

# 一种新型的阳离子型姜黄素纳米粒对 肝细胞癌增殖的影响<sup>\*</sup>

张阳德<sup>1,2 \*\*\*</sup> 段菁华<sup>1,2 \*\*</sup> 陈玉祥<sup>1,2</sup> 廖明媚<sup>1,2</sup> 黄伯云<sup>3</sup> 赵劲风<sup>1,2 \*\*\*</sup>

(1 中南大学卫生部肝胆肠外科研究中心 长沙 410078 2 中南大学卫生部纳米生物技术重点实验室 长沙 410078)

(3 中南大学粉末冶金国家重点实验室 长沙 410083)

**摘要** 姜黄药用的主要有效成分是姜黄素,曾被认为是理想的抗癌化学治疗药物之一,然而,姜黄素在水中的溶解度低,体内吸收少,生物利用度低,极大地限制了它的应用。采用乳化聚合的方法,成功地制备了粒径在 250nm 左右的表面带正电荷的聚氰基丙烯酸正丁酯包载的姜黄素纳米粒,该纳米姜黄素仍然保留了姜黄素本身的生物活性,可抑制人肝癌细胞株 HepG2 细胞的生长,阻滞细胞周期于 G<sub>2</sub>/M 期,对 HepG2 细胞有抗增殖作用,能诱导细胞凋亡,下调在肿瘤血管生长中起重要作用的血管内皮生长因子和调控血管内皮生长因子的环氧合酶-2 的表达。

**关键词** 纳米姜黄素 HepG2 细胞 细胞周期 凋亡 血管生成

**中图分类号** Q819

姜黄素(curcumin)是从姜科姜黄属植物姜黄根茎中提取的一种酚性色素,是姜黄的主要成分。大量的研究报道姜黄素有许多重要的生物学作用,包括抗炎、抗氧化、抑制肿瘤的发生发展、广谱的抗微生物活性、调节机体免疫反应、防治老年痴呆和治疗囊性纤维化等<sup>[1-2]</sup>,具有多种药理作用和良好的临床应用潜力。但是姜黄素几乎不溶于水,体内吸收差极不稳定易降解,因此限制了其应用<sup>[3]</sup>。

近年来的研究表明,多种亚微粒系统,尤其是纳米技术的兴起,纳米粒和纳米囊作为药物载体,可以增加疏水性药物的溶解度,促进胃肠道吸收。

聚氰基丙烯酸酯纳米颗粒具有高吸附能力、释药持续性、低毒性、优良的生物降解性能和生物相容性等优点,使得它非常适宜作为药物传输载体将药物传送到身体的各个组织器官<sup>[4]</sup>,同时也适应了临床对制剂高效、低毒、安全、方便的要求。因此,聚氰基丙烯酸酯纳米颗粒被广泛应用为纳米药物载体以及被动靶向释药

制剂<sup>[5-6]</sup>。

本文采用乳化聚合的方法,选用了具有高吸附能力、低毒性、优良的生物降解性能和生物相容性等优点的聚氰基丙烯酸正丁酯(polybutyl cyanoacrylate, PBCA)作为药物递送的载体材料,在添加壳聚糖作为稳定剂的基础上成功地制备出了 200nm 左右的带正电荷的载姜黄素的聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒(纳米姜黄素)。测定了纳米粒的平均粒径及表面电荷(Zeta 电位),并考察了纳米姜黄素对人肝癌细胞株 HepG2 凋亡的干预作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

氰基丙烯酸正丁酯(butyl cyanoacrylate, BCA)单体购自广州白云医用胶有限公司,壳聚糖(脱乙酰度 ≥ 85%)购自 Sigma 公司,分析纯的姜黄素购自国药集团上海试剂公司。人肝癌细胞株 HepG2 细胞和正常肝细胞 L02 细胞由本实验室提供。抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)兔多克隆抗体和抗环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)兔多克隆抗体均购自武汉博士德生物工程有限公司。抗 β-actin 兔多克隆抗体购自美国 Abgent 公司。二抗辣根过氧化

