

• 药剂与工艺 •

Angiopep-2 修饰的载三氧化二砷介孔二氧化硅脂质囊纳米递药系统的构建及体外评价

张 燕, 费伟东, 陶姣阳, 邹佳峰, 陆燕平, 李范珠*

浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 311400

摘要: 目的 以聚丙烯酸 (polyacrylic acid, PAA) 接枝的介孔二氧化硅纳米粒 (mesoporous silica nanoparticles, MSN) 为核 (PAA-MSN), 采用薄膜水化法自组装形成 Angiopep-2 (氨基酸残基序列为 TFFYGGSRGKRNNFKTEEY) 修饰的功能化 MSN 脂质囊纳米粒 (ANG-LP-PAA-MSN)。通过 Angiopep-2 与血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 和脑胶质瘤细胞上高表达的低密度脂蛋白相关受体 1 (LRP-1) 特异性地识别、结合, 旨在增加水溶性药物三氧化二砷 (arsenic trioxide, As_2O_3) 跨血脑屏障并靶向脑胶质瘤能力。方法 采用透射电子显微镜 (TEM)、热重分析仪 (TGA) 等考察递药系统的理化性质和载药量, 透析袋法考察其不同 pH (pH 6.0、7.4) 环境下的释药特征; 噻唑蓝 (MTT) 比色法考察递药系统对人脑微血管内皮细胞 (HBMEC) 和脑胶质瘤细胞 (C6) 毒性; 通过构建体外 BBB 细胞模型研究载体对 As_2O_3 跨膜转运能力的影响。结果 该载药纳米粒 (ANG-LP-PAA-MSN@ As_2O_3) 呈圆整的“核-壳”结构, 分散性与稳定性良好, 载药量为 6.32%; PAA 接枝后的递药系统突释现象显著改善并表现出 pH 响应特性; 脂质囊包裹以后的递药系统显著提高了生物安全性, 同时增加了药物的跨 BBB 转运率; 体外抗肿瘤活性结果表明 ANG-PAA-LP-MSN@ As_2O_3 具有较好的体外抗脑胶质瘤效果。结论 该智能靶向递药系统能够有效增加 As_2O_3 跨 BBB 转运, 增加药物在脑胶质瘤部位的聚集, 并实现肿瘤部位 pH 响应释放药物。

关键词: Angiopep-2; 三氧化二砷; 脑胶质瘤; pH 响应; 介孔二氧化硅; 脂质囊纳米粒; 聚丙烯酸; 血脑屏障

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)06-1289-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.06.009

Preparation and *in vitro* evaluation of arsenic trioxide-loaded phospholipid-capped mesoporous silica nanoparticles modified with Angiopep-2 as targeting drug delivery system

ZHANG Yan, FEI Wei-dong, TAO Jiao-yang, ZOU Jia-feng, LU Yan-ping, LI Fan-zhu

College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311400, China

Abstract: Objective To enhance the blood-brain barrier (BBB) penetration and glioma targeting ability of arsenic trioxide (As_2O_3), the lipid-coated mesoporous silica nanoparticles (MSN) modified with Angiopep-2 and polyacrylic acid (ANG-PAA-LP-MSN) is prepared by thin-film hydration method. This complex is specifically recognized and bound between ANG and low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) which is highly expressed on BBB and glioma cells. **Methods** The drug delivery system characterization were analysed by transmission electron microscopy (TEM) and thermogravimetric analysis (TGA). Dialysis bag method was used to analyse the drug release characteristics at different pH conditions (pH 6.0 and 7.4, respectively). Cytotoxicity of

收稿日期: 2017-11-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目: “协同靶向”策略构建两性寡肽脂质体介导三氧化二砷前药脑胶质瘤胞药及机理研究 (81673607), 砒霜活性成分三氧化二砷脂质囊纳米粒脑胶质瘤深部渗透靶向递药系统研究 (81473361), 双重血栓靶向定位释放水蛭素融合蛋白基因给药系统的研究 (81603303); 老年病中药新产品湖北省协同创新中心项目: 基于 LRP 受体介导载三氧化二砷金属钼中空介孔二氧化硅脂质囊纳米粒的研究 (15111903); 浙江省教育厅科研项目: 阿霉素自组装纳米粒的制备及其脑内递药特性研究 (Y201431480); 浙江省中医药优秀青年人才基金项目: 马钱子总碱柔性传递体的制备及其透皮靶向递药研究 (2018ZQ013)

作者简介: 张 燕 (1990—), 女, 在读硕士, 研究方向为药物新剂型与新技术。Tel: 18758134864 E-mail: 2463965245@qq.com

***通信作者** 李范珠 (1964—), 男, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为新型给药系统及靶向制剂的研究。

Tel: (0571)61768130 E-mail: lifanzhu@zcmu.edu.cn

nanocarriers and the antitumor activity *in vitro* of this drug delivery system were measured on human brain micro-capillary endothelial cells (HBMEC) and glioma cells (C6) by MTT assay. Moreover, *in vitro* cells model of BBB was established to study the effect of vehicle on the transmembrane transport of As_2O_3 . **Results** The drug delivery system (ANG-PAA-LP-MSN@ As_2O_3) was constructed successfully, it showed a rounded “core-shell” structure with good dispersibility and stability. The drug loading efficiency was 6.32%. After PAA modification, this drug delivery system showed higher pH responsiveness to release medium, and the burst release of As_2O_3 was significantly reduced compared with that of unmodified group. Lipid coating could significantly improve the biosafety and penetration ability of BBB. The antitumor activity study showed that ANG-PAA-LP-MSN@ As_2O_3 exhibited an ideal glioma inhibition effect *in vitro*. **Conclusion** This smart targeting drug delivery system enhance the BBB penetration ability of As_2O_3 , and the special pH responsiveness demonstrated antitumor ability through increasing its accumulation in the tumor site.

Key words: Angiopep-2; arsenic trioxide; glioma; pH response; mesoporous silica; lipid capsule nanoparticles; polyacrylic acid; blood brain barrier

三氧化二砷 (As_2O_3) 是砒霜的主要成分, 常温下呈白色粉末, 无气味, 微溶于水。近年来研究发现, As_2O_3 对多种实体肿瘤细胞存在抑制生长和诱导凋亡的作用, 具有广谱抗癌性^[1-3], 其中关于脑胶质瘤的研究尤为引人关注^[4-5]。然而其脂溶性差、透过血脑屏障 (BBB) 困难以及分布缺乏特异性等缺点严重限制了其应用^[6]。因此, 构建一个脑胶质瘤靶向递药、靶区释放药物的递药系统是十分有意义的。

