

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.09.004

文章编号: 1005-8982(2016)09-0016-07

论著

氟尿嘧啶联合姜黄素纳米剂型抑制肝癌细胞的研究*

董伟,刘福晨,倪俊声,李鹏鹏,郭兴刚,刘辉

(第二军医大学东方肝胆外科医院 肝外三科,上海 200438)

摘要:目的 探究纳米层状双氢氧化物(LDH)共载氟尿嘧啶(Fu)姜黄素(Cur)混合剂型对肝癌细胞的抑制作用。**方法** 通过共沉淀法合成纳米 LDH 混合剂型,并对其进行详细表征,如电镜(TEM)、X 射线衍射(XRD)及动态光散射技术(DLS)检测,细胞计数试剂盒(CCK8)测定 Fu 组、Fu+Cur 组及纳米剂型组对 7721、Hep G2 和 LM3 细胞的增殖抑制作用,同时凋亡试剂盒检测各组对 7721 细胞的凋亡效应,Western blot 检测各组对细胞抗凋亡相关基因 Bcl-2 蛋白的表达及下游 Caspase 的活化情况。**结果** 合成的纳米 LDH 混合剂型具有较好的均一性,DLS 检测提示其粒径约为 400nm,XRD 提示 Fu 及 Cur 通过水平方式插入 LDH 层间;CCK8 结果提示,相对于单纯的 Fu 组、Fu+Cur 组和 LDH-Fu 组,LDH-Fu-Cur 组对 LM3、Hep G2 和 7721 细胞具有更强的增殖抑制作用 ($P<0.05$)。相对于单纯的 Fu 组、Fu+Cur 组和 LDH-Fu 组,LDH-Fu-Cur 组对 LM3、Hep G2 和 7721 细胞具有更强的促凋亡效应作用 ($P<0.05$), $35\mu\text{g/ml}$ 浓度的 Fu 纳米混合剂型组死亡率高达 $(87.0\pm 4.7)\%$,而单纯 Fu 仅为 $(23.0\pm 2.3)\%$;Western blot 检测结果显示,纳米混合剂型能够下调 7721 细胞 Bcl-2 水平。**结论** 纳米 LDH 混合剂型具有良好的抗肿瘤效应,其机制可能为下调肿瘤抗凋亡基因 Bcl-2 从而引起下游 Caspase 活化。

关键词: 层状双氢氧化物;肝细胞癌;氟尿嘧啶;姜黄素;细胞凋亡

中图分类号: R735.7

文献标识码: A

Co-delivery of fluorouracil and curcumin by nano-layered double hydroxide for inhibition of hepatocellular carcinoma cells *in vitro**

Wei Dong, Fu-chen Liu, Jun-sheng Ni, Peng-peng Li, Xing-gang Guo, Hui Liu
(The Third Department of Hepatic Surgery, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

Abstract: Objective To evaluate the effects of fluorouracil and curcumin co-loaded nano-layered double hydroxide (NLDH) on proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma cell lines. **Methods** NLDH was synthesized by co-precipitation method. Detailed characterizations of NLDH such as its morphology, structure and particle size were performed by electron microscopy, X-ray diffraction (XRD) and dynamic light scattering technique (DLS). The function of pure fluorouracil, fluorouracil and curcumin, fluorouracil loaded NLDH (LDH-Fu), fluorouracil and curcumin co-loaded NLDH (LDH-Fu-Cur) on cell viability of 7721, LM3 and Hep G2 cell lines was measured by CCK-8 kit. Meanwhile, apoptosis kit was applied to detect apoptosis of 7721 cells in the aforementioned groups. In order to explore the mechanism of apoptosis induced by fluorouracil and curcumin co-delivered NLDH, Western blot was used to detect the expression levels of apoptotic proteins such as Bcl-2, Caspase-3 and Caspase-9. **Results** NLDH, with a size of 400 nm, presented a good uniformity under electron microscope. XRD results indicated that fluorouracil and curcumin were horizontally inserted into

收稿日期:2015-11-26

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(No: NSFC81271694);科技部国际合作专项(No: 010S2012ZR0058、2011DFA32980)