收稿日期:2010-08-31 修回日期:2010-11-05

<sup>\*</sup> 国家“十五”“863”计划(2005AA473254)、国家“十一五”“863”计划(2007AA021809)、2009 年湖南省研究生科研创新项目(CX2009B052)资助项目

<sup>\*\*</sup> 并列第一作者

<sup>\*\*\*</sup> 通讯作者,电子信箱:ZYD@2118. CN, zhaojinfeng@hotmail. com

物酶(HRP)标记的驴抗兔 IgG 购自美国 Santa Cruz 公司。化学发光(ECL)底物购自美国 Pierce 公司。碘化丙锭(propidium iodide,PI)购自北京鼎国生物技术有限责任公司。Hoechst 33258 购自美国 Acros 公司。

## 1.2 方法

1.2.1 纳米粒的制备 采用乳化聚合法<sup>[7]</sup>,姜黄素先用无水乙醇配成 1mg/ml 的溶液,0.01g 的壳聚糖溶于 pH 为 1.5 的 10ml 盐酸水溶液中[该溶液中水:无水乙醇=1:1(V/V)],加入一定量的姜黄素乙醇溶液至溶液澄清,在搅拌条件下向上述混合溶液中滴加 BCA (100 $\mu$ l)后,继续搅拌 6 h;用 0.5mol/L NaOH 中和 pH 至中性,该黄色乳浊液用 16000r/min 离心 30min,即得黄色的载药纳米粒沉降物,用蒸馏水洗涤 3 次,干燥备用。

1.2.2 纳米粒的结构表征 (1)粒径和电位测定 吸取少量纳米粒混悬液滴至铺有碳膜的铜网上,滴加 2%、pH 6.2 的磷钨酸溶液负染,自然晾干后,于透射电子显微镜(JEOL 1230)下观察纳米粒形态和粒径。另取纳米粒混悬液适量,加双蒸水稀释后用 Zetasizer 1000 HS<sub>A</sub> 粒度分析仪测定平均粒径和分散度。再取纳米粒混悬液适量,加 10 mmol/L NaCl 稀释后用 Zetasizer Nano system 电位分析仪测定 Zeta 电位。

(2)载药量和包封率的测定 将制得的姜黄素纳米混悬液 16000r/min 离心 30min,水洗 4 次后,收集上清液,用日本岛津 LC10AT 高效液相色谱仪(HPLC)测定其中姜黄素的含量。色谱条件为:采用大连依利特的 Hypersil BDS C18 (4.6mm $\times$ 250 mm, 5 $\mu$ m)色谱柱,流动相为甲醇-5%醋酸(70:30),流速为 1.0 ml/min,柱温 30 $^{\circ}$ C,紫外检测器,检测波长为 420nm。按照以下公式计算包封率和载药量:

包封率 = (姜黄素的总量 - 上清液中姜黄素的含量) / 姜黄素的总量

载药量 = (姜黄素的总量 - 游离姜黄素的量) / 姜黄素纳米粒的总量

1.2.3 细胞培养及形态学观察 人肝癌细胞株 HepG2 细胞用 10% FBS(fetal bovine serum)、100U/ml 青霉素-链霉素的 DMEM (Dulbecco's modification of eagle's medium)培养基于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的二氧化碳培养箱常规培养,取对数生长期的细胞用于实验。在加入 30 $\mu$ g/mL 姜黄素稀释液(用二甲亚砜溶解,且细胞中的 DMSO 终浓度 <0.1%)与姜黄素纳米粒的混悬液(用灭菌水稀释),培养 4h 之后用预冷的 1

$\times$  PBS 洗涤 3 次,与 10 $\mu$ g/ml 的 Hoechst 33258 室温孵育 1min,1 $\times$  PBS 洗涤 3 次后在荧光显微镜(Leica DM LB2,德国莱卡公司)下观察其对 HepG2 细胞形态的影响。