介孔二氧化硅纳米粒 (mesoporous silica nanoparticles, MSN) 因其高度有序的介孔结构、较大的比表面积和孔容积, 成为最有前途的药物载体之一^[2,7-10]。具有环境响应性 (包括酶敏、温敏、pH 值敏等) 的 MSN 可以通过肿瘤微环境响应释放药物^[11]。有研究表明, 聚丙烯酸 (polyacrylic acid, PAA) 是一种表面带负电荷的 pH 值敏感材料^[2], 本实验将 PAA 通过酸碱共轭修饰 MSN (PAA-MSN), 以期达到封堵介孔及 pH 环境响应作用。同时在介孔硅纳米粒表面包裹磷脂双分子层 (LP-PAA-MSN), 形成类似 “原始细胞” 结构, 不但能够降低二氧化硅毒性与聚集性, 降低其与体内蛋白的结合达到长循环的目的^[12], 而且能有效降低纳米粒对药物的突释作用^[13]。本研究将低密度脂蛋白受体相关蛋白 (LRP) 受体的配体 Angiopep-2 (ANG, ANG 是近年来发现的一段由多个氨基酸残基组成的具有脑靶向性质的短肽, 序列为 TFFYGGSRGKRNNFKTEEY) 修饰到递药系统外表面 (ANG-LP-PAA-MSN), 以实现递药系统跨 BBB 和脑胶质瘤双重靶向功能^[14-16]。

1 仪器与材料

H7650 透射电子显微镜 (TEM), 日本日立公司; 380ZLS 激光粒度测定仪, 美国 Nicomp 公司; TRISTAR II 3020 多通道全自动比表面和孔隙分析

仪, 美国 Micromeritics 公司; Pyris1TGA 热重分析仪, 美国 PerkinElmer 公司; BrukerD8Advance X 射线衍射仪, 德国布鲁克公司; 傅里叶红外光谱仪, 美国 Thermo 公司; ICAP 6300 等离子体发射光谱仪, 美国 Agilent 公司; 核磁共振仪, 美国 Palo Alto 公司; 透析袋, 上海绿鸟科技发展有限公司, 截留相对分子质量 3 500; SynergyTM2 酶标仪, 美国 Bio-Tek 公司。

四乙氧基硅烷 (tetraethoxysilane, TEOS, 质量分数 98%)、十六烷基三甲基溴化铵 (hexadecyltrimethylammoniumbromide, CTAB, 质量分数 98%)、三氨基丙基三乙氧基硅烷 (3-aminopropyltriethoxysilane, APTES, 质量分数 99%)、PAA (相对分子质量 1 800), 美国 Sigma 公司; As_2O_3 , 质量分数 99.9%, 苏州诺德派森公司; 标准砷溶液, 1.000 g/L, 北京世纪奥科生物技术有限公司; ANG, 杭州中肽生化有限公司; 二硬脂酰磷脂酰马来酰亚胺聚乙二醇 (DSPE-PEG₂₀₀₀-MAL), 美国 Laysan 生物科技有限公司; 二硬脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC)、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (DSPE)、胆固醇, 上海艾韦特医药科技有限公司; DMEM 培养基 (含双抗), 杭州吉诺生物医药技术有限公司; 四甲基偶氮唑盐 (MTT), 美国 Sigma 公司; 其他试剂均为分析纯。

C6 细胞和人脑微毛细血管内皮细胞 (HBMEC), 浙江中医药大学实验动物中心提供, 培养于 DMEM 培养基。培养条件为 37 °C、5% 的 CO_2 、饱和湿度 90%。所有细胞实验是取对数生长期的细胞进行。

2 方法与结果

2.1 DSPE-PEG₂₀₀₀-ANG 的合成与表征

DSPE-PEG₂₀₀₀-MAL 与 ANG (物质的量比为 3 : 1), 氮气保护下, PBS 缓冲溶液 (pH 7.4) 中反

应 24 h, 反应物用透析袋(相对分子质量 3 500)渗透 48 h 以去除未反应的 ANG 和 DSPE-PEG₂₀₀₀-MAL, 将合成的产品冷冻干燥 24 h, 于 4 °C 冰箱保存。产物用核磁共振仪进行表征。如图 1 所示, 在核磁谱图中 DMSO 的溶剂峰出现在 δ 2.50(图 1-a~c)。DSPE-PEG₂₀₀₀-MAL 中马来酰亚胺基的特征吸收峰出现在 δ 7.02(图 1-b)。当马来酰亚胺基与 ANG 反应后即得 ANG 修饰的 DSPE-PEG₂₀₀₀-MAL (DSPE-PEG₂₀₀₀-ANG), DSPE-PEG₂₀₀₀-ANG 的核磁谱图中出现 ANG 结构中苯环的特征峰, 位于 δ 6.60~7.30 区域(图 1-c)。¹H-NMR 结果证明 DSPE-PEG₂₀₀₀-ANG 靶向化合物合成成功。

2.2 氨基修饰的 MSN (NH₂-MSN) 的制备

采用一步法制备 NH₂-MSN。精密称取 CTAB 0.3 g, 分散于超纯水中, 加入 2 mol/L NaOH 调节 pH 值约 11.5。80 °C 条件下, 磁力搅拌 0.5 h, 将

TEOS 1 mL 和 APTES 0.5 mL 的混合液逐滴缓慢加入 CTAB 溶液中反应 2 h, 静置, 熟化, 20 000 r/min 离心 20 min, 硝酸铵酸性乙醇(10 mg/mL) 50 °C 回流 12 h, 重复 3 次以除去模板剂 CTAB。超纯水洗涤数次, 离心, 冷冻干燥, 即得 NH₂-MSN。

2.3 PAA 修饰的介孔二氧化硅载 As₂O₃ (PAA-MSN@As₂O₃) 的制备

据文献方法^[2]精密称取 40 mg NH₂-MSN 冻干粉, 加入 10 mL As₂O₃ 溶液中(1 mg/mL), 室温搅拌 24 h。20 000 r/min 离心 30 min, 除去游离 As₂O₃, 超纯水洗涤数次, 离心, 冷冻干燥, 即得 MSN@As₂O₃。精密称取 20 mg MSN@As₂O₃ 溶于 20 mL DMF 溶液中, 充分搅拌, 加入 20 mg PAA, 100 °C 下搅拌反应 2 h, 20 000 r/min 离心 30 min, 产物分别用无水乙醇、超纯水洗涤数次, 离心, 冷冻干燥, 即得 PAA-MSN@As₂O₃。

2.4 ANG 修饰的介孔二氧化硅载 As₂O₃ 脂质囊纳米粒 (ANG-LP-PAA-MSN@As₂O₃) 的制备

采用自组装及薄膜水化法^[14]: 精密称取 DSPC-胆固醇-DSPE-PEG₂₀₀₀-DSPE-PEG₂₀₀₀-ANG (65:25:8:2) 脂质材料于茄形瓶中, 40 °C 条件下溶解于微量三氯甲烷中, 加入一定比例的 PAA-MSN@As₂O₃ (20% 脂质材料质量), 迅速涡旋分散置 40 °C 下旋转蒸发成膜。PBS 水化超声得混悬液, 葡聚糖凝胶柱(G-100)纯化分离除去空白脂质体, 即得 ANG-LP-PAA-MSN@As₂O₃。上述工艺不加入 DSPE-PEG₂₀₀₀-ANG, 即得 LP-PAA-MSN@As₂O₃。