[通信作者] 刘辉, E-mail: happyehbh@163.com; Tel: 021-81875524

the interlayer of NLDH. CCK8 results indicated that LDH-Fu-Cur more efficiently inhibited the growth of 7721, LM3 and Hep G2 cell lines compared with pure fluorouracil, fluorouracil plus curcumin, and LDH-Fu ($P < 0.05$). Similarly, LDH-Fu-Cur was more effective in promoting apoptosis than pure fluorouracil, fluorouracil plus curcumin, and LDH-Fu, as was evidenced by the apoptosis rate of LDH-Fu-Cur which was $(87.0 \pm 4.7)\%$ with the fluorouracil concentration of $35 \mu\text{g/ml}$ while the apoptosis rate of pure fluorouracil was only $(23.0 \pm 2.3)\%$ with that concentration ($P < 0.05$). Western blot results showed that NLDH could significantly down-regulate the Bcl-2 gene expression of 7721 cells and induce cell apoptosis by activating Caspase-3 and Caspase-9. **Conclusions** NLDH presents as a good carrier for anti-cancer drugs such as fluorouracil and curcumin and exhibits a potent anti-tumor effect, which make it a promising candidate for cancer therapy.

Keywords: nano-layered double hydroxide; hepatocellular carcinoma; curcumin; fluorouracil; cell apoptosis

原发性肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 位于肿瘤发病率的第 5 位, 其死亡率在肿瘤中居第 3 位^[1]。早期 HCC 患者的最佳治疗措施是手术切除, 然而 HCC 起病隐匿, 确诊时多属晚期, 已丧失手术机会。有数据显示, 早期进行手术切除的肿瘤患者, 其术后也具有较高的复发率^[2], 因此临床上化学治疗对于上述患者具有重要的治疗意义。

单一化疗药物, 如氟尿嘧啶 (Fluorouracil, Fu), 存在治疗窗口窄、毒副作用大等缺点。临床上常采取的多种化疗药物联用治疗也存在不足, 如多种药物之间可能存在相互作用, 多种药物副作用的叠加效应等^[3-5]。近年来, 传统中药的抑制肿瘤作用越来越受到关注, 中药辅助临床常用的化疗药物不仅存在经济上的优势, 还因中药的毒副作用小而具有相对安全性。姜黄素 (Curcumin, Cur) 是来源于食物的天然药物, 具有廉价、安全等诸多优点。研究表明, 大剂量的姜黄素对于人体没有明显的毒副作用, 基础实验也证实姜黄素具有抗炎、抗氧化及抗肿瘤等多重作用^[6]。同时文献报道显示, 联合化疗药物与姜黄素能够抑制肿瘤生长^[7]。但是姜黄素具有水溶性差、体内代谢快等不足, 如何充分发挥姜黄素的强大功能值得探究。

纳米技术的发展为肿瘤药物剂型提供新方向, 纳米技术具有诸多优点: 纳米载体的 pH 敏感性、温度敏感性, 以及修饰的不同配体可以实现主动及被动靶向至肿瘤部位, 基于纳米技术的联合用药不仅局限于两种药物机械混合使用, 还可以实现化疗药物的时序性、协同性作用^[8-9]。层状双氢氧化物 (layered double hydroxide, LDH) 是一类具有双层板状结构的阴离子型黏土, 因具有无毒、高载药量和 pH 敏感性等优点, 而受到广泛关注。LDH 板间带负电荷, 可用于阴离子物质交换, 可负载电离为阴离子的药物及小分子的核酸, 如 LI 等^[10]采用 LDH 负载尿嘧啶和 siRNA 可用于肿瘤的药物、基因联合疗法, 为逆转肿

瘤耐药提供新思路。

基于文献报道以及前期的实验结果, 本实验利用 LDH 负载氟尿嘧啶、姜黄素纳米混合剂型, 并对其一系列的特征, 采用 7721、LM3 和 Hep G2 细胞为模型, 研究纳米剂型对肝癌多细胞系的抑制作用, 并对其作用机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 实验材料

六水硝酸镁 [$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 分析纯]、九水硝酸铝 [$\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 分析纯]、氢氧化钠 (NaOH, 分析纯) 及二甲亚砜 [(dimethyl sulfoxide, DMSO), 分析纯] 购自上海化学试剂公司, 高纯氮购自上海比欧西气体工业有限公司, 1640 培养液、小牛血清、胰酶 - 乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、活细胞计数法试剂盒 (cell counting kit 8, CCK8) 及凋亡试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司, 氟尿嘧啶购自大连美仑生物有限公司, 姜黄素购自阿拉丁试剂, 7721、LM3、Hep G2 和 LO2 细胞株购自中科院上海细胞库, 同济大学生命科学院冷冻保存, 所有抗体均购自美国 Cell Signaling Technology (CST) 公司。

