

• 药剂与工艺 •

载三氧化二砷脑胶质瘤靶向纳米递药系统 iRGD/TGN-PEG-PAMAM/ATO 的构建及体外研究

倪文娟¹, 马 瑞^{2#}, 陆燕平², 陈晓劼², 程 瀛², 李范珠^{2*}

1. 浙江医药高等专科学校, 浙江 宁波 315100

2. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 311400

摘要: 目的 以树状大分子为载体材料并修饰血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 靶向短肽 TGN 和肿瘤靶向短肽 iRGD 构建脑胶质瘤靶向递药系统 (iRGD/TGN-PEG-PAMAM/ATO), 旨在解决三氧化二砷 (arsenic trioxide, As₂O₃, ATO) 在治疗脑胶质瘤过程中分布缺乏特异性、透 BBB 难等问题, 使其具有更好抗脑胶质瘤作用。方法 核磁共振图谱 (¹H-NMR)、透射电子显微镜 (TEM) 等考察载体的理化性质; 电感耦合等离子体发射光谱 (ICP)、透析袋法分析其包封率及体外释放情况; 通过激光共聚焦及流式细胞仪分析 iRGD、TGN 对细胞摄取的影响; MTT 法考察纳米载体对脑微血管内皮细胞 (HBMEC) 和脑胶质瘤 U87 细胞的毒性及 BBB 模型中递药系统抑制 U87 细胞生长的情况。结果 成功合成了 iRGD/TGN-PEG-PAMAM 载体, 其形态规整, 大小均匀, 测得其粒径 (24.87±0.84) nm, 电位 (17.26±1.64) mV; 该载体对 HBMEC 和 U87 细胞均具有较小的毒性; 递药系统 iRGD/TGN-PEG-PAMAM/ATO 的包封率为 (71.92±1.17) %, 体外释放表明 ATO 经载体包载后呈现一种缓慢释放趋势, 且在酸性条件下更有利于 ATO 的释放; 细胞摄取结果提示 iRGD/TGN 的修饰有利于 U87 细胞对递药系统的摄取; 体外跨 BBB 抑制 U87 细胞生长实验结果表明, iRGD/TGN-PEG-PAMAM/ATO 组具有更好的跨 BBB 抑制 U87 细胞生长效果。结论 iRGD/TGN-PEG-PAMAM/ATO 脑胶质瘤靶向递药系统具有较好的体外跨 BBB 抑制 U87 细胞生长的效果, 为脑胶质瘤治疗提供了新的策略。

关键词: iRGD; TGN; 脑胶质瘤; 靶向递药系统; 三氧化二砷

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)09-2049-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.09.007

Preparation and *in vitro* evaluation of arsenic trioxide-loaded glioma targeting drug delivery system iRGD/TGN-PEG-PAMAM/ATO

NI Wen-juan¹, MA Rui², LU Yan-ping², CHEN Xiao-jie², CHENG Ying², LI Fan-zhu²

1. Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 315100, China

2. School of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311400, China

Abstract: Objective To construct a glioma targeting delivery system, PAMAM G5 were modified with the oligopeptide of blood brain barrier (BBB) targeting TGN and tumor targeting oligopeptide iRGD to solve the problem of non-specificity in distribution and difficulty in permeating BBB of ATO, in order to have better anti-glioma effect. **Methods** The physical and chemical properties of nanocarriers were investigated by ¹H-NMR and transmission electron microscopy (TEM); The encapsulation efficiency and *in vitro* release were analyzed by inductively coupled plasma emission spectrum (ICP) and dialysis bag method; The effects of iRGD and TGN on cellular uptake of the carriers were analyzed by laser confocal and flow cytometry. The cytotoxicity of nanocarriers on brain

收稿日期: 2019-01-28

基金项目: 国家自然科学基金项目: 双重血脑屏障靶向定位释放水蛭素融合蛋白基因给药系统研究 (81603303); 国家自然科学基金面上项目“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靶向及机理研究 (81673607)

作者简介: 倪文娟 (1983—), 女, 实验员, 研究方向为药物新剂型与新技术。Tel: 18768549858 E-mail: 158016248@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

#并列第一作者 马 瑞 (1995—), 女, 在读硕士, 研究方向为药物新剂型与新技术。Tel: 15700068196 E-mail: marui1995@vip.qq.com

microvascular endothelial cells (HBMEC) and glioma cells (U87), the inhibition effect on U87 cells of drug delivery systems after acrossing the BBB model *in vitro* were investigated by MTT method. **Results** The iRGD/TGN-PEG-PAMAM was synthesized successfully. The TEM results showed that iRGD/TGN-PEG-PAMAM was regular in shape and uniform in size. The particle size of iRGD/TGN-PEG-PAMAM/ATO was (24.87 ± 0.84) nm and the potential was (17.26 ± 1.64) mV. The synthesized carrier had less toxicity to HBMEC and U87 cells. The encapsulation efficiency of iRGD/TGN-PEG-PAMAM/ATO delivery system was $(71.92 \pm 1.17)\%$. The *in vitro* release showed that ATO had a slow release trend after entrapment, and it was more favorable for ATO release under acidic conditions. The cell uptake indicated that iRGD/TGN modification was more beneficial for U87 cell to uptake the drug delivery system. The *in vitro* inhibition effect on U87 cells after acrossing the BBB model showed iRGD/TGN-PEG-PAMAM/ATO had better inhibition effect on U87 cells. **Conclusion** The iRGD/TGN-PEG-PAMAM/ATO targeting drug delivery system has good inhibition effect on U87 cells effect after acrossing the BBB model *in vitro*, which provides a new strategy for the treatment of glioma. **Key words:** iRGD; TGN; glioma; targeting drug delivery system; arsenic trioxide

脑胶质瘤是中枢神经系统常见的原发性恶性肿瘤, 发病率及复发率高, 中位生存期短^[1-3]。常见的脑胶质瘤治疗方法包括手术治疗、放射治疗和化学治疗, 其中手术切除联合化疗是目前治疗脑胶质瘤的主要手段, 但肿瘤细胞呈浸润性生长, 与正常脑组织无明显界限, 其表现为指状深入破坏脑组织, 所以即使手术也不能够完全切除, 残留的脑胶质瘤细胞在手术后大量增殖而导致肿瘤的复发^[4]。