2.5 纳米粒的表征

采用 TEM 分别对 NH₂-MSN、LP-PAA-MSN@As₂O₃ 进行观察, 380ZLS 激光粒度测定仪测定粒径分布及电位。TRISTAR II 3020 多通道全自动比表面和孔隙分析仪绘制 NH₂-MSN 和 MSN@As₂O₃ 的氮气吸-脱附曲线, 计算比表面积和孔径, 热重分析测定载药量^[17]。

通过 TEM 观察结果见图 2, NH₂-MSN 介孔结构明显呈介孔网络结构, LP-PAA-MSN@As₂O₃ 介孔结构则不明显, 且其外观较 NH₂-MSN 呈现出更规整的球形。NH₂-MSN 的粒径为 (101.40±0.36) nm, 略大于透射电镜图中的粒径(图 3-a), 因为在水分散体系中, MSN 表面会形成水化膜而增加粒径^[18]。从表 1 可知, 负载 As₂O₃ 以后, 仍可为 PAA 的接枝反应提供正电荷。PAA 包裹以后, 纳米粒表面电荷由正转变为负, 说明 PAA 修饰成功。脂质囊包裹以

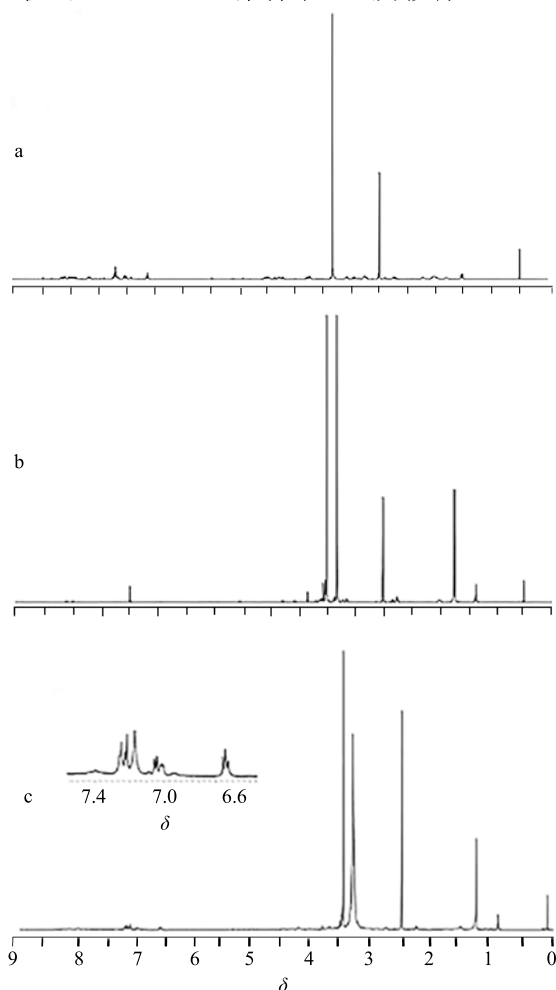


图 1 ANG (a)、DSPE-PEG₂₀₀₀-MAL (b)、DSPE-PEG₂₀₀₀-ANG (c) 的 ¹H-NMR 核磁共振谱

Fig. 1 ¹H-NMR spectrum of ANG (a), DSPE-PEG₂₀₀₀-MAL (b), and DSPE-PEG₂₀₀₀-ANG (c)

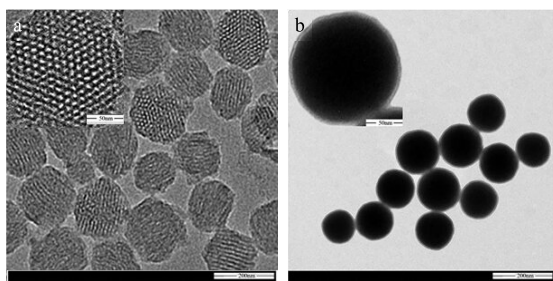


图 2 $\text{NH}_2\text{-MSN}$ (a) 和 $\text{LP-PAA-MSN@As}_2\text{O}_3$ (b) TEM 图
Fig. 2 TEM images of $\text{NH}_2\text{-MSN}$ (a) and $\text{LP-PAA-MSN@As}_2\text{O}_3$ (b)

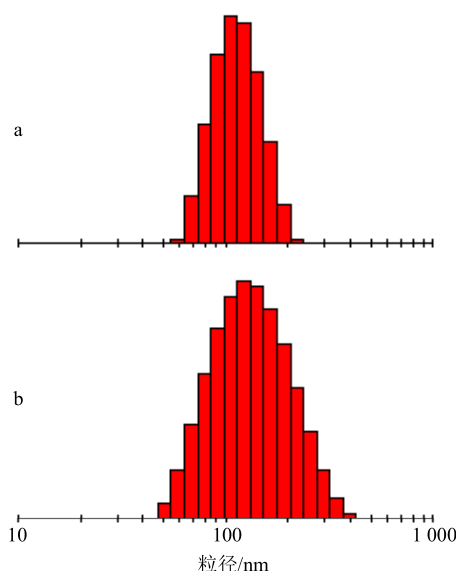


图 3 $\text{NH}_2\text{-MSN}$ (a) 和 ANG-LP-PAA-MSN (b) 粒径分布
Fig. 3 Particle size of $\text{NH}_2\text{-MSN}$ (a) and ANG-LP-PAA-MSN (b)

表 1 $\text{NH}_2\text{-MSN}$ 、 $\text{MSN@As}_2\text{O}_3$ 、 $\text{PAA-MSN@As}_2\text{O}_3$ 、 $\text{LP-PAA-MSN@As}_2\text{O}_3$ 和 $\text{ANG-LP-PAA-MSN@As}_2\text{O}_3$ 的 Zeta 电位

Table 1 Zeta potential of $\text{NH}_2\text{-MSN}$, $\text{MSN@As}_2\text{O}_3$, $\text{PAA-MSN@As}_2\text{O}_3$, $\text{LP-PAA-MSN@As}_2\text{O}_3$, and $\text{ANG-LP-PAA-MSN@As}_2\text{O}_3$

样品	Zeta 电位/mV
$\text{NH}_2\text{-MSN}$	45.80 ± 0.81
$\text{MSN@As}_2\text{O}_3$	21.47 ± 0.43
$\text{PAA-MSN@As}_2\text{O}_3$	-29.61 ± 0.64
$\text{LP-PAA-MSN@As}_2\text{O}_3$	-16.67 ± 0.87
$\text{ANG-LP-PAA-MSN@As}_2\text{O}_3$	-14.85 ± 0.63