1.2 纳米材料的合成

LDH 的合成依据实验室前期基础。称取 NaOH 0.272 g 溶于 40 ml 除二氧化碳 CO_2 去离子水, 于三口烧瓶中氮气氛围下充分搅拌 5 min, 10 ml 溶解 0.796 g $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 0.372 g $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 快速加入三口烧瓶中, 60°C 水浴快速搅拌, 1 h 后离心收集, 除二氧化碳 CO_2 去离子水清洗 3 遍。用 40 ml 0.15 mol NaOH 溶液, 其中溶解氟尿嘧啶或氟尿嘧啶加姜黄素, 重悬上述离心收集的浆液。三口烧瓶 60°C 水浴快速搅拌 1 h 后, 除 CO_2 去离子水清洗 3 遍, 70 ml 除 CO_2 去离子水重悬, 放置于水热釜中 100°C 、16 h 后室温冷却, 去离子水清洗 3 次即得

LDH-Fu(LF)和 LDH-Fu-Cur(LFC)。

1.3 纳米材料的表征

通过电镜观察 LF 和 LFC 的形貌,动态激光散射仪测定其粒径,X 射线衍射观察其晶型结构。紫外分光光度测定纳米材料的载药量。分别测定氟尿嘧啶在 265 nm 处及姜黄素在 425 nm 处的药物标准曲线,根据标准曲线和待测样品紫外吸收光密度(optical density,OD)值计算其相对应的浓度。

1.4 细胞培养

7721、LM3、Hep G2 及 LO2 细胞培养于含 10% 小牛血清及 1% 双抗的 1640 培养基中,37℃、5%CO₂ 培养,细胞的传代消化选用含 EDTA 的胰酶。

1.5 增殖抑制试验

7721、LM3 和 Hep G2 细胞消化后重悬,接种于 96 孔板,接种数目约为每孔 5 000 个。待细胞增殖至约板底 50%时,加入不同 Fu 浓度的 Fu、LF、LFC 及 Fu+Cur 组,每孔 100 μl (Fu 浓度分别为 15、20、25、30 和 35 μg/ml)。37℃、5%CO₂ 细胞培养箱内培养 24 h,吸去上清液培养基,用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline,PBS)清洗细胞 2 次后加入含 10% CCK8 的新鲜培养基。37℃、5%CO₂ 环境下培养,孵育适当时间,用酶标仪 450nm 测定 OD 值。根据对照组计算细胞存活率,每组 3 个复孔。LDH 安全性评价采取不同浓度的 LDH 悬液作用于正常 LO2 肝脏细胞,步骤同上。

1.6 凋亡实验

7721 细胞消化后重悬,接种于 12 孔板,计数约为 10 万个 / 孔。待细胞长至板底约 60%时,换 1 ml 新鲜培养基,设分别包含不同 Fu 浓度的 Fu、LF、LFC 及 Fu+Cur 组 (Fu 浓度分别为 25、30 和 35 μg/ml,LDH 采取最高 LFC 对应的 LDH 浓度评价 LDH 的促凋亡效应),24 h 后消化收集细胞,用无菌 PBS 清洗细胞 2 次,细胞凋亡双染试剂盒膜联蛋白 - 别藻蓝素 / 7-氨基放线菌素 D (annexin V-allophycocyanin/7-amino-actinomycin D,Annexin V APC/7-AAD) 固定液 500 μl 重悬,依次加入 5 μl APC 和 5 μl 7-AAD,于流式细胞仪检测。

1.7 Western blot 检测

7721 细胞消化离心后接种于 6 孔板,约 15 万个 / 孔。分别加入 LDH、Fu、LF、LFC 及 Fu+Cur (各组 Fu 为 25 μg/ml,LDH 为 LFC 相对应的 LDH 浓度),蛋白提取试剂盒提取全蛋白后采取二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid,BCA)法定量,分组点样于 10%

聚丙烯酰胺凝胶进行十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis,SDS-PAGE)电泳,聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride,PVDF)转膜后加封闭液室温封闭 1 h,分别加入 Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)一抗 4℃孵育过夜后加入二抗,室温轻摇 1 h,加入增强化学发光法 (enhanced chemiluminescence,ECL)发光剂,置于凝胶成像仪中观察结果,并拍照记录。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,双因素多水平方差分析,两两比较用 SNK (Student-Newman-Keuls) 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 纳米材料的表征

