

## • 药剂与工艺 •

# pH 值响应释药 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 聚乙二醇-聚己内酯-聚乙烯亚胺纳米粒的制备及体外评价

徐骏军<sup>1</sup>, 陈丹飞<sup>2</sup>, 宋倩倩<sup>3</sup>, 林涛<sup>1</sup>, 费伟东<sup>3\*</sup>

1. 浙江大学医学院附属第二医院 药剂科, 浙江 杭州 310009

2. 浙江中医药大学附属第一医院 儿科, 浙江 杭州 310006

3. 浙江大学医学院附属妇产科医院 药剂科, 浙江 杭州 310006

**摘要:** 目的 制备负载 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 的聚乙二醇-聚己内酯-聚乙烯亚胺 (PEG-PCL-PEI, PPP) 纳米粒 (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs), 并进行体外评价。方法 以 PPP 三嵌段聚合物为载体材料, 通过静电载药原理一步制备 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs; 电感耦合等离子体发射光谱仪 (ICP-OES) 测定纳米药物的载药量与包封率, 透析袋法考察其体外释药特性; 紫外分光光度法测定 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs 的溶血毒性; 噻唑蓝 (MTT) 法考察 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs 对人宫颈癌细胞 HeLa 和人肝癌细胞 HepG2 的细胞毒性; 采用 ICP-OES 以及共聚焦显微镜考察 HepG2 细胞对 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs 的摄取效率以及摄取机制。**结果** 所制备的 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs 呈类球形, 分散良好, 粒径约为 88.7 nm, 包封率和载药量分别为 (92.75±3.83)% 和 (4.39±0.26)%。体外释放研究表明, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs 具有缓释以及低 pH 响应释药的特征, 能够实现肿瘤环境的特异性释药。溶血实验表明, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 的负载中和了 PPP 材料的正电性, 从而降低了溶血毒性。细胞毒性试验表明 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs 对 HeLa 细胞和 HepG2 细胞的半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub> 值) 分别为 6.24、5.85 μmol/L, 具有较理想的抑制肿瘤细胞生长的作用。细胞摄取研究表明, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs 因表面荷正电, 容易被细胞摄取迅速, 并具备溶酶体逃逸的特性, 能实现 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 在细胞浆中释放从而发挥药效。**结论** As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs 展现出显著的缓释以及低 pH 响应释药的特性, 并具有溶酶体逃逸的特征, 是一种有潜在价值的抗实体瘤纳米递药体系。

**关键词:** As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; 聚乙二醇-聚己内酯-聚乙烯亚胺; pH 响应释药; 溶酶体逃逸; 体外评价

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)23-5532-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.23.008

## Preparation and *in vitro* evaluation of pH-responsive drug releasing As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-loaded PEG-PCL-PEI nanoparticles

XU Jun-jun<sup>1</sup>, CHEN Dan-fei<sup>2</sup>, SONG Qian-qian<sup>3</sup>, LIN Tao<sup>1</sup>, FEI Wei-dong<sup>3</sup>

1. Department of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China

2. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310006, China

3. Department of Pharmacy, Women's Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China

**Abstract: Objective** To prepare and evaluate As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> loaded polyethylene glycol-polycaprolactone-polyethyleneimine (PEG-PCL-PEI, PPP) nanoparticles (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs) *in vitro*. **Methods** As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs was prepared by one-step electrostatic loading method using PPP triblock polymer as carrier. The drug loading and entrapment efficiency of the nano-drug were determined by ICP-OES. *In vitro* drug release property was studied by the dialysis bag method. Hemolytic toxicity of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs was investigated by UV spectrophotometry. Cytotoxicity of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs on human cervical cancer (HeLa) and human hepatocellular carcinoma cells (HepG2) was evaluated by MTT assay. Finally, ICP-OES and confocal microscopy was used to investigate the uptake efficiency and uptake mechanism of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs by HepG2 cells. **Results** The prepared nano-formulations were spherical and well-dispersed

收稿日期: 2018-07-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81673607, 81603125); 浙江省药学会医院药学专项科研资助项目 (2018ZY04)

作者简介: 徐骏军 (1990—), 男, 浙江东阳人, 硕士研究生, 药师, 从事药物的靶向及缓控释研究。E-mail: xujunjun90@zju.edu.cn

\*通信作者 费伟东 (1991—), 男, 浙江绍兴人, 硕士研究生, 药师, 从事药物的靶向及缓控释研究。

Tel: (0571)89991148 E-mail: feiweidong@zju.edu.cn

with particle size of 88.7 nm. The encapsulation efficiency and the drug loading rate were  $(92.75 \pm 3.83)\%$  and  $(4.39 \pm 0.26)\%$ , respectively. *In vitro* release studies showed that  $\text{As}_2\text{O}_3$ -PPP-NPs had the characteristics of sustained release and low pH responsive drug release, which could achieve specific drug release in the tumor environment. The loading of  $\text{As}_2\text{O}_3$  neutralized the positive charge of PPP, and the hemolytic toxicity of the material was reduced. MTT assay showed that the median lethal concentrations ( $\text{IC}_{50}$  values) of  $\text{As}_2\text{O}_3$ -PPP-NPs to HeLa and HepG2 cells were  $6.24 \mu\text{mol/L}$  and  $5.85 \mu\text{mol/L}$ , respectively, which showed strong inhibiting effect on tumor cells. Cellular uptake studies showed that  $\text{As}_2\text{O}_3$ -PPP-NPs was rapidly taken up by cells due to positively charged surface and featured the lysosomal escaping ability, so the drug could be released in the cytoplasm and exert its anti-tumor effect. **Conclusion**  $\text{As}_2\text{O}_3$ -PPP-NPs exhibits significantly sustained and low pH responsive release characteristics, and has the ability to escape from lysosomes.  $\text{As}_2\text{O}_3$ -PPP-NPs is a potential drug delivery system against solid tumor.

