

• 药剂与工艺 •

氧化还原响应性二氧化硅载三氧化二砷纳米递药系统的制备及体外评价

马 瑞¹, 汤红霞^{1#}, 陆燕平^{2*}, 陈晓劫¹, 李范珠^{1*}

1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

2. 杭州市富阳区第一人民医院, 浙江 杭州 311402

摘要: 目的 以介孔二氧化硅 (mesoporous silica nanoparticles, MSN) 为载体材料, 通过具有氧化还原敏感的二硫键修饰, 酰化反应连接无毒无免疫原性的聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG), 静电吸附作用负载三氧化二砷 (arsenic trioxide, As₂O₃), 构建一种载 As₂O₃ 的氧化还原响应性二氧化硅 (MSN-SS-PEG@As₂O₃) 纳米递药系统, 并进行体外评价。方法 采用共沉淀法合成二氧化硅, 以二氧化硅、(3-巯基丙基)三甲氧基硅烷、2-(2-吡啶基二硫基)乙胺盐酸盐以及甲氧基封端的 PEG 为基础, 合成氧化还原响应性载体 (MSN-SS-PEG)。通过马尔文粒度测定仪测定其粒径、Zeta 电位; 红外光谱法验证载体结构; 采用透射电镜、小角粉末衍射仪等方法考察载体的形态及理化性质; 电感耦合等离子体发射光谱法 (inductively coupled plasma emission spectrum, ICP) 考察了载 As₂O₃ 的二硫键修饰二氧化硅 (MSN-SS-NH₂@As₂O₃) 和 MSN-SS-PEG@As₂O₃ 的载药量, 利用热重分析仪进一步验证其载药量。透析袋法考察了不同 pH 条件下递药系统的体外释药特性。MTT 法考察载体以及递药系统对人正常肝细胞 (L02) 或人肝癌 HepG2 细胞的毒性。结果 MSN、MSN-SS-NH₂、MSN-SS-PEG 的电位分别为 (-13.40 ± 0.87)、(31.63 ± 0.90)、(27.70 ± 5.60) mV, 经修饰后的载体最终电位为正。MSN-SS-PEG 的粒径为 (159.60 ± 3.10) nm。透射电镜结果表明 MSN、MSN-SS-NH₂、MSN-SS-PEG 均呈圆形或类圆形; 通过 ICP 测定 MSN-SS-PEG@As₂O₃ 的载药量 4.38%; 体外释放实验结果表明 MSN-SS-PEG@As₂O₃ 具有氧化还原的敏感响应。相比于 L02 细胞, HepG2 细胞对载体的毒性更敏感, 且随着载体质量浓度的增加 MSN-SS-PEG 组的细胞存活率大于 MSN-SS-NH₂ 组, 表明 PEG 修饰可进一步降低载体的细胞毒性, 提高载体的生物相容性。另外 MTT 结果表明 MSN-SS-PEG@As₂O₃ 组抑制 HepG2 细胞生长的效果明显高于其他组。结论 载体 MSN-SS-PEG 外观圆整, 带正电, 粒径均一, 经修饰后的二氧化硅系统能在肿瘤特殊微环境下响应下释放药物, 增加药物在肿瘤部位的积累。该纳米递药系统作为肿瘤微环境响应性载体在肿瘤治疗方面具有较好的应用前景。

关键词: 三氧化二砷; 二氧化硅; 氧化还原响应; 肝癌; 纳米递药系统; 共沉淀法; 电感耦合等离子体发射光谱法; 热重分析; MTT 法; L02 细胞; HepG2 细胞; 细胞毒性; 生物相容性; 肿瘤

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)06-1508-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.06.018

Preparation and *in vitro* evaluation of redox-responsive silica-loaded arsenic trioxide nano-drug delivery systemMA Rui¹, TANG Hong-xia¹, LU Yan-ping², CHEN Xiao-jie¹, LI Fan-zhu¹

1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

2. The First People's Hospital of Fuyang, Hangzhou 311402, China

Abstract: Objective The redox-responsive drug delivery system of MSN-SS-PEG@As₂O₃ was constructed based on mesoporous silica nanoparticle (MSN), which was modified by both redox-sensitive disulfide bonds and non-toxic, non-immunogenic polyglycols

收稿日期: 2019-10-30

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)

作者简介: 马 瑞 (1995—), 女, 在读研究生, 研究方向为药物新剂型与新技术。Tel: 15700068196 E-mail: marui1995@vip.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 18957130268 E-mail: lifanzhu@zcmu.edu.cn

陆燕平 (1992—), 女, 药师, 研究方向为药物新剂型与新技术。Tel: 15757194294 E-mail: 1217287243@qq.com

#并列第一作者 汤红霞 (1992—), 女, 在读研究生, 研究方向为药物新剂型与新技术。Tel: 15700068420 E-mail: 846134997@vip.qq.com

(PEG), and loaded the arsenic trioxide (As_2O_3) by electrostatic adsorption and evaluated *in vitro*. **Methods** Silica was synthesized by coprecipitation method. The redox-responsive carrier (MSN-SS-PEG) was synthesized on the basis of silica, (3-mercaptopropyl) trimethoxysilane, 2-(2-pyridylidithio) ethylamine hydrochloride and methoxy terminated PEG. The particle size and Zeta potential of MSN-SS-PEG were measured by Malvern particle size analyzer; The structure of the carrier was verified by infrared spectroscopy; The morphology and physical and chemical properties of the carrier were investigated by transmission electron microscopy (TEM) and small angle powder diffraction; The drug loading efficiency of MSN-SS- NH_2 @ As_2O_3 and MSN-SS-PEG@ As_2O_3 were investigated by inductively coupled plasma emission spectrum (ICP). The drug loading was further verified by thermogravimetry (TGA). *In vitro* release characteristics of the drug delivery system under different pH conditions were investigated by dialysis bag method. MTT assay was used to investigate the toxicity of carrier and delivery system to human normal hepatocytes (L02) or human hepatocarcinoma (HepG2) cells. **Results** The potential of MSN, MSN-SS- NH_2 , MSN-SS-PEG was (-13.40 ± 0.87) , (31.63 ± 0.90) , (27.70 ± 5.60) mV, respectively. The final potential of modified carrier was positive. The particle size of MSN-SS-PEG was (159.60 ± 3.10) nm. The results of TEM showed that MSN, MSN-SS- NH_2 and MSN-SS-PEG were all round or quasi round; The drug loading of MSN-SS-PEG@ As_2O_3 was 4.38%, which measured by ICP; The release *in vitro* showed that MSN-SS-PEG@ As_2O_3 was redox sensitive response. Compared with L02 cells, HepG2 cells were more sensitive to the toxicity of the carrier, and with the increase of the carrier concentration, the cell survival rate of MSN-SS-PEG was higher than that of MSN-SS- NH_2 , suggesting that PEG modification can further reduce the cytotoxicity of the carrier and improve the biocompatibility of the carrier. In addition, MTT results showed that the inhibitory effect of MSN-SS-PEG@ As_2O_3 on HepG2 cell was significantly higher than that of other groups. **Conclusion** The carrier prepared in this paper had a round and uniform particle size. The modified silica can release under the special microenvironment of the tumor and increase the accumulation of the drug in the tumor site. The delivery system has a good application in tumor therapy as a tumor micro-environment responsive carrier.