纳米技术以及高分子材料的快速发展为新型递药系统带来了全新的机遇和挑战, 其中聚酰胺-胺树状大分子 (PAMAM) 因其自身结构优势被广泛应用于递药系统的研究, 其具有粒径可控、稳定性好、表面有大量可修饰的末端基团 (如羟基、羧基、氨基等)、生物相容性好等优点^[5-6]。

为了提高细胞、组织等部位的药物浓度, 可在递药系统表面修饰各种配体, 通过配体和细胞表面的受体特异性相互作用来增加细胞的摄取以提高细胞、组织等部位的药物浓度。其中 $\alpha_v\beta_3$ 整合素是大多数肿瘤及其新生血管内皮高表达的受体, 而 RGD (Arg-Gly-Asp) 三肽序列是其特异性配体, 其中 iRGD (CRGDK/RGPD/EC) 具有较强的肿瘤渗透能力^[7-9]。另外 TGN (TGNYKALHPHNG) 是由 12 个氨基酸组成的多肽, 具有靶向、促进纳米粒渗透 BBB 的作用, 是较好的修饰配体^[10-11]。本研究将具有肿瘤靶向的 iRGD 肽以及 BBB 靶向的 TGN 肽共修饰于 PAMAM 表面并包载抗肿瘤药物三氧化二砷 (arsenic trioxide, As_2O_3 , ATO)^[12-15], 构建一种具有靶向脑胶质瘤、促 BBB 渗透的双功能的靶向递药系统 (iRGD/TGN-PEG-PAMAM/ATO)。

1 材料与仪器

Millipore Amicon Ultra-4 超滤管、超纯水仪, 美国 Millipore 公司; 立式低温离心机, 湖南赫西仪

器公司; MTN-2800D 氮吹仪, 天津奥特赛恩斯仪器公司; DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器, 河南巩义科华仪器有限公司; Mercury Plus600 核磁共振仪, 瑞士 Bruker 公司; Nano-ZS90 纳米粒度-电位分析仪, 英国 Malvern 仪器有限公司; HT7700 透射电子显微镜 (TEM), 日本 Hitachi 公司; Labconco 真空冷冻干燥机, 美国 Labconco 公司; SpectraMax M2 酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; CO₂ 培养箱, 美国 Thermo 公司; Guava Easycyte 流式细胞仪, 德国 Merck Millipore 公司; 激光共聚焦显微镜, 日本 Olympus 公司。

As_2O_3 , 质量分数 99.9%, 苏州诺德派森公司; 第 5 代聚酰胺-胺树状大分子 (PAMAM G5, 为其 5% 甲醇溶液)、异硫氰酸荧光素 (FITC), 美国 Sigma-Aldrich 公司; 甲氧基-聚乙二醇-琥珀酰亚胺乙酸酯 [methoxy PEG succinimidyl carboxymethyl ester, mPEG₃₀₀₀-NHS, 相对分子质量 (M_w) 3 000]、马来酰亚胺-聚乙二醇-琥珀酰亚胺琥珀酸酯 (maleimide-PEG-NHS ester, MAL-PEG₃₅₀₀-NHS), 北京键凯科技有限公司; iRGD、TGN 肽 (CRGDK/RGPD/EC、TGNYKALHPHNGC), 上海吉尔生化有限公司; β -巯基乙醇, 上海晶纯试剂有限公司; 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐 (MTT)、4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI), 美国 Sigma 公司; RPMI 1640 培养液、0.25% 胰蛋白酶、胎牛血清, 美国 Gibco 公司; 青-链霉素溶液, 杭州四季青公司; 其余试剂均为分析纯。人脑微血管内皮细胞 (HBMEC)、人恶性脑胶质瘤 U87 细胞均由浙江中医药大学动物实验研究中心提供。

2 方法与结果

2.1 iRGD/TGN-PEG-PAMAM 的合成

精密称取 MAL-PEG₃₅₀₀-NHS (M_w 3 500, 9.2

μmol), 迅速加入含有 iRGD (M_w 950.06, $9.2 \mu\text{mol}$) 或 TGN (M_w 1 411.54, $9.2 \mu\text{mol}$) 的 NaAc-HAc 缓冲液 (0.1 mol/L , $\text{pH } 6.0$) 中, 涡旋 30 s 后, 生成 iRGD-PEG-NHS 或 TGN-PEG-NHS; 将此反应液加入含有 $0.2 \mu\text{mol}$ PAMAM 的 0.05 mol/L 硼砂-NaOH 缓冲液 ($\text{pH } 9.2$), 使 iRGD (TGN)/MAL-PEG-NHS/PAMAM 最终物质的量比为 $45:45:1$ 。反应过夜后, 调节反应液 pH 至 7.0 , 并加入 $9.2 \mu\text{L}$ β -巯基乙醇。继续反应 1 h 后, 于超滤管 (截留 M_w $10\ 000$) $4\ 000 \text{ r/min}$ 离心 20 min , 反复离心至无游离的 PEG。收集离心浓缩后的产物复溶于 $\text{pH } 8.0$ 磷酸盐缓冲液 (PBS) 中, 向其中加入 mPEG₃₀₀₀-NHS, 使 PAMAM 与 PEG 的最终反应物质的量比为 $1:64$ 。反应 48 h 后除去未反应的 PEG, 冷冻干燥得到白色疏松固体 iRGD-PEG-PAMAM 或 TGN-PEG-PAMAM。