**Key words:** arsenic trioxide; polyethylene glycol-polycaprolactone-polyethyleneimine; pH responsive drug release; lysosomal escape; *in vitro* evaluation

$\text{As}_2\text{O}_3$  是中药砒霜的有效活性成分。20 世纪 70 年代,  $\text{As}_2\text{O}_3$  用于临床治疗早幼粒细胞白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL), 治愈率高达 90%<sup>[1-3]</sup>, 之后又将其适应症扩展至其他血液性恶性肿瘤, 如急/慢性骨髓性白血病、霍奇金病和多发性骨髓瘤等<sup>[4-5]</sup>。近年来, 许多研究团队发现  $\text{As}_2\text{O}_3$  对多种实体瘤细胞也具有抑制生长和诱导凋亡作用<sup>[6-8]</sup>, 但由于  $\text{As}_2\text{O}_3$  存在肾清除率和血浆蛋白结合率高<sup>[9-10]</sup>、体内分布缺乏特异性、治疗窗窄等缺陷, 容易引起记忆损伤、心/肝功能衰竭、周围神经病变以及中毒等严重的不良反应<sup>[11-12]</sup>, 从而限制了  $\text{As}_2\text{O}_3$  在临床上治疗实体肿瘤。

纳米医学的蓬勃发展赋予一些经典老药新的生机。许多药物经纳米载体负载以后, 展现出靶向、缓控释和环境响应释药等特性, 达到增效减毒的目的<sup>[12-14]</sup>。课题组前期构建了载  $\text{As}_2\text{O}_3$  介孔二氧化硅纳米递药系统<sup>[15-16]</sup> (mesoporous silica nanoparticles, MSNs), 一定程度上改善了药物的体内过程, 增强了药物对肝癌的治疗效果并降低了药物的毒副作用<sup>[8,17]</sup>。然而, MSNs 对  $\text{As}_2\text{O}_3$  依旧存在严重的突释、漏释、非靶部位释放等缺陷; 此外, MSNs 在体内难降解<sup>[18]</sup>, 因此这类纳米制剂仍难以向临床转化。聚乙烯亚胺 (PEI) 是一类广泛应用于核酸递药的阳离子聚合物, 其分子中含有大量的胺结构, 在正常生理条件下能够与药物分子中的酸根离子相互结合而形成酸碱离子对复合物<sup>[19]</sup>。随着 pH 值的降低, 游离质子和酸根优先被 PEI 中各级胺捕获, 竞争药物分子中酸根与 PEI 的结合, 从而逐渐释放出药物。因  $\text{As}_2\text{O}_3$  在溶液中以亚砷酸盐形式存在, 能够与 PEI 结合形成酸碱离子对复合物, 理论上含有 PEI 的载体可以对亚砷酸离子进行有效包载并在酸性环境中缓慢释放。此外, 基于 PEI 所构建的纳米递药系统

通常带正电, 能够促进细胞摄取并实现溶酶体逃逸, 继而增强  $\text{As}_2\text{O}_3$  的抗实体瘤作用。

课题组前期通过开环聚合和迈克尔加成反应, 将 PEI 化学偶联至聚乙二醇-聚己内酯 (PEG-PCL) 上, 合成聚乙二醇-聚己内酯-聚乙烯亚胺 (PEG-PCL-PEI, PPP) 三嵌段聚合物<sup>[20]</sup>。本研究以 PPP 为药物载体, 制备具有 pH 响应释药特征的载  $\text{As}_2\text{O}_3$  的 PPP 纳米粒 ( $\text{As}_2\text{O}_3$ -PPP-NPs), 并进行包封率、载药量和粒径等药剂学特性评价; 透析法考察其在不同 pH 条件下的体外释药特性; MTT 法评价其对人宫颈癌 HeLa 细胞和人肝癌 HepG2 细胞的细胞毒性; 共聚焦显微镜观察摄取及分布, 为  $\text{As}_2\text{O}_3$ -PPP-NPs 体内药效学研究奠定基础。

## 1 仪器与材料

Nikon A1 型激光共聚焦显微镜, 日本 Nikon 公司; Nano-ZS 90 激光粒度分析仪, 英国 Malvern 公司; JEM-1200EX 透射电子显微镜 (TEM), 日本电子株式会社; SpectraMax M5 多功能酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; ICAP6300 电感耦合等离子体发射光谱仪 (ICP-OES)、ST16R 台式离心机、Thermo Scientific Forma II CO<sub>2</sub> 培养箱, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; Mill-Q 超纯水仪, 美国 Millipore 公司; MD200 氮吹仪, 杭州奥盛仪器有限公司; CP225D 电子天平, 北京赛多利斯仪器有限公司。

$\text{As}_2\text{O}_3$  原料药, 批号 20170606, 质量分数  $\geq 98\%$ , 浙江中医药大学药学院李范珠教授课题组分装馈赠并做剧毒药物使用记录备案; 砷标准溶液,  $1 \text{ mg/mL}$ , 批号 13A121, 北京世纪奥科生物技术有限公司; PPP, 自制, 相对分子质量约 9 800, 多分散指数 (PDI) 为 1.08, 质量分数  $\geq 90\%$ , 临界胶束浓度为  $0.723 \text{ nmol/L}$ <sup>[20]</sup>; Cy5 荧光探针标记的 PPP

(PPP<sub>Cy5</sub>), 自制, 荧光接枝率约 3.9%; 噻唑蓝 (MTT), 上海阿拉丁试剂有限公司; 泊洛沙姆 188, 德国巴斯夫公司; DMEM 培养基 (添加有 4.5 g/L 葡萄糖、3.7 g/L 碳酸氢钠、10%胎牛血清、1%非必需氨基酸、1%谷氨酰胺、100 μg/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素)、0.25%胰蛋白酶溶液, 美国 Gibco 公司; 细胞核染料 Hoechst 33342、溶酶体绿色染料 LysoTracker® Green DND99, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 二甲亚砜 (DMSO) 等均为国产分析纯。人宫颈癌 HeLa 细胞系和人肝癌 HepG2 细胞系, 源于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

## 2 方法与结果

### 2.1 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs 的制备和表征

**2.1.1 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs 的制备** 称取适量 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 溶于氢氧化钠溶液 (pH 值 10.0) 配制质量浓度为 10 mg/mL 的 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 母液。采用乳化溶剂挥发法制备 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs: 称取 20 mg PPP 溶于 2 mL 体积比为 2:1 的丙酮-甲醇混合溶剂中作为有机相; 取 10 mL 质量分数为 1% 的泊洛沙姆 188 溶液 (pH 值 10.0) 和 0.1 mL 的 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 母液作为水相; 1 000 r/min 搅拌下将有机相缓慢滴加到水相中, 滴毕, 继续搅拌 30 min 同时缓慢滴加盐酸溶液 (pH 值 2.0), 调节 pH 值至 7.4 左右 (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 在该体系中的溶解度约为 12.5 mg/mL), 通过旋转蒸发仪减压蒸出有机溶剂和部分水, 调整体积至 10 mL, 即得到具有淡蓝色乳光的 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs 混悬液。同法制备未载药的 PPP 纳米粒 (空白 PPP-NPs) 以及载 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 的荧光标记的纳米粒 (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs<sub>Cy5</sub>)。