Key words: As_2O_3 ; mesoporous silica; redox responsive; liver cancer; nano drug delivery system; co-precipitation method; inductively coupled plasma emission spectrum method; thermogravimetry; MTT method; L02 cells; HepG2 cells; cytotoxicity; biocompatibility; tumor

三氧化二砷 (arsenic trioxide, As_2O_3) 是传统中药砒霜的主要成分, 常温下为白色粉末, 性酸, 热, 有大毒, 入脾、肺、肝经。现代医学表明 As_2O_3 对急性早幼粒细胞白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) 的疗效显著^[1-2]。近年来研究发现, As_2O_3 对多种实体肿瘤细胞具有抑制生长和诱导凋亡的作用^[3], 此外, As_2O_3 能抑制癌细胞侵袭和迁移, 提高实体瘤的治疗效果, 其中对肝癌的研究尤为引人关注^[4-9]。然而由于 As_2O_3 毒性较大, 治疗窗窄, 副作用多以及分布缺乏特异性等缺点限制了其在肿瘤治疗方面的应用^[10]。

介孔二氧化硅 (mesoporous silica nanoparticles, MSN) 由于其孔径可调、比表面积大、生物相容性好、易于表面修饰等优点被广泛用于药物的递送系统^[11-16]。2011 年, 以二氧化硅纳米粒为基础的肿瘤诊断纳米粒 Cornell dots (C-dots) 被 FDA 批准应用于临床试验, 说明二氧化硅作为药物载体具有较好的前景和潜力^[17]。智能纳米载体对肿瘤微环境 (如温度、pH 值、酶、氧化还原等) 具有灵敏的响应性, 可实现药物可控释放, 改变其体内的循环时间, 延长治疗的时间, 降低药物的毒副作用^[18-19]。近年来 pH 值、氧化还原、酶等敏感 MSN 递药系统逐渐引

起关注^[16,20-22]。

因此, 本实验旨在构建二硫键和 PEG 共修饰的 MSN 氧化还原性纳米递药系统 (MSN-SS-PEG), 通过静电吸附将 As_2O_3 负载于 MSN 中制备氧化还原响应性二氧化硅载三氧化二砷纳米递药系统 (MSN-SS-PEG@ As_2O_3), 以达到实体瘤微环境下氧化还原响应的目的, 拟克服 As_2O_3 毒性大、治疗窗窄以及分布缺乏特异性等缺点, 从而增强抗肿瘤的效果。本实验将从递药系统的构建与表征、细胞学研究等方面对所构建的载体或递药系统进行评价。

1 材料与仪器

6700 红外光谱仪, 美国赛默飞公司; H7650 透射电子显微镜, 日本日立公司; 380ZLS 激光粒度测定仪, 美国 Nicomp 公司; DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器, 巩义市瑞德仪器设备有限公司; Bruker D8 Advance X 射线衍射 (XRD) 仪, 德国布鲁克公司; OptimaMax 超速低温离心机, 美国 Beckman 公司; Pyris1TGA 热重分析仪, 美国珀金埃尔默仪器公司; XH49L-14 陶瓷纤维马弗炉, 杭州卓驰仪器有限公司。

As_2O_3 , 质量分数 99.9%, 苏州诺德派森公司; 砷标准溶液, 1 mg/mL, 北京世纪奥科生物技术有限

公司；四乙氧基硅烷 (TEOS)，上海阿拉丁试剂有限公司；十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB)，上海艾韦特医药科技有限公司；甲氧基-聚乙二醇 (PEG)-琥珀酰亚胺乙酸酯 [methoxy PEG succinimidyl carboxymethyl ester, mPEG2000-NHS, 相对分子质量 (M_w) 2 000]，北京键凯科技有限公司；(3-巯基丙基)三甲氧基硅烷 (MPTS)，Sigma-Aldrich (上海) 贸易有限公司；2-(2-吡啶基二巯基)乙胺盐酸盐，郑州阿尔法化工有限公司；DMEM 培养液、0.25% 胰蛋白酶、胎牛血清，美国 Gibco 公司；青-链霉素溶液，青霉素含量为 10 000 U/mL，链霉素的含量为 10 mg/mL，杭州四季青公司。人肝癌细胞 (HepG2 细胞)、人正常肝细胞 (L02 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 载体的合成

2.1.1 MSN 的合成 将 0.3 g CTAB 溶于 240 mL 超纯水中，并加入适量的 NaOH (2 mol/L) 溶液，于 40 °C 下磁力搅拌 0.5 h 后，将 1 mL TEOS 逐滴加到 CTAB 溶液中，反应 2 h，20 000 r/min 离心 30 min，超纯水离心洗涤 3 次，真空干燥，马弗炉煅烧除去模板剂 CTAB 后即得 MSN。

2.1.2 巯基修饰二氧化硅 (MSN-SH) 的合成 将 100 mg MSN 分散于 100 mL 超纯水中，加入 400 μ L NaOH，40 °C 条件下反应 20 min 后加入 225 μ L (3-巯基丙基)三甲氧基硅烷，继续反应 1.5 h，15 000 r/min 离心 30 min，水洗、醇洗 3 次，真空干燥后即得 MSN-SH。

