

pH 响应三氧化二砷聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米粒的制备及体外评价

吴仁杰¹, 余红芳¹, 颜星星¹, 范婷¹, 诸佳珍², 谢晓伟², 施政^{1*}, 姚文栋^{1*}

1. 浙江中医药大学附属第一医院 药剂科, 浙江 杭州 310018

2. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 311400

摘要: **目的** 为了提高三氧化二砷 (arsenic trioxide, ATO) 在体内的稳定性, 使其具备 pH 响应及缓释特性, 制备了 pH 响应的载三氧化二砷聚乳酸-羟基乙酸共聚物 [poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA] 纳米粒 (pH-ATO-PLGA@NPs), 并对其进行了理化性质考察和细胞学评价。**方法** 以 NaHCO₃ 为 pH 响应因子, 采用复乳溶剂蒸发法制备 pH-ATO-PLGA@NPs 并进行单因素考察优化。随后, 利用马尔文粒径仪考察 pH-ATO-PLGA@NPs 的粒径、多分散系数 (polydispersity index, PDI)、Zeta 电位、稳定性; 透射电子显微镜 (TEM) 观察形态; 电感耦合等离子体发射光谱仪测定包封率、载药量; 透析袋法考察其在不同 pH 值的体外释药特性; MTT 法考察载体及 pH-ATO-PLGA@NPs 对人源性肝癌 HepG2 细胞及人正常肝 L02 细胞的细胞毒性。**结果** pH-ATO-PLGA@NPs 外观圆整均一, 其粒径、PDI、Zeta 电位分别为 (214.35±1.86) nm、0.24±0.02、(-35.49±1.88) mV; 包封率及载药量分别为 (62.32±2.61)%、(1.59±0.34)%。体外释放实验表明, pH-ATO-PLGA@NPs 不仅可以达到缓释效果, 还具有 pH 响应特性。细胞实验结果表明, PLGA 及 pH-PLGA 纳米粒载体毒性低, 生物相容性良好。pH-ATO-PLGA@NPs 在 pH 7.4 培养基中半数抑制浓度 (IC₅₀) 值为 (23.71±0.70) μmol/L, 而在 pH 6.5 的培养基中 IC₅₀ 值显著降低 ($P<0.01$), 为 (16.40±0.62) μmol/L, 具备 pH 响应特性。而在 L02 细胞中, pH-ATO-PLGA@NPs 的细胞毒性 [IC₅₀ 为 (39.72±1.84) μmol/L] 显著小于 ATO 溶液 [IC₅₀ 为 (28.25±1.33) μmol/L] ($P<0.01$), 降低了在正常细胞中的毒性。**结论** pH-ATO-PLGA@NPs 具备缓释以及 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: 三氧化二砷; PLGA 纳米粒; pH 响应; 体外评价; 复乳溶剂蒸发法; 缓释

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2021)15-4528-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.15.010

Preparation and *in vitro* evaluation of arsenic trioxide loaded pH responsive poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles

WU Ren-jie¹, YU Hong-fang¹, YAN Xing-xing¹, FAN Ting¹, ZHU Jia-zhen², XIE Xiao-wei², SHI Zheng¹, YAO Wen-dong¹

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

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

Abstract: Objective To improve the stability of arsenic trioxide (ATO) *in vivo* with characteristics of pH response and sustained release, a pH responsive poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) (pH-PLGA) nanoparticles was designed to load ATO. Then, the properties and cytological evaluation of pH responsive arsenic trioxide-loaded PLGA (pH-ATO-PLGA) nanoparticles (pH-ATO-PLGA@NPs) was been tested. **Methods** Using NaHCO₃ as the pH response factor, this study prepared pH-ATO-PLGA@NPs using the double emulsion solvent evaporation method. The particle size, PDI, and Zeta potential of pH-ATO-PLGA@NPs were measured by Malvern particle size analyzer; The morphology of pH-ATO-PLGA@NPs was investigated by transmission electron microscopy; The drug loading and entrapment efficiency of pH-ATO-PLGA@NPs detected by inductively coupled plasma emission spectrum. *In vitro* release characteristics of pH-ATO-PLGA@NPs under different pH conditions were investigated by dialysis bag

收稿日期: 2021-03-19

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (LQ19H280004); 浙江省药学会医院药学专项科研资助项目 (石药专项) (2019ZY22); 浙江省药学会医院药学专项科研资助项目 (石药专项) (2019ZY23); 浙江省药学会医院药学专项科研资助项目 (石药专项) (2020ZY04)

作者简介: 吴仁杰, 药师, 硕士研究生, 研究方向为药物制剂新技术。Tel: 18368022352 E-mail: 1508814835@qq.com

*通信作者: 施政, 副主任药师, 中药学博士, 研究方向为中药靶向递药系统的研究。Tel: 13857188289 E-mail: frysz@163.com

姚文栋, 药师, 药剂学硕士, 研究方向为新型给药系统及靶向制剂的研究。Tel: 15990140730 E-mail: yaowendong7370@dingtalk.com

method. MTT assay was used to investigate the toxicity of carrier and pH-ATO-PLGA@NPs to HepG2 and L02. **Results** The shape of the pH-ATO-PLGA@NPs was round and uniform, while the particle size, polydispersity coefficient (PDI), and Zeta potential were (214.35 ± 1.86) nm, 0.24 ± 0.02 , (-35.49 ± 1.88) mV, respectively. The encapsulation efficiency and the drug loading rate of pH-ATO-PLGA @NPs were $(62.32 \pm 2.61)\%$ and $(1.59 \pm 0.34)\%$, respectively. *In vitro* release studies showed that pH-ATO-PLGA@NPs had the characteristics of sustained release and pH responsive drug release, which can achieve specific drug release in the tumor environment. The carrier displayed remarkable biocompatibility in HepG2 cells. MTT assay showed that the median lethal concentrations (IC_{50} values) of (23.71 ± 0.70) $\mu\text{mol/L}$ at pH 7.4 while (16.40 ± 0.62) $\mu\text{mol/L}$ at pH 6.5 ($P < 0.01$), which showed pH responsive and strong inhibiting effect on tumor cells. In L02 cells, the cytotoxicity of pH-ATO-PLGA@NPs [IC_{50} (39.72 ± 1.84) $\mu\text{mol/L}$] was significantly lower than that of ATO solution [IC_{50} (28.25 ± 1.33) $\mu\text{mol/L}$] ($P < 0.01$), which reduced toxicity in normal cells. **Conclusion** The pH-ATO-PLGA@NPs reveals significantly sustained and pH responsive release characteristics. The pH-ATO-PLGA@NPs is a potential drug delivery system against tumor with tumor micro-environment responsive.

