

载 As₂O₃ pH 敏感钙砷复合物脂质体的制备及体外评价

陈云云¹, 姚文栋¹, 谢先泽¹, 毛超¹, 张钊², 诸佳珍²

1. 浙江中医药大学附属第一医院药剂科, 浙江 杭州 310018

2. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

摘要: 目的 制备 pH 敏感释药的 As₂O₃ 脂质体, 并进行体外评价。方法 采用薄膜分散法制备含钙离子脂质体, 然后用离子沉淀法孵育制备钙砷复合物脂质体 (CaAs-LP)。测定 CaAs-LP 的粒径、Zeta 电位及多分散系数 (PDI); 透射电子显微镜观察脂质体的形态; 电感耦合等离子体发射光谱仪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。噻唑蓝 (MTT) 法考察未载药脂质体及 CaAs-LP 对人源性乳腺癌 MCF-7 细胞、人源性脑胶质瘤 U87 细胞和人源性肝癌 HepG2 细胞的毒性; 共聚焦显微镜考察 U87 细胞对 CaAs-LP 的摄取效率。结果 制备的 CaAs-LP 呈规整类球形, 粒径约为 (117.16±1.94) nm, 包封率和载药量分别为 (74.31±2.11) %、(8.31±0.13) %。体外释放研究表明, CaAs-LP 具有明显的缓释以及 pH 响应释药特征。未载药的脂质体在 MCF-7、U87、HepG2 和 L02 细胞中的生物相容性良好; CaAs-LP 抑制肿瘤细胞生长的作用较原药有所上升, 半数抑制浓度 (IC₅₀) 值分别为 11.91、4.90、19.41、27.59 μmol/L。细胞摄取研究表明肝癌细胞对脂质体具有良好的摄取。结论 CaAs-LP 具备显著的缓释以及 pH 响应释药的特性, 在肿瘤治疗方面具有较好的应用前景。

关键词: As₂O₃; 脂质体; pH 敏感; 钙离子; 体外评价; 薄膜分散法; 离子沉淀法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)21-5447-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.21.008

Preparation and *in vitro* evaluation of pH-sensitive drug releasing As₂O₃-loaded liposome

CHEN Yun-yun¹, YAO Wen-dong¹, XIE Xian-ze¹, MAO Chao¹, ZHANG Ke², ZHU Jia-zhen²

1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310018, China

2. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To prepare pH-sensitive drug releasing As₂O₃ loaded liposome (CaAs-LP) and evaluate it *in vitro*. **Methods** CaAs-LP was prepared by thin film dispersion and ion precipitation method. The particle size, PDI, and Zeta potential of CaAs-LP were measured by Malvern particle size analyzer; The morphology of the liposome was investigated by transmission electron microscopy; The drug loading and entrapment efficiency of CaAs-LP by inductively coupled plasma emission spectrum. *In vitro* release characteristics of CaAs-LP under different pH conditions were investigated by dialysis bag method. MTT assay was used to investigate the toxicity of carrier and CaAs-LP to MCF-7, U87 and HepG2 cells. **Results** The prepared CaAs-LP were spherical and well-dispersed with particle size of (117.16 ± 1.94) nm. The encapsulation efficiency and the drug loading rate of CaAs-LP were (74.31 ± 2.11)% and (8.31 ± 0.13)%, respectively. *In vitro* release studies showed that CaAs-LP had the characteristics of sustained release and pH sensitive drug release, which can achieve specific drug release in the tumor environment. The carrier displayed remarkable biocompatibility in MCF-7, U87, HepG2 and L02 cells. MTT assay showed that the median lethal concentrations (IC₅₀ values) of MCF-7, U87 and HepG2 cells were 11.91, 4.90 and 19.41 μmol/L, while L02 was 27.59 μmol/L, respectively, which showed strong inhibiting effect on tumor cells. **Conclusion** CaAs-LP reveals significantly sustained and pH sensitive release characteristics. CaAs-LP is a potential drug delivery system against solid tumor with tumor micro-environment responsive.