2.1.3 二巯键修饰二氧化硅 (MSN-SS-NH₂) 的合成 在“2.1.2”项 MSN-SH 合成过程中，加入 225 μ L (3-巯基丙基)三甲氧基硅烷反应 1.5 h 后，继续加入 25 mg 2-(2-吡啶基二巯基)乙胺盐酸盐反应 1.5 h，15 000 r/min 离心 30 min，水洗、醇洗数次后真空干燥，即得 MSN-SS-NH₂。

2.1.4 PEG 修饰含二巯键二氧化硅 (MSN-SS-PEG) 的合成 精密称取 25 mg MSN-SS-NH₂ 溶于 10 mL 二甲基甲酰胺 (DMF) 中，室温搅拌 0.5 h 后加入 25 mg MPEG₂₀₀₀-NHS，继续搅拌 12 h，所得产物经 15 000 r/min 离心 30 min，水洗、醇洗 3 次后，真空干燥，即得 MSN-SS-PEG。

2.1.5 红外吸收谱图 利用红外光谱仪对 MSN、MSN-SH、MSN-SS-NH₂、MSN-SS-PEG 进行结构分析。在 MSN 的谱图 (图 1) 中，1 090.22 cm⁻¹ 处

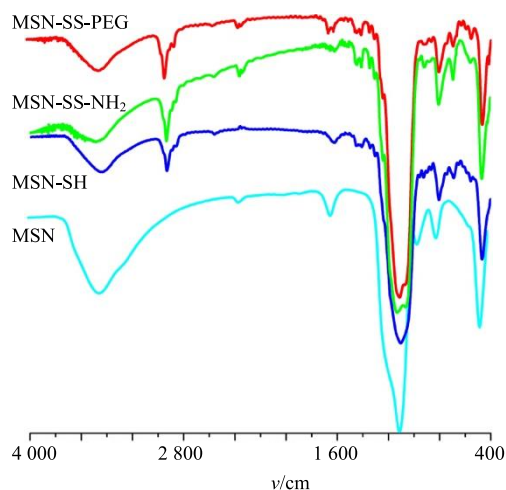


图 1 MSN、MSN-SH、MSN-SS-NH₂、MSN-SS-PEG 的红外光谱图

Fig. 1 FT-IR photograph of MSN, MSN-SH, MSN-SS-NH₂ and MSN-SS-PEG

的吸收峰为 Si-O-Si 键的反对称伸缩振动峰；806.25、464.33 cm⁻¹ 处分别出现 Si-O-Si 键的对称伸缩振动和弯曲振动；在 956.54 cm⁻¹ 附近的吸收峰为 Si-OH 的弯曲振动峰。巯基修饰后 2 557.14 cm⁻¹ 处出现巯基特征峰，说明 MSN 被巯基修饰成功；氨基修饰后巯基峰几乎消失，1 505.68 cm⁻¹ 处出现氨基特征峰，PEG 修饰后 1 617.05 cm⁻¹ 和 1 666.14 cm⁻¹ 分别为酰胺和羧基中 C=O 的伸缩振动峰。

2.2 MSN-SS-PEG@As₂O₃ 的制备

精密称取 40 mg 的 MSN-SS-NH₂、MSN-SS-PEG，分别加至 1 mg/mL As₂O₃ 溶液 10 mL 中，搅拌 24 h，20 000 r/min 离心 30 min，除去游离 As₂O₃，超纯水洗 3 次，真空干燥，即得 MSN-SS-NH₂@As₂O₃ 和 MSN-SS-PEG@As₂O₃。

2.3 MSN-SS-PEG@As₂O₃ 载药量的测定

2.3.1 电感耦合等离子体发射光谱 (inductively coupled plasma emission spectrum, ICP) 法测定载药量。

(1) 工作条件：射频 (radio frequency, RF) 功率 1 150 W，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 (Ar) 99.99%。由标准溶液来绘制校准曲线，根据曲线的线形选择最优谱线。最终选择 189 nm 为分析谱线，其干扰少，稳定性好，灵敏度高。

(2) 检测限与定量限：将双蒸水设置为空白溶液组，并在“2.3.1 (1)”项工作条件下，连续测定

10 次, 砷元素的检出限为连续测定 10 次所得 SD 值的 3 倍; 定量限为空白溶液连续测定 10 次 SD 值的 10 倍。实验测得砷元素的检出限和定量限分别为 1.68、5.60 $\mu\text{g/L}$ 。

(3) 标准曲线的绘制: 精密移取砷标准溶液置于 100 mL 量瓶中, 稀释至刻度, 得到质量浓度分别为 0.01、0.10、1.00、2.50、5.00 mg/L 的砷标准溶液。按“2.3.1 (1)”项工作条件测定标准空白溶液和各质量浓度砷标准溶液在 189 nm 处的发射强度, 纵坐标为发射强度(Y), 横坐标为质量浓度(C), 使用软件 Excel 2010 绘制出标准曲线, 相关系数方程为 $Y=437.32 X-11.667$, $R^2=0.999 6$, 其在 0.01~5.00 mg/L 内线性关系良好。

(4) 精密度试验: 取低、中、高 (0.01、1.00、5.00 mg/L) 质量浓度砷标准溶液, 按“2.3.1 (1)”项工作条件测定, 分别于 1 d 内进行 6 次测定及连续 6 d 进行测定 (每天测 1 次), 计算日内和日间精密度, 结果日内和日间精密度 RSD 分别为 1.39%、1.66%、0.85%和 2.02%、2.89%、1.11%, 表明日内、日间精密度均符合方法学要求。

(5) 稳定性试验: 取质量浓度为 2.5 mg/L 样品溶液滤过膜后分别于 0、2、4、6、8、12 h 按“2.3.1 (1)”项工作条件进样, 结果 RSD 为 0.10%, 符合方法学要求。

(6) 重复性试验: 取质量浓度为 2.5 mg/L 样品溶液 6 份, 按“2.3.1 (1)”项工作条件测定, 结果砷质量浓度的 RSD 为 1.79%, 符合方法学要求。