1.2.4 MTT 法检测细胞活力 HepG2 细胞悬液和 L02 细胞悬液按每孔 10<sup>4</sup> 个细胞接种于 96 孔板中,每孔体积 200 $\mu$ l。按实验安排加入不同剂量(5,10,20,30,40,50 $\mu$ g/ml)姜黄素 DMSO 溶液、姜黄素纳米粒水溶液和空白纳米粒,常规条件培养 24h,每个剂量组设 6 个复孔。作用结束后吸弃培养基,细胞用 PBS 洗 3 次,每孔加入 200 $\mu$ l 新鲜培养基及 20 $\mu$ l MTT 溶液(5mg/ml),继续孵育 4 h 后终止培养。小心吸弃孔内培养上清,每孔再加入 150 $\mu$ l 二甲亚砜,振荡 10 min,使结晶充分溶解。自动酶标仪(multiskan spectrum,美国 Electro Thermo 公司)上用 570nm 波长测定各孔光吸收值,用试验孔与对照孔的吸光度百分比值表示细胞活力。

1.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡及细胞周期 根据相关文献报道及预实验结果,选取 20、40 $\mu$ g/ml 浓度姜黄素进行凋亡检测实验。姜黄素先溶解于 DMSO 中,再用 DMEM 培养基稀释到所需浓度,样品中 DMSO 终浓度 <0.1%。取对数生长期的 HepG2 细胞,培养 24h 后去上清,胰酶消化,PBS 洗涤细胞 2 次,离心 10min,去上清。预冷的 70% 乙醇 4 $^{\circ}$ C 固定过夜,碘化丙锭避光染色 30min,于流式细胞仪(FACS Calibur,美国 BD 公司)上机检测。

1.2.6 Western blot 将 HepG2 细胞接种到 100mm 培养皿中,培养过夜后,分别加入 20 $\mu$ g/ml 的空白聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒、姜黄素 DMSO 溶液以及姜黄素纳米粒处理 48h,之后用 1 $\times$  PBS 洗涤细胞 3 次,用细胞刮子收集细胞,加入预冷的 EBC 裂解液(50mmol/L Tris pH7.5,150mmol/L NaCl,0.5% Nonidet P-40 及蛋白酶抑制剂混合物)超声破碎,即得所提的全细胞蛋白,测定蛋白浓度,-20 $^{\circ}$ C 保存。取 100 $\mu$ g 蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离,转移到硝酸纤维素膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 2h,加入一抗 VEGF(1:200)和 COX-2(1:200)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,之后用 1 $\times$  PBST 洗 3 次,每次 5min。再加入 HRP 标记的二抗(1:5000)室温振摇孵育 1h,用 1 $\times$  PBST 洗涤 4 次除去未结合的二抗,用 ECL 试剂盒曝光显影。内参选用  $\beta$ -actin。

1.2.7 统计学分析 实验数据均以均值 $\pm$ 标准差表示。细胞毒性评估应用 SPSS 17.0 软件,利用单向方差分析(one-way analysis of variance,ANOVA)法进行比

较,以  $P < 0.05$  为差异有显著性意义,  $P < 0.01$  差异有非常显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 纳米粒的性质

采用乳化聚合的方法在室温条件下可制备出载姜黄素的聚氰基丙烯酸正丁酯纳米颗粒,激光粒度分析仪测得姜黄素纳米粒的粒径约为 250nm 左右(图 1a),图 1b 中的透射电子显微镜下观察纳米粒多呈球形,而直径也在 250nm 左右。表面电位的结果显示,在 10mmol/L NaCl 溶液的介质中该纳米粒的表面带有较多的正电荷。空白的聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒的表面电位为 +44.5 mV,姜黄素纳米粒的电位是 +37.3 mV。HPLC 测得纳米姜黄素的载药量为 1.088%,包封率为 98.75%。