收稿日期: 2020-05-31

基金项目: 浙江省中医药优秀青年人才基金项目 (2018ZQ013); 浙江省自然科学基金项目 (LQ19H280004); 浙江中医药大学 2018 年度校级科研基金资助项目 (2018ZJ09)

作者简介: 陈云云 (1995—), 男, 在读研究生, 研究方向为中药药理学、中药药剂学。Tel: 18257127682 E-mail: 1374071067@qq.com

Key words: arsenic trioxide; liposome; pH-sensitive; calcium ions; *in vitro* evaluation; thin film dispersion method; ion precipitation method

As₂O₃ (arsenic trioxide), 性酸、热, 有大毒, 入脾、肺、肝经, 常温下为白色粉末, 早在北宋初年《太平圣惠方》中就已经有使用砷剂的记载。20 世纪 70 年代, 将 As₂O₃ 用于治疗急性早幼粒细胞白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) 取得了显著的疗效, 对 APL 初治患者有效率高达 90% 以上, 其中完全缓解率可大于 70%^[1-3]。近年来有文献证明 As₂O₃ 对多种实体瘤细胞有抑制生长和诱导凋亡的作用^[4-6]。然而, As₂O₃ 毒性大, 且其进入体内后血清蛋白结合率高, 没有特异性分布, 且肾脏清除快, 不良反应明显, 因而其临床应用受到限制^[6-8]。

脂质体具有独特的类细胞结构和载药特点, 是多种药物的优良载体, 能改变药物在体内的分布, 并降低毒性^[9-12]。然而, 脂质体载砷后, 其有机性质与 As₂O₃ 在水溶液中的无机亚砷酸根 (AsO₃³⁻) 形式不相容^[13-15]。且 As₂O₃ 可以自由穿透磷脂双层, 造成 As₂O₃ 脂质体不稳定, 极易突释漏释^[13]。基于此, 本研究利用了 As₂O₃ 对磷脂双分子层的渗透特性, 采用离子沉淀方式使 As₂O₃ 进入到脂质体内部纳米空腔中与无法穿过磷脂层的离子 (Mn、Ni 及本研究的 Ca) 形成水不溶性亚砷酸盐复合物达到载药目的^[16-18]。而所形成的不溶性复合物对 pH 值敏感, 在弱酸环境中可重新溶解, 转化为钙离子与亚砷酸根 (As₂O₃ 在生理环境中的起效形式)。本实验从钙砷复合物脂质体 (CaAs-LP) 的构建与表征、体外释放、细胞学评价等方面综合考察钙砷复合物脂质体。

1 材料与仪器

Nano-ZS 90 激光粒度分析仪, 英国 Malvern 仪器有限公司; HT7700 透射电子显微镜 (TEM), 日本日立公司; Optima Max 超速低温离心机, 美国 Beckman 有限公司; FiveEasy 电导 pH 计, 梅特勒-托利多国际股份有限公司; JY92-IIN 超声波细胞破碎仪, 宁波新芝生物科技有限公司; 高压均质器, 美国 ATS 公司; 超滤装置微孔 Labscale TFF 系统, 美国 Milipore 公司; ICP 7000 等离子体发射光谱仪, 美国 Thermo Fisher 公司。

As₂O₃, 质量分数 99.9%, 苏州诺德派森公司, 批号 20151005; 砷标准溶液, 1 mg/mL, 北京世纪奥科生物技术有限公司; 大豆卵磷脂、胆固醇、聚

乙二醇化二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (DSPE-PEG) 均购自上海艾韦特医药科技有限公司; 醋酸钙, 上海凌峰化学试剂有限公司; 无水硫酸钠, 上海阿拉丁工业公司; DMEM 培养液、0.25% 胰蛋白酶、胎牛血清, 美国 Gibco 公司; FITC、四甲基偶氮唑盐 (MTT), 美国 Sigma 公司; 青-链霉素溶液, 杭州四季青公司; 其余试剂均为分析纯。

人源性乳腺癌 MCF-7 细胞、人源性脑胶质瘤 U87 细胞、人源性肝癌 HepG2 细胞及正常肝 LO2 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 CaAs-LP 的制备

2.1.1 含 Ca²⁺ 脂质体的制备 取大豆卵磷脂 500 mg、DSPE-PEG 50 mg、胆固醇 100 mg, 用 50 mL 无水乙醇加热溶解, 分 5 次每次 10 mL 加入茄形瓶中, 在 45 °C 水浴下减压旋转 10 min 蒸发成膜, 加入 120 mmol/L 醋酸钙溶液 10 mL 水化 10 min, 随后超声 (225 W, 超声 1 s 停 1 s), 均质挤压过 400、200、100 nm 膜, 收集得脂质体, 过超滤装置洗去外层游离 Ca²⁺, 得到内部纳米空腔含 Ca²⁺ 的脂质体 (Ca-LP)。

2.1.2 CaAs-LP 的制备 将“2.1.1”项制备的 Ca-LP, 用 120 mmol/L 硫酸钠溶液 20 mL 洗涤, 并超滤至 20 mL, 加入等体积 As₂O₃ 溶液 (3 mg/mL), 室温过夜, 使用生理盐水再次超滤除去脂质体外溶液中的砷离子游离药物, 超滤至 20 mL, 收集 CaAs-LP, 备用。