Key words: arsenic trioxide; PLGA nanoparticles; pH response; *in vitro* evaluation; double-emulsion solvent evaporation method; sustained release

砒霜在我国拥有悠久的历史,其主要成分为三氧化二砷(arsenic trioxide, ATO)。20世纪70年代,黑龙江中医药大学将ATO用于急性早幼粒细胞白血病的治疗,并取得了显著的疗效^[1]。随着ATO的使用,经研究发现其对于肝癌、乳腺癌等多种实体瘤也存在抑制生长和诱导凋亡的作用^[2-3]。ATO能够影响细胞周期,抑制肿瘤细胞增殖与转移,还能够通过影响线粒体功能诱导肿瘤细胞凋亡^[3]。但ATO进入人体后,血浆结合率高,代谢消除快,无特异性分布等缺陷导致的诸多不良反应限制了其对于实体瘤的临床应用^[4]。因此,通过相关生物学及制剂技术提高ATO在体内的稳定性,延长作用时间,使其具有靶向性、肿瘤环境响应给药特性^[5],这对ATO应用于肿瘤的治疗具有重要意义。

乳酸-羟基乙酸共聚物(poly-lactic-co-glycolic acid, PLGA)由乳酸和羟基乙酸缩合而成,被人体吸收后可正常代谢,对生物体无毒副作用,是美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准的可安全使用的药用高分子材料^[6]。PLGA具有良好的生物相容性和可降解性,形成纳米粒或微球后可应用于药物的包埋荷载,提高包载药物体内稳定性^[7]。PLGA纳米粒具备靶向性及缓控释特性,使包载药物特异性分布且延长其作用时间^[8-9]。并且,PLGA可经修饰或添加针对肿瘤微环境刺激性响应因子,如 NaHCO_3 ,而制备成pH响应PLGA纳米粒(pH-PLGA)^[10]。

PLGA纳米粒的上述特性使之成为ATO的理想载体。因此,本研究以 NaHCO_3 为pH响应因子制备了pH响应的载三氧化二砷PLGA纳米粒(pH-ATO-PLGA@NPs),并对其粒径、多分散系数(PDI)、稳定性、体外释放及对对人源性肝癌HepG2

细胞的毒性进行考察。

1 仪器与材料

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 Coulter有限公司;JY92-IIN 超声波粉碎机,宁波新芝生物科技股份有限公司;细胞培养箱,美国Thermo公司;SpectraMax M2 酶标仪,美国Molecular Devices公司;ICAP 6300 电感耦合等离子体发射光谱仪,美国Thermo公司;R205D 旋转蒸发器,上海申胜生物技术有限公司;ZD-85 恒温水浴震荡器,力辰科技有限公司。

PLGA,批号93671849,相对分子质量20 000,6:4,济南岱罡生物工程有限公司;1,3-双硬脂酸甘油酯,玛雅试剂有限公司,批号MAYA-CR-784;二氯甲烷,麦克林试剂,批号C10167809;ATO,苏州诺德派森公司,批号20151005,质量分数97%; NaHCO_3 ,Aladdin公司,批号J1916092;砷标准溶液(1 mg/mL,国家有色金属及电子材料分析测试中心,货号GSB04-1714-2004);胎牛血清,杭州四季青公司,批号18110504;司盘-80,Aladdin公司,批号38771;聚乙烯醇,美国Sigma Aldrich公司,批号1002287571,其余试剂均为分析纯。HepG2细胞由浙江中医药大学动物实验中心提供。

2 方法与结果

2.1 pH-PLGA 纳米粒 (pH-PLGA@NPs) 的制备及处方工艺优化

2.1.1 pH-PLGA@NPs 的制备方法 本研究采用复乳溶剂蒸发法^[11]制备纳米粒。称取适量PLGA溶于10 mL二氯甲烷,加入1,3-双硬脂酸甘油酯60 mg及1.0 mL司盘-80溶解作为油相;取 NaHCO_3 水溶

液作为内水相于离心管,加入油相后于超声波粉粹仪下超声 15 min。在超声后所得初乳中加入表面活性剂聚乙烯醇(PVA)的水溶液,再超声得到复乳。复乳至圆底烧瓶 40 °C 水浴旋蒸 10 min 后,于 40 °C 水浴搅拌 4 h,挥干有机溶剂,即得 pH-PLGA@NPs。

以 pH-PLGA@NPs 的粒径及多分散系数(PDI)为指标,考察 PLGA 用量、超声功率、表面活性剂浓度、NaHCO₃ 质量浓度对纳米粒的影响。

2.1.2 PLGA 用量 根据“2.1.1”项下所述方法,分别称取 50、100、150、200、250 mg PLGA 溶于 10 mL 二氯甲烷,加入 1,3-双硬脂酸甘油酯 60 mg 及 1.0 mL 司盘-80 溶解作为油相,采用 180 W 超声功率,0.2% PVA 溶液,2.5 mg/mL NaHCO₃ 溶液进行后续操作,制备 pH-PLGA@NPs,并分别对所得纳米粒的粒径及 PDI 进行检测,结果见表 1。为方便后续载药及生物学研究^[7],综合纳米粒粒径及 PDI 结果,选取 200 mg PLGA 投料量进行纳米粒的制备。

