

为了解决姜黄素与槲皮素的共递送问题，研究人员设计了基于载体材料的纳米药物递送系统，例如聚合物纳米颗粒。MANSOURIZADEH F 等[14]研究人员将姜黄素与槲皮素封装于 Apoferritin 纳米笼中，实现二者共同递送的同时，增强了对人乳腺癌细胞系 MCF7 的凋亡作用。虽然基于载体材料的纳米技术已经取得较大进展，但是对抗癌药物成分的装载效率仍较低，同时载体的毒性情况在很大程度上仍处于未知状态[15]。基于此，无载体自组装纳米药物递送系统引起了研究人员的广泛关注。无载体自组装纳米药物通常由前药、药物或两亲性药物 - 药物偶联物通过分子间相互作用力自组装而成。其中，药物分子自组装纳米递送系统采用液相沉淀法[16]（即液相状态下纳米粒子凝聚析出的方法），并借助非共价分子间作用力（如疏水、静电、氢键作用力等）构建无载体纳米药物[17-18]。而且，在该纳米药物中添加少量表面活性剂可提高胶体稳定性或者调整药物理化性质[19-21]。此外，该共组装体系不仅具备双药或多药递送的优良性质以及载药量高的特点，还能避免载体引起的潜在毒性、免疫原性以及难降解性的问题[22-23]。因此，将姜黄素和槲皮素共组装成无载体纳米药物，为高效递送姜黄素和槲皮素提供了可能性，并且有望延长药物的血液循环时间，提高生物利用度[4,9]。同时，通过被动靶向使得纳米药物聚集到肿瘤组织，提高姜黄素和槲皮素在肿瘤组织的浓度，有利于降低药物的所需剂量并发挥协同抗肿瘤效果[3-4,20]。

本研究利用药物无载体自组装技术，通过液相沉淀法制备姜黄素 - 槲皮素复合纳米颗粒（Cur - Que NPs），并对该纳米颗粒的形貌、粒径、物相性质以及稳定性进行表征，在研究 Cur - Que NPs 的组装机制基础上，探究 Cur - Que NPs 的体外与体内抗乳腺癌作用。

1 仪器与材料

1.1 仪器 FD - 2A 型冻干机，北京博益康实验仪器有限公司；SU8600 型扫描电子显微镜（SEM），日立公司；Ultima Ⅳ X 射线粉末衍射仪（XRPD），日本理学公司；差示扫描量热仪（DSC），瑞士梅特勒公司；Alpha Ⅱ光谱仪（FTIR），德国布鲁克公司；Clario Star 型酶标仪，德国 BMG Labtech 公司；C170 型二氧化碳培养箱，德国 Brinder 公司；CKX41 - A22PHP 型倒置显微镜，日本 Olympus 公司；Captair Bio 321 Smart 型超净工作台，法国 Erlab 公司；游标卡尺，上海赛拓五金有限公司。

1.2 试剂 姜黄素（批号 RH197202，浓度级别 AR）与槲皮素（批号 RH181593，浓度级别 97%）购自上海易恩化学技术有限公司；羟丙基甲基纤维素（hydroxypropyl methyl cellulose，HPMC，批号 G2020084）购自阿拉丁试剂（上海）有限公司；MTT（批号 2018092101）购自北京拜尔迪生物技术有限公司；胎牛血清（fetal bovine serum，FBS，批号 aq20367582）购自北京翱擎生物科技有限公司；胰蛋白酶（批号 25200 - 056）、RPMI 1640（批号 8122527）以及抗青霉素（100 U/mL）- 抗链霉素（100 μg/mL，批号 2595647），购自美国 Gibco 公司；二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO，批号 C15345504）购自上海麦克林生化科技股份有限公司；所有其他化学试剂均来自 Sigma - Aldrich 公司。

1.3 细胞与动物 小鼠乳腺癌细胞株 4T1 购自美国 ATCC 公司；SPF 级 Balb/c 雌性小鼠，体质量 18 ~ 19 g，购于斯贝福（北京）生物技术有限公司，许可证号 SCXK（京）2019 - 0010。实验期间动物饲养于同一环境下，保持室温（25 ± 1）℃，空气湿度 55% ~65%，12 h 光暗循环，自由进水饮食。本实验相关动物实验遵循北京中医药大学有关实验动物管理和使用的规定，动物实验伦理批准号为 BUCM - 2023100901 - 4005。

2 方法与结果

2.1 Cur - Que NPs 的制备形貌表征 将 125 mg 姜黄素和 103 mg 槲皮素溶于 50 mL 无水甲醇中，配制为姜黄素 - 槲皮素复合有机溶液。称取 125 mg HPMC 溶于 400 mL 去离子水，作为反溶剂相。在 5 ℃和搅拌条件下，将姜黄素 - 槲皮素有机复合溶液滴加至反溶剂中，得到姜黄素 - 槲皮素复合纳米混悬液，进一步将姜黄素 - 槲皮素复合纳米悬浮液在 - 20 ℃温度下以 6 Pa 的压力进行 72 h 的冻干处理，即得到 Cur - Que NPs。

将分散于去离子水的姜黄素原料药、槲皮素原料药以及 Cur - Que NPs 复合纳米颗粒滴加至硅片上，待样品自然干燥

后,进行喷金处理,随后采用 SEM 进行形貌观察,并使用 Image J 软件对 Cur - Que NPs 进行粒度统计。结果如插页XLV图 1 所示,姜黄素原料药以块状形式存在,表面光滑;槲皮素原料药以棒状形式存在,表面略显粗糙。而 Cur - Que NPs 为粒径(44.33 ± 12.18)nm 的球形颗粒,与原料药颗粒形貌及大小发生明显变化,说明姜黄素与槲皮素可共组装形成纳米颗粒。