(7) 加样回收率试验: 向空白溶液中加入标准品溶液并稀释定容, 使 As_2O_3 质量浓度分别为 0.01、1.00、5.00 mg/L 作为回收率实验的 3 个质量浓度, 经滤膜滤过取续滤液按“2.3.1 (1)”工作条件进行测定, 每个质量浓度平行测定 6 次, 计算得砷标准液的回收率分别为 $(1.08 \pm 0.08)\%$ 、 $(1.07 \pm 0.05)\%$ 、 $(1.03 \pm 0.01)\%$, $\text{RSD} < 3\%$, 符合方法学要求。

(8) 载药量的测定: 取按照“2.2”项中制备所得的 $\text{MSN-SS-NH}_2@As_2O_3$ 和 $\text{MSN-SS-PEG}@As_2O_3$ 经高速离心法结合 ICP 测定递药系统的载药量; 并且采用热重分析法进一步验证递药系统的载药量。取“2.2”项中离心所得含 As_2O_3 游离上清液体积记为 V_1 , ICP 直接测得游离药物质量浓度记为 C_1 , $W_1=C_1V_1$, 根据方程式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 MSN 的游离药物量, W_1 为 MSN 的总质量

通过 ICP 测定上清中药物质量浓度的方法计算得 $\text{MSN-SS-NH}_2@As_2O_3$ 、 $\text{MSN-SS-PEG}@As_2O_3$ 的载药量分别为 4.73%、4.38%。同时, 本研究采用 ICP 来监测离心、洗涤的过程中药物损失量, 发现在制备洗涤处理过程中 As_2O_3 损失几乎可以忽略不计。

2.3.2 热重分析法测定载药量 同时利用热重分析仪在氮气保护下进行载药量分析, 加热速率设置为 $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ 。如图 2 所示, 温度由 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 上升到 $800\text{ }^\circ\text{C}$ 时, MSN、 MSN-SS-NH_2 、 $\text{MSN-SS-NH}_2@As_2O_3$ 、 $\text{MSN-SS-PEG}@As_2O_3$ 的质量损失分别为 8.98%、30.43%、35.24%、38.15%。根据各样品质量损失并进行计算, $\text{MSN-SS-NH}_2@As_2O_3$ 和 $\text{MSN-SS-PEG}@As_2O_3$ 的载药量分别为 4.81%、4.36%, 损失较小, 这与 ICP 法测得的 $\text{MSN-SS-NH}_2@As_2O_3$ 载药量没有显著性差异 ($P > 0.05$)。

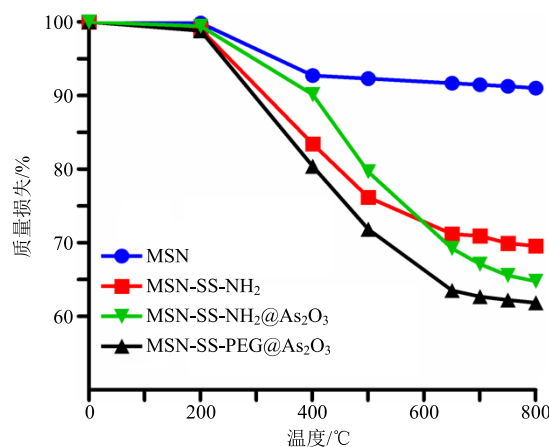


图 2 MSN、 MSN-SS-NH_2 、 $\text{MSN-SS-NH}_2@As_2O_3$ 、 $\text{MSN-SS-PEG}@As_2O_3$ 的热重分析

Fig. 2 TGA curves of MSN, MSN-SS-NH_2 , $\text{MSN-SS-NH}_2@As_2O_3$ and $\text{MSN-SS-PEG}@As_2O_3$

2.4 纳米粒的表征

2.4.1 外观形态 纳米粒经过真空干燥后呈现为白色粉末状, 复溶后溶液具有淡蓝色的乳光。将其缓慢滴于铜网上, 静置 10 min, 滤纸片吸干, 待其自然挥干后在透射镜下进行观察, 结果见图 3, 由图可知, MSN、 MSN-SS-NH_2 具有明显介孔网络的结构, 而实体二氧化硅 ($sSiO_2$) 中则不具有明显的介孔网络结构。这是由于煅烧形成了介孔结构, 且介孔结构清晰, 分散均匀。 $sSiO_2$ 、MSN、 MSN-SS-NH_2 外观均呈圆形或类圆形, 但相比于 $sSiO_2$ 与 MSN, MSN-SS-NH_2 的分散性更佳。

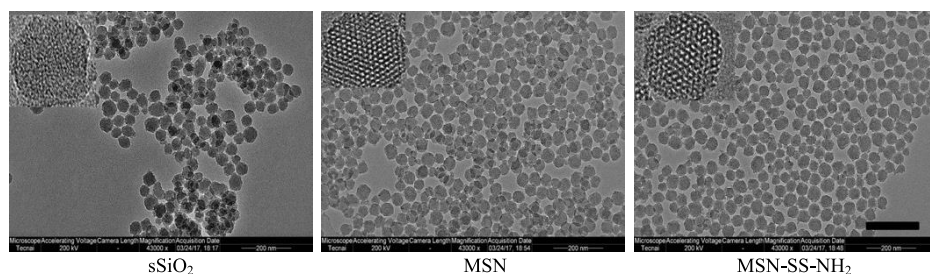


图 3 纳米粒透射电镜图 (标尺为 200 nm)

Fig. 3 TEM images of nanoparticles (scale bar is 200 nm)

2.4.2 平均粒径、Zeta 电位考察 通过激光粒度仪对纳米粒的粒径和 Zeta 电位进行测定,结果见表 1。MSN 的粒径为 (62.50 ± 7.83) nm, MSN-SS-NH₂ 的粒径为 (127.97 ± 1.50) nm, PEG 修饰后的 MSN-SS-PEG 的粒径为 (159.60 ± 3.10) nm, 负载药物后 MSN-SS-PEG@As₂O₃ 粒径为 (177.77 ± 4.82) nm。由表 1 可知, MSN 的 Zeta 电位为 (-13.40 ± 0.87) mV, 氨基连接后载体电荷由负转为正, MSN-SS-NH₂ 的 Zeta 电位为 (31.63 ± 0.90) mV, PEG 连接后电荷减小, Zeta 电位为 (27.70 ± 5.60) mV, MSN-SS-PEG@As₂O₃ 的 Zeta 电位为 (24.13 ± 2.73) mV。