表 1 不同 PLGA 投料量对 pH-PLGA@NPs 粒径及 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of PLGA with different dosages on size and PDI of pH-PLGA@NPs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

PLGA/mg	粒径/nm	PDI
50	272.38 ± 8.34	0.42 ± 0.07
100	253.76 ± 4.54	0.36 ± 0.07
150	238.26 ± 3.42	0.27 ± 0.05
200	226.61 ± 2.14	0.22 ± 0.02
250	232.54 ± 4.43	0.24 ± 0.02

2.1.3 超声功率 根据“2.1.1”项下所述方法,称取 200 mg PLGA 溶于 10 mL 二氯甲烷,加入 1,3-双硬脂酸甘油酯 60 mg 及 1.0 mL 司盘-80 溶解作为油相。选取 0、90、180、270、360 W 超声功率进行超声,采用 0.2% PVA 溶液,2.5 mg/mL NaHCO₃ 溶液并进行后续操作,制备 pH-PLGA@NPs,并分别对所得纳米粒的粒径及 PDI 进行检测,结果见表 2。综合粒径与 PDI 结果,选取 180 W 超声制备 pH-PLGA@NPs。

2.1.4 表面活性剂浓度 分别称取 0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 g PVA 水浴加热溶于 100 mL 纯水中得 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0% PVA 溶液。根据“2.1.1”项下所述方法,称取 200 mg PLGA 溶于

表 2 不同超声功率对 pH-PLGA@NPs 粒径及 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of different ultrasonic power on size and PDI of pH-PLGA@NPs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

功率/W	粒径/nm	PDI
0	896.55 ± 28.52	0.76 ± 0.08
90	428.82 ± 6.38	0.34 ± 0.04
180	224.39 ± 2.52	0.22 ± 0.02
270	234.38 ± 3.65	0.28 ± 0.02
360	239.43 ± 3.26	0.29 ± 0.03

10 mL 二氯甲烷,加入 1,3-双硬脂酸甘油酯 60 mg 及 1.0 mL 司盘-80 溶解作为油相,在 180 W 下超声。分别加入 0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1.0% PVA 溶液,采用 2.5 mg/mL NaHCO₃ 溶液并进行后续操作,制备 pH-PLGA@NPs,并分别对所得纳米粒的粒径及 PDI 进行检测,结果见表 3。0.2%、0.4% 浓度的 PVA 溶液所制备的 pH-PLGA@NPs 粒径无显著性差异 ($P > 0.05$),但 0.4% 浓度下的 PDI 更小,故而选取 0.4% 浓度的 PVA 溶液作为表面活性剂制备 pH-PLGA@NPs。

表 3 不同表面活性剂浓度对 pH-PLGA@NPs 粒径及 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of different surfactant concentrations on size and PDI of pH-PLGA@NPs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

PVA/%	粒径/nm	PDI
0.2	212.46 ± 2.84	0.25 ± 0.04
0.4	212.35 ± 2.16	0.21 ± 0.02
0.6	243.27 ± 2.49	0.22 ± 0.04
0.8	259.71 ± 5.91	0.26 ± 0.03
1.0	290.65 ± 7.52	0.35 ± 0.07

2.1.5 NaHCO₃ 质量浓度 根据“2.1.1”项下所述方法,称取 200 mg PLGA 溶于 10 mL 二氯甲烷,加入 1,3-双硬脂酸甘油酯 60 mg 及 1.0 mL 司盘-80 溶解作为油相,在 180 W 下超声,加入 0.4% PVA 溶液。内水相分别为 1.0 (pH 8.39)、2.5 (pH 8.39)、5.0 (pH 8.40)、7.5 (pH 8.42)、10.0 (pH 8.44) mg/mL NaHCO₃ 溶液,并进行后续操作,制备 pH-PLGA@NPs,并分别对所得 pH-PLGA@NPs 的粒径及 PDI 进行检测,结果如表 4 所示。综合粒径与 PDI 结果,选取 2.5 mg/mL NaHCO₃ 溶液为内水相制备 pH-PLGA@NPs。

2.1.6 pH-PLGA@NPs 制备方法优化结果 综合

表 4 不同 NaHCO₃ 质量浓度对 pH-PLGA@NPs 粒径及 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effects of different NaHCO₃ concentrations on size and PDI of pH-PLGA@NPs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

NaHCO ₃ /(mg·mL ⁻¹)	粒径/nm	PDI
1.0	229.48±2.63	0.26±0.03
2.5	210.56±2.32	0.21±0.02
5.0	247.85±3.68	0.29±0.08
7.5	276.42±5.71	0.39±0.12
10.0	435.40±10.22	0.51±0.12

PLGA 用量、超声功率、表面活性剂浓度及 NaHCO₃ 质量浓度考察结果, 得到 pH-PLGA@NPs 最终制备方案: 称取 200 mg PLGA 溶于 10 mL 二氯甲烷, 加入 1,3-双硬脂酸甘油酯 60 mg 及 1.0 mL 司盘-80 溶解作为油相; 取 2.5 mg/mL NaHCO₃ 溶液 0.5 mL 作为水相于离心管, 加入 2.5 mL 油相后于超声波粉碎仪下以 180 W 功率超声 10 min, 形成初乳。所得初乳中加入 0.4% 聚乙烯醇 PVA 水溶液 8 mL 后, 180 W 功率超声波粉碎仪下超声 10 min, 得到复乳。取复乳至圆底烧瓶悬液蒸 10 min 后, 于 40 °C 水浴搅拌 4 h, 挥干有机溶剂。将成品于 10 000 r/min 高速离心 10 min, 去上清, 减压干燥得 pH-PLGA@NPs。