2.2 Cur - Que NPs 的物相性质分析 利用 XRPD 分别对姜黄素原料药、槲皮素原料药、姜黄素和槲皮素原料药的物理混合物和 Cur - Que NPs 的存在状态进行分析。辐射源:Cu - Kα;起始角:5 °(2θ);终止角:40 °(2θ);扫描速度:5 °/min;扫描步长:0.02 °。电压和电流分别为 40 kV 和 40 mA。

采用 DSC 分别对姜黄素原料药、槲皮素原料药、姜黄素和槲皮素原料药的物理混合物和 Cur - Que NPs 的热力学性质进行分析。扫描范围 25 ~ 240 ℃,扫描速度 10 ℃/min,氮气流速 50 mL/min。

XRPD 结果显示,姜黄素原料药在 7.91°、8.87°、12.26°、13.84 ~ 19.47°、21.17°以及 22.28 ~ 29.07°存在明显的特征衍射峰,槲皮素原料药在 9.32°、10.78 ~ 17.86°、22.04°以及 23.86 ~ 28.24°存在明显的特征衍射峰,说明二者以晶体的形式存在[24-25]。物理混合物的图谱中清晰可见姜黄素原料药和槲皮素原料药的特征衍射峰,说明物理混合不影响药物的晶体类型。而在 Cur - Que NPs 的图谱中,原料药的特征衍射峰均消失(插页XLV图 2 - A),说明姜黄素与槲皮素在共组装后,二者的结晶度显著降低,转变为无定型状态[26]。Cur - Que NPs 改变了药物的存在状态,有利于提高药物生物利用度[24,27]。

DSC 的结果同样证明了 Cur - Que NPs 以无定型的形式存在。如插页XLV图 2 - B 所示,姜黄素原料药在 183.49 ℃左右出现了熔融吸热峰[28]。槲皮素原料药在 125.06 ℃左右出现较宽的熔融吸热峰[29]。物理混合物中同时出现了姜黄素和槲皮素的熔融吸热峰,而 Cur - Que NPs 的熔融吸热峰完全消失,说明姜黄素和槲皮素在纳米颗粒中是无定型状态,这与 XRPD 结果吻合。

2.3 Cur - Que NPs 的稳定性 采用 SEM、XRPD 以及 DSC 对在室温避光条件下储存 180 d 的 Cur - Que NPs 进行形貌观察、晶型以及热力学性质分析。如插页XLVI图 3 可知,将冻干后的 Cur - Que NPs 再分散于去离子水中,其粒径为(44.53 ± 10.08)nm,且仍为球形,说明 Cur - Que NPs 水再分散性良好。同时进一步将室温避光条件下存储 6 个月的 Cue - Que NPs 再分散于去离子水中,其粒径与形貌并未发生显著改变,表明Cur - Que NPs 的稳定性良好。另外,在室温避光条件下储存 180 天的 Cur - Que NPs 与刚制备的 Cur - Que NPs 的 XRPD 与 DSC 图谱一致,并无明显改变,表明 Cur - Que NPs 仍处于无定型状态,说明姜黄素与槲皮素之间的相互作用以及 HPMC 作为稳定剂使得 Cur - Que NPs 具有较好的物理稳定性(插页XLV图 2)。

2.4 Cur - Que NPs 的自组装机制 将姜黄素原料药、槲皮素原料药、姜黄素和槲皮素原料药的物理混合物和 Cur - Que NPs 与溴化钾混合并充分研磨,压片制样。采用 FTIR 对样品进行扫描,扫描范围为 4000 cm^{-1} ~ 400 cm^{-1}。

如插页XLVI图 4 所示,姜黄素原料药在 3 503.73 cm^{-1}处的峰值归因于 - OH 的伸缩振动,在 1 628.53 cm^{-1}和 1 599.29 cm^{-1}处的条带归属于苯环上羰基的伸缩振动,这是姜黄素芳香环中的羰基,此外,在 1 505.72 cm^{-1}以及 1 276.87 cm^{-1}处的吸收峰分别归属于苯环中的 C = C 伸缩振动以及 C - O 伸缩振动[26]。槲皮素原料药在光谱中的特征吸收峰包括在 3 381.26 cm^{-1}处的 O - H 伸缩振动峰,在 1 658.03 cm^{-1}和 1 599.29 cm^{-1}处的 C = O 伸缩振动峰,在 1 511.19 cm^{-1}处的芳香环的 C = C 伸缩振动峰以及在 1 361.94 cm^{-1}处的 C - OH 伸缩振动峰[25]。姜黄素与槲皮素的物理混合物中可以观察到槲皮素的 C - OH 伸缩振动峰(1 361.94 cm^{-1})、槲皮素的 O - H 伸缩振动峰(3 381.26 cm^{-1})、槲皮素的 C = O 伸缩振动峰(1 658.03 cm^{-1}、1 599.29 cm^{-1}以及 1 560.13 cm^{-1})与姜黄素的 C = O 伸缩振动峰(1 628.53 cm^{-1}和 1 599.29 cm^{-1})等特征吸收峰。而在 Cur - Que NPs 的光谱中,槲皮素的 O - H 伸缩振动峰消失,槲皮素的 C - OH 伸缩振动峰峰强减弱,姜黄素的 C = O 伸缩振动频率向低波数移动(1 624.02 cm^{-1}和 1 592.89 cm^{-1}),提示姜黄素的羰基与槲皮素的羟基之间形成了氢键[30],表明姜黄素和槲皮素自组装主要是依靠氢键相互作用。