精密称取 MAL-PEG₃₅₀₀-NHS (M_w $3\ 500$, $18.4 \mu\text{mol}$), 迅速加入含有 iRGD (M_w $1\ 093.22$, $9.2 \mu\text{mol}$) 的 0.1 mol/L NaAc-HAc 缓冲液中 ($\text{pH } 6.0$) 中, 涡旋 30 s 后生成 iRGD-PEG-NHS; 将此反应液加入含有 $0.2 \mu\text{mol}$ PAMAM 的 0.05 mol/L 硼砂-NaOH 缓冲液 ($\text{pH } 9.2$), 反应 3 h 后, 加入 TGN ($9.2 \mu\text{mol}$) 使 iRGD/TGN/MAL-PEG-NHS/PAMAM 最终物质的量比为 $45:45:90:1$ 。反应过夜后, 调节反应液 pH 值至 7.0 , 并加入 $9.2 \mu\text{L}$ β -巯基乙醇。继续反应 1 h 后, 于超滤管 $4\ 000 \text{ r/min}$ 离心 20 min , 反复离心至无游离的 PEG。TLC 检测游离 PEG, 条件为 (甲醇-氯仿 $1:1$, 碘蒸汽显色), 收集离心浓缩后的产物复溶于 $\text{pH } 8.0$ 的 PBS 中, 向其中加入 mPEG₃₀₀₀-NHS, 使 PAMAM 与 PEG 的最终反应物质的量比为 $1:64$ 。反应 48 h 后除去未反应的 PEG, 冷冻干燥, 得到白色疏松固体 iRGD/TGN-PEG-PAMAM。

经反应后的 iRGD-PEG-PAMAM、TGN-PEG-PAMAM、iRGD/TGN-PEG-PAMAM 均为白色疏松固体, 其产率分别是 65.82% 、 61.29% 和 54.87% 。

2.2 iRGD/TGN-PEG-PAMAM 的表征

2.2.1 $^1\text{H-NMR}$

以重水 (D_2O) 为溶剂, 通过核磁共振仪对 iRGD-PEG-PAMAM、TGN-PEG-PAMAM、iRGD/TGN-PEG-PAMAM 进行 $^1\text{H-NMR}$ 分析, 并根据 iRGD、TGN、PEG 和 PAMAM 的特征质子峰计算产物的 PEG 化程度和 iRGD 及 TGN 耦联个数。结果见图 1, 通过比较 iRGD、TGN、MAL-PEG-NHS、PAMAM 等产物的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱可见, δ 2.3 , 2.5 , 2.7 为 PAMAM 的特征质子峰, δ $3.60\sim 3.66$ 的宽峰和

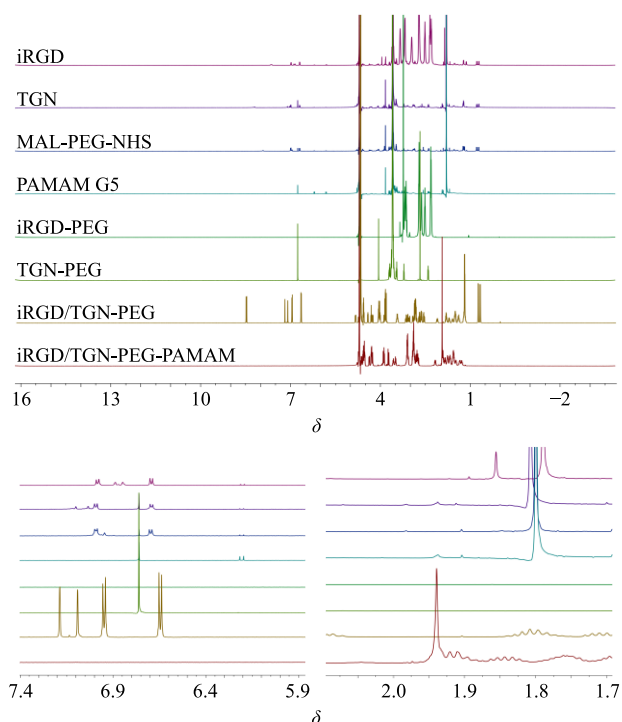


图1 iRGD、TGN、MAL-PEG-NHS、PAMAM G5、iRGD-PEG、TGN-PEG、iRGD/TGN-PEG、iRGD/TGN-PEG-PAMAM 的 $^1\text{H-NMR}$ 图谱

Fig. 1 $^1\text{H-NMR}$ of iRGD, TGN, MAL-PEG-NHS, PAMAM G5, iRGD-PEG, TGN-PEG, iRGD/TGN-PEG and iRGD/TGN-PEG-PAMAM

δ 3.00 处的单峰分别是 PEG 中 $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 和 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CONH}-$ 的特征峰, δ $1.9\sim 2.1$ 为 iRGD 中乙酰基甲基上的 H, 为 iRGD 的特征峰, δ 6.7 和 δ 6.9 左右为 TGN 酚环上的 H_a 和 H_b , 是 TGN 的特征峰^[16-17]。在 iRGD 的 $^1\text{H-NMR}$ 图中可以看到在 δ 1.95 处有很明显的峰, 但是在 TGN、MAL-PEG-NHS、PAMAM 以及 TGN-PEG 中都没有, 而在 iRGD-PEG、iRGD/TGN-PEG 以及 iRGD/TGN-PEG-PAMAM 中有很小的峰, 这说明 iRGD 的成功键合。另外通过对各结构进行氢谱图的归属分析, 在 δ 2.3 , 2.5 , 2.7 这 3 簇峰为 PAMAM G5 的特征质子峰, 其积分面积比例基本维持 $2:1:2$, 在 δ 2.3 左右的一般按照 504 个 H 计算; δ 6.7 和 δ 6.9 左右为 TGN 中酚环上的 H_a 和 H_b , 以 δ 2.3 左右的特征质子峰为基数, 按照 504 个 H 计算, 则 δ 6.7 和 δ 6.9 H_a 和 H_b 分别为 4.38 个 H 和 4.47 个 H, 即每个 PAMAM 上平均接有 4 个 TGN 分子, 同理计算得约有 10 个 iRGD, 32 个 PEG 被成功键合于 iRGD/TGN-PEG-PAMAM 上。

2.2.2 平均粒径、Zeta 电位考察

取适量的 PAMAM、iRGD-PEG-PAMAM、TGN-PEG-PAMAM、

iRGD/TGN-PEG-PAMAM 溶于超纯水中,通过纳米粒度-电位分析仪测定平均粒径、电位分布。各载体的粒径分布和 Zeta 电位结果见表 1,与未经修饰的 PAMAM 相比,经修饰后的 iRGD-PEG-PAMAM、TGN-PEG-PAMAM、iRGD/TGN-PEG-PAMAM 的粒径均有所增加,而 Zeta 电位下降,但仍保持正电性。