2.2 pH-ATO-PLGA、PLGA、ATO-PLGA 纳米粒 (pH-ATO-PLGA@NPs、PLGA@NPs、ATO-PLGA@NPs) 的制备

内水相加入 0.5 mL 10 mg/mL ATO 溶液, 油相按“2.1.6”项下所述方法制备, 后续步骤相同。挥干有机溶剂后, 将 pH-ATO-PLGA@NPs 的溶液移至透析袋中, 在 500 mL 外液环境中透析 6 h (100 r/min) 除去未加载的游离 ATO, 得到 pH-ATO-PLGA@NPs。制备过程中不加入 NaHCO₃ 溶液重复“2.1.6”项后续步骤, 得到普通的 PLGA@NPs。无 pH 响应的普通 PLGA@NPs, 重复“2.1.6”项后续步骤负载 ATO, 得到 ATO-PLGA@NPs。

2.3 pH-ATO-PLGA@NPs 的表征

2.3.1 粒径、Zeta 电位及形态 通过 Nano-ZS 90 激光粒度分析仪测定 PLGA@NPs、pH-PLGA@NPs、ATO-PLGA@NPs、pH-ATO-PLGA@NPs 的粒径、PDI 及 Zeta 电位; 采用 HT7700 透射电子显微镜观察 pH-ATO-PLGA@NPs 的形态。

复乳溶剂蒸发法制备所得 PLGA@NPs、pH-PLGA@NPs、ATO-PLGA@NPs 及 pH-ATO-PLGA@NPs 的粒径见表 5, PLGA@NPs 的粒径、PDI 及 Zeta

电位分别为 (206.18±1.83) nm、0.20±0.02、(-22.26±1.43) mV。载药后, 纳米粒的粒径和 PDI 均有所增大, 变为(212.54±2.04)nm 及 0.24±0.03, Zeta 电位下降至 (-23.46±1.96) mV。pH 响应因子加入后, pH-PLGA@NPs 粒径较 PLGA@NPs 略有增加, Zeta 电位却显著下降至 (-32.75±1.81) mV。pH-ATO-PLGA@NPs 兼具载药及 pH 响应功能, 粒径增大至 (214.35±1.86) nm, Zeta 电位下降至 (-35.49±1.88) mV。

TEM 结果 (图 1) 显示, pH-ATO-PLGA@NPs 形态规整, 呈圆整球形或类球形, 分散性良好, 无团聚现象, 但 TEM 下粒径比粒径仪测得的小 20 nm 左右。

表 5 PLGA@NPs、pH-PLGA@NPs、ATO-PLGA@NPs 与 pH-ATO-PLGA@NPs 的粒径、PDI、电位 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Particle size, PDI, Zeta potential of PLGA@NPs, pH-PLGA@NPs, ATO-PLGA@NPs and pH-ATO-PLGA@NPs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
PLGA@NPs	206.18±1.53	0.20±0.02	-22.26±1.43
pH-PLGA@NPs	210.43±1.68	0.21±0.02	-32.75±1.81
ATO-PLGA@NPs	212.54±2.04	0.24±0.03	-23.46±1.96
pH-ATO-PLGA@NPs	214.35±1.86	0.24±0.02	-35.49±1.88

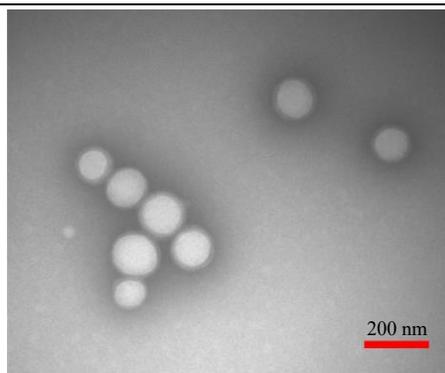


图 1 pH-ATO-PLGA@NPs 的 TEM 图
Fig. 1 TEM of pH-ATO-PLGA@NPs

2.3.2 包封率和载药量 取 ATO-PLGA@NPs 与 pH-ATO-PLGA@NPs 制备过程中透析 6 h 后的透析外液, 用已建立的电感耦合等离子体发射光谱仪测定其砷质量浓度^[12], 通过质量浓度及质量分数换算得到游离 ATO 的质量, 记作 W₁; 将收集得到的纳米粒质量, 记作 W₂; 按以下公式分别计算 ATO 的包封率和载药量。

$$\text{包封率} = (W_0 - W_1) / W_0$$

$$\text{载药量} = (W_0 - W_1) / W_2$$

W_0 为 ATO 总投药量, W_1 为 ATO-PLGA@NPs 或 pH-ATO-PLGA@NPs 中的游离药物量, W_i 为 ATO-PLGA@NPs 或 pH-ATO-PLGA@NPs 的总质量

通过对透析外液测定结果, 计算得到 ATO-PLGA@NPs 的包封率为 $(68.76 \pm 2.92)\%$, 载药量为 $(1.84 \pm 0.42)\%$; 而 pH-ATO-PLGA@NPs 的包封率为 $(62.32 \pm 2.61)\%$, 载药量为 $(1.59 \pm 0.34)\%$, ATO-PLGA@NPs 的包封率与载药量均略高于 pH-ATO-PLGA@NPs。

2.3.3 稳定性 将制备好的 PLGA@NPs、pH-PLGA@NPs、ATO-PLGA@NPs 及 pH-ATO-PLGA@NPs 分散于超纯水中, 于 4 °C 环境放置, 分别测定其 0、1、3、5、7 d 粒径及 Zeta 电位的变化。