**2.1.2 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs 的表征** 取少量 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs 混悬液, 蒸馏水稀释后经粒径仪测定其平均粒径及 Zeta 电位。取 1 滴 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs 混悬液滴于铜网上, 放于红外灯下蒸干溶剂, 经醋酸双氧铀溶液负染, 置于透射电子显微镜观察其微观形貌特征。精密量取 1 mL As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs 混悬液置于离心管中, 于 20 000 r/min 离心 30 min, 取上清液经硝酸消化后纯水稀释, 用 ICP-OES 测定 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 的浓度, 计算包封率和载药量。

$$\text{包封率} = (W_0 - W_1) / W_0$$

$$\text{载药量} = (W_0 - W_1) / W_1$$

$W_0$  为总投药量,  $W_1$  为载药后上清液中的游离药物量,  $W_1$  为 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs 的总质量

制备得到的 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs 混悬液具有淡蓝色

乳光 (图 1), As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs 呈类球形颗粒, 大小均匀, 分布良好, 粒子之间未见明显粘连及团聚现象 (图 2), 测得平均粒径为  $(88.7 \pm 4.6)$  nm (图 3), PDI 为  $0.17 \pm 0.05$ , Zeta 电位为  $(7.4 \pm 2.8)$  mV。经荧光探针 Cy5 标记后载药纳米粒 (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs<sub>Cy5</sub>) 呈现一定的蓝色。未载药的空白 PPP-NPs 分散性较好 (图 2), 粒径较小但分布范围较宽, 荷

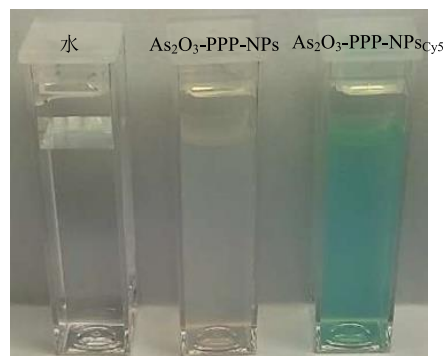


图 1 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs 与 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs<sub>Cy5</sub> 外观特征  
Fig. 1 Morphological appearance of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs and As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs<sub>Cy5</sub>

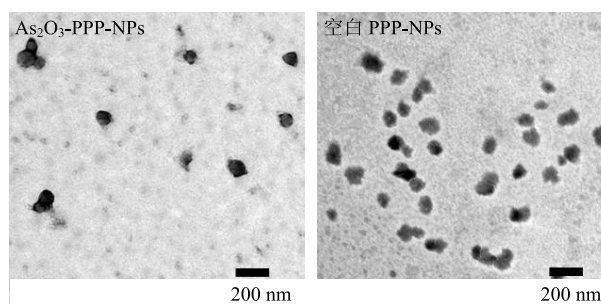


图 2 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs 和空白 PPP-NPs 透射电镜图  
Fig. 2 TEM photograph of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs and blank PPP-NPs

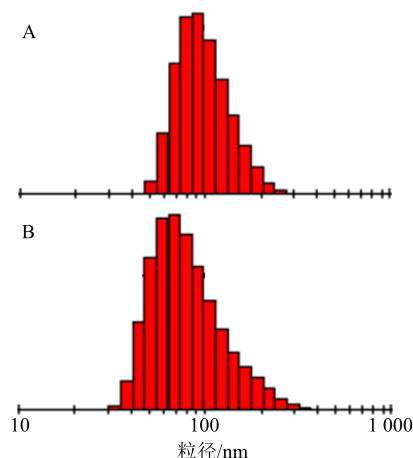


图 3 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs (A) 和空白 PPP-NPs (B) 粒径分布图  
Fig. 3 Particle size distribution of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs (A) and blank PPP-NPs (B)

有较强的正电, 平均粒径为  $(81.5 \pm 6.1)$  nm (图 3), PDI 为  $0.26 \pm 0.08$ , Zeta 电位为  $(15.3 \pm 5.6)$  mV。采用高速离心法考察各纳米制剂的包封率和载药量, 经 ICP-OES 测定,  $\text{As}_2\text{O}_3$ -PPP-NPs 包封率为  $(92.75 \pm 3.83)\%$ , 载药量为  $(4.39 \pm 0.26)\%$ , 高于普通脂质体与其他聚合物对  $\text{As}_2\text{O}_3$  的包载效率 (载药量分别为 1.85% 与 2.82%)<sup>[21-22]</sup>。

以 PPP 为载体所制备得到的纳米粒带正电, 这主要由于 PEI 嵌段中各级胺的质子化赋予了纳米粒正电特性, 同时质子化的胺基与亚砷酸根构成酸碱离子对, 提高了对药物的包载效率, 并且能够降低药物的突释漏释。包载  $\text{As}_2\text{O}_3$  后的纳米药物粒径分布范围变窄, 电位降低, 其原因分别是  $\text{As}_2\text{O}_3$  与 PEI 中各级胺形成离子对复合物后使聚合物疏水端更加趋于有序性, 制备的纳米粒更加均一以及  $\text{As}_2\text{O}_3$  以亚砷酸形式中和了载体的正电荷, 使  $\text{As}_2\text{O}_3$ -PPP-NPs 的 Zeta 电位低于空白 PPP-NPs。此外, 较低的 Zeta 电位可以降低血浆蛋白在纳米粒表面的吸附, 防止包载在纳米粒内部的药物与血浆蛋白的结合, 降低网状内皮系统对药物的清除作用。

## 2.2 $\text{As}_2\text{O}_3$ 药物分析方法的建立

设定 ICP-OES 仪器测试参数: 射频功率 1 100 W, 等离子体体积流量 50 L/min, 辅助气体流量 0.5 L/min, 雾化气体流量 0.3 L/min, 泵速 50 L/min, 稳定延时 5 s, 清洗时间 30 s, 载气高纯氦气, 砷元素分析谱线 189 nm。精密量取砷标准溶液适量至 100 mL 量瓶中, 用稀硝酸稀释至刻度, 得质量浓度为 0.01、0.05、0.10、0.50、1.00、5.00、10.00、50.00、100.00  $\mu\text{g/mL}$  系列砷标准溶液。测定各系列标准溶液中砷元素在 189 nm 处的发射强度 ( $Y$ ), 以  $Y$  值为纵坐标, 质量浓度 ( $C$ ) 为横坐标, 绘制标准曲线, 进行线性回归并计算曲线相关系数 ( $r^2$ ), 结果回归方程为  $Y = 2\,538.5 C + 22.87$ ,  $r^2 = 0.967\,7$ , 表明  $\text{As}_2\text{O}_3$  在 0.05~10.00  $\mu\text{g/mL}$  呈良好的线性关系。