后, 平均粒径增大, 与没有疏水碳链作为骨架的 LP-MSN 相比^[16], LP-PAA-MSN 拥有厚度更加均一的脂质囊, 并且制备得到的纳米粒更加圆整。ANG 修饰以后, 粒径增大至 $(123.47 \pm 0.31) \text{ nm}$ (图 3-b),

由于 EPR 效应, 粒径在 $100 \sim 200 \text{ nm}$ 的纳米粒更容易向肿瘤组织分布^[19]。

如图 4-a、b 所示, 氮气吸脱附结果证明 $\text{NH}_2\text{-MSN}$ 具有 IV 型吸附等温线^[20], 计算得 $\text{NH}_2\text{-MSN}$ 的比表面积、孔径分别是 $932.82 \text{ m}^2/\text{g}$ 、 3.8 nm 。吸-脱附等温线趋近于平行, 属于 H1 滞后环, 进一步表明其具有明显的介孔结构^[21]。负载药物之后, 比表面积、孔径分别减少至 $612.28 \text{ m}^2/\text{g}$ 、 2.5 nm , 说明药物成功载于介孔二氧化硅孔内。热重分析实验中 (图 4-c), 温度从 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 逐渐程序上升至

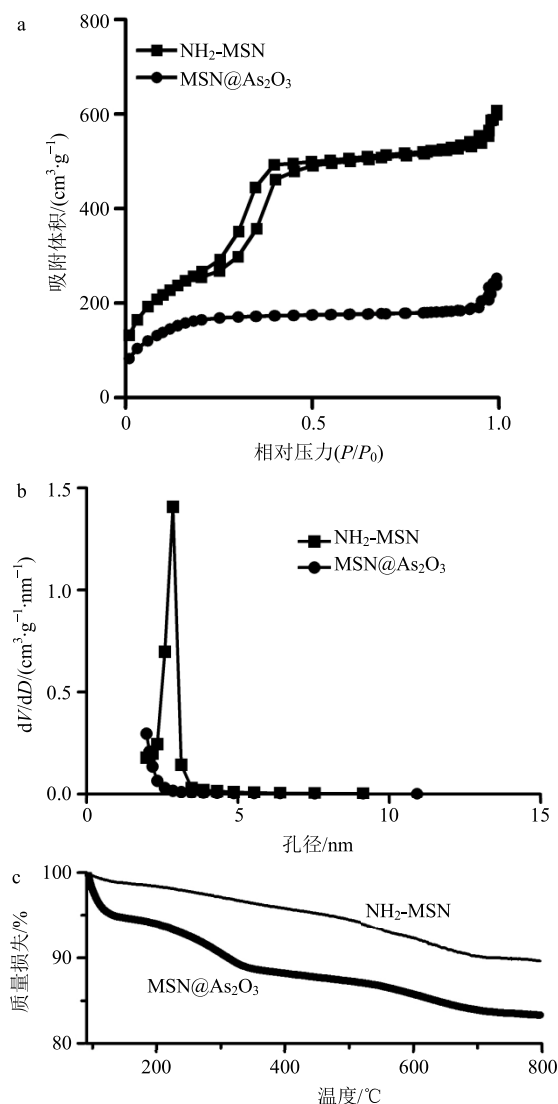


图 4 $\text{NH}_2\text{-MSN}$ 和 $\text{MSN@As}_2\text{O}_3$ 氮气吸-脱附等温线 (a)、 $\text{NH}_2\text{-MSN}$ 和 $\text{MSN@As}_2\text{O}_3$ 孔径分布 (b)、 $\text{NH}_2\text{-MSN}$ 和 $\text{MSN@As}_2\text{O}_3$ 热重分析 (c)

Fig. 4 N_2 adsorption-desorption isotherm of $\text{NH}_2\text{-MSN}$ and $\text{MSN@As}_2\text{O}_3$ (a), pore-size distribution of $\text{NH}_2\text{-MSN}$ and $\text{MSN@As}_2\text{O}_3$ (b), and TGA curves of $\text{NH}_2\text{-MSN}$ and $\text{MSN@As}_2\text{O}_3$ (c)

800 °C, $\text{NH}_2\text{-MSN}$ 、 $\text{MSN@As}_2\text{O}_3$ 的质量损失分别是 10.36%、16.68%。因 SiO_2 具有高热稳定性^[22], 故 $\text{NH}_2\text{-MSN}$ 的质量损失可能是 APTES 中的有机硅链灰化。 $\text{MSN@As}_2\text{O}_3$ 的质量损失表明载药量约 6.32%。如图 5 所示, 红外光谱结果中, MSN 在 $1\,180.24\text{ cm}^{-1}$ 出现最大吸收峰是 Si-O-Si 键的反对称伸缩振动; 806.11 、 462.84 cm^{-1} 是 Si-O-Si 键的对称伸缩振动和弯曲振动; MSN 氨基化以后, $1\,540.87\text{ cm}^{-1}$ 出现 $-\text{NH}_3^+$ 的对称振动峰表明氨基成功的连接在 MSN 上^[23], PAA 修饰之后, $1\,637.60$ 、 $1\,718.77\text{ cm}^{-1}$ 特征吸收分别是酰胺和羧基中的 C=O 的伸缩振动^[24-25], 表明 PAA 接枝成功。

2.6 体外释放

用不同 pH 值的磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 6.0、7.4) 为释放介质, 考察 3 种药物制剂 (As_2O_3 溶液、