粒径变化结果见图 2-A, 纳米粒粒径均随着放置时间延长而逐渐减小。到第 7 天, PLGA@NPs 下降至 (195.31 ± 2.94) nm, 粒径下降了约 11 nm; pH-PLGA@NPs 下降至 (192.68 ± 3.02) nm, 粒径下降了约 17 nm; ATO-PLGA@NPs 下降至 (197.62 ± 2.64) nm, 较初始粒径下降了约 15 nm; pH-ATO-PLGA@NPs 下降至 (187.74 ± 3.14) nm, 较初始粒径下降幅度最大, 约为 27 nm。

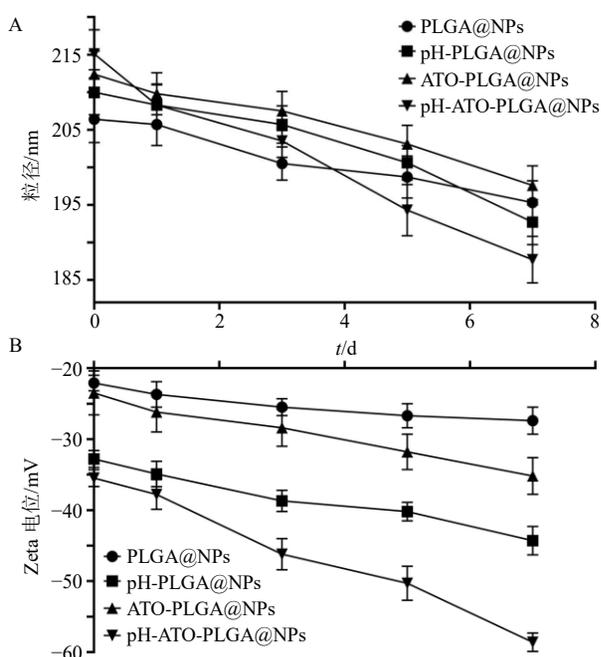


图 2 PLGA@NPs、pH-PLGA@NPs、ATO-PLGA@NPs 与 pH-ATO-PLGA@NPs 在 4 °C 环境冷藏的稳定性粒径 (A) 及 Zeta 电位 (B) 变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig 2 Stability changes in particle size (A) and Zeta potential (B) of PLGA@NPs, pH-PLGA@NPs, ATO-PLGA@NPs and pH-ATO-PLGA@NPs in cold storage at 4 °C ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

电位变化结果见图 2-B, 纳米粒电位均随着放置时间延长而逐渐减小。到第 7 天, PLGA@NPs 电位下降至 (-27.41 ± 1.89) mV, 下降幅度最小; pH-PLGA@NPs 电位下降至 (-44.92 ± 1.98) mV, 较初始电位下降了约 12 mV; ATO-PLGA@NPs 电位下降至 (-35.22 ± 2.63) mV, 较初始电位下降了约 10 mV; pH-ATO-PLGA@NPs 电位下降至 (-59.58 ± 1.39) mV, 较初始电位下降了约 23 mV, 下降幅度最大。

结果表明, 加入 pH 响应因子及载药后, 纳米粒的稳定性较 PLGA@NPs 略有下降。

2.4 体外释放

采用透析袋法测定 ATO、ATO-PLGA@NPs 与 pH-ATO-PLGA@NPs 的体外释药特性。精密称取 ATO、ATO-PLGA@NPs 和 pH-ATO-PLGA@NPs 并适量分散溶解后, 分别取 2 mL (含 ATO 2 mg) 置于透析袋中, 密封后分别放入 pH 值分别为 7.4、6.5、5.5 的 500 mL 磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 为释放介质的烧杯中, 然后置于 37 °C、100 r/min 恒温水浴振荡器中, 避光, 平行操作 3 份。于 0、0.25、0.5、1、2、4、6、8、12、24 h 时间点吸取 1.0 mL 的透析液, 并补充同温等量释放介质。样品用 0.22 μm 微孔滤膜滤过后, 续滤液测定砷质量浓度, 换算并计算累积释放率, 结果见图 3。

ATO 为水溶性药物, 尽管有透析袋减缓其释放速率, 2 h 时在 3 种不同 pH 值的 PBS 中均释放超过 90%, 且在之后基本释放完全, 释放曲线趋于平缓。经 ATO-PLGA@NPs 包埋后, ATO 的释放速率明显降低, 24 h 在 pH 7.4、6.5、5.5 环境中累积释放了 $(62.81 \pm 3.11)\%$ 、 $(60.78 \pm 2.96)\%$ 、 $(60.78 \pm 2.87)\%$, 具有明显的缓释特性, 不具备 pH 响应特性。pH-ATO-PLGA@NPs 则具备 pH 响应特性。24 h 时, pH-ATO-PLGA@NPs 中 ATO 在 pH 7.4 PBS 中累积释放量接近 ATO-PLGA@NPs, 为 $(67.36 \pm 3.24)\%$; 在 pH 6.5 PBS 中, 累积释放量已高于 ATO-PLGA@NPs, 为 $(72.42 \pm 4.51)\%$; 在 pH 5.5 PBS 中, pH-ATO-PLGA@NPs 中 ATO 累积释放量进一步升高至 $(89.06 \pm 3.92)\%$, 具备 pH 响应特性。

2.5 细胞学评价

2.5.1 空白载体细胞毒性 取处于对数生长期的 HepG2 细胞, 以 8×10^3 个/孔接种于 96 孔板, 37 °C 培养 12 h。取上述培养细胞后的 96 孔板, 移弃培养液, 分别加入质量浓度 10、25、50、100、250、500、