2.2 脂质体的表征

2.2.1 外观形态 将制备的 CaAs-LP 稀释至 5.0 mg/mL 并与 As₂O₃ 溶液、Ca-LP 检查外观。如图 1 所示, 脂质体纳米粒溶液呈淡乳白色, 略微偏蓝, 溶液外观无混浊, 较为澄明; 当红外光射入时, 产生了丁达尔现象。

取适量脂质体进行稀释, 滴加到铜网, 用 2% 的磷钨酸溶液进行染色, 滤纸吸干, 置于红外灯下照射 10 s 进行再次烘干后进行 TEM 扫描。TEM 下 2 种脂质体纳米粒呈规整圆球状, 但 CaAs-LP 因内部有钙砷复合物而在电镜下有内部层阴影 (图 2)。

2.2.2 粒径与 Zeta 电位 采用激光粒度仪对 CaAs-LP 的粒径、多分散系数 (PDI) 和 Zeta 电位进行测

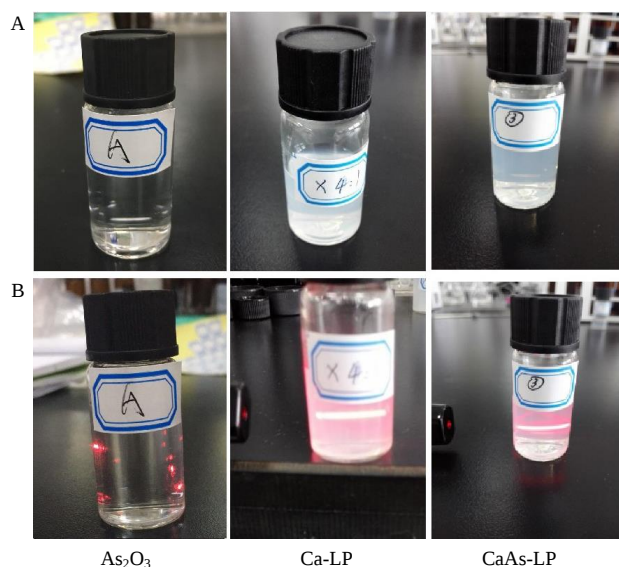


图 1 As_2O_3 溶液、Ca-LP 和 CaAs-LP 的外观 (A) 及其丁达尔效应 (B)

Fig. 1 Appearance (A) and Tyndall effect (B) of As_2O_3 solution, Ca-LP and CaAs-LP

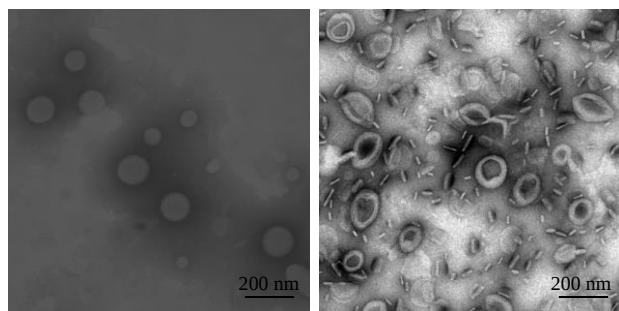


图 2 Ca-LP 和 CaAs-LP 的 TEM 图

Fig. 2 TEM photograph of Ca-LP and CaAs-LP

定, 结果见表 1。LP-Ca 的粒径为 (119.32 ± 2.16) nm, 而载药后的 CaAs-LP 粒径无显著变化, 为 (117.16 ± 1.94) nm; 两者 PDI 分别为 0.195 ± 0.021 、 0.212 ± 0.018 , 较也接近; 但 Zeta 电位载药前为 (-21.72 ± 2.42) mV, 而 CaAs-LP 的电位显著下降至 (-26.33 ± 2.25) mV。这是由于亚砷酸根负载后, 负电性进一步降低。

2.2.3 载药量及包封率 收集的脂质体用 2 mL 超滤离心管进行离心 ($12\ 000$ r/min、10 min), 收集离心液 100 μL , 用 5% 硝酸溶液稀释至 10 mL 后过 0.22