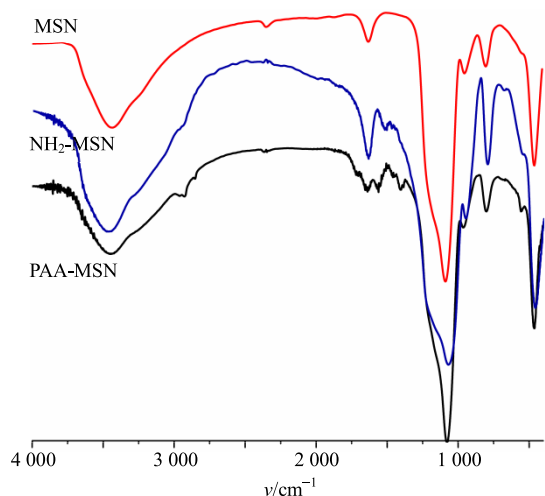


图 5 MSN 、 $\text{NH}_2\text{-MSN}$ 和 PAA-MSN 的 FT-IR 图谱

Fig. 5 FT-IR photograph of MSN , $\text{NH}_2\text{-MSN}$, and PAA-MSN

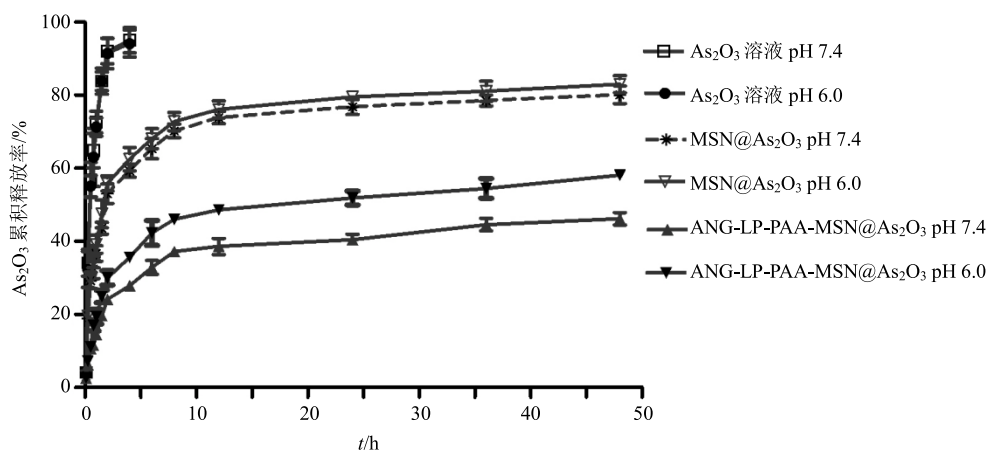


图 6 As_2O_3 不同制剂在不同 pH (6.0、7.4) 环境中的体外释药曲线

Fig. 6 *In vitro* release profiles of As_2O_3 in PBS (pH 6.0, 7.4) from As_2O_3 formulation

$\text{MSN@As}_2\text{O}_3$ 和 $\text{ANG-LP-PAA-MSN@As}_2\text{O}_3$) 中 As_2O_3 的释放特征, 精密称取适量 3 种 As_2O_3 制剂的冻干粉 (含 As_2O_3 0.5 mg), 用 2 mL 释放介质溶解或分散, 置于已处理的透析袋内, 排除气泡后密封, 置于 100 mL 释放介质中, 于 $(37.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 恒温水浴振荡 (75 r/min), 分别于 0.1、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、4、6、8、12、24、36、48 h 准确取样 2 mL, 并立即补加等量同温同 pH 值新鲜释放介质, 样品经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 取续滤液稀释用等离子体发射光谱仪测定 As 浓度。工作条件: RF 功率 1 150 W; ICAP 6300 等离子体流量 50 L/min; 辅助气流量 0.5 L/min; 雾化器流量 0.3 L/min; 泵速 50 L/min; 仪器稳定延时 5 s; 清洗时间 30 s; 载气为氩气 (纯度 99.99%); 分析谱线 189 nm。 As_2O_3 溶液、 $\text{MSN@As}_2\text{O}_3$ 、 $\text{ANG-LP-PAA-MSN@As}_2\text{O}_3$ 在不同 pH 值的磷酸盐缓冲液 (pH 6.0、7.4) 释放特征见图 6。 As_2O_3 溶液在 2 h 内释放超过 90% 的药物, $\text{MSN@As}_2\text{O}_3$ 在 2 h 后释放近 56%、53% 的药物 (pH 6.0、7.4), 具有强烈的突释效应。因 MSN 上的氨基具有吸收与释放质子的能力, 因此 $\text{MSN@As}_2\text{O}_3$ 的释放曲线具有微弱的 pH 值响应性^[26-27]。 $\text{ANG-LP-PAA-MSN@As}_2\text{O}_3$ 在不同 pH (6.0、7.4) 环境中 48 h 内分别累积释放率约为 58%、47%。

2.7 载体的细胞毒性实验

取处于对数生长期的 C6 和 HBMEC 细胞, 分别以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板, 37°C 培养 24 h 后移弃培养液, 加入不同质量浓度的 $\text{NH}_2\text{-MSN}$ 、 PAA-MSN 、 LP-PAA-MSN 和 ANG-LP-PAA-MSN , 继续培养 48 h 后, 吸去含药培养液, 每孔分别加入含 0.5 mg/mL MTT 的无血清培养液 0.2 mL, 于

37 ℃继续孵育 4 h, 吸去含有 MTT 的培养液, 用 PBS 清洗 2 次后, 每孔加入 0.1 mL DMSO, 待溶解均匀后用 SynergyTM2 酶标仪测定 490 nm 处吸光度 (A) 值, 计算细胞活力抑制 50% 时的质量浓度 (IC_{50})^[28]。所有实验重复 3 次。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{正常}}$$

$A_{\text{给药}}$ 为不同质量浓度样品组的吸光度, $A_{\text{正常}}$ 为空白细胞组的吸光度

采用 MTT 法测定 48 h 内 NH_2 -MSN、PAA-MSN、LP-PAA-MSN 和 ANG-LP-PAA-MSN 对

表 2 NH_2 -MSN、PAA-MSN、LP-PAA-MSN 和 ANG-LP-PAA-MSN 对 C6 细胞和 HBMEC 细胞的细胞毒性 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Table 2 Viability of C6 cell and HBMEC cell after being treated with NH_2 -MSN, PAA-MSN, LP-PAA-MSN, and ANG-LP-PAA-MSN (concentrations ranging from 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ to 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for 48 h, $\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	C6 细胞存活率/%					
	0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
NH_2 -MSN	99.91 $\pm$ 3.82	94.53 $\pm$ 2.50	88.50 $\pm$ 1.99	83.89 $\pm$ 0.88	74.32 $\pm$ 3.08	65.57 $\pm$ 3.75
PAA-MSN	98.98 $\pm$ 2.44	93.14 $\pm$ 2.09	89.79 $\pm$ 2.19	85.68 $\pm$ 1.72	76.91 $\pm$ 1.14	72.98 $\pm$ 1.92*
LP-PAA-MSN	99.90 $\pm$ 2.28	95.91 $\pm$ 1.90	91.00 $\pm$ 1.58	84.60 $\pm$ 1.83	79.97 $\pm$ 2.28*	76.97 $\pm$ 2.82*
ANG-LP-PAA-MSN	99.05 $\pm$ 1.41	93.41 $\pm$ 1.29	89.97 $\pm$ 1.36	85.97 $\pm$ 1.25	77.69 $\pm$ 1.66	71.43 $\pm$ 1.37*

组别	HBMEC 细胞存活率/%					
	0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
NH_2 -MSN	99.50 $\pm$ 5.87	98.22 $\pm$ 4.28	95.48 $\pm$ 3.68	84.51 $\pm$ 3.78	75.84 $\pm$ 3.97	69.40 $\pm$ 2.39
PAA-MSN	95.61 $\pm$ 2.54	95.79 $\pm$ 3.54	90.65 $\pm$ 4.41	88.55 $\pm$ 1.50	81.15 $\pm$ 1.67	76.80 $\pm$ 3.38*
LP-PAA-MSN	99.32 $\pm$ 4.16	93.06 $\pm$ 3.93	90.27 $\pm$ 4.78	87.78 $\pm$ 3.79	85.22 $\pm$ 2.76*	81.69 $\pm$ 2.21*
ANG-LP-PAA-MSN	98.72 $\pm$ 5.02	94.86 $\pm$ 1.73	90.76 $\pm$ 3.30	87.63 $\pm$ 0.88	83.09 $\pm$ 1.51*	80.12 $\pm$ 2.41*