表 1 PAMAM、iRGD-PEG-PAMAM、TGN-PEG-PAMAM、iRGD/TGN-PEG-PAMAM 的粒径和 Zeta 电位 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 1 Particle size and Zeta potential of PAMAM, iRGD-PEG-PAMAM, TGN-PEG-PAMAM, and iRGD/TGN-PEG-PAMAM ($\bar{x} \pm s, n=3$)

样品	粒径/nm	Zeta 电位/mV
PAMAM	5.84 $\pm$ 0.26	25.57 $\pm$ 1.37
iRGD-PEG-PAMAM	18.38 $\pm$ 1.38	23.17 $\pm$ 2.90
TGN-PEG-PAMAM	21.79 $\pm$ 1.70	23.83 $\pm$ 2.22
iRGD/TGN-PEG-PAMAM	24.87 $\pm$ 0.84	17.26 $\pm$ 1.64

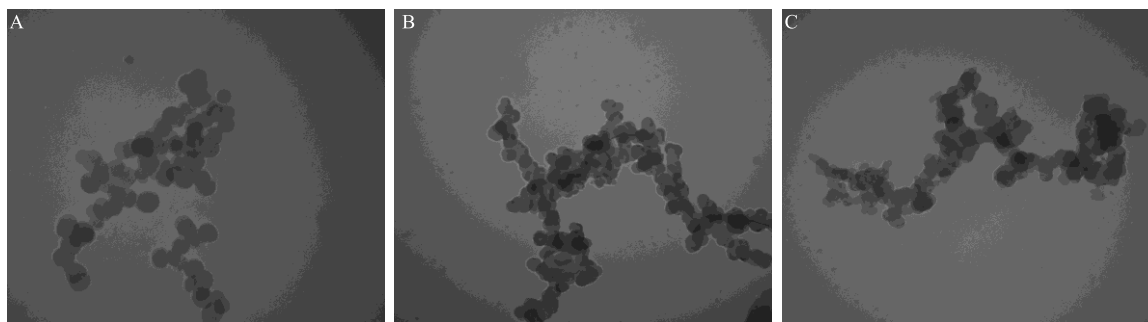


图 2 iRGD-PEG-PAMAM (A)、TGN-PEG-PAMAM (B) 和 iRGD/TGN-PEG-PAMAM (C) 的 TEM 图 (bar = 200 nm)
Fig. 2 TEM images of iRGD-PEG-PAMAM (A), TGN-PEG-PAMAM (B), and iRGD/TGN-PEG-PAMAM (C) (bar = 200 nm)

光反应 24 h, 超纯水透析后超滤离心, 除去游离 FITC, 冷冻干燥, 得黄色疏松固体。

FITC 通过硫脲基键与 PAMAM 上的氨基偶联, 在 δ 6.4~7.0 处为 FITC 的芳香环质子峰, δ 7.0~8.0 处为硫脲基末端的亚甲基质子峰。如图 3 所示, 在 δ 6.4 和 δ 7.0~8.0 处出现了 FITC 的特征峰, 由此可见 FITC 的成功标记。通过峰面积归一化法, 将 FITC 结构中 3 个苯环结构上的质子峰 (δ 6.4 左右) 与 PAMAM 在 δ 2.35 处特征峰的质子氢之比计算, 得每分子 PAMAM 约耦联 12 个 FITC。

2.4 iRGD/TGN-PEG-PAMAM 的细胞毒性

取对数生长期的 HBMEC 和 U87 细胞, 分别用胰酶消化后, 加入细胞培养液吹打分散均匀并制备成细胞悬液 (5×10^4 个/mL)。取 100 μ L 的细胞悬液接种于 96 孔板中, 37 $^{\circ}$ C 孵育过夜。将 PAMAM、iRGD-PEG-PAMAM、TGN-PEG-PAMAM 和 iRGD/TGN-PEG-PAMAM 分别配制成相同的浓度梯度,

2.2.3 形态观察 取适量 iRGD-PEG-PAMAM、TGN-PEG-PAMAM、iRGD/TGN-PEG-PAMAM 溶于超纯水中, 使各样品终质量浓度为 4 mg/mL, 滴于铜网上, 干燥后在 TEM 下观察其外观形态。

iRGD/TGN-PEG-PAMAM 的 TEM 图见图 2, 其为球形、形态规整, 大小均匀。直观粒径在 40 nm 左右, 但由于经过 PEG 修饰后 PAMAM 表面的氨基被部分修饰, 其 Zeta 电位有所减小, 导致分子间斥力减小, 故出现部分聚集现象。在各样品的透射电镜图中, 3 者形态和粒径未见显著差异。

2.3 iRGD/TGN-PEG-PAMAM 纳米载体的荧光标记

称取适量 iRGD-PEG-PAMAM、TGN-PEG-PAMAM、iRGD/TGN-PEG-PAMAM 分别溶于超纯水中, 加入 10 μ L 含有 0.82 mg FITC 的 DMSO 溶液, 使各反应以 FITC-PAMAM (12:1) 进行。室温避

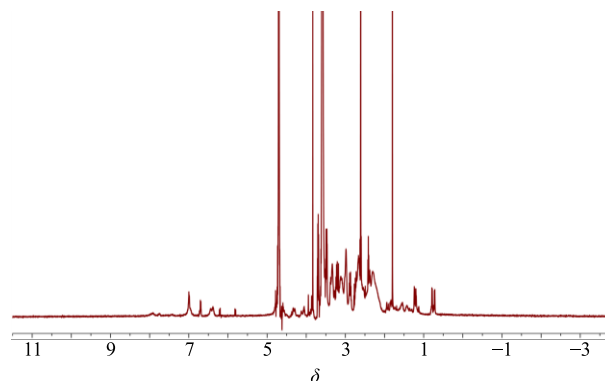


图 3 iRGD/TGN-PEG-PAMAM-FITC 的 $^1\text{H-NMR}$
Fig. 3 $^1\text{H-NMR}$ of iRGD/TGN-PEG-PAMAM-FITC

然后向上述 96 孔板中每孔加入 25 μ L 各药物, 每组 6 个复孔。同时以 PBS 作为对照组, 培养 48 h 后, 每孔加入 31.5 μ L MTT (5 mg/mL), 继续培养 4 h 后终止培养, 弃去含 MTT 的培养液, 每孔加入 200 μ L DMSO, 于微量振荡器上震荡 10 min 后用酶标仪测定其 490 nm 处的吸光度 (A) 值, 根据公式计