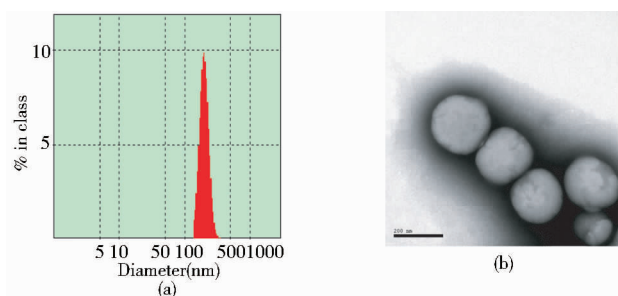


图 1 纳米姜黄素的粒径分布及透射电子显微镜照片

Fig. 1 The size distribution with dynamic light scattering (a) and the transmission electron microscopy of nanocurcumin (b)

### 2.2 对 HepG2 细胞的生长抑制作用

从图 2 的 MTT 实验结果得知,对照组姜黄素以及纳米姜黄素能明显地抑制 HepG2 细胞的增殖,且随着浓度的增大,抑制作用显著增强,而空白的聚氰基丙烯酸正丁酯纳米粒 (PBCA-NPs) 在同样的浓度范围内则对人肝癌 HepG2 细胞无杀伤作用。游离姜黄素的  $IC_{50}$  为 15  $\mu\text{g/ml}$ ,纳米姜黄素的  $IC_{50}$  则为 25  $\mu\text{g/ml}$  (以纳米粒浓度计算),因为该纳米粒的载药量低,所以形成纳米姜黄素后只需要极少量的姜黄素就可以起到杀伤肝癌细胞的作用,如以游离姜黄素的浓度来计算的话,纳米姜黄素的  $IC_{50}$  值明显比游离姜黄素的  $IC_{50}$  低很多,原因可能在于在用乳化聚合的方法形成纳米姜黄素的时候,纳米粒中包载了多个姜黄素分子的缘故。

不同浓度 (25、50、100  $\mu\text{g/ml}$ ) 的纳米姜黄素 (以纳米粒浓度计算) 分别作用于正常肝细胞与肝癌细胞,结

果发现 25、50、100  $\mu\text{g/ml}$  的纳米姜黄素对正常肝细胞 L02 的抑制率分别为 11.42%、41.95%、86%,而对肝癌细胞 HepG2 的抑制率为 49.3%、86.3%、94.3%,说明该纳米姜黄素在对正常肝细胞杀伤不强的情况下能有效地抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖。另外,研究发现 25  $\mu\text{g/ml}$  和 50  $\mu\text{g/ml}$  的纳米姜黄素 (以纳米粒的浓度计算) 对正常肝细胞 L02 的杀伤 (抑制率分别为 11.42% 和 41.95%) 比 25  $\mu\text{g/ml}$  和 50  $\mu\text{g/ml}$  的游离姜黄素对 L02 的杀伤 (抑制率分别为 67.5% 和 87.8%) 少很多,表明这种新型的纳米姜黄素在有效抑制肝癌细胞增殖的同时减少了姜黄素本身对正常肝细胞的伤害。

正常 HepG2 细胞和加空白纳米粒的 HepG2 细胞仍能贴壁生长,分布均匀,细胞接触紧密,生长迅速,胞浆丰满。加入纳米姜黄素后,细胞增殖变慢,逐渐变圆,细胞间隙增大,附壁疏松,脱壁,细胞周围碎片增多。经 Hoechst 33258 染色后,荧光显微镜下观察经姜黄素处理的细胞 (图 3c) 和经纳米姜黄素处理的 HepG2 细胞 (图 3d) 均有很明显凋亡,细胞核呈波纹状,体积缩小,部分染色质出现浓缩状态,细胞核的染色质高度凝聚,裂解为碎块。