根据实验室前期基础,成功制备 LF 和 LFC,结果显示,LF 具有较为均一的正六面体形貌 (见图 1A),而 LFC 出现显著的形貌变化 (见图 1B);XRD 检测用于评估氟尿嘧啶和姜黄素载入 LDH 的方式,各组材料均出现 003 和 006 特征峰 (见图 1C);动态激光散射测定 LF 平均半径为 (94.0 ± 5.5) nm, LFC 平均半径为 (200.0 ± 6.4) nm (见图 1D),提示 LDH 具有良好的晶体结构。LF 的 2θ 角 (003) 发生在 11.28°,晶面间距 d 为 0.78 nm; LFC 的 2θ 角 (003) 发生在 10.64°,晶面间距 d 为 0.84 nm,减去 LDH 板层的 0.48 nm,剩余间距均非常接近氟尿嘧啶和姜黄素的层面高度,分别为 0.34 和 0.32 nm,提示两者是水平被插入 LDH 层间。另外结果还显示,LFC 特征峰显著变弱变宽,提示姜黄素晶体结构差,有利于药物的释放;LF 中 Fu 的载药量为 (19.56 ± 0.32)%, LFC 中 Fu 和 Cur 的载药量分别为 (18.32 ± 0.27)% 和 (15.64 ± 0.25)%。

2.2 肝癌细胞的增殖抑制试验

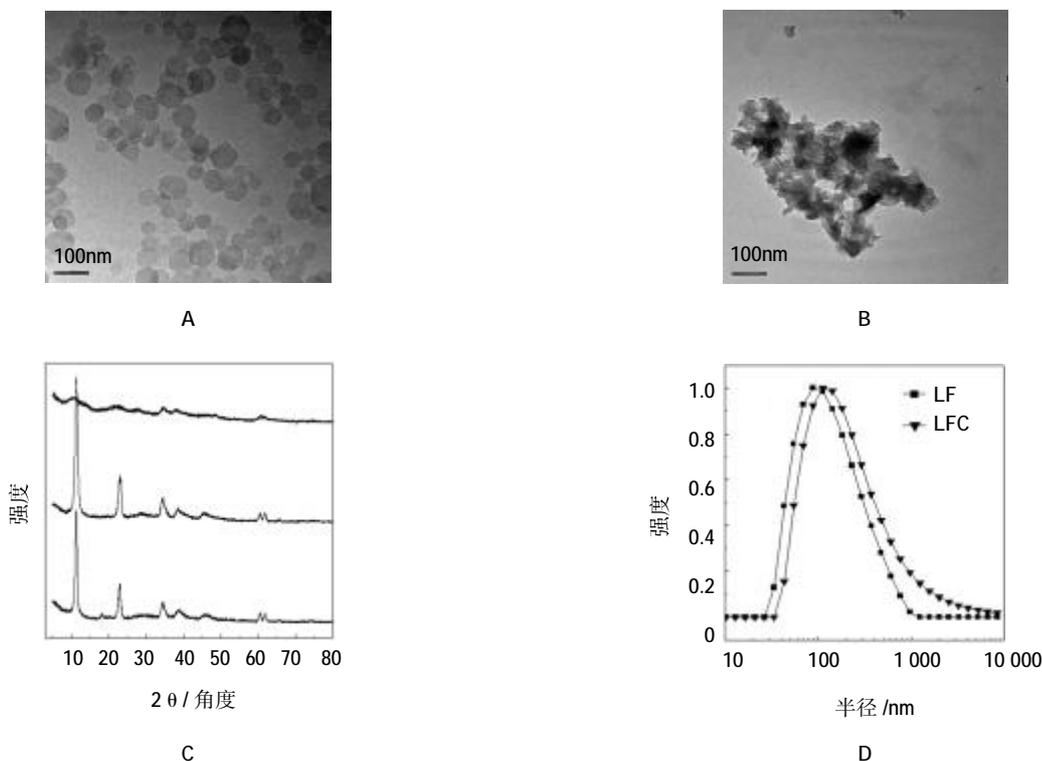
增殖抑制结果显示,各浓度下单纯的 LDH 对正常肝脏细胞 LO2 的细胞存活率 >80%,提示 LDH 生物安全性良好 (见图 2A)。相对于单纯的 Fu 组,纳米剂型对 LM3、Hep G2 和 7721 不同肝癌细胞系均有不同程度的增殖抑制效应 (见图 2B ~ D),从柱状图可以看出 LFC 各浓度下细胞存活率均小于 Fu 组,且在最高浓度下 (Fu 浓度为 35 μg/ml),LFC 组 7721