2.5 体外细胞毒性测试 采用 MTT 法考察 Cur - Que NPs 对 4T1 细胞的抗肿瘤效果。实验设置姜黄素原料组、槲皮素原料药组、姜黄素 - 槲皮素物理混合组以及 Cur - Que NPs 组。将姜黄素、槲皮素、姜黄素 - 槲皮素物理混合物以及 Cur - Que NPs 用完全培养基稀释至不同浓度(姜黄素浓度为 15、30、60、120、240 μmol/L)。4T1 细胞以 1×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μL。将 96 孔板置于细胞培养箱中培养,待细胞完全贴壁后,弃去原培养基,给药组分别加入不同浓度的含药培养基(100 μL),对照组加入等体积的完全培养基,置于细胞培养箱中继续培养 48 h。48 h 后,每孔加入 10 μL MTT 工作液,并置于细胞培养箱中继续孵育 4 h。之后吸除孔中液体,加入 150 μL DMSO,振荡使紫色结晶充分溶解。利用全自动酶标仪测定各孔在 490 nm 波长处的吸光度值,计算存活率。采用 GraphPad Prism 10.1.2 软件计算 IC_{50},并计算 CI 值[31-32]。

细胞存活率 = $A_{给药}/A_{对照}$

采用 MTT 法评估了 Cur - Que NPs 对 4T1 细胞的体外细胞毒性,结果如插页XLVI图 5 所示,各给药组随着药物浓度增加,细胞毒性逐渐增强。与姜黄素原料组、槲皮素原料药组以及姜黄素 - 槲皮素物理混合物组相比,Cur - Que NPs 组对 4T1 细胞显示出最强的细胞毒性。其中在姜黄素浓度为 60 μmol/L 时,Cur - Que NPs 组的细胞存活率为 29.28%,明显低于姜黄素原料药组(49.63%,$P < 0.001$)、槲皮素原料组(50.90%,$P < 0.001$)以及姜黄素 - 槲皮素物理混合组(40.82%,$P < 0.001$),表明 Cur - Que NPs 能更有效地杀死肿瘤细胞。姜黄素原料药组与槲皮素原料药组对 4T1 细胞的抑制活性 IC_{50}值分别为 52.05 与 72.72 μmol/L[33-35],物理混合组以及 Cur - Que NPs 组的 IC_{50}值分别为 41.93 与 24.11 μmol/L. Cur - Que NPs 对 4T1 细胞的 CI 值为 0.40,表明姜黄素与槲皮素联用能够发挥协同抗肿瘤作用。见表 1。

表 1 不同处理组对 4T1 细胞的抑制活性 IC_{50}

组别	IC_{50}/(μmol/L)
姜黄素原料药组	52.05
槲皮素原料药组	72.72
姜黄素 - 槲皮素物理混合组	41.93
Cur - Que NPs 组	24.11

2.6 体内药效学研究 采用 0.25% 胰蛋白酶对 4T1 细胞进行消化处理,2 min 后加入 2 mL 完全培养基终止消化,1000 r/min 离心 3 min 收集细胞,并用完全培养基重悬,获得最终浓度为 2×10^7 个/mL 的细胞悬液。将 200 μL 细胞悬液皮下接种

于 Balb/c 小鼠的右后肢前侧。

待小鼠肿瘤体积达到 100 ~ 200 mm^3 时，将荷瘤小鼠随机分为 5 组（$n=6$），即空白组（a）、姜黄素原料药组（b）、槲皮素原料药组（c）、姜黄素 - 槲皮素物理混合组（d）、Cur - Que NPs 组（d）。通过尾静脉注射给药，注射体积为 200 μL，姜黄素给药剂量为 5 mg/kg，槲皮素给药剂量为 4 mg/kg。每 2 天给药 1 次，连续给药 5 次。以第 1 次给药当天作为药效实验的第 0 天，并用天平称量小鼠体质量，并通过游标卡尺测量肿瘤长、短径，持续记录 11 天。监测给药期间各组小鼠的体质量变化及肿瘤生长情况。肿瘤体积计算公式如下：

$V = a \times b^2/2$

其中 V 为肿瘤体积，a 为肿瘤长径（mm），b 为肿瘤短径（mm）。

待实验结束后，将各组小鼠脱颈处死，解剖，取出各组肿瘤组织，用 PBS 洗涤至器官表面无浮血。滤纸吸干器官表面多余水分，用天平记录各组肿瘤重量并对离体肿瘤进行拍照记录。

由肿瘤体积变化结果（插页ⅪⅦ图 6 - A）可知，随着时间的延长，Cur - Que NPs 组小鼠的肿瘤体积增长最为缓慢，在第 10 天时，与空白组相比，各给药组的肿瘤体积均有减小，其中姜黄素原料药组与槲皮素原料药组平均肿瘤体积分别为（832.99 ± 154.18）mm^3 和（934.44 ± 265.28）mm^3。相较于原料药组，姜黄素 - 槲皮素物理混合组的平均肿瘤体积减小，为（679.84 ± 173.76）mm^3。与其他各组相比，Cur - Que NPs 对肿瘤的抑制效果最为明显，为（439.56 ± 233.97）mm^3（$P < 0.01$），这可能是因为姜黄素和槲皮素的自组装复合纳米粒通过被动靶向聚集到肿瘤组织，增加了姜黄素和槲皮素的释放量，并通过不同作用机制发挥抗肿瘤作用。