μm 滤膜, 按事先建立好的 ICP 方法进行游离砷含量检测^[19-20]; 另取脂质体 100 μL 加高氯酸 50 μL 超声破坏, 用 5% 稀硝酸定容到 10 mL, 过 0.22 μm 滤膜后测总含量。设定 ICP 仪器测试参数: 射频功率 1 100 W, 等离子体体积流量 50 L/min, 辅助气体体积流量 0.5 L/min, 雾化气体体积流量 0.3 L/min, 泵速 50 L/min, 稳定延时 5 s, 清洗时间 30 s, 载气高纯氩气, 砷元素分析谱线 189 nm。根据以下公式计算包封率和载药量分别为 $(74.31 \pm 2.11)\%$ 和 $(8.31 \pm 0.13\%)$ 。

$$\text{包封率} = (W_0 - W_1) / W_0$$

$$\text{载药量} = (W_0 - W_1) / W_t$$

W_0 为总药量, W_1 为所测载药后上清液中的游离药物量, W_t 为 CaAs-LP 的总质量

2.3 体外释放研究

选用 pH 值分别为 7.4、6.8、5.5 的 PBS 为释放介质, 考察 As_2O_3 及载药脂质体中 As_2O_3 的释放特征。精密量取 As_2O_3 溶液及 CaAs-LP (含 As 1.0 mg) 2 mL, 置于预先处理过的透析袋内, 排除气泡后密封, 置于 200 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、15、30、45 min 及 1、2、4、6、8、12、24 h 取样 1 mL, 并立即补加等量同温同 pH 值新鲜释放介质, 样品经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液稀释用 ICP 测定释放介质中药物含量, 计算累积释药率 (Q), 并绘制释药曲线。 As_2O_3 溶液和 CaAs-LP 在不同 pH 值条件下的释药曲线如图 3 所示。 As_2O_3 溶液在释放介质中 4 h 就几乎释放完全, 且不同 pH 值下的释放曲线十分接近, 无 pH 值响应。不同 pH 值下 CaAs-LP 的释放均显著慢于 As_2O_3 溶液。CaAs-LP 的释药初始时释放较快, 而后逐渐趋于平缓; 释药速率随着 pH 值的降低而增加, 48 h 时在 pH 值分别为 7.4、6.8、5.5 时, 累积释药率分别为 41.6%、62.1%、89.9%, 具有显著的 pH 值响应释药特性。当 pH 值为 5.5, 释放速率相对于 pH 为 7.4、6.8 时明显加快, 且 48 h 接近释放完全。

2.4 载体毒性

分别取对数生长期的 MCF-7、U87、HepG2 细胞和 L02 细胞, 8×10^3 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质量浓度 (1、5、10、25、50、100、500 $\mu\text{g/mL}$) Ca-LP 的无血清培养液, 放入培养箱继续培养 48 h, 吸弃含药培养液, 加入 0.2 mL 含 MTT (0.5 mg/mL) 的无血

表 1 Ca-LP 及 CaAs-LP 的粒径、PDI 和 Zeta 电位

Table 1 Particle size, PDI and Zeta potential of Ca-LP and CaAs-LP

样品	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
Ca-LP	119.32 ± 2.16	0.195 ± 0.021	-21.72 ± 2.42
CaAs-LP	117.16 ± 1.94	0.212 ± 0.018	-26.33 ± 2.25

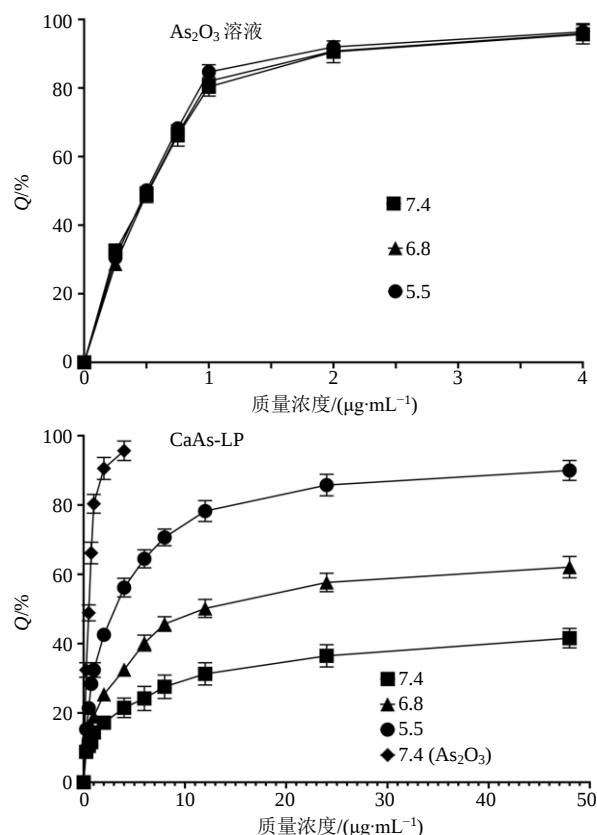


图 3 As_2O_3 溶液和 CaAs-LP 在不同 pH 值释放介质中体外释药曲线

Fig. 3 *In vitro* release profiles of As_2O_3 solution and CaAs-LP in different pH medium