细胞的存活率 <10% (见图 2D), LF 及 LFC 组细胞存活率随着药物浓度的增加而下降。采取析因设计资料的方差分析比较浓度(检验值和 P 值为 F_1, P_1)、组别(检验值和 P 值为 F_2, P_2)对 LM3、Hep G2、7721 细胞存活率差异的影响,结果显示,在给定的 5% 显著性水平下,组别和浓度对 LM3 ($F_1=732.12, P_1=0.000; P_2=460.09, P_2=0.000$)、Hep G2 ($F_1=604.87, P_1=0.000; F_2=1487.48, P_2=0.000$) 和 7721 ($F_1=3401.73, P_1=0.000; F_2=4497.85, P_2=0.000$) 细胞存活率的抑制作用比较,差异有统计学意义,且组别与浓度间存在交互效应 (LM3: $F=119.75, P=0.000$; Hep G2: $F=110.61, P=0.000$; 7721: $F=651.89, P=0.000$)。各浓度间 LM3、Hep G2 和 7721 细胞存活率比较,差异有统计学意义。SNK 多重比较结果显示,随着药物浓度的提高,细胞致死率明显增加,35 $\mu\text{g/ml}$ 组药物处理后,细胞存活率低于其他组;SNK 多重比较分别对 LM3、Hep G2 和 7721 细胞存活率差异进行组间两两比较,结果提示,3 种细胞中 Fu+Cur 与 Fu、LF 与 Fu、LFC 与 Fu、LF 与 Fu+Cur、LFC 与 Fu+Cur、LFC 与 LF 两组间细胞存活率比较,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),说明 Fu+Cur、LF、LFC 较 Fu 均能降低 LM3、Hep G2 及 7721 细胞存活率,而 LFC 组最强,即 LFC 组较其