通过小鼠的体质量变化对 Cur - Que NPs 的生物安全性进行初步评价。由小鼠的体质量变化结果（插页ⅪⅦ图 6 - B）可知，空白组小鼠的平均体质量逐渐增加，可能是因为小鼠肿瘤体质量逐渐增加。姜黄素原料药组与姜黄素 - 槲皮素物理混合组小鼠的平均体质量先增加后降低，可能是因为肿瘤影响部分小鼠的健康状况。槲皮素原料药组小鼠体质量变化不明显，说明槲皮素对小鼠的健康几乎没有影响[36]。Cur - Que NPs 组小鼠在治疗期间，体质量并没有明显的变化，说明 Cur - Que NPs 具有较好的治疗效果，体现了其生物安全性。

由离体肿瘤的质量与照片结果（插页ⅪⅦ图 6 - C 与 D）可知，与空白组相比，各组的离体肿瘤质量均有所降低，其中 Cur - Que NPs 组的肿瘤质量最小，为（0.42 ± 0.14）g。根据肿瘤质量计算姜黄素原料药组、槲皮素原料组、姜黄素 - 槲皮素物理混合组以及 Cur - Que NPs 组的肿瘤抑制率分别为 29.75%、23.84%、44.50% 和 64.14%。说明 Cur - Que NPs 组具有最好的肿瘤抑制效果。

3 讨论

本研究通过药物自组装技术制备了无载体 Cur - Que NPs，该纳米粒的粒径小且均匀，两种成分以无定型形式存在，冻干再分散性和物理稳定性良好，实现了姜黄素与槲皮素共同递送。通过体外细胞毒性实验与体内药效研究，考察了姜黄素 - 槲皮素复合纳米粒的联合抗肿瘤效果，为天然抗肿瘤药物的联合应用提供了实验依据。

液相沉淀法制备纳米制剂有望实现质量控制、规模化生产以及临床转化[21]。课题组前期实验发现，采用液相沉淀法制备纳米粒时，温度是影响纳米粒径的重要参数之一，一般温度降低，纳米粒的粒径也会相应降低，因此制备 Cur - Que NPs 时，固定温度为 5 ℃。溶剂与反溶剂体积比也是沉淀法制备纳米粒的重要参数，溶剂与反溶剂的比例通过引起体系中过饱和度的变化从而影响纳米粒的粒径。一般来说，当溶剂与反溶剂的比例增加时，纳米粒的粒径会减小，这是因为较高的过饱和度可有效提高成核速率，减小纳米粒的粒径[37]。此外，无载体纳米药物制剂自组装主要是由疏水相互作用、氢键作用、π - π 堆积以及静电相互作用等非共价相互作用驱动的[38]。课题组通过 FTIR 分析发现姜黄素和槲皮素之间存在氢键相互作用，后期可能通过分子动力学（molecular dynamics，MD）模拟预测姜黄素与槲皮素之间的其他分子间相互作用[39]。姜黄素与槲皮素作为疏水分子，由于表面能比较高，因此添加 HPMC 作为纳米制剂的稳定剂[40]。

姜黄素通过干扰癌细胞的细胞周期、促进细胞凋亡、抑制细胞增殖以及抗炎等机制发挥抗癌作用[3,5]。YU S X 等发现，Cur@ ZIF - 8@ HA 通过诱导 G2/M 和 S 期的细胞周期停滞，并诱导 ROS 的大量产生从而引发线粒体功能障碍，最终导致细胞凋亡[41]。槲皮素通过诱导细胞凋亡、干扰细胞周期、调节自噬、抑制细胞的增殖、迁移和侵袭发挥抗癌作用[7]。姜黄素 - 槲皮素自组装纳米递送系统的抗癌机制例如信号转导通路、诱导细胞凋亡的途径、制剂的内吞机制等值得被进一步挖掘[40]。有报道表明，透明质酸与 CD44 受体高度亲和，叶酸受体在多种肿瘤细胞表面过表达，因此，未来考虑将纳米制剂与透明质酸或叶酸偶联，通过主动靶向增加药物在特定的肿瘤组织或细胞器的积累，进一步增强抗肿瘤的效果[41-43]。