与 NH_2 -MSN 组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs NH_2 -MSN group

均显著提高 ($P < 0.05$)。LP-PAA-MSN 处理组在高质量浓度时对 HBMEC 抑制率低于 PAA-MSN 处理组, ANG-LP-PAA-MSN 相比于 LP-PAA-MSN、PAA-MSN 在高质量浓度时对 C6 细胞抑制率效佳。

2.8 体外抗肿瘤活性实验

取对数生长期的 C6 细胞, 以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板, 37 ℃培养 24 h 后移弃培养液, 分别加入不同质量浓度的 As_2O_3 溶液、MSN@ As_2O_3 、PAA-MSN@ As_2O_3 、LP-PAA-MSN@ As_2O_3 和 ANG-LP-PAA-MSN@ As_2O_3 继续培养 48 h 后, 每孔加入含 0.5 mg/mL MTT 的无血清培养液 0.2 mL, 孵育 4 h。采用酶标仪测定 A 值, 计算 IC_{50} 。所有实验重复 3 次。 As_2O_3 溶液、MSN@ As_2O_3 、PAA-MSN@ As_2O_3 、LP-PAA-MSN@ As_2O_3 和 ANG-LP-PAA-MSN@ As_2O_3 对 C6 细胞的抑制情况如图 7 所示, 随着质量浓度的增大, 各组细胞的存活率显著降低, 表明 As_2O_3 对脑胶质瘤细胞具有良好的抑制作用。MSN@ As_2O_3 、

HBMEC 细胞和 C6 脑胶质瘤细胞的毒性, 如表 2 所示, 当载体质量浓度小于 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的时候, C6 和 HBMEC 细胞的存活率都高于 85%, 4 种载体细胞毒性均较小。随着载体质量浓度的逐渐增大, NH_2 -MSN 对 2 种细胞均表现出较高的细胞抑制率, 由于载体表面带较强的正电荷, 阳离子载体容易引起溶血等细胞毒性, 因而产生较强的细胞毒性^[29]。高质量浓度 PAA-MSN 处理后 (大于 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), HBMEC 细胞与 C6 细胞存活率较 NH_2 -MSN 处理组

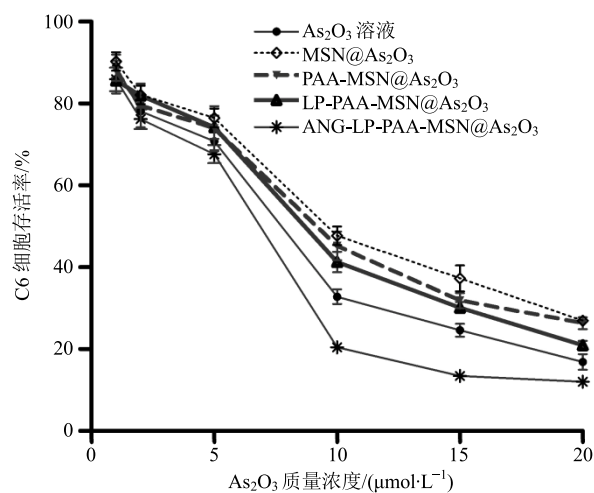


图 7 As_2O_3 溶液、MSN@ As_2O_3 、PAA-MSN@ As_2O_3 、LP-PAA-MSN@ As_2O_3 、ANG-LP-PAA-MSN@ As_2O_3 对 C6 细胞的抑制曲线

Fig. 7 Viability of C6 cells after being treated with As_2O_3 solution, MSN@ As_2O_3 , PAA-MSN@ As_2O_3 , LP-PAA-MSN@ As_2O_3 , and ANG-LP-PAA-MSN@ As_2O_3

PAA-MSN@As₂O₃ 与 LP-PAA-MSN@As₂O₃ 的 IC₅₀ 分别是 9.321、8.229、6.942 μmol/L, 均大于 As₂O₃ 溶液的 IC₅₀ 6.42 μmol/L。ANG 修饰之后, ANG-LP-PAA-MSN@As₂O₃ 处理组 IC₅₀ 为 5.684 μmol/L, 小于 As₂O₃ 溶液组, 说明 ANG-LP-PAA-MSN@As₂O₃ 具有较理想的体外抗肿瘤作用。

2.9 体外跨 BBB 转运实验

体外 BBB 模型的建立: HBMEC 细胞接种于 12 孔 transwell 板 (膜嵌套直径 12 mm, 平均孔径 3 μm, 比表面积 1.12 cm², 美国康宁公司), 细胞数 1×10⁵ 个/孔。培养 3 d 后, 用细胞电阻仪监控并检测跨细胞电阻 (trans epithelial electric resistanc, TEER), 只有细胞单层跨细胞电阻超过 250 Ω/cm² 才能用于实验研究。采用 D-Hank's 缓冲液作为转运介质研究各个样品的跨膜转运率。实验时用预先 37 °C 保温的 D-Hank's 溶液冲洗供体池 3 次, 在供体池中分别加入含 As₂O₃ 溶液、MSN@As₂O₃、PAA-MSN@As₂O₃、

LP-PAA-MSN@As₂O₃ 和 ANG-LP-PAA-MSN@As₂O₃ 的 DMEM 培养液, 受体池中加入空白缓冲液, 平行 6 孔, 继续孵育, 于 1、2、3、4、8 h 在受体池中吸取样品 200 μL, 并及时补充等量空白介质。样品经离子体发射光谱仪检测 As₂O₃ 质量浓度。

各含药组的跨 BBB 转运能力实验结果如表 3 所示, 从表 3 中可以发现在 8 h 后 As₂O₃ 溶液、MSN@As₂O₃、PAA-MSN@As₂O₃、LP-PAA-MSN@As₂O₃ 和 ANG-LP-PAA-MSN@As₂O₃ 的跨 BBB 转运率分别是 (2.21±0.19) %、(2.47±0.11) %、(3.04±0.07) %、(3.81±0.35) %和 (7.70±0.48) %, 脂质囊包裹的制剂转运效率显著增加 ($P<0.01$), 而 ANG 修饰以后, ANG-LP-PAA-MSN@As₂O₃ 处理组的转运效率分别是 PAA-MSN@As₂O₃ 和 LP-PAA-MSN@As₂O₃ 处理组的 2.53、2.02 倍, 该结果表明 ANG 与细胞上高表达的 LRP-1 特异性地识别从而达到了较好的转运效果。