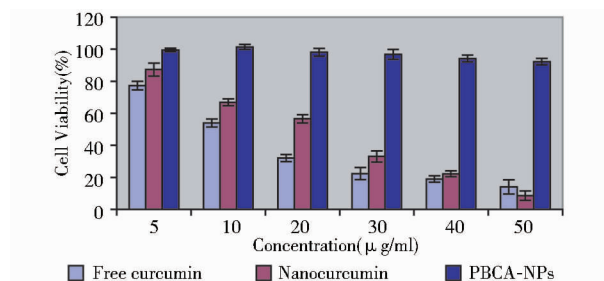


图 2 不同浓度的姜黄素,纳米姜黄素和空纳米粒对 HepG2 细胞的毒性实验

Fig. 2 Cytotoxicity of curcumin, nanocurcumin and empty PBCA-NPs analyzed by MTT assay ( $n = 6$ )

Columns, mean; bars, SD,  $p < 0.001$  as evaluated by one-way ANOVA using SPSS 17.0 version

### 2.3 对 HepG2 细胞周期的影响

正常生长的 HepG2 细胞 24h 后测得  $G_0/G_1$  期、S 期、 $G_2/M$  期的比例分别为 56.5%、32.6%、10.9%,经 100  $\mu\text{g/ml}$  的未载药的聚氰基丙烯酸正丁酯纳米处理 HepG2 细胞 24h 后,流式细胞仪测得  $G_0/G_1$  期、S 期、 $G_2/M$  期的比例分别为 62.1%、29.1%、8.84%,与阴性对照组相比无较明显的显著性差异。而经 40  $\mu\text{g/ml}$  游

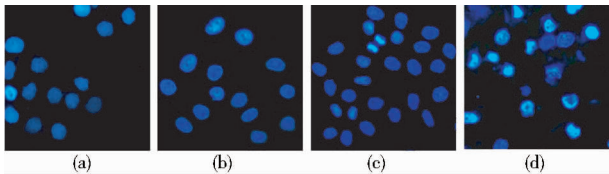


图3 姜黄素与纳米姜黄素对 HepG2 细胞形态的影响

Fig.3 Cell apoptosis observed by Hoechst 33258 staining (200 ×)

(a) Control (b) Empty PBCA-NPs

(c) Free curcumin (d) Nanocurcumin

离姜黄素以及 40μg/ml 纳米姜黄素(以纳米粒的浓度计算)与 HepG2 细胞孵育 24h 后,在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期、S 期细胞比例均有所下降,G<sub>2</sub>/M 期细胞分布明显增多,呈现 G<sub>2</sub>/M 期阻滞,见表 1。

表 1 不同物质对 HepG2 细胞周期的分布变化

Table 1 The cell cycle's distribution change of HepG2 cells caused by different substances

组 别	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> (%)	S (%)	G <sub>2</sub> /M (%)
对照组	56.5	32.6	10.9
空白纳米粒 100μg/ml	62.1	29.1	8.84
姜黄素 40μg/ml	52.1	28.8	19.1
纳米姜黄素 40μg/ml	49.4	28.5	22.1

2.4 纳米姜黄素能有效地抑制 HepG2 细胞中 COX-2 和 VEGF 的表达

环氧合酶(cyclooxygenase, COX)是花生四烯酸合成前列腺素的限速酶,多数肿瘤组织及体外培养的肿瘤细胞株中 COX-2 呈高表达状态<sup>[8-9]</sup>,另一方面,血管内皮生长因子(VEGF)在肿瘤生长与转移过程中起重要作用,肿瘤组织内 VEGF 表达增高<sup>[10]</sup>。因此有学者推测 COX-2 影响 VEGF 的分泌与合成,从而影响肿瘤的生长与转移。

近年来,植物化学和药理学研究发现,姜黄素具有抗肿瘤和抗血管生成等作用,抗血管生成表现为抑制血管生成的几种标志物,其中包括 COX-2 和 VEGF。

Western blot 结果显示,纳米姜黄素 20μg/ml(以纳米粒的浓度计算)处理 HepG2 细胞 48h 后能有效地下调 COX-2 和 VEGF 的表达,这与姜黄素本身的抗血管生成的作用也是相符合的(图 4)。说明采用这种乳化聚合的方法形成的带正电荷的聚氰基丙烯酸正丁酯的姜黄素纳米粒很好地保留了姜黄素的生物活性。