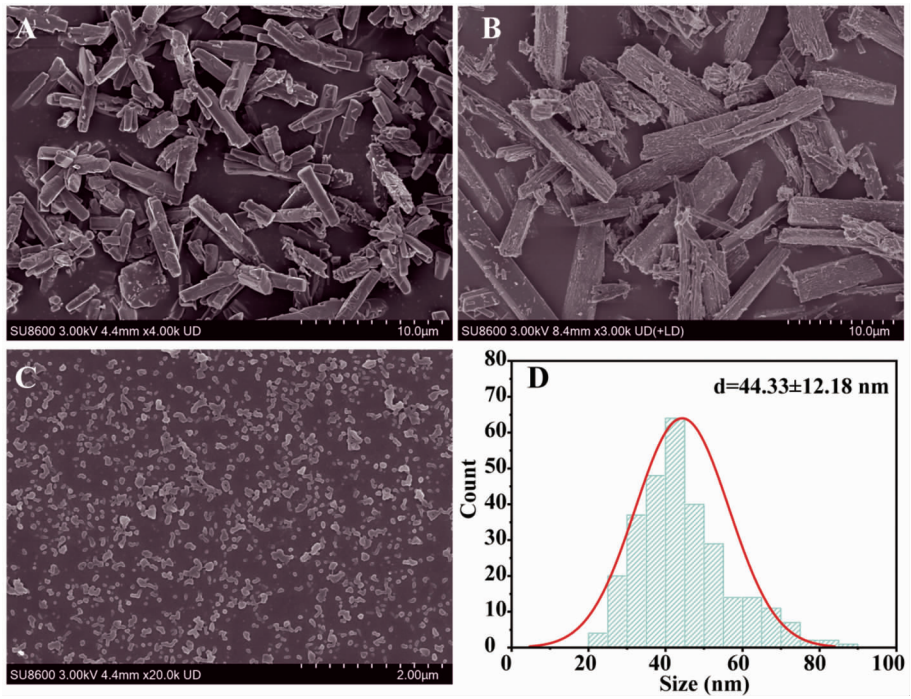
参考文献

[1] CHHIKARA B S, PARANG K. Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis[J]. Chem Biol Lett, 2023, 10(1): 541.
[2] SENAPATI S, MAHANTA A K, KUMAR S, et al. Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance[J]. Sig Transduct Target Ther, 2018, 3: 7.
[3] DA SILVA FELTRIN F, AGNER T, SAYER C, et al. Curcumin encapsulation in functional PLGA nanoparticles: a promising strategy for cancer therapies[J]. Adv Colloid Interface Sci, 2022, 300: 102582.
[4] OBEID M A, ALSAADI M, ALJABALI A A. Recent updates in curcumin delivery[J]. J Liposome Res, 2023, 33(1): 53 - 64.
[5] KARIMI M, GHEYBI F, ZAMANI P, et al. Preparation and characterization of stable nanoliposomal formulations of curcumin with high loading efficacy: *in vitro* and *in vivo* anti - tumor study[J]. Int J Pharm, 2020, 580: 119211.
[6] ZHU J, LI Q, WU Z P, et al. Curcumin for treating breast cancer: a review of molecular mechanisms, combinations with anticancer drugs, and nanosystems[J]. Pharmaceutics, 2024, 16(1): 79.
[7] RAUF A, IMRAN M, KHAN I A, et al. Anticancer potential of quercetin: a comprehensive review[J]. Phytother Res, 2018, 32(11): 2109 - 2130.
[8] YALLAPU M M, KHAN S, MAHER D M, et al. Anti - cancer activity of curcumin loaded nanoparticles in prostate cancer[J]. Biomaterials, 2014, 35(30): 8635 - 8648.
[9] HOMAYOONFAL M, AMINIANFAR A, ASEMI Z, et al. Application of nanoparticles for efficient delivery of quercetin inCancer cells[J]. Curr Med Chem, 2024, 31(9): 1107 - 1141.
[10] EZZATI M, YOUSEFI B, VELAEI K, et al. A review on anti - cancer properties of Quercetin in breast cancer[J]. Life Sci, 2020, 248:

117463.
[11] KUNDUR S, PRAYAG A, SELVAKUMAR P, et al. Synergistic anticancer action of quercetin and curcumin against triple – negative breast cancer cell lines[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(7): 11103 – 11118.
[12] SRIVASTAVA N S, SRIVASTAVA R A K. Curcumin and quercetin synergistically inhibit cancer cell proliferation in multiple cancer cells and modulate Wnt/β – catenin signaling and apoptotic pathways in A375 cells[J]. Phytomedicine, 2019, 52: 117 – 128.
[13] HEGDE M, GIRISA S, BHARATHWAJCHETTY B, et al. Curcumin formulations for better bioavailability: what we learned from clinical trials thus far? [J]. ACS Omega, 2023, 8(12): 10713 – 10746.
[14] MANSOURIZADEH F, ALBERTI D, BITONTO V, et al. Efficient synergistic combination effect of Quercetin with Curcumin on breast cancer cell apoptosis through their loading into Apo ferritin cavity [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2020, 191: 110982.
[15] JIANG S L, FU Y, ZHANG X Y, et al. Research progress of carrier – free antitumor nanoparticles based on phytochemicals[J]. Front Bioeng Biotechnol, 2021, 9: 799806.
[16] 贾志谦,刘忠洲. 液相沉淀法制备纳米粒子的过程特征和原理[J]. 化学工程, 2002(1): 38 – 41.
[17] KARAOSMANOGLU S, ZHOU M J, SHI B Y, et al. Carrier – free nanodrugs for safe and effective cancer treatment[J]. J Control Release, 2021, 329: 805 – 832.
[18] FAN L L, ZHANG B C, XU A X, et al. Carrier – free, pure nanodrug formed by the self – assembly of an anticancer drug for cancer immune therapy [J]. Mol Pharmaceutics, 2018, 15(6): 2466 – 2478.
[19] ZHANG X B, SUN B J, ZUO S Y, et al. Self – assembly of a pure photosensitizer as a versatile theragnostic nanoplatform for imaging – guided antitumor photothermal therapy[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2018, 10(36): 30155 – 30162.
[20] MEI H, CAI S S, HUANG D, et al. Carrier – free nanodrugs with efficient drug delivery and release for cancer therapy: From intrinsic physicochemical properties to external modification[J]. Bioact Mater, 2022, 8: 220 – 240.
[21] FU S W, LI G T, ZANG W L, et al. Pure drug nano – assemblies: a facile carrier – free nanoplatform for efficient cancer therapy[J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 12(1): 92 – 106.
[22] LV Y, LI W Q, LIAO W, et al. Nano – drug delivery systems based on natural products[J]. Int J Nanomed, 2024, 19: 541 – 569.
[23] QIAO L, YANG H S, GAO S J, et al. Research progress on self – assembled nanodrug delivery systems[J]. J Mater Chem B, 2022, 10(12): 1908 – 1922.
[24] REN J, WU H S, LU Z H, et al. pH – driven preparation of pea protein isolate – curcumin nanoparticles effectively enhances antitumor activity[J]. Int J Biol Macromol, 2024, 256: 128383.
[25] LI S F, WU J H, HU T G, et al. Encapsulation of quercetin into zein – ethyl cellulose coaxial nanofibers: Preparation, characterization and its anticancer activity[J]. Int J Biol Macromol, 2023, 248: 125797.
[26] GOMATHI T, STEPHY JOHN J, GINIL MON S, et al. Chitosan/Histidine nanoparticles for controlled curcumin delivery: a potential strategy in anticancer treatment[J]. Inorg Chem Commun, 2024, 164: 112448.
[27] JANGID A K, PATEL K, JAIN P, et al. Carrier – free resveratrol nanoparticles: Formulation development, *in – vitro* anticancer activity, and oral bioavailability evaluation [J]. Mater Lett, 2021, 302: 130340.
[28] KAMAL G, ABDULLAH S, BASINGAB F, et al. Curcumin – betaine solid dispersion for enhancing curcumin dissolution and potentiating pharmacological synergism in gastric cancer cells[J]. J Drug Deliv Sci Technol, 2023, 79: 103951.
[29] RAJAMOHAN R, ASHOKKUMAR S, MURUGAVEL K, et al. Preparation and characterization of a nano – inclusion complex of quercetin with β – cyclodextrin and its potential activity on cancer cells [J]. Micromachines, 2023, 14(7): 1352.
[30] HAN J W, YANG Y, HOU Y J, et al. Insight into formation, synchronized release and stability of co – amorphous curcumin – piperine by integrating experimental – modeling techniques[J]. J Pharm Sci, 2024, 113(7): 1874 – 1884.
[31] 丁欢欢,姜先梅,刘红梅,等. 藤黄酸和雷帕霉素共载脂质体的制备及协同抗肿瘤活性研究[J]. 中草药, 2024, 55(9): 2896 – 2911.
[32] 刘改枝,许杜娟,何孟瑜,等. 薯蓣皂苷元衍生物自组装纳米粒的制备及抗肿瘤活性评价[J]. 中国医院药学杂志, 2024, 44(12): 1429 – 1434.
[33] HOSSEINI S S, EBRAHIMI S O, HAJI GHASEM KASHANI M, et al. Study of quercetin and fisetin synergistic effect on breast cancer and potentially involved signaling pathways[J]. Cell Biol Int, 2023, 47(1): 98 – 109.
[34] LI M, LV L, GUO A J, et al. Copolymeric micelles loading curcumin: preparation, characterization and *in vitro* evaluation[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2018, 18(3): 1585 – 1593.
[35] KIM K R, YOU S J, KIM H J, et al. Theranostic potential of biodegradable polymeric nanoparticles with paclitaxel and curcumin against breast carcinoma [J]. Biomater Sci, 2021, 9(10): 3750 – 3761.
[36] PELLEGRINO M, BEVACQUA E, FRATTARUOLO L, et al. Enhancing the anticancer and anti – inflammatory properties of curcumin in combination with quercetin, for the prevention and treatment of prostate cancer[J]. Biomedicines, 2023, 11(7): 2023.
[37] HAN N, LIU Y, LIU X, et al. The controlled preparation of a carrier – free nanoparticulate formulation composed of curcumin and piperine using high – gravity technology[J]. Pharmaceutics, 2024, 16(6): 808.
[38] AN J L, ZHANG Z Q, ZHANG J R, et al. Research progress in tumor therapy of carrier – free nanodrug[J]. Biomed Pharmacother, 2024, 178: 117258.
[39] SHEN Y N, ZOU Y Q, CHEN X N, et al. Antibacterial self – assembled nanodrugs composed of berberine derivatives and rhamnolipids against Helicobacter pylori [J]. J Control Release, 2020, 328: 575 – 586.
[40] YU J Y, KIM J A, JOUNG H J, et al. Preparation and characterization of curcumin solid dispersion using HPMC[J]. J Food Sci, 2020, 85(11): 3866 – 3873.
[41] YU S X, WANG S Y, XIE Z K, et al. Hyaluronic acid coating on the surface of curcumin – loaded ZIF – 8 nanoparticles for improved breast cancer therapy: an *in vitro* and *in vivo* study[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2021, 203: 111759.
[42] GAYATHRI K, BHASKARAN M, SELVAM C, et al. Nano formulation approaches for curcumin delivery – a review[J]. J Drug Deliv Sci Technol, 2023, 82: 104326.
[43] MAHALUNKAR S, YADAV A S, GORAIN M, et al. Functional design of pH – responsive folate – targeted polymer – coated gold nanoparticles for drug delivery and *in vivo* therapy in breast cancer[J]. Int J Nanomed, 2019, 14: 8285 – 8302.