表 3 As₂O₃ 不同制剂跨 BBB 转运率 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Transport ratio of As₂O₃ formulations across the BBB model *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	转运率/%				
	1 h	2 h	4 h	6 h	8 h
As ₂ O ₃ 溶液	0.33±0.01	0.82±0.10	1.24±0.12	1.63±0.12	2.21±0.20
MSN@As ₂ O ₃	0.39±0.02*	0.98±0.15	1.38±0.10	1.77±0.04	2.47±0.11
PAA-MSN@As ₂ O ₃	0.66±0.07*	1.43±0.09**	1.81±0.11**	2.30±0.14**	3.04±0.07**
LP-PAA-MSN@As ₂ O ₃	0.85±0.13**	1.56±0.06**	2.05±0.11**	2.96±0.40***	3.81±0.35***
ANG-LP-PAA-MSN@As ₂ O ₃	1.65±0.10***	3.06±0.11***	4.51±0.26***	5.75±0.17***	7.70±0.48***

与 As₂O₃ 溶液组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与 PAA-MSN@As₂O₃ 组比较: *** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs As₂O₃ solution group; *** $P<0.01$ vs PAA-MSN@As₂O₃ group

另外, 如表 4 所示, 在 LRP 受体竞争性抑制剂 ANG 或 Aprotin 存在的条件下, 其余各组在 4 h 内的转运效率没有显著差异, 而 ANG-LP-PAA-MSN@As₂O₃ 处理组的跨 BBB 效率从 (4.53±0.39) %降低到 (2.44±0.11) %和 (2.56±0.11) % ($P<0.01$), 说明 ANG-LP-PAA-MSN@As₂O₃ 跨 BBB 很大程度上依赖 ANG 的主动靶向作用。

3 讨论

本研究通过制备 ANG 修饰的 pH 值响应介孔二氧化硅脂质囊纳米粒, 有效促进了 As₂O₃ 跨 BBB 以及实现脑胶质瘤细胞靶向和肿瘤微环境触发释放药物, 最终提高了对脑胶质瘤的抑制作用。实验利用一步合成法制备 NH₂-MSN, 二氧化硅有序的介孔和大的孔容面积以及氨基表面的正电荷为酸性

表 4 As₂O₃ 不同制剂时 ANG 和抑肽酶对 LRP 受体的竞争性实验 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Transport ratio of different As₂O₃ formulations across the BBB model *in vitro* in competition assay with LRP receptor antagonists (ANG or Aprotinin) ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	转运率/%		
	空白	ANG	抑肽酶
As ₂ O ₃ 溶液	1.23±0.12	1.21±0.12	1.17±0.05
MSN@As ₂ O ₃	1.30±0.12	1.33±0.03	1.38±0.05
PAA-MSN@As ₂ O ₃	1.83±0.07	1.84±0.05	1.82±0.11
LP-PAA-MSN@As ₂ O ₃	1.89±0.09	1.93±0.10	1.96±0.05
ANG-LP-PAA-MSN@As ₂ O ₃	4.53±0.36	2.44±0.12**	2.56±0.11**

与空白组比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group

As₂O₃ 提供了良好的负载条件。MSN-NH₂ 表征是为了证明介孔结构, 由于 MSN@As₂O₃、PAA-MSN@As₂O₃ 和 ANG-LP-PAA-MSN@As₂O₃ 载药后电镜图结构基本相同, 而氮气吸脱附和热重主要针对药物是否载进介孔硅进行研究, 故主要以 MSN-NH₂、MSN@As₂O₃ 为研究对象。电位图可看出载药后 NH₂-MSN 依然带正电荷, 可以通过静电吸附继续为带负电荷的 PAA 提供吸附条件, FT-IR 图谱中 1 637.60、1 718.77 cm⁻¹ 出现特征峰, 表明 PAA 修饰成功^[30]。PAA 修饰以后, 作为支撑骨架, 为脂质囊的包裹提供了有力的条件, 电镜图结果表明脂质囊纳米粒呈现规整的“核-壳”结构, 脂质囊的厚度均一。ANG 进一步修饰后, 体外跨 BBB 结果表明 ANG-PAA-LP-MSN@As₂O₃ 的跨 BBB 转运率明显高于其他组, 表明本实验制备的 ANG-PAA-LP-MSN@As₂O₃ 对脑胶质瘤的治疗具有一定的优势。

体外释放曲线表明 MSN 对药物具有缓释作用, 这是由于药物介孔内高浓度逐渐向释放介质扩散所致, 然而药物的突释现象显著。PAA 修饰以后, 因其封堵了介孔以及阻碍了 MSN 表面吸附的药物向外扩散, 因此有效改善了载体对药物的突释情况。同时随着 pH 的降低 As₂O₃ 的释放量增大, 主要是由于酸性条件下 PAA 质子化, 溶解度变差从而打开封堵的介孔, 释放出 As₂O₃^[31]。此结果表明 ANG-PAA-LP-MSN@As₂O₃ 能较好地药物蓄积于肿瘤部位后释放, 不仅能更好地发挥肿瘤抑制效果, 并且能减小对正常细胞的损伤。

载体毒性实验结果中 PAA 的修饰可有效降低 NH₂-MSN 表面裸露的氨基引起的细胞毒性。由于脂质体的生物相容性高, 脂质囊包裹的递药系统的生物安全性进一步提高。ANG-LP-PAA-MSN 处理组在高浓度时的细胞抑制率高于 PAA-MSN 和 LP-PAA-MSN 处理组, 是因为 ANG 修饰以后, 通过主动转运进入细胞的载体量增大, 因而产生了较强的细胞毒性。

体外抗肿瘤活性实验中, 因 MSN 不能完全释放出负载的 As₂O₃, 导致 MSN@As₂O₃ 处理组的 IC₅₀ 值高于 PAA-MSN@As₂O₃ 处理组。PAA 修饰以后, IC₅₀ 值较 MSN@As₂O₃ 减小的原因: 1) 改善了载体对药物的突释情况; 2) 具有肿瘤细胞微环境响应释放的特征使得药物在肿瘤细胞聚集。脂质囊包裹以后, 可增加细胞对纳米粒的内吞^[32], 因此, 抗肿瘤作用较 MSN@As₂O₃ 增强。ANG 修饰以后, 由于受

体介导的内吞(receptor mediated endocytosis, RME)作用机制, 使得递药系统入胞量大幅度增加, 因此其抗肿瘤效果显著强于其余各组。

本实验构建的 pH 值响应的双重靶向载 As₂O₃ 介孔二氧化硅脂质囊纳米粒智能递药系统能有效克服 As₂O₃ 脂溶性差、透血脑屏障难以及分布缺乏特异性等缺点, 实现了“靶向递药”与“靶区触发释药”, 显著提高药物跨血脑屏障能力以及对脑胶质瘤的疗效。同时, 本研究对治疗窗窄的水溶性药物靶向递送至脑内病灶部位具有一定的参考价值。