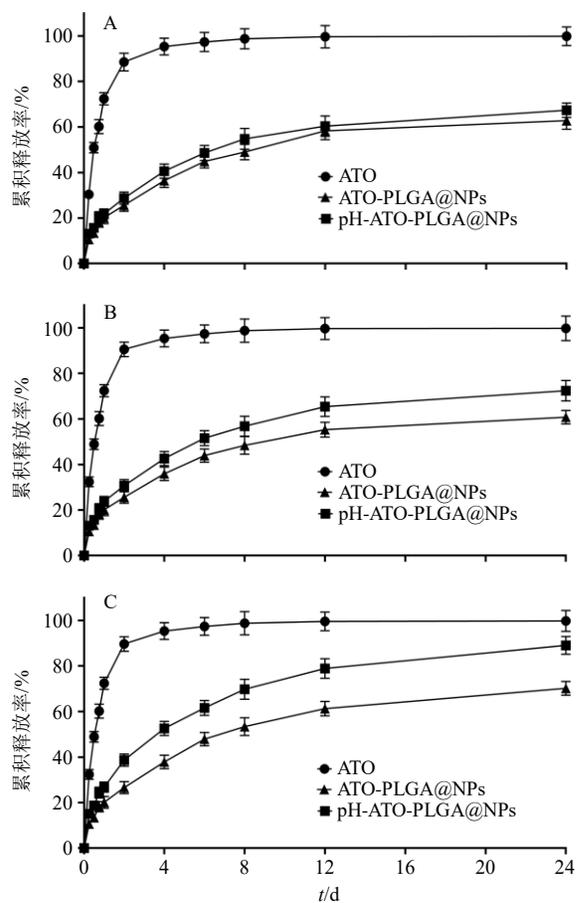


图3 ATO、ATO-PLGA@NPs及pH-ATO-PLGA@NPs在pH 7.4 (A)、6.5 (B)、5.5 (C) 环境中的体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 *In vitro* release curves of ATO, ATO-PLGA@NPs and pH-ATO-PLGA@NPs in pH 7.4 (A), 6.5 (B), 5.5 (C) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PLGA@NPs 及 pH-PLGA@NPs 的无血清培养基继续培养 24 h 后, 吸去含药培养液, 每孔加入 0.2 mL 含 0.5 mg/mL MTT 的 PBS, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育 4 h, 吸去含有 MTT 的培养液, 用 PBS 清洗 3 次后, 每孔加入 0.15 mL DMSO, 振荡 15 min, 溶解均匀后使用酶标检测仪于波长 540 nm 处测定吸收度 (A) 值。

不同质量浓度的 PLGA@NPs 及 pH-PLGA@NPs 对 HepG2 细胞存活率的影响结果如图 4 所示。在质量浓度 10~250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, PLGA@NPs 表现出良好的生物相容性, 存活率均未受影响; 当质量浓度达到 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, HepG2 细胞虽然受到影响, pH-PLGA@NPs 组 HepG2 细胞的存活率小于 90%, 但仍高于 85%, 而 PLGA@NPs 组的存活率仍大于 90%; 当质量浓度增大至 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, PLGA@

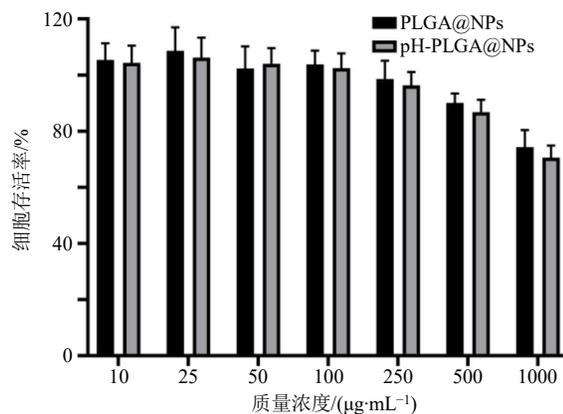


图4 不同质量浓度 PLGA@NPs、pH-PLGA@NPs 对 HepG2 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of PLGA@NPs, pH-PLGA@NPs with different concentrations on survival rate of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

NPs 与 pH-PLGA@NPs 组 HepG2 细胞的存活率均下降至小于 80%。上述结果表明, PLGA@NPs 与 pH-PLGA@NPs 均对 HepG2 细胞的细胞毒性作用均较弱, pH-PLGA@NPs 的细胞毒性作用略高于 PLGA@NPs。

2.5.2 载药纳米粒的细胞毒性 为了测定纳米粒 pH 响应性及对 ATO 包载后对肿瘤细胞活性的影响, 采用 MTT 考察纳米粒在 pH 7.4、6.5 对 HepG2 细胞的细胞毒性。取处于对数生长期的 HepG2 细胞, 以 8×10^3 个/孔接种于 96 孔板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h。取上述培养细胞后的 96 孔板, 移弃培养液, 分别加入含 ATO 浓度为 1、5、10、25、50、100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 ATO、ATO-PLGA@NPs 及 pH-ATO-PLGA@NPs 的普通无血清培养基 (pH 7.4) 与酸化后的无血清培养基 (pH 6.5) 继续培养 24 h。后续操作同“2.5.1”项, 测定 A 值, 计算半数抑制浓度 (IC_{50}) 值。结果见图 5-A、B, 在 pH 7.4 时, ATO 溶液的细胞毒性大于 ATO-PLGA@NPs 及 pH-ATO-PLGA@NPs, 并计算得到其 IC_{50} 为 $(21.99 \pm 1.30) \mu\text{mol}/\text{L}$; ATO-PLGA@NPs 的 IC_{50} 为 $(26.64 \pm 1.06) \mu\text{mol}/\text{L}$, 细胞毒性低于 pH-ATO-PLGA@NPs 的 $(23.71 \pm 0.70) \mu\text{mol}/\text{L}$ ($P < 0.05$)。而在 pH 6.5 时, ATO 溶液的 IC_{50} 为 $(21.17 \pm 1.72) \mu\text{mol}/\text{L}$, 与 pH 7.4 时无显著性差异 ($P > 0.05$); 而 pH-ATO-PLGA@NPs 的 IC_{50} 与 pH 7.4 时相比显著减小 ($P < 0.01$), 为 $(16.40 \pm 0.62) \mu\text{mol}/\text{L}$, ATO-PLGA@NPs 的 IC_{50} 为 $(24.36 \pm 0.71) \mu\text{mol}/\text{L}$ 。