算细胞存活率。实验重复 3 次。

细胞存活率 = $A_{\text{样品}}/A_{\text{对照}}$

$A_{\text{样品}}$ 为不同质量浓度样品的 A 值, $A_{\text{对照}}$ 为空白细胞的 A 值

PAMAM、iRGD-PEG-PAMAM、TGN-PEG-PAMAM 和 iRGD/TGN-PEG-PAMAM 对 U87 和 HBMEC 细胞的毒性结果见图 4, 4 者的细胞毒性均具有浓度依赖性。当载体浓度等于 $10 \mu\text{mol/L}$ 时, iRGD/TGN-PEG-PAMAM 组 HBMEC 和 U87 细胞的存活率均高于 80% (PAMAM 组为 41.00%、14.40%), 表明这 3 种载体均具有较好的体外安全性。PAMMA 对 HBMEC 细胞和 U87 细胞的 IC_{50} 分别为 21.64、7.46 $\mu\text{mol/L}$, 与 HBMEC 细胞相比, U87 细胞对载体毒性更为敏感。

2.5 U87 细胞对 iRGD/TGN-PEG-PAMAM 的细胞摄取

2.5.1 细胞共定位 取对数生长期的 U87 细胞以 4×10^4 个/孔接种于激光共聚焦玻底培养皿小室中, 培养 24 h 后吸去培养液, PBS 洗涤 3 次, 分别加入含 FITC 标记的 iRGD-PEG-PAMAM、TGN-PEG-

PAMAM 和 iRGD/TGN-PEG-PAMAM 无血清培养液 (FITC 的终浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$), 4 h 后吸除培养液, 预冷的 PBS 漂洗 3 次。用 4% 多聚甲醛固定 15 min 后弃去, PBS 漂洗 3 次后加入 Phalloidin 孵育 20 min, PBS 漂洗 3 次, 随后加入 0.5 mL DAPI ($0.2 \mu\text{g/mL}$) 孵育 20 min 后弃去, PBS 漂洗 3 次, 于激光共聚焦显微镜下观察各载体的分布情况。

采用激光共聚焦显微镜观察 U87 细胞对 iRGD-PEG-PAMAM、TGN-PEG-PAMAM 和 iRGD/TGN-PEG-PAMAM 摄取的实验结果见图 5。经标记后的载体呈现绿色荧光, 经 Phalloidin 染色后的细胞骨架呈现红色荧光, 经 DAPI 染色后的细胞核呈现蓝色荧光。通过 3 者的叠加图定性分析可见, iRGD-PEG-PAMAM、TGN-PEG-PAMAM 和 iRGD/TGN-PEG-PAMAM 均能被 U87 细胞摄取, TGN-PEG-PAMAM 的荧光强度弱于 iRGD-PEG-PAMAM 及 iRGD/TGN-PEG-PAMAM。

2.5.2 流式细胞术 取对数生长期的 U87 细胞以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板, 24 h 后分别加入经 FITC 标记的 iRGD-PEG-PAMAM、TGN-PEG-PAMAM 和 iRGD/TGN-PEG-PAMAM 载体材料, 分别于 0.5、1.0、4.0 h 后收集各组细胞, 以不含载体培养的空白细胞作为阴性对照, 流式细胞仪定量分析各组细胞摄取率。流式细胞仪定量分析 U87 细胞对 iRGD-PEG-PAMAM、TGN-PEG-PAMAM 和 iRGD/TGN-PEG-PAMAM 摄取情况, 结果见图 6, 在 0.5 h, U87 细胞摄取载体的量明显少于 1 h 和 4 h, U87 细胞对各载体的摄取具有时间依赖性, 其中 iRGD-PEG-PAMAM 和 iRGD/TGN-PEG-PAMAM 处理组之间无明显差异 ($P > 0.05$)。流式细胞仪检测结果表明 iRGD 修饰可以显著提高 U87 细胞对载体的摄取量。这与细胞共定位实验结果一致。

2.6 iRGD/TGN-PEG-PAMAM/ATO 的包封率测定

分别称取 20 mg 冷冻干燥的 iRGD-PEG-PAMAM、TGN-PEG-PAMAM 和 iRGD/TGN-PEG-PAMAM 溶于 2 mL 超纯水中, 加入 2 mL ATO 母液 (10 mg/mL), 搅拌 (150 r/min) 反应过夜 (24 h)。于截流相对分子质量为 3 000 的 Millipore 超滤离心管中, 超滤除去游离砷盐。收集超滤后的下滤液, ICP 测定下滤液中砷元素的质量浓度, 根据公式计算包封率。冷冻干燥后于 -80°C 保存。

包封率 = $(W_0 - W_1)/W_0$

W_0 为总投药量, W_1 为游离药量

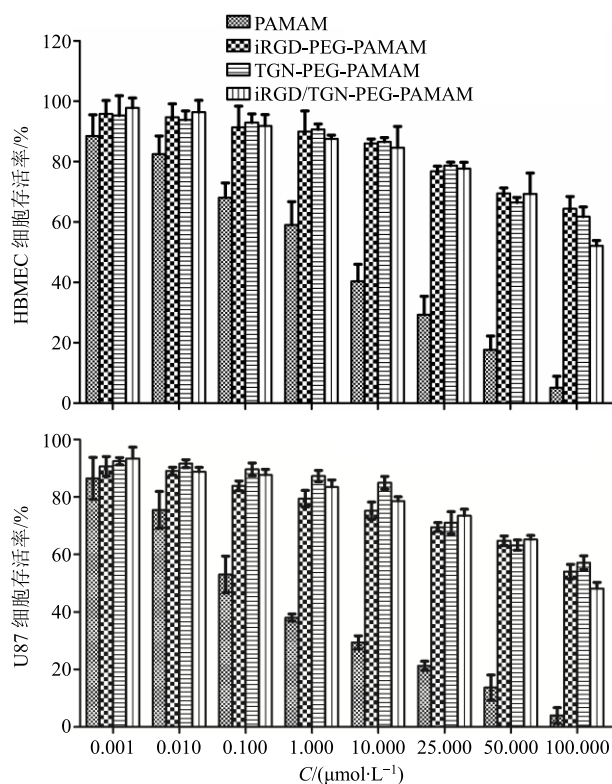


图 4 PAMAM、iRGD-PEG-PAMAM、TGN-PEG-PAMAM 和 iRGD/TGN-PEG-PAMAM 对 U87 及 HBMEC 细胞的毒性 ($n = 6$)