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, 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 [细胞存活率 = $(A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$], 结果见图 4。在 3 种癌细胞与正常肝细胞中, 不含砷的脂质体表现出良好的生物相容性, 除 MCF-7 在 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时 (86%) 外, 存活率均大于 90%。MCF-7 存活率在质量浓度为 1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 随脂质体的质量浓度增加而升高, 随后在质量浓度为 25~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时存活率逐步递减; U87 存活率在质量浓度为 1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时随脂质体的质量浓度上升呈升高趋势, 随后下降; HepG2 则在质量浓度为 1~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时升高, 在 100~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时下降; 而正常肝细胞 L02 在质量浓度为 1~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时升高, 在 100~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时呈下降趋势。

2.5 递药系统体外毒性评价

取对数生长期的 MCF-7、U87、HepG2 和 L02 细胞以 8×10^3 个/孔接种于 96 孔板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养

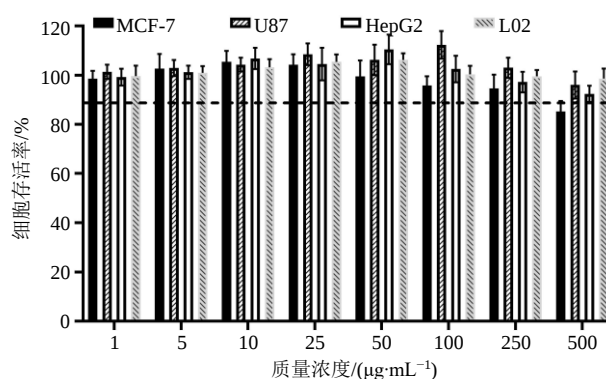


图 4 Ca-LP 对 MCF-7、U87、HepG2 和 L02 细胞的载体毒性

Fig. 4 Cytotoxicity of Ca-LP on MCF-7, U87, HepG2 and L02 cells

12 h, 移弃培养液, 分别加入 1、5、10、25、50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ As_2O_3 及 CaAs-LP 的无血清培养液, 放入培养箱继续培养 48 h。后续步骤同 2.4, 测 A 值并计算细胞存活率, 半数抑制浓度 (IC_{50}) 值。

结果见图 5, 随着 As_2O_3 及 CaAs-LP 浓度的增加, MCF-7、U87 及 HepG2 细胞的存活率均降低, 说明 As_2O_3 及 CaAs-LP 对 MCF-7、U87 及 HepG2 细胞均具有较好的抑制作用, 且呈浓度相关性; 对正常细胞也存在毒性。根据给药浓度及细胞存活率计算在各细胞中的 IC_{50} 值, 结果如表 2 所示。 As_2O_3 处理的 MCF-7、U87、HepG2 和 L02 的 IC_{50} 值分别为 14.86、7.49、26.67、31.84 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 脂质体包载后, IC_{50} 值下降至 11.91、4.90、19.41、27.59 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 说明 As_2O_3 及 CaAs-LP 对 3 种肿瘤细胞均具有良好的抑制作用。经脂质体包载后, 虽然缓释会影响药物在前期的作用, 但经 48 h 后, 对癌细胞药效反而被进一步加强 (3 组均 $P < 0.05$)。

2.6 递药系统的细胞摄取及分布

取对数生长期的 U87 细胞接种于激光共聚焦专用培养皿, 数量为 1×10^4 个/mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h, 吸去培养基, 加入含 FITC 标记脂质体的 DMEM 培养基, 培养 4 h, PBS 洗涤 3 次, 与 0.5 mL 4% 多聚甲醛共孵育 10 min, 继续 PBS 洗涤 3 次, 加入 0.1% 的 Tritonx-100 共孵育 3~5 min, 加 0.5 mL 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Hoechst 染色 15 min; PBS 洗涤 3 次, 加入 Phalloidin 染色细胞骨架 20 min, 洗涤 3 次, 加少量 PBS 防止干燥, 进行激光共聚焦检测。结果如图 6 所示, U87 对 FITC 标记的脂质体的摄取情况良好, 且主要分布在胞质部分。