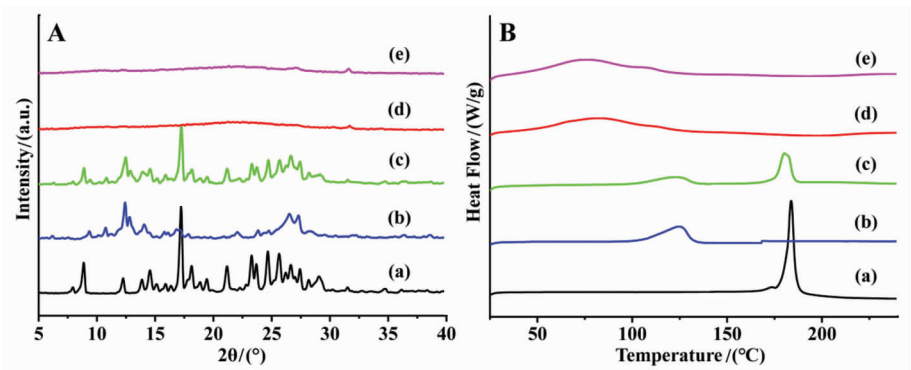
姜黄素－槲皮素无载体复合纳米颗粒用于抗肿瘤的实验研究

（正文见 129－133 页）



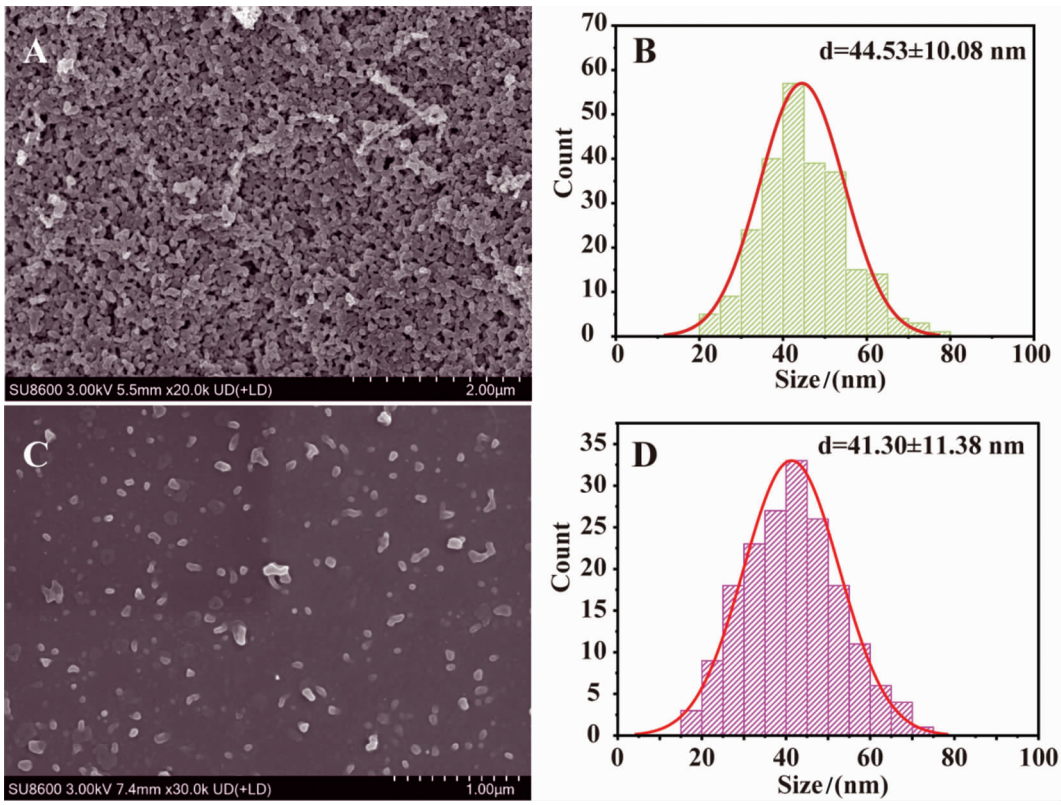
注：姜黄素原料药（A）、槲皮素原料药（B）以及 Cur－Que 纳米复合混悬液（C）的 SEM 图；Cur－Que 纳米复合悬浮液的粒径分布图（D）

图 1　Cur－Que NPs 制备形貌表征



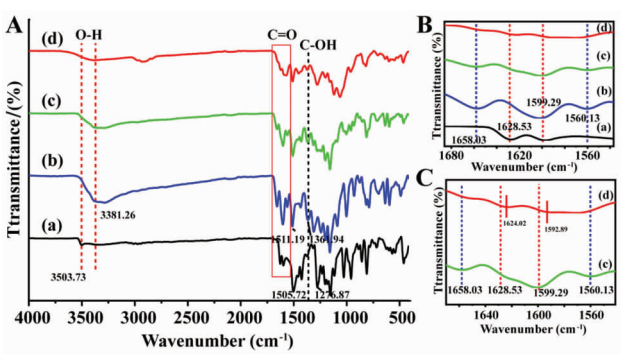
注：姜黄素原料药（a）、槲皮素原料药（b）、姜黄素和槲皮素原料药的物理混合物（c）、Cur－Que NPs（d）和在室温避光条件下储存 180 d 的 Cur－Que NPs（e）的 XRPD 图谱（A）与 DSC 图谱（B）

图 2　Cur－Que NPs 的物相性质分析



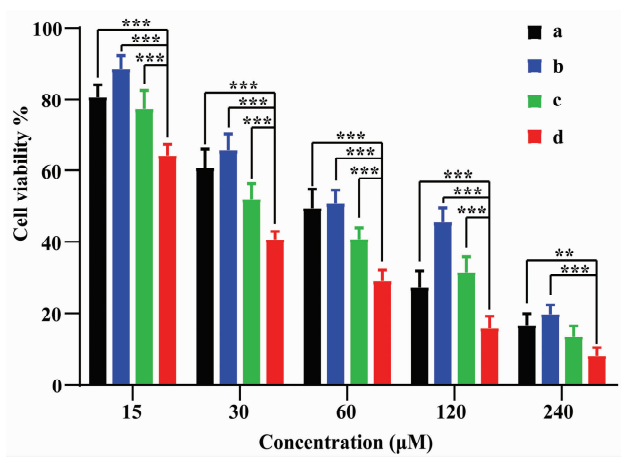
注：经过冻干处理的 Cur－Que NPs 再分散于去离子水中所获得样品的 SEM 图（A）以及粒径分布图（B）；经过冻干处理并在室温避光条件下储存 6 个月的 Cur－Que NPs 再分散于去离子水中获得样品的 SEM 图（C）以及粒径分布图（D）