他组对于 LM3、Hep G2 和 7721 细胞具有明显的增殖抑制作用。笔者采取 7721 细胞进行下一步实验。

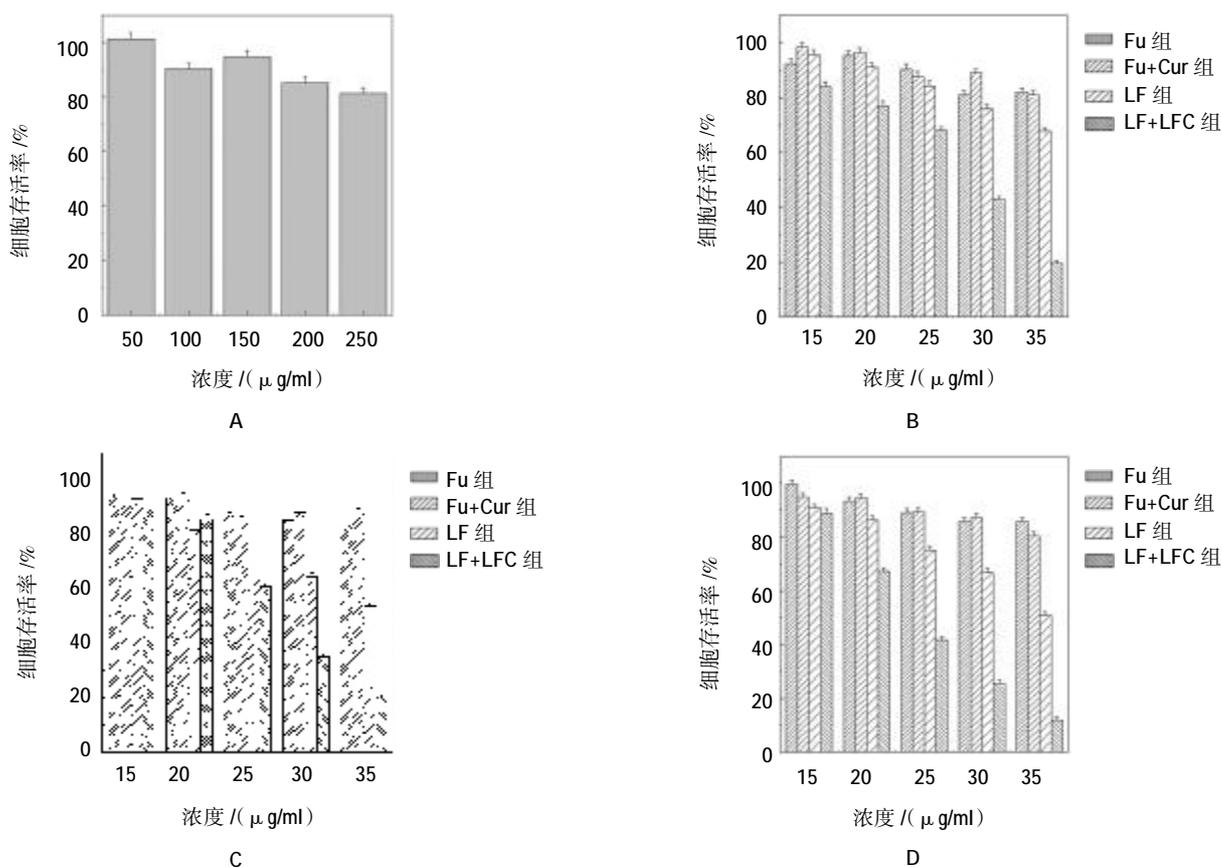
2.3 凋亡实验

从流式凋亡结果图可以看出,最高 LFC 浓度组的 LDH 浓度对于 7721 细胞的诱导凋亡率低,仅约为 9%,提示 LDH 生物安全性良好。LFC 组各浓度下的细胞凋亡率均高于单纯 Fu 组, Fu 浓度为 35 $\mu\text{g/ml}$ 时 Fu、Fu+Cur、LF 及 LFC 对应的凋亡率分别为 $(23.5 \pm 2.3)\%$ 、 $(40.0 \pm 3.5)\%$ 、 $(74.0 \pm 2.5)\%$ 和 $(87.0 \pm 4.7)\%$ (见图 3)。采取析因设计资料的方差分析比较浓度、组别对 7721 细胞凋亡率差异的影响,结果提示,不同处理浓度对 7721 细胞凋亡率比较差异有统计学意义 ($F=18.27, P=0.000$),说明各浓度药物处理后诱导细胞的凋亡率存在差异,经 SNK 法比较,得出 35 $\mu\text{g/ml}$ 组促进细胞凋亡率最明显 ($P < 0.05$)。不同组别处理 7721 细胞后细胞凋亡率比较差异有统计学意义 ($F=52.56, P=0.000$),提示各组间细胞的凋亡率比较差异有统计学意义,组间和浓度间无交互效应。进一步采用 SNK 法对 7721 细胞进行组间两两比较,结果提示, Fu+Cur 与 Fu、LF 与 Fu、LFC 与 Fu、LF 与 Fu+Cur、LFC 与 Fu+Cur、LFC 与 LF 两组间 7721 细胞的凋亡率比较,差异有统计学