取对数生长期的 U87 细胞以密度为 1×10^5

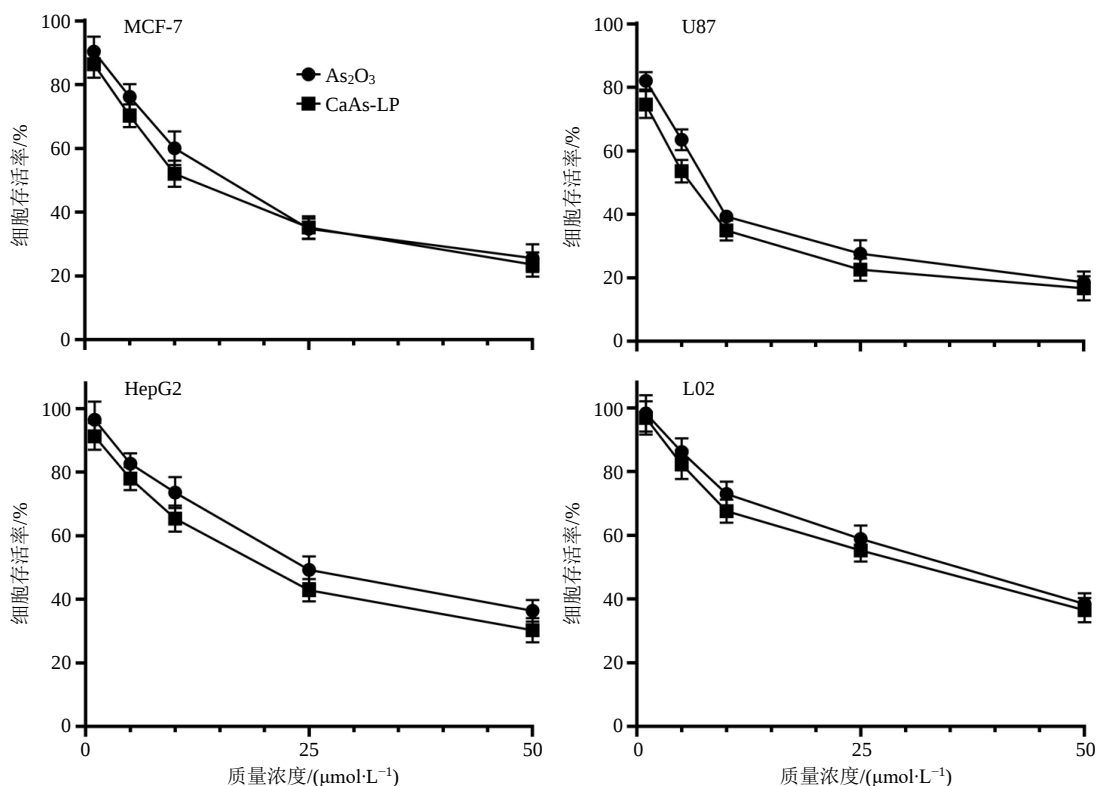


图 5 As_2O_3 溶液及 CaAs-LP 对 MCF-7、U87、HepG2 和 L02 细胞的细胞毒性考察

Fig. 5 Cellular cytotoxicity of As_2O_3 solution and CaAs-LP on MCF-7, U87, HepG2 and L02 cells

表 2 As_2O_3 及 CaAs-LP 在 MCF-7、U87、HepG2 和 L02 中的 IC_{50} 值

Table 2 IC_{50} of As_2O_3 and CaAs-LP in MCF-7, U87, HepG2 and L02 cells

组别	$\text{IC}_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$			
	MCF-7	U87	HepG2	L02
As_2O_3	14.86 ± 1.54	7.49 ± 0.52	26.67 ± 2.11	31.84 ± 2.35
CaAs-LP	$11.91 \pm 1.02^*$	$4.90 \pm 0.38^{**}$	$19.41 \pm 1.83^{**}$	27.59 ± 2.43

与 As_2O_3 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs As_2O_3 group

个/mL 接种 2 mL 于 6 孔板, 37 °C 培养 12 h。吸去培养基, 加入 100 μL 的 As_2O_3 水溶液和 CaAs-LP,

分别孵育 1、2、4 h。PBS 洗 3 次后, 收集细胞, 处理后经 ICP 测定药物含量, 进一步评价 U87 细胞对 CaAs-LP 的摄取效率。结果如图 7 所示, 随着共孵育的时间增长, As_2O_3 与 CaAs-LP 不断摄入细胞中。相比于 As_2O_3 溶液的逐步摄取, CaAs-LP 在开始 2 h 内摄取更为迅速 ($P < 0.05$); 4 h 后, 两者胞内浓度均趋于饱和, 无显著性差异。