取低、中、高 (0.1、1、10  $\mu\text{g/mL}$ ) 质量浓度的砷标准溶液, 按 ICP-OES 仪器测试参数条件进行测定, 分别于 1 d 内测定 3 次, 连续测定 3 d, 计算 3 种质量浓度砷标准溶液的日内和日间精密度。制备未载药的空白纳米粒混悬液, 然后加入适量的砷标准溶液使得理论  $\text{As}_2\text{O}_3$  质量浓度为 0.1、1、10  $\mu\text{g/mL}$ , 经硝酸消化后纯水稀释定容, 按 ICP-OES 仪器测试参数条件进行测定, 计算 3 种质量浓度砷

标准溶液的回收率。结果发现低、中、高质量浓度  $\text{As}_2\text{O}_3$  溶液的日内和日间精密度 RSD 分别为 0.65%、0.72%、0.88% 和 2.73%、1.86%、1.92%, 均小于 3%。按处方量的 80%、100%、120% 加入  $\text{As}_2\text{O}_3$  后, 回收率分别为  $(90.33 \pm 3.65)\%$ 、 $(91.49 \pm 2.45)\%$ 、 $(95.38 \pm 3.57)\%$ , 均符合方法学要求。

## 2.3 体外释药特性考察

选择含 2% 甘露醇和 2% 甘油的 PBS 缓冲液作为释放介质, 采用透析法考察  $\text{As}_2\text{O}_3$ -PPP-NPs 在 3 种不同 pH (pH 值 7.4、6.0、5.0) 条件下体外释药特性: 分别取  $\text{As}_2\text{O}_3$ -PPP-NPs 混悬液和  $\text{As}_2\text{O}_3$  溶液适量 (折合  $\text{As}_2\text{O}_3$  质量为 1 mg) 加入透析袋内, 用透析夹封口后置于 200 mL 释放介质中, 放于 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴振荡, 分别于 0.25、0.5、1、2、3、4、6、8、12、24、48 h 取释放介质 1 mL, 补加等量空白释放介质, 试样处理后经 ICP-OES 测定  $\text{As}_2\text{O}_3$  含量, 计算累积释放率 ( $Q$ ), 绘制并拟合体外释药曲线。

$\text{As}_2\text{O}_3$  溶液和  $\text{As}_2\text{O}_3$ -PPP-NPs 在不同 pH 条件下的释药曲线如图 4 所示。 $\text{As}_2\text{O}_3$  溶液在释放介质中释药很快, 4 h 内药物  $Q$  大于 70%, 8 h 时药物  $Q$

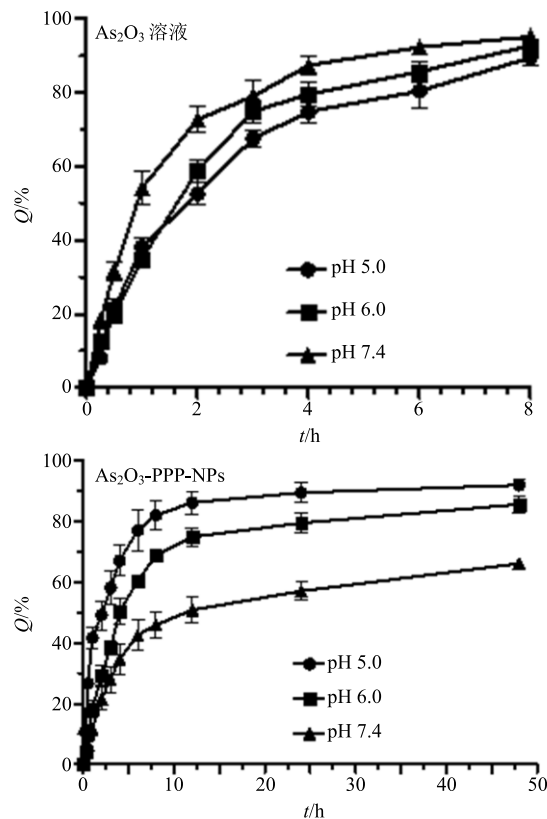


图 4  $\text{As}_2\text{O}_3$  溶液和  $\text{As}_2\text{O}_3$ -PPP-NPs 在不同 pH 值释放介质中体外释药曲线

Fig. 4 *In vitro* release profiles of  $\text{As}_2\text{O}_3$  solution and  $\text{As}_2\text{O}_3$ -PPP-NPs in different pH medium

约为90%，基本释药完全（图4）。随着pH值下降，As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>溶液释放速率下降，主要是由于透析袋内释放介质的渗入和交换，释放体系逐渐由碱性变为酸性，溶液中的亚砷酸离子逐渐转变为As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>，呈现絮状沉淀析出，降低了透析袋内As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>的有效透析浓度，因此释放速率降低。As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs的释药行为可以分为突释和缓释两相，开始时释放较快，随后释药曲线渐趋平稳，缓慢释药，随着pH值条件呈酸性，As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>释放速率明显增加，12 h时在pH 7.4、6.0、5.0条件下，As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs的Q分别为

51.3%、74.5%、83.5%，具有显著的pH值响应释药特性（图4）。随着pH值条件呈酸性，酸中质子与胺基竞争亚砷酸根，使其逐渐转变为H<sub>3</sub>AsO<sub>3</sub>，即呈现出低pH值环境特异性释药的特征。

采用经典的零级动力学模型、一级动力学模型、Higuchi模型对As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs体外释药特性进行方程拟合，如表1所示，As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs在中性PBS缓冲液中的释药行符合Higuchi模型方程，为 $Q=0.104\ 4\ t^{1/2}+0.064\ 7$  ( $r^2=0.907\ 2$ )，具有一定的缓释特性。

表1 体外释放曲线模型拟合 (pH 7.4)