Fig. 4 Viabilities of HBMEC cells and U87 cells after being treated with PAMAM, iRGD-PEG-PAMAM, TGN-PEG-PAMAM, and iRGD/TGN-PEG-PAMAM ($n = 6$)

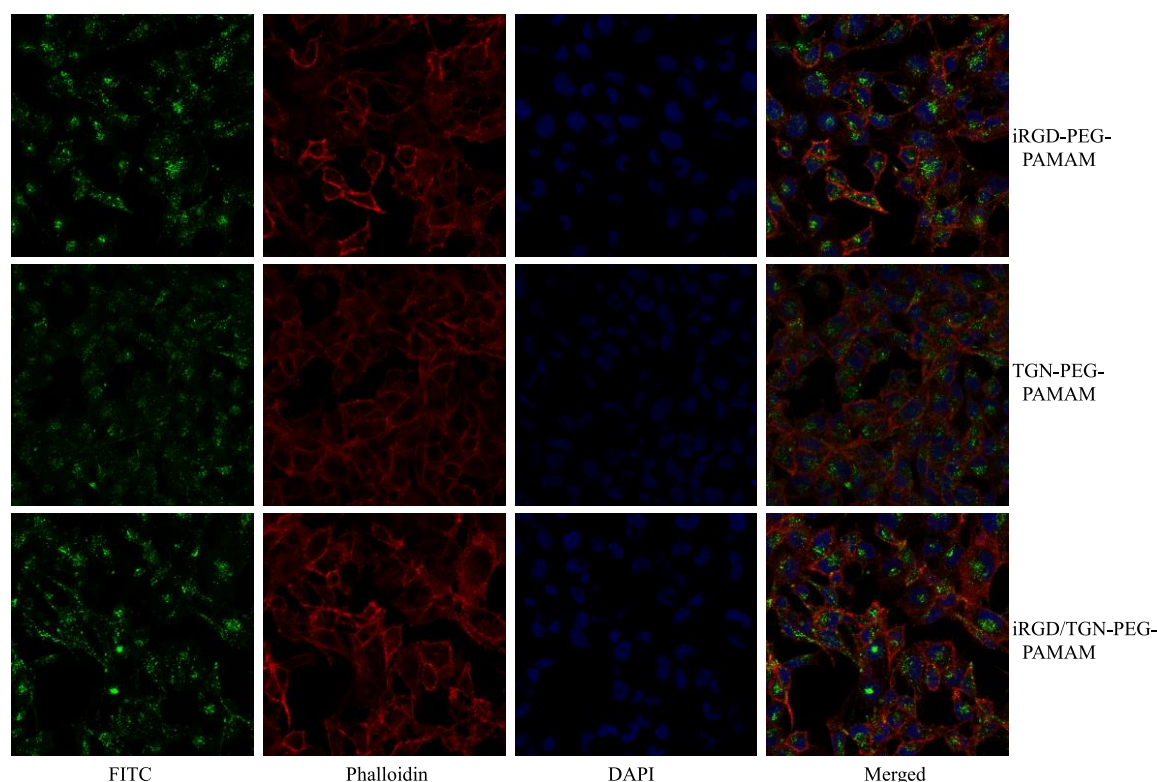


图 5 CLSM 观察 FITC 标记的 iRGD-PEG-PAMAM、TGN-PEG-PAMAM 和 iRGD/TGN-PEG-PAMAM 孵育 4 h 后, FITC 标记的载体在 U87 细胞内的分布

Fig. 5 Confocal images of U87 cells incubated with FITC modified iRGD-PEG-PAMAM-FITC, TGN-PEG-PAMAM-FITC, and iRGD/TGN-PEG-PAMAM-FITC for 4 h

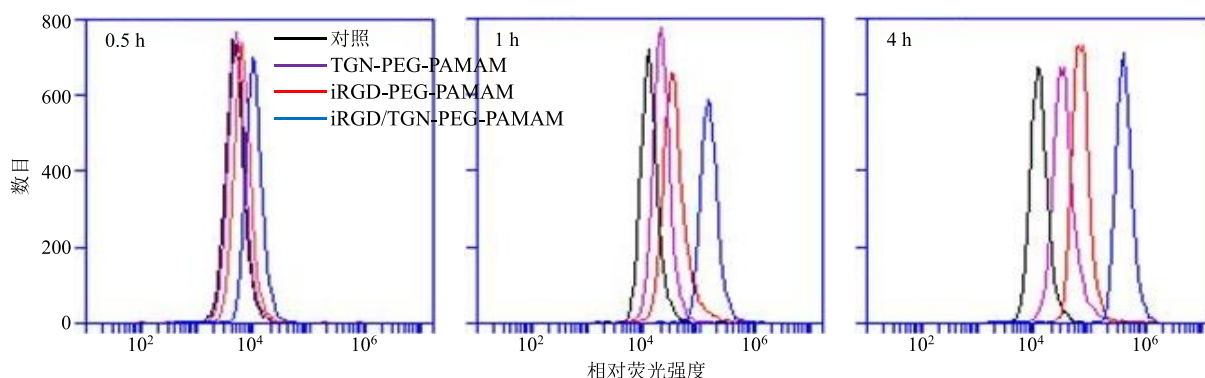


图 6 流式细胞仪检测经 FITC 标记的 iRGD-PEG-PAMAM、TGN-PEG-PAMAM 和 iRGD/TGN-PEG-PAMAM 处理 U87 细胞在 0.5、1、4 h 的摄取情况

Fig. 6 Flow cytometry profiles of U87 cells incubated with FITC modified iRGD-PEG-PAMAM, TGN-PEG-PAMAM, and iRGD/TGN-PEG-PAMAM at 0.5, 1, and 4 h

经过 ICP 测定和计算, iRGD-PEG-PAMAM/ATO、TGN-PEG-PAMAM/ATO 和 iRGD/TGN-PEG-PAMAM/ATO 的包封率分别为 $(67.68 \pm 0.40) \%$ 、 $(69.27 \pm 0.34) \%$ 、 $(71.92 \pm 1.17) \%$ 。