表 1 MSN、MSN-SS-NH₂、MSN-SS-PEG、MSN-SS-PEG@As₂O₃ 的粒径和 Zeta 电位 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Particle size and Zeta potential of MSN, MSN-SS-NH₂, MSN-SS-PEG, MSN-SS-PEG@As₂O₃ ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	粒径/nm	Zeta 电位/mV
MSN	62.50 ± 7.83	-13.40 ± 0.87
MSN-SS-NH ₂	127.97 ± 1.50	31.63 ± 0.90
MSN-SS-PEG	159.60 ± 3.10	27.70 ± 5.60
MSN-SS-PEG@As ₂ O ₃	177.77 ± 4.82	24.13 ± 2.73

2.4.3 小角粉末衍射 (XRD 法) 小角粉末衍射主要用来判断有序介孔结构是否存在,是 MSN 表征最常用的手段之一,出现的衍射峰是有序介孔结构存在的依据。本实验扫描条件为速度 1°/min, 工作电压 40 kV, 工作电流 200 mA。小角 X 射线结果见图 4, 在 2°~3°MSN 出现明显的衍射峰, 表明其具有介孔结构, 当载药且 PEG 修饰包裹后衍射峰几乎消失。

2.5 体外释放研究

采用透析法考察递药系统的体外释药特性。选用 pH 值分别为 7.4、6.5、5.0 的含谷胱甘肽 10 mmol/L (或不含谷胱甘肽) 的 PBS 溶液为释放介质。MSN-SS-NH₂@As₂O₃ 和 MSN-SS-PEG@As₂O₃ (含 As₂O₃ 0.5 mg) 分散液于经煮沸除去甘油和硫的

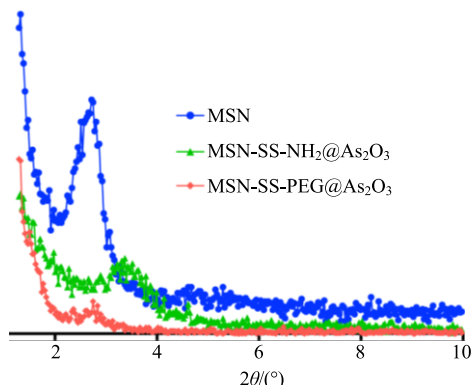


图 4 MSN、MSN-SS-NH₂@As₂O₃、MSN-SS-PEG@As₂O₃ 的小角粉末衍射图

Fig. 4 XRD photograph of MSN, MSN-SS-NH₂@As₂O₃ and MSN-SS-PEG@As₂O₃

透析袋内,密封后置于 200 mL 的释放介质中,37 °C 恒温水浴振荡 (75 r/min), 分别于 0、0.25、0.5、1、1.5、2、4、6、8、10、12、24 h 取样, 并立即补加等量同温同 pH 值同谷胱甘肽含量的释放介质, 样品经处理后, 取续滤液稀释并用 ICP 测定药物的含量, 按公式计算累积释药率 (Q), 并绘制释药曲线。

$$M_n = C_n V_0 + \sum C_i V_i$$

$$Q_n = M_n / V_0$$

M_n 为各时间点的累积释放量, Q_n 为各时间点的累积释药率, C_n 为时间 n 时的药物浓度, V₀ 为释放介质体积, V_i 为时间 i 时取出的样品体积, C_i 为时间 i 时药物的浓度, C_n 为总药物的质量浓度

体外释药结果如图 5-A 所示, 在 24 h、谷胱甘肽为 10 mmol/L 时, MSN-SS-PEG@As₂O₃ 在 pH 7.4、6.5、5.0 的 PBS 中释放的 As₂O₃ 分别为 (55.16 ± 1.57) %、 (69.49 ± 2.88) %、 (81.00 ± 3.24) %, 结果表明在 pH 5.0 条件下的释放量明显高于 pH 7.4 时的释放, 说明该递药系统具有一定的 pH 值响应释放, 有利于药物在酸性条件下释放。此外, 在图 5-B 中, MSN-SS-PEG@As₂O₃ 在 pH 5.0、谷胱甘肽存在 (10 mmol/L) 的释放介质中 As₂O₃ 累积释药量