Table 1 Fitting result of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> solution and As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs release curve for optimized formulation (pH 7.4)

| 拟合模型       | As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 溶液                 | As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -PPP-NPs           |
|------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 零级动力学模型    | $Q=0.135\ 1\ t+0.146\ 7$ , $r^2=0.856\ 3$         | $Q=0.019\ 2\ t+0.194\ 4$ , $r^2=0.622\ 3$         |
| 一级动力学模型    | $\ln(1-Q)=-0.284\ 7\ t-0.116\ 4$ , $r^2=0.957\ 8$ | $\ln(1-Q)=-0.021\ 6\ t-0.224\ 4$ , $r^2=0.756\ 3$ |
| Higuchi 模型 | $Q=0.369\ 3\ t^{1/2}-0.023\ 2$ , $r^2=0.874\ 7$   | $Q=0.104\ 4\ t^{1/2}+0.064\ 7$ , $r^2=0.907\ 2$   |

## 2.4 红细胞溶血考察

取抗凝后的新鲜兔血，于2 000 r/min离心5 min去除上层血清和蛋白后，用pH 7.4的PBS缓冲液重分散、洗涤并离心3次，直至上清液不显红色，最后PBS缓冲液稀释配制浓度约为 $1\times 10^8$ 个/mL红细胞储备液。在离心管中加入一定质量浓度的As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs混悬液和空白PPP-NPs混悬液，PBS缓冲液稀释至系列梯度质量浓度，使得总体积为900 μL，最后加入100 μL的红细胞储备液。将离心管置于37℃恒温摇床中振荡，2 h后，于2 000 r/min离心5 min分离出未破裂的红细胞。收集上层液200 μL，使用酶标仪测定其在540 nm处的吸光度(A)。以相应PBS溶液作为阴性对照，纯水溶液作为阳性对照，计算溶血率[溶血率=(A<sub>样</sub>-A<sub>阴</sub>)/(A<sub>阳</sub>-A<sub>阴</sub>)]。

采用兔红细胞考察As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs和空白PPP-NPs细胞溶血现象，如图5所示，随着聚合物浓度的增加，As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs和空白PPP-NPs均出现溶血现象，在低于0.05 mmol/L时红细胞溶血率小于5%，具有良好的溶血耐受性。在相同浓度下，空白PPP-NPs比As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs具有更高的溶血率，主要因为PPP聚合物中的PEI嵌段具有较强的正电特性，其结构中多级胺所生成的铵盐能够引起红细胞溶血，这一问题也是阳离子聚合物及阳离子脂质体等新型纳米制剂普遍存在的弊端<sup>[23]</sup>，包载酸性As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>后降低了PEI的正电性，从而有效降低了As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs的溶血毒性。

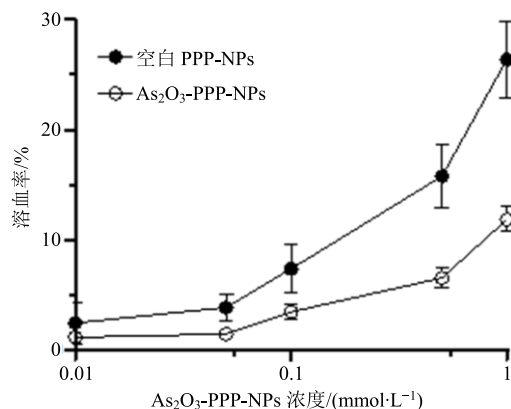


图5 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs对红细胞溶血性考察 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Fig. 5 Hemolysis ratio of blank PPP-NPS and As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs on red blood cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

## 2.5 细胞摄取效率考察

将对数生长期的HepG2细胞用DMEM培养基稀释至密度为 $1\times 10^5$ 个/mL的细胞悬液，取6孔板，每孔加入2 mL细胞悬液，稳定培养12 h。一定的时间点加入100 μL的As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>溶液和As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs，使其孵育0、0.25、0.5、1、1.5、2、3 h，吸弃培养基，PBS冲洗3遍，胰酶消化，收集细胞，试样处理后经ICP-OES测定As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>含量，绘制摄取速率曲线，评价HepG2对As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs的摄取效率。

As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs和As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>溶液在不同时间点的摄取效率如图6所示，随着孵育时间的延长As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-PPP-NPs和As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>溶液不断被摄取进入细胞中。As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>溶液摄取较缓慢，在120 min时摄取量达到最

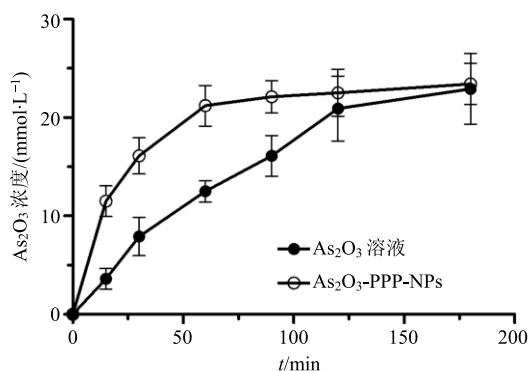


图 6 HepG2 细胞对  $\text{As}_2\text{O}_3$  溶液和  $\text{As}_2\text{O}_3$ -PPP-NPs 的摄取效率考察 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 6 Cellular uptake efficiency of  $\text{As}_2\text{O}_3$  solution and  $\text{As}_2\text{O}_3$ -PPP-NPs by HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

高峰, 而  $\text{As}_2\text{O}_3$ -PPP-NPs 摄取十分迅速, 15 min 内约有 50% 的  $\text{As}_2\text{O}_3$ -PPP-NPs 摄取进入细胞, 60 min 能够达到最大摄取量, 展现出较高的摄取效率。这是由于离子型的亚砷酸较难透过细胞膜, 而  $\text{As}_2\text{O}_3$ -PPP-NPs 荷有正电, 能与细胞膜表面分布各类带负电的蛋白和磷脂相互吸引, 从而促进细胞摄取内吞  $\text{As}_2\text{O}_3$ -PPP-NPs。

## 2.6 细胞毒性实验

分别取对数生长期 HeLa 和 HepG2 细胞, 用 DMEM 培养基稀释细胞至密度为  $5 \times 10^4$  个/mL, 取 96 孔板, 每孔加入 180  $\mu\text{L}$ , 待贴壁 12 h 后, 实验组分别加入系列梯度质量浓度的纳米制剂混悬液 20  $\mu\text{L}$ , 对照组加入等量的 PBS, 各组平行 6 孔。48 h 后每孔加入 20  $\mu\text{L}$  的 5 mg/mL MTT 溶液, 继续孵育 4 h, 离心弃上清后加入 200  $\mu\text{L}$  DMSO, 置于振荡器上振荡 1 min, 以 570 nm 为检测波长和以 620 nm 为校正波长, 用酶标仪测定的  $A$  值, 计算细胞的存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验组}} / A_{\text{对照组}}$$