A: LF 电镜图; B: LFC 电镜图; C: LDH、LF、LFC XRD 检测; D: LF、LFC DLS 检测

图 1 LF 及 LFC 的表征



A: LDH 生物安全评价; B: LM3 细胞增殖抑制试验; C: Hep G2 细胞增殖抑制试验; D: 7721 细胞增殖抑制试验

图 2 细胞增殖抑制试验

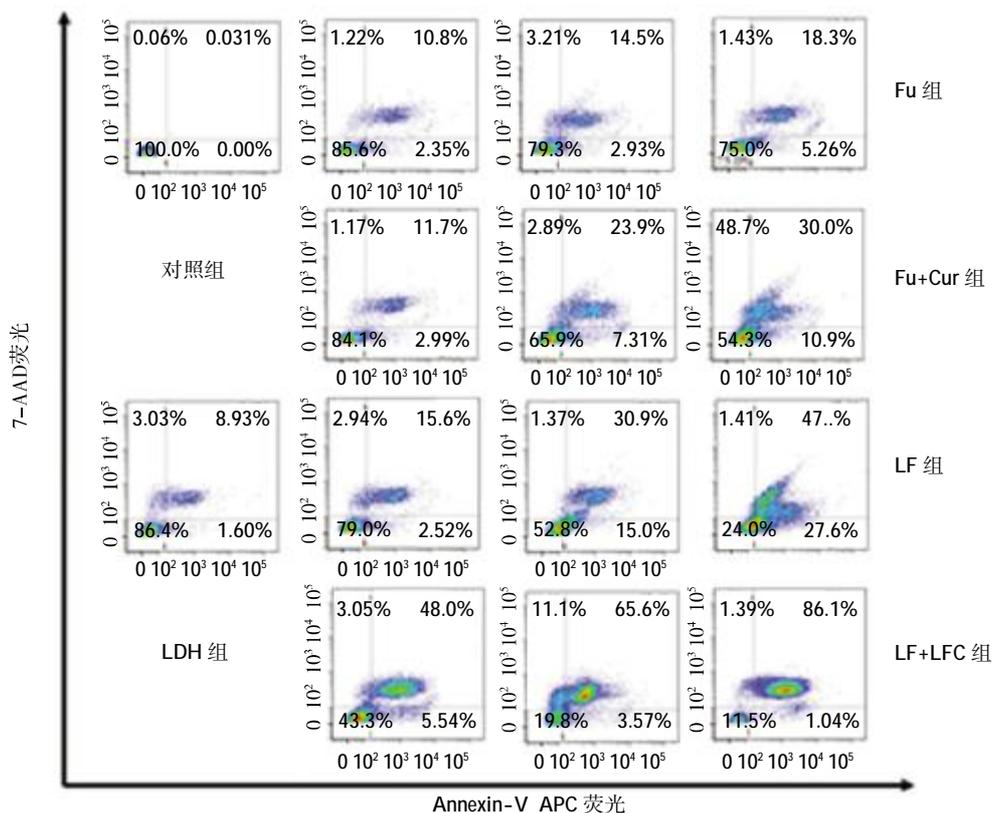


图 3 7721 细胞凋亡实验

意义($P<0.05$),两组间 7721 细胞凋亡率比较差异有统计学意义,说明 Fu+Cur、LF、LFC 较 Fu 都能促进 7721 细胞凋亡,而 LFC 组促凋亡率最高,即 LFC 较其他组对于 7721 细胞具有明显的促凋亡效应。

2.4 Western Blot 检测

Bcl-2 是调节细胞凋亡的重要基因,在细胞发生损伤时,可以使细胞逃逸死亡,下调 *Bcl-2* 可以引起下游 *Caspase* 活化,有效诱导细胞凋亡。Western blot 检测结果显示,LFC 组 *Bcl-2* 较其他组明显下调,同时 *Caspase-3*、*Caspase-9* 较其他组明显上调(见图4),提示 LFC 具有较强的促凋亡效应。

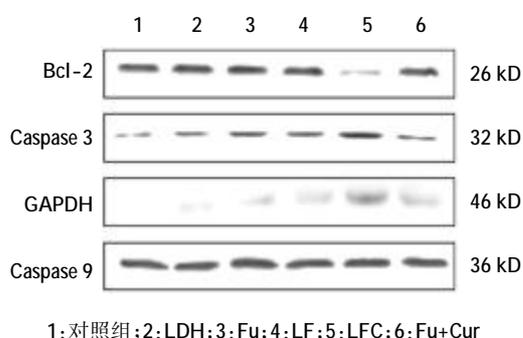


图 4 Western blot 检测

3 讨论

肝癌起病隐匿且恶性程度高,发现多属晚期,化学药物在肝癌治疗中必不可少,然而化疗药物的毒副作用常导致剂量降低或患者放弃治疗,临床上常采取的多种化疗药物联合应用也存在诸多不确定因素^[3,5]。传统中药具有较强的抗肿瘤效果,且安全性高,却存在生物利用度低等缺陷,本实验成功制备 LDH 负载氟尿嘧啶和姜黄素的混合剂型,改善姜黄素水溶性差、生物利用度低等缺陷,充分发挥其抗肿瘤效果。

LDH 是一类具有 pH 敏感性的双层片状结构的纳米载体,因其具有低毒、高细胞摄取率及高载药量而被广泛关注^[11],与本实验结果相一致。实验中 LFC 中 Fu 和 Cur 的载药量分别高达 18.32% 和 15.64%,同时 250 μ g/ml LDH 对于正常肝脏 LO2 细胞没有明显的抑制作用,显示其优越的生物安全性。课题组前期报道显示,LDH 很容易被 MDDCs 细胞摄取,归因于其 Zeta 电位为正电,容易被带负电的肿瘤细胞获取^[12]。

有文献报道,联合应用氟尿嘧啶和姜黄素能够实现更好地抗肿瘤效果^[13]。而本实验中,单纯的氟尿

嘧啶及氟尿嘧啶和姜黄素的机械混合剂型对于 7721 细胞无明显的增殖抑制效果,而 LF 和 LFC 均有明显的增殖抑制效果,且 LFC 明显强于 LF,可能归结于 LDH 的特殊作用。有文献报道指出,纳米材料能更大程度的被肿瘤细胞摄取,而纳米载体本身具有缓释性能,同时不易被细胞泵出,从而实现药物在肿瘤内的聚集,达到更好的抗肿瘤效应^[14]。

凋亡结果提示,低浓度的氟尿嘧啶、氟尿嘧啶和姜黄素机械混合剂型均表现出有限的诱导细胞凋亡率。而引入 LDH 后的 LF 及 LFC 均对照组有明显的促凋亡效果,且 LFC 明显强于 LF,这不仅从另一方面显示 LDH 的特殊作用,还可能与姜黄素相关。姜黄素是一类植物提取的天然性药物,具有多重药理活性^[5]。文献报道显示,姜黄素能够显著下调 *Bcl-2* 水平,而 *Bcl-2* 是调节细胞凋亡的重要基因,在细胞发生损伤时,可以使细胞逃逸死亡,下调 *Bcl-2* 可以有效诱导细胞凋亡^[16-18]。在本实验中,Western Blot 检测结果显示,LFC 能够显著下调 *Bcl-2*,从而激活 *Caspase* 信号通路,进而促进细胞凋亡。