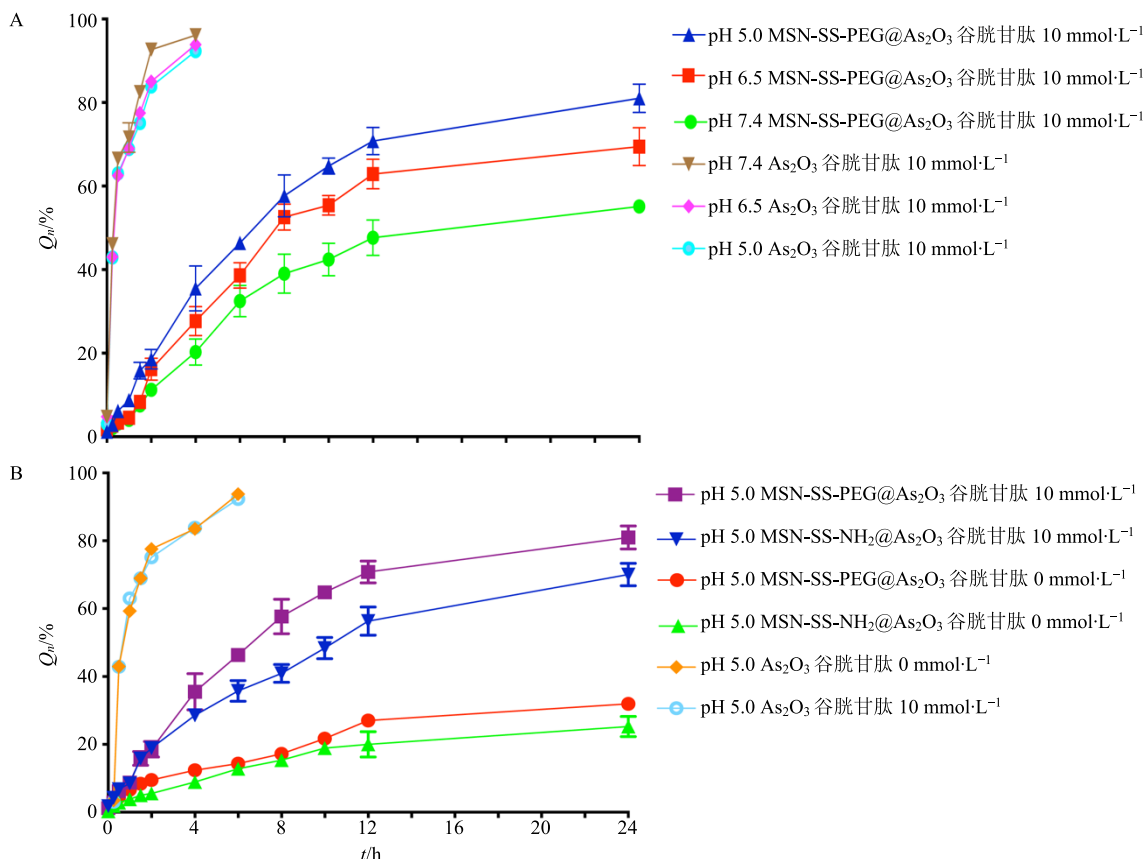


图 5 体外释放曲线 (n = 3)
Fig. 5 *In vitro* release profiles of As₂O₃ (n = 3)

可达 81.00%，而在无谷胱甘肽的 pH 5.0 PBS 介质中，24 h 时 MSN-SS-PEG@As₂O₃ 的累积释放量仅为 25.84%，MSN-SS-NH₂@As₂O₃ 的累积释放量为 25.28%，10 mmol/L 谷胱甘肽释放介质可使 MSN-SS-NH₂@As₂O₃ 的 As₂O₃ 快速释放 24 h 内高达 70.02%。结果表明，随着谷胱甘肽的存在会使递药系统表现氧化还原响应性释放，有利于药物在肿瘤微环境下释放。

2.6 载体毒性

分别取对数生长期的 HepG2 和 L02 细胞，8 × 10³ 个/孔接种于 96 孔板，37 °C 下培养 12 h，移弃培养液后分别加入不同浓度的 MSN、MSN-SS-NH₂、MSN-SS-PEG 无血清培养液，放入培养箱继续培养 24 h，吸弃含药培养液，加入 0.2 mL 含 MTT (0.5 mg/mL) 的无血清培养液继续孵育 4 h，移液枪将含有 MTT 的培养液轻轻吸去，用 PBS 重复清洗 3 次，每孔加入 0.15 mL DMSO，于摇床上振摇 15 min，用酶标仪检测在 490 nm 时的吸光度 (A) 值，并按公式计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_s - A_B) / (A_C - A_B)$$

A_s 为给药组的吸光度，A_B 为只加培养液组的吸光度，A_C 为药物质量浓度为 0 的对照组吸光度

结果见图 6。在载体毒性实验中，MSN、MSN-SS-NH₂、MSN-SS-PEG 对 L02 和 HepG2 均表现出较低的细胞毒性，表明其生物相容性较好。当载体质量浓度低于 2.5 μg/mL 时，L02 细胞的存活率均大于 85%，且各载体之间无显著差异。另外相比于 L02 细胞，HepG2 细胞对载体的毒性更敏感。当载体质量浓度高于 5 μg/mL 时，MSN-SS-PEG 组的细胞存活率高于 MSN-SS-NH₂ 组，表明 PEG 修饰后进一步降低了载体的细胞毒性，提高了载体的生物相容性。

2.7 递药系统体外毒性评价

取对数生长期的 HepG2 细胞以 8 × 10³ 个/孔接种于 96 孔板，37 °C 下培养 12 h，移弃培养液，分别加入不同浓度的 As₂O₃、MSN-SS-NH₂@As₂O₃ 和 MSN-SS-PEG@As₂O₃，继续培养 24 h 后，吸弃含药培养液，每孔各加入 0.2 mL 含 MTT 的无血清培养液，于 37 °C 继续孵育 4 h 后避光摇晃 15 min，采用酶标仪检测吸光度，并计算细胞存活率。所有

实验均重复 3 次。结果见图 7。随着质量浓度的增加, As₂O₃、MSN-SS-NH₂@As₂O₃、MSN-SS-PEG@As₂O₃ 各组的存活率均降低, 说明 As₂O₃ 对 HepG2 细胞具有较好的抑制作用。

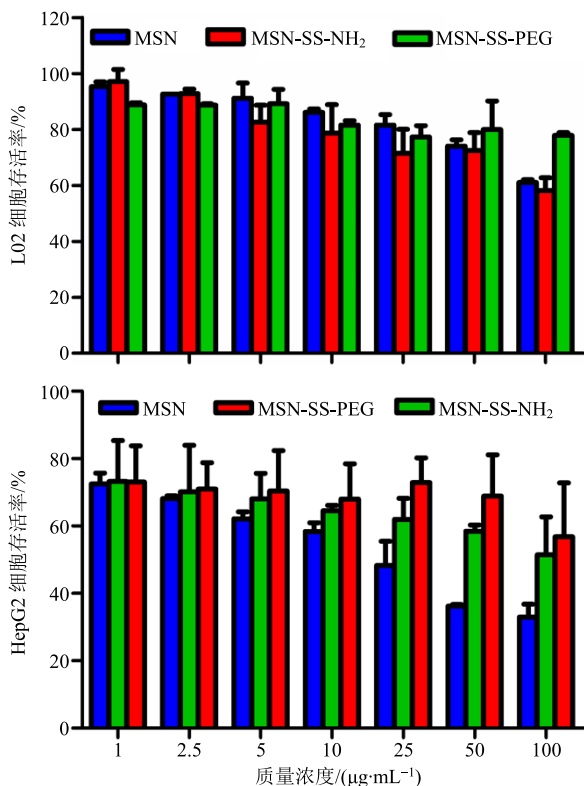


图 6 质量浓度 1~100 µg·mL⁻¹ 下 MSN、MSN-SS-NH₂、MSN-SS-PEG 与 L02 (A) 和 HepG2 (B) 细胞共孵育 24 h 后的细胞存活率