3 讨论

为了提高 As_2O_3 的在体稳定性, 降低血浆蛋白结合率从而延长在体循环时间并增加其靶向性, 研究者们设计了脂质体、胶束、介孔二氧化硅等纳米

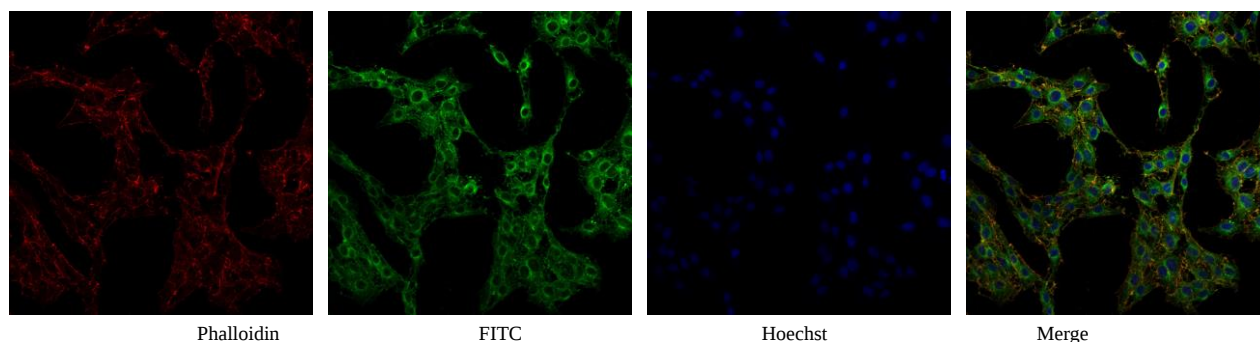


图 6 激光共聚焦显微镜观察 U87 细胞对 FITC 标记载体的摄取及胞内分布

Fig. 6 Intracellular process and intracellular distribution of FITC labeled liposome cultured with U87 cells observed by confocal microscope

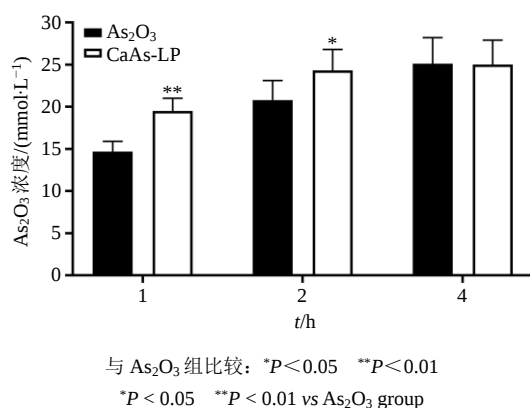


图7 U87细胞对As₂O₃及CaAs-LP的摄取效率考察

Fig. 7 Cellular uptake efficiency of U87 cells to As₂O₃ and CaAs-LP

制剂,并均展现出良好的抗实体瘤作用^[21-24]。然而无机的亚砷酸根离子(As₂O₃在水溶液中的存在形式)与脂质体及胶束的有机形式不相容,这使得药物主要存在于纳米制剂的水相或以吸附的形式结合,难以达到理想的包封率和载药量,并在体内循环过程存在严重的突释漏释现象^[13]。本研究在醋酸钙梯度法制备及利用酸根差异负载药物基础上,还利用了As₂O₃对磷脂双分子层的渗透特性,使As₂O₃进入到脂质体内部纳米空腔中与钙离子形成水不溶性亚砷酸盐复合物,实现对As₂O₃高效包载^[25]。

CaAs-LP在不同pH值释放介质中的释药速度不同,随pH值的降低显著增加。不载药的Ca-LP在低浓度时不仅几乎没有细胞毒性,而且因为构成脂质体的磷脂为一种细胞的营养物质,在一定程度上增加了3种癌细胞的存活率。其中,U87作为脑胶质瘤细胞,对脂质吸收作用较好,存活率相对于MCF-7及HepG2细胞较高。因为Ca²⁺浓度增加到一定程度会超过细胞膜对Ca²⁺的调节,引起细胞内部的钙超载,引起细胞死亡^[26],所以随后浓度继续增加,细胞的存活率反而下降。CaAs-LP相比于As₂O₃在3种癌细胞中均显示出更强的细胞毒性。这可能是由于初始阶段,细胞膜对亚砷酸根离子具有阻挡作用,却可以吸收CaAs-LP,使细胞内部的药物浓度最高时间持续更久。另一方面,As₂O₃在细胞中会促进线粒体的涨溶促进细胞凋亡,而线粒体本身是调节胞内Ca²⁺浓度的细胞器。CaAs-LP摄取后的胞内Ca²⁺浓度升高,失去线粒体调节后,形成钙超载,也增加了CaAs-LP的细胞毒性^[27]。CaAs-LP具备的pH敏感特性可能使得药物在肿瘤细胞内特异性释放,降低了药物的毒副作用。