图 3　Cur－Que NPs 的稳定性



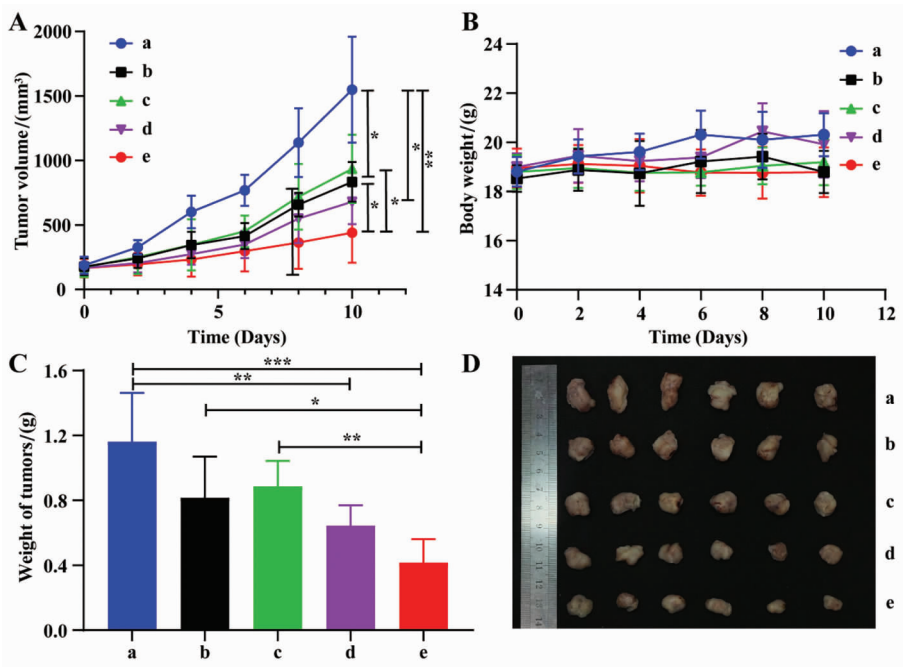
注：（A）姜黄素原料药（a）、槲皮素原料药（b）、姜黄素和槲皮素原料药的物理混合物（c）和 Cur－Que NPs（d）的 FTIR 图谱；（B）姜黄素原料药（a）、槲皮素原料药（b）、姜黄素和槲皮素原料药的物理混合物（c）和 Cur－Que NPs（d）的局部放大 FTIR 图谱；（C）姜黄素和槲皮素原料药的物理混合物（c）和 Cur－Que NPs（d）的局部放大 FTIR 图谱

图 4　Cur－Que NPs 的组装机制



注：＊＊$P<0.01$，＊＊＊$P<0.001$。实验组别：姜黄素原料药组（a）、槲皮素原料药组（b）、姜黄素－槲皮素物理混合组（c）、Cur－Que NPs 组（d）。

图 5　不同处理组对 4T1 细胞的细胞毒性（$n=6$）

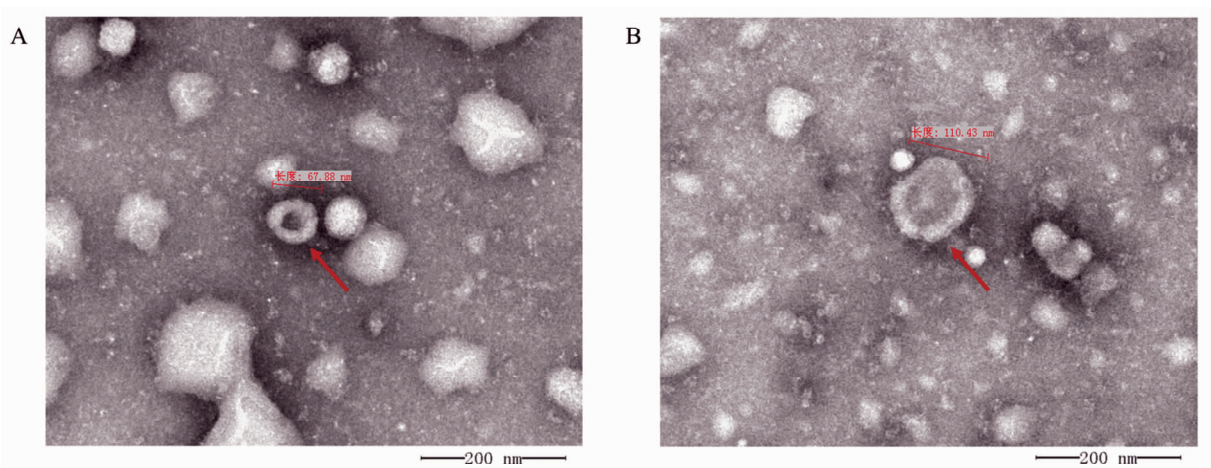


注：(A)4T1 荷瘤小鼠肿瘤体积变化曲线($n=6$)，$*P<0.05$，$**P<0.01$；(B)荷瘤小鼠体质量变化曲线($n=6$)；(C)荷瘤小鼠肿瘤质量测量结果($n=6$)，$*P<0.05$，$**P<0.01$，$***P<0.001$；(D)荷瘤小鼠离体肿瘤实物($n=6$)。实验组别：空白组(a)、姜黄素原料药组(b)、槲皮素原料药组(c)、姜黄素－槲皮素物理混合组(d)、Cur－Que NPs 组(e)

图 6　体内药效学

负载连翘酯苷 A 的 HucMSC 外泌体的制备及其对 ALI 的作用机制

(正文见 144－150 页)



注：A. HucMSC－Exos；B. FTA－Exos。

图 2　HucMSC－Exos 和 FTA－Exos 的形态