Fig. 6 MTT assay of L02 (A) and HepG2 (B) cells after being treated with MSN, MSN-SS-NH₂ and MSN-SS-PEG at concentrations ranging from 1—100 µg·mL⁻¹ for 24 h

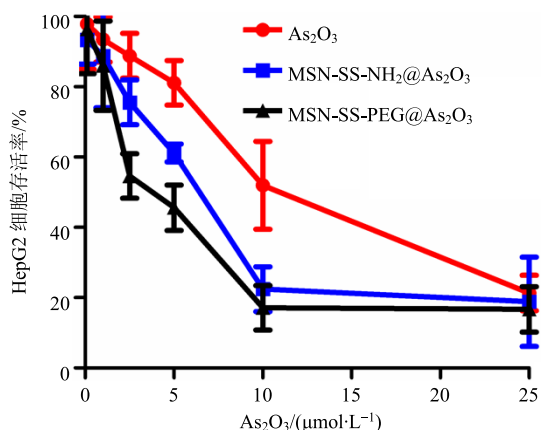


图 7 不同浓度的各递药系统与 HepG2 共孵育 24 h 后细胞存活率曲线

Fig. 7 Viability of HepG2 cells after being treated with As₂O₃ formulations at different concentrations for 24 h

由表 2 可见, 相比于 As₂O₃ 的 IC₅₀ [(14.65 ± 0.16) µmol/L], MSN-SS-NH₂@As₂O₃ [(10.15 ± 0.39) µmol/L] 和 MSN-SS-PEG@As₂O₃ [(7.64 ± 0.35) µmol/L] 的 IC₅₀ 均有所降低, 且具有显著性差异 (P < 0.01)。与 MSN-SS-NH₂@As₂O₃ 相比, MSN-SS-PEG@As₂O₃ 的 IC₅₀ 具有显著性差异 (P < 0.01), 表明 MSN-SS-PEG@As₂O₃ 具有更佳的抑制 HepG2 细胞活性的能力。

表 2 不同浓度的各 As₂O₃ 递药系统与 HepG2 共孵育 24 h 后细胞 IC₅₀ 值

Table 2 IC₅₀ of HepG2 cells after being treated with As₂O₃ formulations for 24 h

组别	IC ₅₀ /(µmol·L ⁻¹)
As ₂ O ₃	14.65 ± 0.16
MSN-SS-NH ₂ @As ₂ O ₃	10.15 ± 0.39**
MSN-SS-PEG@As ₂ O ₃	7.64 ± 0.35**##

与 As₂O₃ 组比较: **P < 0.01; 与 MSN-SS-NH₂@As₂O₃ 组比较: ##P < 0.01

**P < 0.01 vs As₂O₃ group; ##P < 0.01 vs MSN-SS-NH₂@As₂O₃ group

2.8 统计学处理

采用 SPSS 20.0 分析软件进行统计学分析, 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。P < 0.01 表明有显著性差异。

3 讨论

本实验制备的 MSN、MSN-SS-NH₂、MSN-SS-PEG、MSN-SS-PEG@As₂O₃ 溶于水后外观均呈蓝色乳光, 透射电镜下观察各纳米粒其呈现圆形或类圆形, 分散性较好。据文献记载^[23], 粒径在 100~200 nm 内的纳米粒可增强实体瘤的高通透性和滞留效应 (enhanced permeability and retention effect, EPR) 效应而更容易在肿瘤部位蓄积。本实验制备的 MSN-SS-PEG@As₂O₃ 粒径为 (177.77 ± 4.82) nm, 故为药物在肿瘤部位聚集提供了可能。MSN-SS-NH₂ 表面有氨基, 其 Zeta 电位为正, 这为静电吸附带负电的亚砷酸离子提供了基础。负载 As₂O₃ 后, 递药系统 MSN-SS-PEG@As₂O₃ 的电位下降, 但仍保持一定的正电性, 其 Zeta 电位为 (24.13 ± 2.73) mV, 该递药系统的电位绝对值较大, 表明其溶液体系较稳定。

小角粉末衍射、热重分析分别对制备的各个载体进行相关表征。小角粉末衍射结果中 MSN 明显出现衍射峰, 表明有介孔结构, 而 MSN-SS-NH₂@

As₂O₃、MSN-SS-PEG@As₂O₃ 衍射峰基本消失；红外光谱结果表明 MSN 被巯基修饰后 2 557.14 cm⁻¹ 处出现巯基特征峰；氨基修饰后 1 505.68 cm⁻¹ 处出现 N-H 的弯曲振动峰，PEG 修饰后 1 617.05 cm⁻¹ 和 1 666.14 cm⁻¹ 分别出现酰胺和羧基中 C=O 的伸缩振动峰，表明载体修饰成功，其中热重分析的重量损失进一步证明了 PEG 的连接成功。

由体外释放结果可知，MSN-SS-PEG@As₂O₃ 在 pH 7.4、6.5、5.0 PBS 中释放的 As₂O₃ 分别为 55.16%、69.49%、81.00%。表明 MSN-SS-PEG@As₂O₃ 系统在不同 pH 条件下能释放不同的药物量，进一步说明酸性环境下有利于药物的释放。这可能是由于系统表面保持一定的正电荷，分子间的表面电荷密度和排斥力随着 pH 值的降低而增加，从而促进了 As₂O₃ 从载体中释放。此外，MSN-SS-PEG@As₂O₃ 与 MSN-SS-NH₂@As₂O₃ 在含 10 mmol/L GSH 的释放介质中 As₂O₃ 累积释放量分别为 81.00%、70.02%；PBS 中谷胱甘肽不存在时，MSN-SS-PEG@As₂O₃ 与 MSN-SS-NH₂@As₂O₃ 的释放分别为 25.84%、25.28%。因此，说明递送药系统可以通过氧化还原响应进行药物释放。