3 讨 论

姜黄隶属姜科,是从姜科姜黄属植物姜黄、莪术、

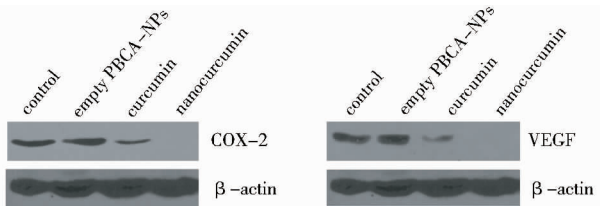


图4 Western blot 检测姜黄素及纳米姜黄素诱导的 COX-2 和 VEGF 下调

Fig. 4 Effect of curcumin and nanocurcumin on cyclooxygenase-2 and VEGF levels as assessed by Western blot analysis

郁金等的根茎中提取的一种天然有效成分。姜黄药用的主要有效成分是姜黄素,近年来的研究发现,姜黄素具有抗肿瘤作用和抗血管生成等作用,其抗肿瘤作用包括对多种肿瘤细胞的体外生长抑制和诱导凋亡以及在体内抑制肿瘤发生的能力<sup>[11]</sup>;抗血管生成作用包括体外抑制血管内皮细胞增殖和体内抑制毛细血管生成和增长<sup>[12]</sup>。正是因为其抗肿瘤和抗血管生成作用,以及低分子量、无毒等特点,姜黄素曾被认为是理想的抗癌化学治疗药物之一。然而,进一步的研究发现,姜黄素在水中的溶解度低,在体内的抗肿瘤活性偏低、体内吸收少、代谢过快,生物利用度低,极大地限制了它的应用。但是,姜黄素确切的生物活性、相对简单的分子结构,仍不失为一种结构修饰及抗肿瘤药物筛选的优秀的前导化合物<sup>[13]</sup>。目前,以保留其药物安全性、增加抗肿瘤活性和水溶性为目的的研究吸引了很多的药物研发机构和公司<sup>[14-15]</sup>。

纳米乳剂对胃肠道淋巴组织具有良好的亲和性,能使更多的药物由淋巴途径进入血液,这些药物可避开肠、肝的生物转化,从而有效提高生物活性;同时由于表面张力较低而易于通过胃肠壁的水化层,使药物能直接和胃肠上皮细胞接触,促进药物的吸收<sup>[16]</sup>。目前药学中用作药物载体的材料很多,包括脂质体、多糖类、高分子聚合物等。聚氰基丙烯酸烷酯(Poly alkylcyanocraylate, PACA)由于可生物降解及其在外科临床应用中的安全性而成为应用较早也较成熟且具有前景的纳米材料<sup>[4,6]</sup>。经过近 30 年的发展,证实聚氰基丙烯酸烷酯纳米粒(PACA nanoparticles, PACA-NPs)较其它纳米载体有较好的被动肝靶向性、制剂的稳定性等诸多优点,而且证实 PACA-NPs 是目前少数可通过血脑屏障(BBB)的纳米粒之一。由于 PACA 在体内的降解速度与烷链的长度成反比,细胞毒性有随链加长

而减小的趋势<sup>[17]</sup>,故对聚氰基丙烯酸正丁酯(PBCA)的研究较多。

本研究以乳化聚合的方法,利用纳米乳液的优良特性,成功地制备了载姜黄素的聚氰基丙烯酸正丁酯的阳离子纳米粒,以人肝癌细胞株 HepG2 细胞为模型,通过考察纳米姜黄素对 HepG2 细胞的凋亡及细胞周期分布的影响,以及对促进内皮细胞分裂,增加血管通透性的血管内皮细胞生成因子(VEGF)和环氧合酶-2 在 HepG2 细胞中的表达,结果发现聚氰基丙烯酸正丁酯的纳米姜黄素能有效抑制 HepG2 细胞生长,诱导其凋亡,并能阻滞细胞于 G<sub>2</sub>/M 期,同时可以高效地抑制影响血管生成的 VEGF 和 COX-2,表明采用该方法制备的纳米姜黄素可降低肿瘤的发生,抑制肿瘤细胞增殖并诱导细胞凋亡,仍然保留着姜黄素的生物活性,具有明显的遏制肿瘤发生发展的功效。