采用 MTT 法考察了空白 PPP-NPs、 $\text{As}_2\text{O}_3$ -PPP-NPs 和  $\text{As}_2\text{O}_3$  溶液对 HeLa 和 HepG2 细胞的细胞毒性, 如图 7 所示, 在给药剂量范围内, 空白 PPP-NPs 处理的 2 种细胞存活率均大于 80%, 未显示显著的细胞毒性, 佐证了聚合物载体具有良好的生物安全性。 $\text{As}_2\text{O}_3$ -PPP-NPs 和  $\text{As}_2\text{O}_3$  溶液 2 种制剂对细胞的毒性呈现浓度依赖性, 随着  $\text{As}_2\text{O}_3$  质量浓度的增加, 细胞存活率逐渐下降。 $\text{As}_2\text{O}_3$ -PPP-NPs 和  $\text{As}_2\text{O}_3$  溶液对 HeLa 细胞的  $\text{IC}_{50}$  分别为 6.24、4.73  $\mu\text{mol/L}$ , 对 HepG2 细胞的  $\text{IC}_{50}$  分别为 5.58、3.77  $\mu\text{mol/L}$ 。在细胞水平上,  $\text{As}_2\text{O}_3$  溶液能够以较高的实际药物浓

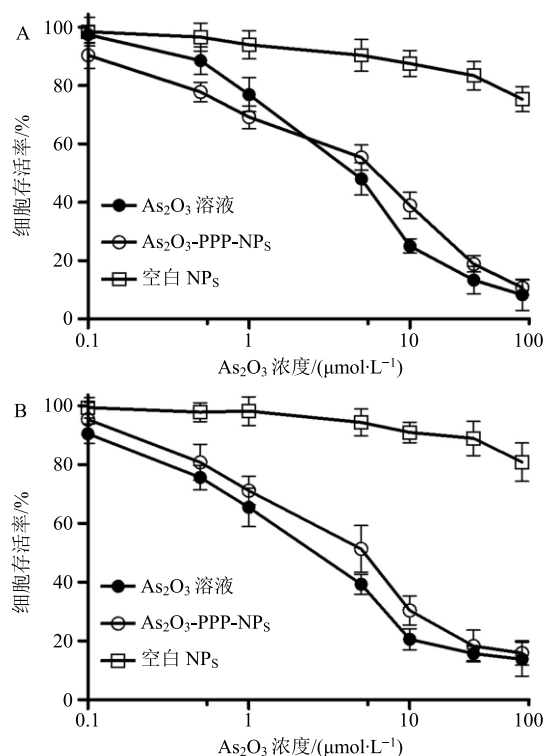


图 7 空白 NPs、 $\text{As}_2\text{O}_3$  溶液、 $\text{As}_2\text{O}_3$ -PPP-NPs 对 HeLa (A) 和 HepG2 (B) 细胞的细胞毒性考察 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

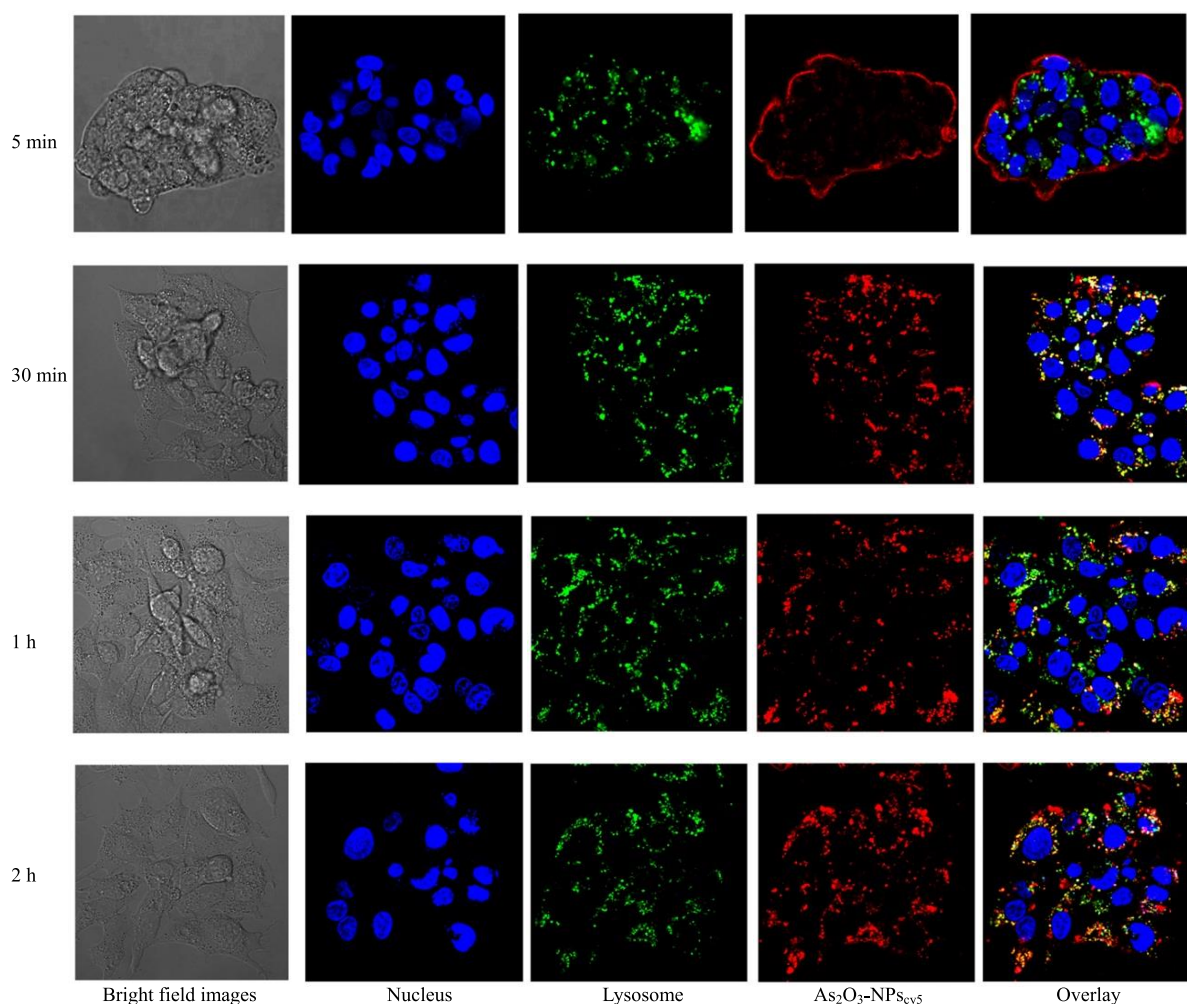
Fig. 7 Cellular cytotoxicity of blank NPs,  $\text{As}_2\text{O}_3$  solution, and  $\text{As}_2\text{O}_3$ -PPP-NPs on HeLa (A) and HepG2 (B) cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