当各载体的质量浓度较低时其细胞毒性均较小。L02 细胞和 HepG2 细胞的细胞毒性均较低，说明各载体的生物相容性良好。随着质量浓度的增大其细胞毒性也随之增大，且 MSN-SS-NH₂ 的细胞毒性均大于 MSN-SS-PEG，这可能由于 MSN-SS-NH₂ 带较强的正电荷，阳离子载体会引起溶血等细胞毒性^[24]，而有 PEG 修饰后形成了空间位阻，一定程度上将阳离子掩蔽导致其与细胞膜的接触减少，因此细胞毒性相对较小，提高了 MSN-SS-PEG 的生物相容性。

递药系统体外毒性实验表明，As₂O₃ 的 IC₅₀ 值为 (14.65 ± 0.16) μmol/L，MSN-SS-NH₂@As₂O₃ 和 MSN-SS-PEG@As₂O₃ 的 IC₅₀ 值分别为 (10.15 ± 0.39) μmol/L 和 (7.64 ± 0.35) μmol/L。MSN-SS-NH₂@As₂O₃ 和 MSN-SS-PEG@As₂O₃ 的 IC₅₀ 均显著低于 As₂O₃ (P < 0.01)，表明载体进行修饰后，在一定程度上提高了递药系统的治疗效果。且 PEG 修饰以后，IC₅₀ 值较 MSN-SS-NH₂@As₂O₃ 减小主要因素是因为 PEG 修饰后延长了递药系统的体内循环时间，使更多药物到达肿瘤部位，且在肿瘤的微环境下能进行 GSH 响应性释放药物，使其达到更佳的治疗效果。因此，MSN-SS-PEG@As₂O₃ 的抗肿瘤

作用较 As₂O₃ 与 MSN-SS-NH₂@As₂O₃ 显著增强。

综上所述，MSN-SS-PEG 是一种较好的肿瘤微环境响应性载体，且具有较高的载药量，同时递药系统 MSN-SS-PEG@As₂O₃ 有利于 As₂O₃ 在肿瘤特殊环境下能响应性释放增加药物在肿瘤部位的蓄积，这种递药系统的设计是肿瘤治疗较有潜力的方法之一。

参考文献

- [1] Zhang X W, Yan X J, Zhou Z R, *et al.* Arsenic trioxide controls the fate of the PML-RARalpha oncoprotein by directly binding PML [J]. *Science*, 2010, 328(5975): 240-243.
- [2] 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.
- [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] Miller W H, Schipper H M, Lee J S *et al.* Mechanisms of action of arsenic trioxide [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(14): 3893-903.
- [5] Zhang X, Wu J G, Choiniere J, *et al.* Arsenic silences hepatic PDK4 expression through activation of histone H3K9 methyltransferase G9a [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2016, 304: 42-47.
- [6] Liu H Y, Zhang Z J, Chi X Q, *et al.* Arsenite-loaded nanoparticles inhibit PARP-1 to overcome multidrug resistance in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 31009.
- [7] 倪文娟, 马瑞, 陆燕平, 等. 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 [J]. *中草药*, 2019, 50(9): 42-49.
- [8] 黄安皓, 韩顺平, 陆燕平, 等. RGDyC 与 PEG 共修饰的 PAMAM 树状大分子载三氧化二砷脑胶质瘤靶向递药系统的制备及体外评价 [J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(8): 1618-1625.
- [9] 韩义香, 章圣辉, 吴建波, 等. 线粒体膜电位在三氧化二砷诱导 K562 细胞凋亡中的作用 [J]. *中草药*, 2010, 41(3): 452-455.
- [10] Akhtar A, Wang X Y, Scarlet G 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.
- [11] Singh R K, Patel K D, Mahapatra C, *et al.* Combinatory cancer therapeutics with nanoceria-capped mesoporous silica nanocarriers through pH-triggered drug release and redox activity [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019,

- 11(1): 288-299.
- [12] Niu D C, Liu Z J, Li Y S, *et al.* Monodispersed and ordered large-pore mesoporous silica nanospheres with tunable pore structure for magnetic functionalization and gene delivery [J]. *Adv Mater Weinheim*, 2014, 26(29): 4947-4953.
- [13] Tarn D, Ashley C E, Xue M, *et al.* Mesoporous silica nanoparticle nanocarriers: Biofunctionality and biocompatibility [J]. *Acc Chem Res*, 2013, 46(3): 792-801.
- [14] 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): 1289-1207.
- [15] 刘瞳, 万龙, 王可可, 等. 难溶性药物与介孔二氧化硅纳米粒载体的相互作用对于释放速率的影响 [J]. *药物评价研究*, 2018, 41(10): 1775-1780.
- [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] Rosenholm J M, Mamaeva V, Sahlgren C *et al.* Nanoparticles in targeted cancer therapy: Mesoporous silica nanoparticles entering preclinical development stage [J]. *Nanomedicine*, 2012, 7(1): 111-120.
- [18] Ju C Y, Mo R, Xue J W, *et al.* Sequential intra-intercellular nanoparticle delivery system for deep tumor penetration [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, 126(24): 6253-6258.
- [19] Tang L, Yang X J, Yin Q, *et al.* Investigating the optimal size of anticancer nanomedicine [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(43): 15344-15349.
- [20] Chen X, Liu Z N, A pH-Responsive hydrogel based on a tumor-targeting mesoporous silica nanocomposite for sustained cancer labeling and therapy [J]. *Macromol Rapid Comm*, 2016, 37(18): 1533-1539.
- [21] Lee B Y, Li Z L, Clemens D L, *et al.* Redox-triggered release of moxifloxacin from mesoporous silica nanoparticles functionalized with disulfide snap-tops enhances efficacy against pneumonic tularemia in mice [J]. *Small*, 2016, 12(27): 3690-3702.
- [22] Zhang Z J, Liu H Y, Zhou H L, *et al.* A facile route to core-shell nanoparticulate formation of arsenic trioxide for effective solid tumor treatment [J]. *Nanoscale*, 2016, 8(7): 4373-4380.
- [23] Seki T, Fang J, Maeda H. Enhanced delivery of macromolecular antitumor drugs to tumors by nitroglycerin application [J]. *Cancer Sci*, 2009, 100: 2426-2430.
- [24] 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.