综上所述,笔者合成共载氟尿嘧啶及姜黄素的层状双氢氧化物纳米剂型,增殖抑制及凋亡结果显示其优越的抗肝癌效果,其机制可能与 LDH 纳米材料的特殊性能及姜黄素的多重药理活性相关,其重要机制可能是下调 *Bcl-2* 水平促进细胞凋亡。层状双氢氧化物共载氟尿嘧啶姜黄素实现传统中药的老药新用及中、西药的联用,为肝癌的化学治疗提供新思路。

参 考 文 献:

- [1] JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, et al. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4): 225-249.
- [2] MANCUSO A, PERRICONE G. Hepatocellular carcinoma and liver transplantation: state of the art[J]. Journal of clinical and translational hepatology, 2014, 2(3): 176-181.
- [3] SHAKADO S, IWATA K, TSUCHIYA N, et al. Pilot study of hepatic arterial infusion chemotherapy with Interferon-beta and 5-fluorouracil: a new chemotherapy for patients with advanced hepatocellular carcinoma[J]. Hepato-gastroenterology, 2014, 61(131): 557-562.
- [4] SONG M J, BAE S H, CHUN H J, et al. A randomized study of cisplatin and 5-Fu hepatic arterial infusion chemotherapy with or without adriamycin for advanced hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 2015, 75(4): 739-746.
- [5] 乔彬彬, 虞希祥, 王舒婷, 等. TACE 术中灌注氟尿嘧啶、奥沙利铂及吡柔比星治疗原发性肝癌的临床效果分析 [J]. 介入放射学杂志

- 志, 2015, 24(4): 349-353.
- [6] HEGER M, VAN GOLEN R F, BROEKGAARDEN M, et al. The molecular basis for the pharmacokinetics and pharmacodynamics of curcumin and its metabolites in relation to cancer[J]. *Pharmacological Reviews*, 2014, 66(1): 222-307.
- [7] 张莉鑫. 姜黄素联用 5-Fu 对人结肠癌细胞凋亡的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2010, 20(15): 2298-2301.
- [8] YOKOYAMA M. Polymeric micelles as drug carriers: their lights and shadows[J]. *Journal of Drug Targeting*, 2014, 22(7): 576-583.
- [9] ZHU Y, WU Y, ZHANG H, et al. Enhanced anti-metastatic activity of etoposide using layered double hydroxide nano particles[J]. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2015, 11(12): 2158-2168.
- [10] LI L, GU W, CHEN J, et al. Co-delivery of siRNAs and anti-cancer drugs using layered double hydroxide nanoparticles[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(10): 3331-3339.
- [11] RIAZ U, ASHRAF S M. Double layered hydroxides as potential anti-cancer drug delivery agents[J]. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 2013, 13(4): 522-529.
- [12] WANG J, ZHU R, GAO B, et al. The enhanced immune response of hepatitis B virus DNA vaccine using SiO₂ LDH nanoparticles as an adjuvant[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(1): 466-478.
- [13] SADZUKA Y, NAGAMINE M, TOYOOKA T, et al. Beneficial effects of curcumin on antitumor activity and adverse reactions of doxorubicin[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2012, 432(1/2): 42-49.
- [14] CHEN Y, CHEN H, SHI J. Inorganic nanoparticle-based drug codelivery nanosystems to overcome the multidrug resistance of cancer cells[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2014, 11(8): 2495-2510.
- [15] 刘红艳, 王海燕, 叶松, 等. 姜黄素药理作用及其机制研究进展[J]. *中国现代医学杂志*, 2012, 22(6): 48-51.
- [16] 董伟, 刘辉. 姜黄素抗肿瘤新剂型研究进展[J]. *第二军医大学学报*, 2015, 36(7): 771-775.
- [17] YANG J, NING J, PENG L, et al. Effect of curcumin on Bcl-2 and Bax expression in nude mice prostate cancer[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2015, 8(8): 9272-9278.
- [18] WENG Q, FU L, CHEN G, et al. Design, synthesis, and anti-cancer evaluation of long-chain alkoxylated mono-carbonyl analogues of curcumin[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2015, 103(20): 44-55.

(童颖丹 编辑)