2.7 iRGD/TGN-PEG-PAMAM/ATO 体外释放性能的测定

透析袋法考察递药系统 iRGD/TGN-PEG-PAMAM/ATO 的体外释放特性。取 iRGD/TGN-

PEG-PAMAM/ATO 分别溶于 1 mL pH 7.4 和 pH 5.0 的 PBS 释放介质中, 放入经预处理的透析袋中。将装有各递药系统的透析袋置于 100 mL 的不同 pH 的 PBS 释放介质中, 37 °C 恒温水浴振荡 (75 r/min)。分别在预定时间点 (0.25、0.5、1、2、3、4、6、12、24、36、48 h) 取样 1 mL, 同时补加等量同温的空白释放介质。将各时间点的样品经过 0.45 μm 微孔滤膜后用 ICP 进行测定。根据已经建立的标准曲线

回归方程计算药物质量浓度, 并按照公式计算药物累积释放率 (Q)。

$$Q = (VC_n + \sum_{i=1}^{n-1} C_i V_Q) / m$$

m 为透析袋内 ATO 的量, C_n 为第 n 个时间点释放介质的药物浓度, V 为释放介质的体积, Q 为第 i 个时间点释放介质的药物浓度, V_Q 为取样体积

递药系统 iRGD/TGN-PEG-PAMAM/ATO 的体外释放特性考察采用 pH 为 7.4、5.0 的 PBS 缓冲液为释放介质, 测定并计算各时间点 ATO 的 Q (图 7), 在 pH 7.4, 12 h 之前 iRGD/TGN-PEG-PAMAM/ATO 的药物 Q 为 $(64.36 \pm 2.83)\%$, 而在 pH 5.0 的条件下, 12 h 之前的 Q 为 $(73.81 \pm 1.06)\%$ 。另外游离 ATO 在 4 h 左右基本释放完全, 而经过 iRGD/TGN-PEG-PAMAM 包载后其呈现一种缓慢释药的趋势。在 48 h 时其释放量达到 70% 以上, 另外在 pH 5.0 时, ATO 释放量较 pH 7.4 时多, 说明该递药系统释放 ATO 具有 pH 响应性释放, 有利于将 ATO 在肿瘤酸性环境下有效释放。其可能的原因是当介质为 pH 为 5.0 的酸性介质时会加速 ATO 药物向释放介质中的扩散, 而且 PAMAM 复合物中的亚胺键遇到低 pH 释放介质时可加速亚胺键的水解, 引起 PAMAM 复合物降解进而加速药物的释放。

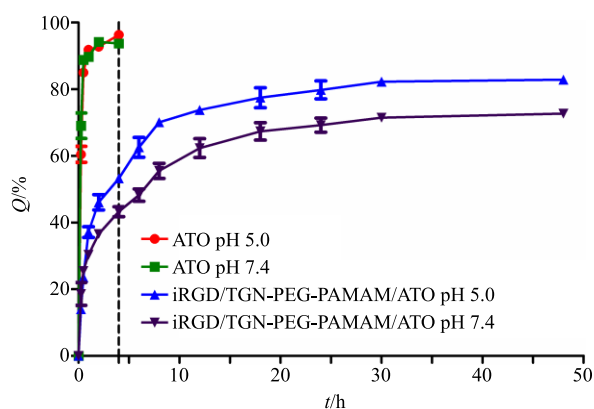


图 7 ATO 及其递药系统在 pH 5.0、7.4 条件下的体外释放曲线 ($n=3$)

Fig. 7 *In vitro* release profiles of ATO and drug delivery system at pH 5.0 and 7.4 ($n=3$)

2.8 体外跨 BBB-抑制 U87 细胞生长实验

参考文献方法制备体外 BBB 模型^[18], 取 0.5 mL 对数生长期的 HBMEC 细胞以 2.0×10^5 个/mL 接种于 12 孔 transwell 板 (膜嵌套直径 12 mm, 孔径 3 μ m, 比表面积 1.12 cm^2 , 美国康宁公司)。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养, 隔天换液, 当细胞单层跨细胞电阻大于 200

$\Omega \cdot \text{cm}^2$ 方可进行后续实验。

将 U87 细胞以 2.5×10^4 个/孔接种于 12 孔板中培养 24 h, 将成功构建的 BBB 模型供体池置于已接种 U87 细胞的 12 孔板上, 分别加入游离 ATO、iRGD-PEG-PAMAM/ATO、TGN-PEG-PAMAM/ATO 和 iRGD/TGN-PEG-PAMAM/ATO (以 ATO 浓度计, 50 $\mu\text{mol/L}$), 4 h 后移除上室, U87 细胞继续培养 48 h, MTT 法测定并计算细胞存活率。

体外跨 BBB-抑制 U87 细胞生长实验结果见表 2, ATO-sol 直接处理 U87 (未经跨体外 BBB 模型, 直接加入 ATO-sol) 时, U87 的细胞活性 (35.62%) 明显低于在体外 BBB 模型中 ATO-sol 处理时 U87 的细胞活性 (79.65%), 说明 ATO-sol 难以透过体外 BBB 模型从而导致抑制 U87 细胞活性的效果不佳。与 ATO-sol 处理组相比, iRGD/TGN-PEG-PAMAM/ATO 组 (39.24%) 具有显著性差异 ($P < 0.01$)。与 iRGD 单修饰组相比, iRGD/TGN 共修饰组与 TGN 单修饰组的跨 BBB 后抑制 U87 细胞生长作用具有显著性差异 ($P < 0.01$), 进一步验证 TGN 促进载体跨 BBB 的作用。

表 2 ATO-sol、iRGD-PEG-PAMAM/ATO、TGN-PEG-PAMAM/ATO 和 iRGD/TGN-PEG-PAMAM/ATO 在 BBB 模型中对 U87 细胞的毒性 ($n=3$)

Table 2 Toxicity of of ATO-sol, iRGD-PEG-PAMAM/ATO, TGN-PEG-PAMAM/ATO and iRGD/TGN-PEG-PAMAM/ATO on U87 cell viability after transporting across BBB ($n=3$)