为了测定 pH 响应纳米粒包载后对正常细胞活

性的影响, 采用 MTT 考察纳米粒在 pH 7.4 的 L02 细胞中的细胞毒性。L02 细胞 (pH 7.4) 的培养及给药同 HepG2 细胞。结果见图 6, 在 pH 7.4 的 L02 细胞中, ATO 溶液的细胞毒性大于 ATO-PLGA@

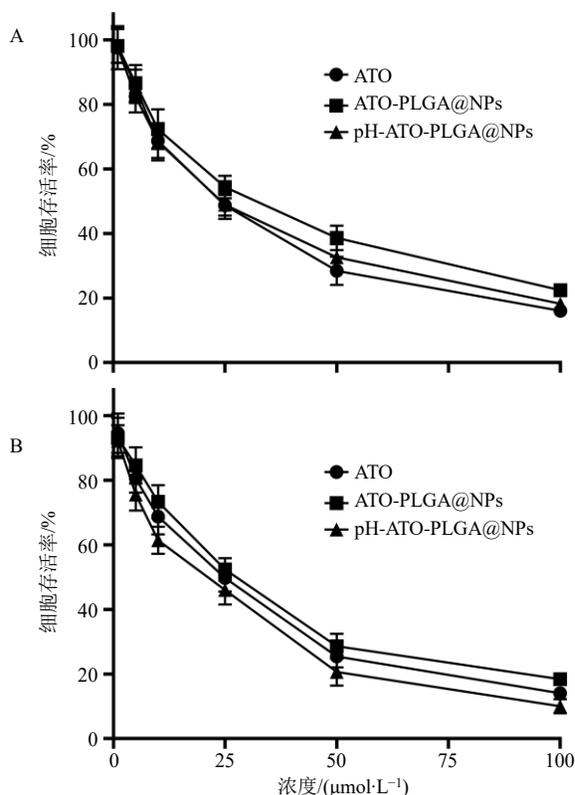


图 5 不同浓度 ATO、ATO-PLGA@NPs 及 pH-ATO-PLGA@NPs 在 pH 7.4 (A) 与 pH 6.5 (B) 时对 HepG2 细胞的毒性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Toxicity of ATO, ATO-PLGA@NPs and pH-ATO-PLGA@NPs of different concentrations on HepG2 cells at pH 7.4 (A), pH 6.5 (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

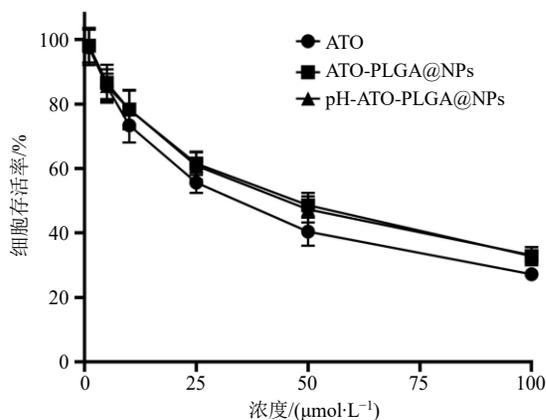


图 6 不同浓度 ATO、ATO-PLGA@NPs 及 pH-ATO-PLGA@NPs 在 pH 7.4 时对 L02 细胞的毒性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Toxicity of ATO, ATO-PLGA@NPs and pH-ATO-PLGA@NPs of different concentrations on L02 cell at pH 7.4 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

NPs 及 pH-ATO-PLGA@NPs, 其 IC_{50} 为 $(28.25 \pm 1.33) \mu\text{mol/L}$; ATO-PLGA@NPs 的 IC_{50} 为 $(40.83 \pm 1.76) \mu\text{mol/L}$, 细胞毒性显著低于 ATO ($P < 0.01$); pH-ATO-PLGA@NPs 的 IC_{50} 为 $(39.72 \pm 1.84) \mu\text{mol/L}$, 细胞毒性显著低于 ATO ($P < 0.01$), 且与 ATO-PLGA@NPs 无显著性差异 ($P > 0.05$).

3 讨论

ATO 作为砒霜的活性成分, 在我国拥有悠久的用药史。现代医学研究发现其不仅对于包括急性早幼粒细胞白血病的血液癌疗效极佳, 对于肝癌等实体瘤也展现出优越的治疗潜力^[3,13]。但是 ATO 进入人体后, 血浆蛋白结合率高^[14], 肾清除快, 无特异性分布等缺陷影响了对实体瘤治疗的效果, 且极易对正常组织产生毒副作用^[3-4]。纳米技术在医学的应用使药物具备靶向及缓释特性, 改善了药物的体内药动学^[15-16]。因此, 本实验采用生物相容性良好的 PLGA 为材料制备了纳米粒并加入 NaHCO_3 赋予纳米粒 pH 响应特性^[10,17], 改善 ATO 的上述缺陷: (1) 通过对 ATO 的包埋, 提高 ATO 的稳定性; (2) 通过缓释及对肿瘤环境低 pH 的响应减少对正常组织的毒副作用。

本实验制备的 pH-ATO-PLGA@NPs 在马尔文粒径仪中测得粒径为 $(214.35 \pm 1.86) \text{ nm}$, TEM 下观察到的粒径在 $150 \sim 180 \text{ nm}$ (电镜图中较小)。其原因为粒径仪测得为纳米粒的水合粒径, 大于电镜下直接观察的粒径^[18]。pH-ATO-PLGA@NPs 因其存在 pH 响应因子的 NaHCO_3 , 再负载 ATO 时离子强度增加, 故而使其载药量、包封率及稳定性均略低于 ATO-PLGA@NPs^[17]。因 pH-ATO-PLGA@NPs 在纯水中稳定性较 ATO-PLGA@NPs 低, 更适合以减压干燥或冻干粉形式保存, 在 pH-ATO-PLGA@NPs 在配置后需尽快使用。