### 参考文献

- [ 1 ] Guo L Y, Cai X F, Lee J J, et al. Comparison of suppressive effects of demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin on expressions of inflammatory mediators *in vitro* and *in vivo*. Archives of Pharmacal Research, 2008, 31(4): 490-496.
- [ 2 ] Kunnumakkara A B, Anand P, Aggarwal B B. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. Cancer Letters, 2008, 269(2): 199-225.
- [ 3 ] Anand P, Kunnumakkara A B, Newman R A, et al. Bioavailability of curcumin: problems and promises. Mol Pharm, 2007, 4(6): 807-818.
- [ 4 ] Couvreur P, Dubernet C, Puisieux F. Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. Eur J Pharm Biopharm, 1995, 41(1): 2-13.
- [ 5 ] Huang C Y, Chen C M, Lee Y D. Synthesis of high loading and encapsulation efficient paclitaxel-loaded poly ( *n*-butyl cyanoacrylate ) nanoparticles via miniemulsion. Int J Pharm, 2007, 338(1-2): 267-275.
- [ 6 ] Ambruosi A, Yamamoto H, Kreuter J. Body distribution of polysorbate-80 and doxorubicin-loaded [ 14C ] poly ( butyl cyanoacrylate ) nanoparticles after i. v. administration in rats. J Drug Targeting, 2005, 13(10): 535-542.
- [ 7 ] Lescure F, Zimmer C, Roy D, et al. Optimization of polyalkylcyanoacrylate nanoparticle preparation: influence of sulfur dioxide and pH on nanoparticle characteristics. J Colloid and Interface Science, 1992, 154(1): 77-86.
- [ 8 ] Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric adenomas and adenocarcinomas. J Surg Oncol, 2001, 76(1): 26-30.
- [ 9 ] Williams C S, Tsujii M, Reese J, et al. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. J Clin Invest, 2000, 105(11): 1589-1594.
- [ 10 ] Schmitt M, Horbach A, Kubitz R, et al. Disruption of hepatocellular tight junctions by vascular endothelial growth factor (VEGF): a novel mechanism for tumor invasion. J Hepatol, 2004, 41(2): 274-283.
- [ 11 ] Kawamori T, Lubet R, Steele V E, et al. Chemopreventive effect of curcumin, a naturally occurring anti-inflammatory agent, during the promotion/progression stages of colon cancer. Cancer Res, 1999, 59(3): 597-601.
- [ 12 ] Aggarwa B B, Kumar A, Bharti A C, et al. Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. Anticancer Res, 2003, 23: 363-398.
- [ 13 ] Chen W F, Deng S L, Zhou B, et al. Curcumin and its analogues as potent inhibitors of low density lipoprotein oxidation: H-atom abstraction from the phenolic groups and possible involvement of the 4-hydroxy-3-methoxyphenyl groups. Free Radical Biology and Medicine, 2006, 40(3): 526-535.
- [ 14 ] Nurfina A N, Reksahadiprodjo M S, Timmerman H, et al. Synthesis of some symmetrical curcumin derivatives and their anti-inflammatory activity. Eur J Med Chem, 1997, 32(4): 321-328.
- [ 15 ] 梁广,田吉来,邵丽丽,等. 姜黄素的构效关系及以其为先导物的抗肿瘤化合物研究进展. 化学通报, 2008, 71(2): 110-117.  
Liang G, Tian J L, Shao L L, et al. Chemistry, 2008, 71(2): 110-117.
- [ 16 ] 张正全, 陆彬. 微乳给药系统研究概况. 中国医药工业杂志, 2001, 32(3): 139-142.  
Zhang Z Q, Lu B. Chinese J Pharmaceuticals, 2001, 32(3): 139-142.
- [ 17 ] 胡俊, 刘玉玲. 载药纳米粒的研究进展. 中国医药工业杂志, 2004, 35(5): 310-314.  
Hu J, Liu Y L. Chinese J Pharmaceuticals, 2004, 35(5): 310-314.