度直接作用于细胞, 细胞毒性更强, 虽然  $\text{As}_2\text{O}_3$ -PPP-NPs 能够迅速被摄取入胞, 但是  $\text{As}_2\text{O}_3$  经缓释作用释放后才能发挥药效, 因此  $\text{As}_2\text{O}_3$ -PPP-NPs 实际药物浓度要小于理论药物浓度, 细胞毒性相对较弱。

## 2.7 细胞摄取机制考察

将对数生长期的 HepG2 细胞用 DMEM 培养基稀释至密度为  $1 \times 10^5$  个/mL 的细胞悬液, 取规格为 35 mm 的玻璃培养皿, 每皿加入 1 mL 细胞悬液, 稳定培养 24 h。每皿加入 0.2  $\mu\text{L}$  LysoTracker<sup>®</sup> Green DND99 标准液, 20 min 后每皿滴加 2 滴 Hoechst 33342 标准液, 孵育 30 min 后, 吸取培养基, PBS 冲洗 1 遍, 加入新鲜培养基, 然后加入 100  $\mu\text{L}$   $\text{As}_2\text{O}_3$ -PPP-NPs<sub>Cy5</sub> 混悬液, 分别于孵育 5、30 min 及 1、2 h, 激光共聚焦显微镜观察各纳米制剂的细胞摄取过程及胞内分布情况 (选取白光明场通道、DAPI 通道、488 nm 和 640 nm 通道 4 个光源)。

采用激光共聚焦显微镜观察 HepG2 细胞摄取  $\text{As}_2\text{O}_3$ -PPP-NPs<sub>Cy5</sub> 入胞过程, 如图 8 所示,  $\text{As}_2\text{O}_3$ -PPP-NPs<sub>Cy5</sub> 经细胞摄取十分迅速, 5 min 时大量黏附于实体瘤细胞簇膜表面 (红色圆环) 并开始摄取



灰色为明场观察细胞，蓝色为 Hoechst 33342 染色的细胞核，绿色为 DNA26 染色的溶酶体，红色为 Cy5 标记的纳米粒，三色为叠加图 Grey region was under bright field observation, blue and green region was nuclei and lysosome stained with Hoechst 33342 and LysoTracker® Red DNA26, respectively, and red fluorescence was  $\text{As}_2\text{O}_3\text{-PPP-NPs}_{\text{Cy5}}$

图 8 激光共聚焦显微镜观察 HepG2 细胞摄取  $\text{As}_2\text{O}_3\text{-PPP-NPs}_{\text{Cy5}}$  入胞过程及胞内分布

Fig. 8 Intracellular process and intracellular distribution of Cy5 labeled nanoparticles after cultured for different times with HepG2 cells observed by confocal microscope

入胞，30 min 内完全摄取并分布于溶酶体中（绿色和红色重合，显黄色），1 h 时可见有少量纳米粒逃逸出溶酶体扩散进入细胞质，2 h 时有大量纳米粒分散进入整个细胞质。此种溶酶体逃逸特性正是由于载体聚合物 PPP 中 PEI 嵌段具有大量荷正电的多级胺，经细胞内吞进入溶酶体后，在质子海绵效应作用下，溶胀破裂溶酶体，使  $\text{As}_2\text{O}_3\text{-PPP-NPs}_{\text{Cy5}}$  逃逸出溶酶体，从而释放药物发挥疗效。

### 3 讨论

国内外许多研究验证了  $\text{As}_2\text{O}_3$  制备成脂质体、胶束等纳米制剂以后提高了药物的稳定性，延长了循环时间，并通过实体肿瘤的高渗透长滞留效应（EPR 效应）、靶向等作用，增强药物在病灶区域的

特异性分布，均展现出良好的抗实体瘤作用<sup>[24-26]</sup>。然而亚砷酸离子（ $\text{As}_2\text{O}_3$  在水溶液中的存在形式）主要存在于纳米制剂的水相或吸附在外表面，往往难以达到理想的包封率和载药量，并存在严重的突释漏释现象。本研究合成制备的 PPP 中 PEI 嵌段具有大量的多级胺，在生理环境中显碱性，带正电，能与亚砷酸离子形成酸碱离子对复合物，能实现高效包载药物。同时包裹在内部的  $\text{As}_2\text{O}_3$  可以有效避免体内蛋白的结合作用，可以延长药物的半衰期。 $\text{As}_2\text{O}_3\text{-PPP-NPs}$  显著的弱酸性环境（pH 值 5.0~6.0）敏感释药特性能够使得药物在肿瘤细胞内特异性释放，能够降低药物的毒副作用<sup>[27-28]</sup>。

大多数载药纳米粒经过血液循环、体内分布、

进入组织器官,经细胞摄取吞噬后会进入溶酶体。 $\text{As}_2\text{O}_3$ 主要通过作用于细胞浆内的周期关键调控蛋白、凋亡调控因子以及一些酶活性等机制实现杀死肿瘤细胞,因此实现载砷纳米制剂的溶酶体逃逸是十分有意义的<sup>[29-30]</sup>。PEI在基因递药系统中被广泛用于溶胀溶酶体,促进核酸药物的溶酶体逃逸<sup>[31-32]</sup>,其分子结构由大量的各级胺构成,由于溶酶体内pH较低,分子中的胺被质子化,引起氯离子内流进入溶酶体,溶酶体内的渗透压不断升高,使溶酶体破裂从而将内吞的载体纳米粒释放到细胞质,接触作用靶点。本研究充分利用PEI的特性,偶联PEI嵌段至PEG-PCL聚合物上,赋予纳米载体正电的特性,不仅大大提高了纳米粒的摄取效率,而且促进递药载体从溶酶体逃逸。本研究成功合成了三嵌段聚合物PPP,通过静电载药原理制备了载 $\text{As}_2\text{O}_3$ 的PPP纳米粒,该纳米递药系统具有低pH环境缓释药物的特性。此外,因 $\text{As}_2\text{O}_3$ -PPP-NPs表面荷正电,能被细胞迅速摄取,并实现溶酶体逃逸。本研究将为 $\text{As}_2\text{O}_3$ -PPP-NPs体内药效学考察奠定基础,为半衰期短、治疗窗窄的毒性药物新型纳米制剂的构建研究提供参考。