参考文献

- [1] 岳庆喜, 虞红, 何婷, 等. 三氧化二砷和青蒿素抗肿瘤的机制研究进展 [J]. 药学学报, 2016, 51(2): 208-214.
- [2] 郭曼曼, 王国伟, 徐骏军, 等. 载三氧化二砷 pH 值响应介孔二氧化硅纳米粒的制备及体内外评价 [J]. 中草药, 2015, 46(7): 982-989.
- [3] 石瑞平, 郭树霞. 三氧化二砷治疗急性早幼粒性白血病患者骨髓和血液中砷分布的临床检测 [J]. 现代药物与临床, 2012, 27(3): 242-244.
- [4] Emadi A, Gore S D. Arsenic trioxide-an old drug rediscovered [J]. *Blood Rev*, 2010, 24(4/5): 191-199.
- [5] Sun H, Zhang S. Arsenic trioxide regulates the apoptosis of glioma cell and glioma stem cell via down-regulation of stem cell marker Sox2 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 410(3): 692-697.
- [6] 王晓瑜, 马满玲. 主动载药法制备三氧化二砷脂质体 [J]. 中草药, 2014, 45(5): 648-651.
- [7] 唐佳民, 张瑞涛. 介孔二氧化硅纳米粒的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2015, 30(11): 1422-1426.
- [8] 李胜男, 王计瑞, 张继琼, 等. 浸渍离心法制备不同难溶性药物介孔二氧化硅纳米粒载药规律及机制研究 [J]. 中草药, 2017, 48(13): 2638-2644.
- [9] Back S, Singh R K, Khanal D, et al. Smart multifunctional drug delivery towards anticancer therapy harmonized in mesoporous nanoparticles [J]. *Nanoscale*, 2015, 7(34): 14191-14216.
- [10] 何黎黎, 袁志翔, 郑云, 等. 姜黄素-介孔二氧化硅纳米粒固体分散体的制备与表征 [J]. 中草药, 2016, 47(13): 2283-2287.
- [11] Zhu J, Niu Y, Li Y, et al. Stimuli-responsive delivery vehicles based on mesoporous silica nanoparticles: Recent advances and challenges [J]. *J Mater Chem B*, 2016, 5(7): 1339-1352.
- [12] Teng I T, Chang Y J, Wang L S, et al. Phospholipid-functionalized mesoporous silica nanocarriers for

- selective photodynamic therapy of cancer [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(30): 7462-7470.
- [13] Ashley C E, Carnes E C, Phillips G K, *et al.* The targeted delivery of multicomponent cargos to cancer cells by nanoporous particle-supported lipid bilayers [J]. *Nat Mater*, 2011, 10(5): 389-397.
- [14] Huang R, Ma H, Guo Y, *et al.* Angiopep-conjugated nanoparticles for targeted long-term gene therapy of Parkinson's disease [J]. *Pharm Res*, 2013, 30(10): 2549-2559.
- [15] Xin H, Sha X, Jiang X, *et al.* Anti-glioblastoma efficacy and safety of paclitaxel-loading Angiopep-conjugated dual targeting PEG-PCL nanoparticles [J]. *Biomaterials*, 2012, 33(32): 8167-8176.
- [16] 王国伟, 费伟东, 张蓉蓉, 等. Angiopep-2 修饰核-壳介孔二氧化硅脂质囊纳米粒的制备及体外评价 [J]. *中国药理学杂志*, 2015, 50(9): 775-783.
- [17] Fei W, Zhang Y, Han S, *et al.* RGD conjugated liposome-hollow silica hybrid nanovehicles for targeted and controlled delivery of arsenic trioxide against hepatic carcinoma [J]. *Int J Pharm*, 2017, 519(1/2): 250-262.
- [18] Zhao Z, Wang X, Zhang Z, *et al.* Real-time monitoring of arsenic trioxide release and delivery by activatable T1 imaging [J]. *Acs Nano*, 2015, 9(3): 2749-2759.
- [19] 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.
- [20] Sing K S W. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity (Provisional) [J]. *Pure Appl Chem*, 2009, 57(4): 603-619.
- [21] Kruk M, Jaroniec M. Gas adsorption characterization of ordered organic-inorganic nanocomposite materials [J]. *Chem Mater*, 2001, 13(10): 3169-3183.
- [22] Aw M S, Bariana M, Yu Y, *et al.* Surface-functionalized diatom microcapsules for drug delivery of water-insoluble drugs [J]. *J Biomater Appl*, 2013, 28(2): 163-174.
- [23] Chong A S M, Zhao X S. Functionalization of SBA-15 with APTES and characterization of functionalized materials [J]. *J Phys Chem B*, 2003, 107(46): 12650-12657.
- [24] Yuan L, Tang Q, Yang D, *et al.* Preparation of pH-responsive mesoporous silica nanoparticles and their application in controlled drug delivery [J]. *J Phys Chem C*, 2011, 115(20): 9926-9932.
- [25] Mishra A K, Pandey H, Agarwal V, *et al.* Nanoengineered mesoporous silica nanoparticles for smart delivery of doxorubicin [J]. *J Nanopart Res*, 2014, 16(8): 1-10.
- [26] Xiao X, Liu Y, Guo M, *et al.* pH-triggered sustained release of arsenic trioxide by polyacrylic acid capped mesoporous silica nanoparticles for solid tumor treatment *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Biomater Appl*, 2016, 31(1): 23-35.
- [27] Gao Q, Xu Y, Wu D, *et al.* pH-responsive drug release from polymer-coated mesoporous silica spheres [J]. *J Phys Chem C*, 2009, 113(29): 12753-12758.
- [28] 李晶晶, 郭曼曼, 韩顺平, 等. 共修饰冰片和叶酸的阿霉素聚酰胺-胺纳米给药系统的制备及体外评价 [J]. *药理学学报*, 2015, 50(7): 899-905.
- [29] Yu T, Malugin A, Ghandehari H. Impact of silica nanoparticle design on cellular toxicity and hemolytic activity [J]. *Acs Nano*, 2011, 5(7): 5717-5728.
- [30] Li H W, Zhang J Z, Tang Q Q, *et al.* Reduction responsive drug delivery based on mesoporous silica nanoparticle core with crosslinked poly (acrylic acid) shell [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2013, 33(6): 3426-3431.
- [31] 曹 杰, 何定庚, 何晓晓, 等. pH 响应的介孔二氧化硅纳米颗粒的制备及可控释放 [J]. *高等学校化学学报*, 2012, 33(5): 914-918.
- [32] Dengler E C, Liu J, Kerwin A, *et al.* Mesoporous silica-supported lipid bilayers (protocells) for DNA cargo delivery to the spinal cord [J]. *J Control Release*, 2013, 168(2): 209-224.