组别	U87 细胞存活率/%
ATO-sol 直接处理	35.62 ± 1.27
iRGD-PEG-PAMAM/ATO	53.78 ± 5.72
TGN-PEG-PAMAM/ATO	$42.81 \pm 1.63^{##}$
iRGD/TGN-PEG-PAMAM/ATO	$39.24 \pm 3.80^{***}$
ATO-sol (BBB)	79.65 ± 3.36

与 ATO-sol 组比较: ** $P < 0.01$; 与 iRGD-PEG-PAMAM/ATO 组比较: $^{##}P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs ATO-sol group; $^{##}P < 0.01$ vs iRGD-PEG-PAMAM/ATO group

2.9 统计学处理

采用 SPSS 20.0 分析软件进行统计分析, 多组间比较采用方差分析, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 讨论

由于 PAMAM G5 表面具有大量的氨基, 而具有较大的溶血毒性, 经过 PEG 减毒修饰以及靶向肽

修饰的载体毒性在可允许范围内。同时经过 PEG 修饰的各载体对 HBMEC 以及 U87 细胞均具有较小的毒性, 另外, 与正常的细胞相比, 肿瘤细胞对载体毒性更加敏感。从载体的细胞摄取以及胞内定位结果发现, iRGD-PEG-PAMAM 和 iRGD/TGN-PEG-PAMAM 组在 U87 细胞内的荧光强度显著大于 TGN-PEG-PAMAM 组的荧光强度, 这可能是因为 iRGD 与 U87 细胞具有特异性的受体结合, 促进细胞对该载体的摄取且具有一定的时间依赖性。

PAMAM 具有纳米级尺寸和大量的内部空腔, 其生物相容性好, 生物可降解以及无免疫源性, 主要以内部空腔包埋、电荷吸附和化学键合 3 种方式结合药物, 其中 PAMAM 表面及内部基团的正电荷、内部空腔均有利于亚砷酸离子的吸附和包载^[19]。体外释放结果表明, ATO-sol 在 2 种介质中, 4 h 时已经基本完全释放, 而 3 种递药系统的释放呈现一种缓慢释放的趋势。随着 pH 的下降, ATO 递药系统的释放量增加。这种缓释及在酸性环境下的释放特性在之后的肿瘤治疗中具有一定的优势。在体外跨 BBB 抑制 U87 细胞生长实验中, ATO-sol 抑制 U87 细胞生长的作用明显下降, 而 iRGD/TGN-PEG-PAMAM/ATO 表现出更好的跨 BBB 抑制 U87 细胞生长作用。

本实验构建的 iRGD/TGN-PEG-PAMAM/ATO 递药系统具有较高的包封率, 克服了 ATO 在脑胶质瘤治疗中缺乏特异性、难透过 BBB 等缺陷, 显著提高了 ATO 在体外跨 BBB 抑制 U87 细胞生长的作用, 这对脑胶质瘤的治疗提供了新的研究策略。

参考文献

- [1] Ostrom Q T, Bauchet L, Davis F G, *et al.* The epidemiology of glioma in adults: A “state of the science” review [J]. *Neuro-Oncology*, 2014, 16(7): 896-913.
- [2] Gladson C L, Prayson R A, Liu W M. The pathobiology of glioma tumors [J]. *Annu Rev Pathol-Mech*, 2010, 5(1): 33-50.
- [3] Jiang Y, Lv L, Shi H, *et al.* PEGylated polyamidoamine dendrimer conjugated with tumor homing peptide as a potential targeted delivery system for glioma [J]. *Colloid Surface B*, 2016, 147: 242-249.
- [4] 高会乐. 基于不同靶向策略的脑肿瘤靶向递药系统设计及评价 [D]. 上海: 复旦大学, 2013.
- [5] 张洪兵, 张铁军, 李亚卓, 等. 中药新型给药系统局部药动学研究概况 [J]. *中草药*, 2015, 46(21): 3258-3263.
- [6] Maryam G, Gholamreza D, Fereydoon A G, *et al.* Surface functionalized dendrimers as controlled-release delivery nanosystems for tumor targeting [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2018, 122: 311-330.
- [7] Puig-Saus C, Rojas L A, Laborda E, *et al.* iRGD tumor-penetrating peptide-modified oncolytic adenovirus shows enhanced tumor transduction, intratumoral dissemination and antitumor efficacy [J]. *Gene Ther*, 2014, 21(8): 767-774.
- [8] Liu C, Yao S, Li X, *et al.* iRGD-mediated core-shell nanoparticles loading carmustine and O⁶-benzylguanine for glioma therapy [J]. *J Drug Target*, 2017, 25(3): 12.
- [9] 许婷, 李秀妍, 李琳, 等. 纳米有机金属框架与精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸序列短肽偶联最佳工艺 [J]. *中草药*, 2015, 46(10): 1460-1463.
- [10] Zhang C, Wan X, Zheng X, *et al.* Dual-functional nanoparticles targeting amyloid plaques in the brains of Alzheimer’s disease mice [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(1): 456-465.
- [11] 李婧炜. 噬菌体展示技术筛选脑靶向功能肽及其修饰纳米粒的脑内递药研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2012.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Sun L Y, Wang H, Zhou J. Clinical implementation of arsenic trioxide [J]. *Chin Herb Med*, 2016, 8(4): 308-313.
- [16] Wang K, Zhang X, Liu Y, *et al.* Tumor penetrability and anti-angiogenesis using iRGD-mediated delivery of doxorubicin-polymer conjugates [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(30): 8735-8747.
- [17] Qian Y, Zha Y, Feng B, *et al.* PEGylated poly(2-(dimethylamino) ethyl methacrylate)/DNA polyplex micelles decorated with phage-displayed TGN peptide for brain-targeted gene delivery [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(8): 2117-2129.
- [18] Du J, Lu W L, Ying X, *et al.* Dual-targeting topotecan liposomes modified with Tamoxifen and wheat germ agglutinin significantly improve drug transport across the blood-brain barrier and survival of brain tumor-bearing animals [J]. *Mol Pharm*, 2009, 6(3): 905-917.
- [19] Xiong Z, Shen M, Shi X. Dendrimer-based strategies for cancer therapy: Recent advances and future perspectives [J]. *Sci China Mater*, 2018, 61(11): 1387-1403.