## Antiproliferative Effect of a Novel Cationic Nanocurcumin on Human Hepatocellular Carcinoma of HepG2 Cells

ZHANG Yang-de<sup>1,2</sup> DUAN Jing-hua<sup>1,2</sup> CHEN Yu-xiang<sup>1,2</sup> LIAO Ming-mei<sup>1,2</sup>  
HUANG Bo-yun<sup>3</sup> ZHAO Jin-feng<sup>1,2</sup>

(1 National Hepatobiliary and Enteric Surgery Research Center, Ministry of Public Health, Central South University, Changsha 410078, China)

(2 National Key Laboratory of Nanobiological Technology, Ministry of Public Health, Central South University, Changsha 410078, China)

(3 State Key Laboratory for Power Metallurgy, Central South University, Changsha 410083, China)

**Abstract** Curcumin, obtained from the rhizomes of *Curcuma longa* L., Zingiberaceae (turmeric), are the most widely used phytoconstituent in food industry and recently for its therapeutic activity. It has very wide spectrum of therapeutic use like in inflammation, psoriasis and various tumors. But its highly lipophilic nature and very poor bioavailability hampers its therapeutic usefulness. The synthesized cationic poly (butyl) cyanoacrylate (PBCA) nanoparticles are coated with chitosan encapsulated formulation of curcumin-nanocurcumin. The particle size and zeta potential of prepared nanocurcumin was about 250nm and + 37.3 mV. The TEM study revealed the spherical nature of the prepared nanoparticles along with confirmation of particle size. MTT was used to assay the biologic activities of nanocurcumin and its anti-proliferative effect. Human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells were treated with different concentration of nanocurcumin, curcumin and empty PBCA nanoparticles for 24h. MTT test showed that nanocurcumin was cytotoxic to HepG2 cells, the number of the apoptosis cell line increased. The inhibitory effect of nanocurcumin on cell growth was in a dose-dependent manner. Cell apoptosis percentage was gradually increased along with nanocurcumin concentration rising. The apoptosis rate for 5, 10, 20, 30, 40 and 50  $\mu\text{g/ml}$  is about 13.65%, 33.11%, 43.45%, 67.93%, 77.79% and 91.5% respectively. It shows obvious statistical difference against normal HepG2 cells. While the empty PBCA nanoparticles exhibit a low cytotoxicity to HepG2 cells. The morphologic alteration of HepG2 cells after treatment of nanocurcumin was observed under fluorescent microscope. When treated with nanocurcumin for 4h or longer time at 30  $\mu\text{g/ml}$ , HepG2 cells turned to circle, fell down from wall, and proliferated slowly. According to flow cytometry, after treatment with nanocurcumin, HepG2 cells were observed to block cell cycle in G2/M phase. Nanocurcumin has been shown to inhibit angiogenic biomarkers, vascular endothelial growth factor (VEGF) and cyclooxygenase-2 (COX-2) expression. Nanocurcumin's mechanisms of action on liver cancer cells mirror that of free curcumin. Therefore, this kind of nanocurcumin could be used as a candidate for hepatocellular carcinoma (HCC) in the future. Nanocurcumin also provides an opportunity to expand the clinical application of this efficient agent by enabling ready aqueous dispersion. Future studies utilizing nanocurcumin are warranted in pre-clinical *in vivo* models of cancer and other diseases.

**Key words** Nanocurcumin HepG2 cells Cell cycle Apoptosis Angiogenesis