体外研究显示,基于As₂O₃本身性质设计的一种较好的pH响应性纳米制剂,该研究可为如As₂O₃的半衰期短、治疗窗窄的毒性药物的新型纳米制剂的构建提供参考。

参考文献

- [1] Zhang X W, Yan X J, Zhou Z R, et al. Arsenic trioxide controls the fate of the PML-RAR alpha oncoprotein by directly binding PML [J]. *Science*, 2010, 328(5975): 240-243.
- [2] 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.
- [3] Lo-Coco F, Donato L D, GIMEMA, et al. Targeted therapy alone for acute promyelocytic leukemia [J]. *New Engl J Med*, 2016, 374(12): 1197-1198.
- [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] 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): 2049-2056.
- [6] Fu X, Li Y S, Zhao J, et al. Will arsenic trioxide benefit treatment of solid tumor by nano-encapsulation? [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2020, 20(3): 239-251.
- [7] Cioloboc D, Kurtz D M. Targeted cancer cell delivery of arsenate as a reductively activated prodrug [J]. *J Biol Inorg Chem*, 2020, 25(3): 441-449.
- [8] Tao J Y, Fei W D, Tang H X, et al. Angiopep-2-conjugated "core-shell" hybrid nanovehicles for targeted and ph-triggered delivery of arsenic trioxide into glioma [J]. *Mol Pharm*, 2019, 16(2): 786-797.
- [9] 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.
- [10] Yin X Y, Luo L H, Li W, et al. A cabazitaxel liposome for increased solubility, enhanced antitumor effect and reduced systemic toxicity [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2019, 14(6): 658-667.
- [11] He H S, Lu Y, Qi J P, et al. Biomimetic thiamine- and niacin-decorated liposomes for enhanced oral delivery of insulin [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2018, 8(1): 97-105.
- [12] 徐飞,唐莉,李青山.4-邻甲苯磺酰氧基苯并噻唑酮脂质体的制备及其质量评价研究[J].*药物评价研究*, 2014, 37(3): 246-249.
- [13] Fei W D, Zhang Y, Han S P, 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: 250-262.
- [14] Chen F Y, Yi J W, Gu Z J, *et al.* Inorganic phosphate-triggered release of anti-cancer arsenic trioxide from a self-delivery system: An *in vitro* and *in vivo* study [J]. *Nanoscale*, 2016, 8(11): 6094-6100.
- [15] Seidl M, Balázs G, Scheer M. The chemistry of yellow arsenic [J]. *Chem Rev*, 2019, 119(14): 8406-8434.
- [16] Fei W D, Li C Q, Tao J Y, *et al.* Construction of arsenic-metal complexes loaded nanodrugs for solid tumor therapy: A mini review. [J]. *Int J Pharm*, 2020, 583: 119385.
- [17] Zhao Z H, Zhang H, Chi X Q, *et al.* Silica nanovehicles endow arsenic trioxide with an ability to effectively treat cancer cells and solid tumors [J]. *J Mater Chem B*, 2014, 2(37): 6313-6323.
- [18] Zhao Z H, Wang X M, Zhang Z J, *et al.* Real-time monitoring of arsenic trioxide release and delivery by activatable T(1) imaging [J]. *ACS Nano*, 2015, 9(3): 2749-2759.
- [19] 徐骏军, 陈丹飞, 宋倩倩, 等. pH 值响应释药 As_2O_3 聚乙二醇-聚己内酯-聚乙烯亚胺纳米粒的制备及体外评价 [J]. *中草药*, 2018, 49(23): 5532-5540.
- [20] Althuri A, Mathew J, Sindhu R, *et al.* Microbial synthesis of poly-3-hydroxybutyrate and its application as targeted drug delivery vehicle [J]. *Bioresource Technol*, 2013, 145: 290-296.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] Shi X W, Ma R, Lu Y P, *et al.* iRGD and TGN co-modified PAMAM for multi-targeted delivery of ATO to gliomas [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 527(1): 117-123.
- [24] Wu Q R, Chen X W, Wang P, *et al.* Delivery of arsenic trioxide by multifunction nanoparticles to improve the treatment of hepatocellular carcinoma [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12(7): 8016-8029.
- [25] 蔡丽杰. 三氧化二砷脂质体的制备及药物动力学研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2015.
- [26] Fu Z L, Fan Q M, Zhou Y, *et al.* Elimination of intracellular calcium overload by BAPTA-AM-loaded liposomes: A promising therapeutic agent for acute liver failure [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(43): 39574-39585.
- [27] Naranmandura H, Chen X, Tanaka M, *et al.* Release of apoptotic cytochrome C from mitochondria by dimethylarsinous acid occurs through interaction with voltage-dependent anion channel *in vitro* [J]. *Toxicol Sci*, 2012, 128(1): 137-146.