#### 参考文献

- [1] Wang Z Y, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: From highly fatal to highly curable [J]. *Blood*, 2008, 111(5): 2505-2515.
- [2] Komatsu N. Guest editorial: Acute promyelocytic leukemia: Change from “highly fatal to highly curable” leukemia [J]. *Int J Hematol*, 2014, 100(1): 16-17.
- [3] 蔡宝,魏为添,刘岸,等.三氧化二砷对胰腺癌BXPc-细胞移植瘤的体内抑制作用[J].*中草药*, 2010, 41(1): 90-93.
- [4] 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.
- [5] Akhtar A, Wang S X, Ghali L, et al. Recent advances in arsenic trioxide encapsulated nanoparticles as drug delivery agents to solid cancers [J]. *J Biomed Res*, 2017, 31(3): 177-188.
- [6] Emi N. *Arsenic Trioxide: Clinical Pharmacology and Therapeutic Results* [M]. Singapore: Springer, 2017.
- [7] Peng Y, Zhao Z, Liu T, et al. Smart human-serum-albumin- $\text{As}_2\text{O}_3$  nanodrug with self-amplified folate receptor-targeting ability for chronic myeloid leukemia treatment [J]. *Angew Chem Int Edit*, 2017, 56(36): 10845-10849.
- [8] 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.
- [9] Swindell E P, Hankins P L, Chen H M, et al. Anticancer activity of small-molecule and nanoparticulate arsenic (III) complexes [J]. *Inorg Chem*, 2013, 52(21): 12292-12304.
- [10] Shooshary S, Behtash S, Nafisi S. Arsenic trioxide binding to serum proteins [J]. *J Photochem Photobiol B-Biol*, 2015, 148: 31-36.
- [11] Song X L, You J, Wang J, et al. Preparation and investigation of arsenic trioxide-loaded polylactic acid/magnetic hybrid nanoparticles [J]. *Chem Res Chin U*, 2014, 30(2): 326-332.
- [12] Swindell E P, Hankins P L, Chen H, et al. Anticancer activity of small-molecule and nanoparticulate arsenic (III) complexes [J]. *Inorg Chem*, 2013, 52(21): 12292-12304.
- [13] Hoonjan M, Jadhav V, Bhatt P. Arsenic trioxide: Insights into its evolution to an anticancer agent [J]. *J Biol Inorg Chem*, 2018, 23(3): 313-329.
- [14] Soni N, Dhiman R C. Phytochemical, anti-oxidant, larvicidal, and antimicrobial activities of castor (*Ricinus communis*) synthesized silver nanoparticles [J]. *Chin Herb Med*, 2017, 9(3): 289-294.
- [15] 张燕,费伟东,陶姣阳,等. 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[J].*中草药*, 2018, 49(6): 1289-1297.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 费伟东,陶姣阳,宋倩倩,等.生物可降解介孔硅纳米粒的研究进展[J].*药学报*, 2018, 53(5): 1-11.
- [19] Lachelt U, Wagner E. Nucleic acid therapeutics using polyplexes: A journey of 50 years (and beyond) [J]. *Chem Rev*, 2015, 115(19): 11043-11078.
- [20] 陈丹飞,朱永琴,张源,等.大黄酸PEG-PCL-PEI纳米粒的制备及体外评价[J].*中国中药杂志*, 2017, 42(16): 3121-3130.
- [21] Wang L, Zhang J, An Y, et al. A study on the thermochemotherapy effect of nanosized  $\text{As}_2\text{O}_3$ /MZF thermosensitive magnetoliposomes on experimental

- hepatoma *in vitro* and *in vivo* [J]. *Nanotechnology*, 2011, 22(31): 315102.
- [22] Lu Y, Han S, Zheng H, *et al.* A novel RGDyC/PEG co-modified PAMAM dendrimer-loaded arsenic trioxide of glioma targeting delivery system [J]. *Int J Nanomed*, 2018, 13: 5937-5952.
- [23] Magalie M C, Anaïs A C, Jean-Luc P, *et al.* Hemolysis by surfactants—A review [J]. *Adv Colloid Interfac Sci*, 2016, 228: 1-16.
- [24] Zhang Q, Vakili M R, Li X F, *et al.* Polymeric micelles for GSH-triggered delivery of arsenic species to cancer cells [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(25): 7088-7100.
- [25] Winter N, Murphy R, O'Halloran T, *et al.* Development and modeling of arsenic-trioxide loaded thermosensitive liposomes for anticancer drug delivery [J]. *J Liposome Res*, 2011, 21(2): 106-115.
- [26] Kanamala M, Wilson W R, Yang M M, *et al.* Mechanisms and biomaterials in pH-responsive tumour targeted drug delivery: A review [J]. *Biomaterials*, 2016, 85: 152-167.
- [27] Blanco E, Shen H, Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery [J]. *Nat Biotechnol*, 2015, 33(9): 941-951.
- [28] Maeda H, Nakamura H, Fang J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging *in vivo* [J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2013, 65(1): 71-79.
- [29] 冉 伶, 刘文君. 三氧化二砷抗肿瘤作用机制研究进展 [J]. *中国医药科学*, 2012, 2(1): 39-40.
- [30] Miller W H, Schipper H M, Lee J S, *et al.* Mechanisms of action of arsenic trioxide [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(14): 3893.
- [31] Kanamala M, Wilson W R, Yang M, *et al.* Mechanisms and biomaterials in pH-responsive tumour targeted drug delivery: A review [J]. *Biomaterials*, 2016, 85: 152-167.
- [32] Mura S, Nicolas J, Couvreur P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery [J]. *Nat Mater*, 2013, 12(11): 991-1003.