ATO-PLGA@NPs 与 pH-ATO-PLGA@NPs 包载药物后具备缓释特性, 但在释药最初阶段仍然存在轻微突释现象, 这可能是由于: (1) 原本黏附在纳米粒表面的 ATO 经干燥复溶过程而呈游离状态; (2) 干燥复溶过程使纳米粒表面存在裂隙, 使较为浅表的药物迅速释放^[19-20]。pH-ATO-PLGA@NPs 则具备明显的 pH 响应特性, 随 pH 值的下降, 24 h 累积释放率逐步上升。pH-ATO-PLGA@NPs 的此特性可以使其到达肿瘤后, 响应肿瘤微环境的低 pH 值, 加速释放 ATO。

细胞学评价表明, 作为载体的 PLGA@NPs 及

pH-PLGA@NPs 在低浓度及正常给药的纳米粒浓度时,生物相容性良好,极高浓度时才会产生细胞毒性。pH-PLGA@NPs 的细胞毒性略高于普通的 PLGA@NPs,因 pH-PLGA@NPs 中含有作为 pH 响应因子的 NaHCO_3 , NaHCO_3 浓度随 pH-PLGA@NPs 浓度增加而升高,增强了 pH-PLGA@NPs 的细胞毒性。在 pH 7.4 时,ATO-PLGA@NPs 及 pH-ATO-PLGA@NPs 对 HepG2 的细胞毒性均小于 ATO 溶液,这是由于:(1) ATO 本身可通过自由扩散进入细胞,PLGA@NPs 及 pH-PLGA@NPs 包埋后需要细胞内吞进入细胞,入胞方式的改变使细胞摄入 ATO 量减少^[21-22];(2) PLGA@NPs 及 pH-PLGA@NPs 包埋后 ATO 呈缓释状态,使得在起初阶段大部分 ATO 未释放完全^[23]。

pH-ATO-PLGA@NPs 的细胞毒性高于 ATO-PLGA@NPs,主要原因为细胞摄取进入溶酶体后,因 pH-ATO-PLGA@NPs 的 pH 响应较 ATO-PLGA@NPs 释放相对较快、较完全^[24]。虽然 pH 值为 7.4 时,ATO-PLGA@NPs 及 pH-ATO-PLGA@NPs 对肝癌细胞的毒性小于 ATO ($P < 0.05$),但 pH 值为 6.5 时(肿瘤微环境 pH)^[25],pH-ATO-PLGA@NPs 的细胞毒性大于 ATO ($P < 0.05$)。这是因为:(1) pH-ATO-PLGA@NPs 的 pH 响应性使其未入胞部分也释放了 ATO,可以入胞;(2) pH-ATO-PLGA@NPs 释放 ATO 的同时,也释放了 NaHCO_3 ,溶酶体内的渗透压上升快,使溶酶体加速破裂;(3) pH-ATO-PLGA@NPs 及已释放的 ATO 释放到细胞质中,接触作用靶点,与上升的渗透压共同作用加速细胞凋亡^[26-28]。pH-ATO-PLGA@NPs 不仅具备 pH 响应特性,并通过 pH 响应特性实现了对 ATO 释放的调控从而改变了 ATO 在肿瘤细胞中的细胞毒性。

而在人正常肝细胞 L02 中,ATO-PLGA@NPs 及 pH-ATO-PLGA@NPs 的细胞毒性均显著低于 ATO 溶液 ($P < 0.01$)。这表明制备成纳米制剂后,由于纳米粒的缓释及正常细胞对纳米粒的胞吞作用小于代谢较快的肿瘤细胞,pH-ATO-PLGA@NPs 对正常细胞的毒性降低^[29]。并且,进入人体后,纳米粒可改善 ATO 原有缺陷并通过靶向性,增加 ATO 在瘤分布,从而提高疗效。pH-ATO-PLGA@NPs 的 pH 响应特性使得其可以在肿瘤微环境加速释放,较 ATO-PLGA@NPs 进一步提高疗效。在后继的研究中此外,研究者后续将对其在体内药动学参数及是否可以有效增加荷瘤动物的体内抗肿瘤作用加以探究。

综上所述,pH-ATO-PLGA@NPs 可有效改善 ATO 在治疗实体瘤方面代谢消除快,无特异性分布等缺陷,使 ATO 具备靶向、缓释及 pH 响应特性,为 ATO 有效应用于实体瘤的治疗奠定基础。本实验的设计及展开为诸如 ATO 的半衰期短、治疗窗窄、无特异性分布的有毒类中药新型纳米制剂的构建研究提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张亭栋. 含砷中药治疗白血病研究: 谈谈癌灵 1 号注射液对白血病的治疗 [J]. 中国中西医结合杂志, 1998, 18(10): 581.
- [2] 黄剑宇, 梁启凡, 李俊松, 等. 三氧化二砷抗肿瘤作用机制及其药物递送系统的研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(23): 6102-6111.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 马瑞, 汤红霞, 陆燕平, 等. 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 [J]. 中草药, 2020, 51(6): 1508-1516.
- [6] Kuriakose A E, Pandey N, Shan D Y, *et al.* Characterization of photoluminescent polylactone-based nanoparticles for their applications in cardiovascular diseases [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2019, 7: 353.
- [7] Bahadori F, Eskandari Z, Ebrahimi N, *et al.* Development and optimization of a novel PLGA-Levan based drug delivery system for curcumin, using a quality-by-design approach [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2019, 138: 105037.
- [8] Ding D W, Zhu Q D. Recent advances of PLGA micro/nanoparticles for the delivery of biomacromolecular therapeutics [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2018, 92: 1041-1060.
- [9] 马舒伟, 刘兴艳, 辛杨, 等. 银杏内酯 K 的 PLGA-PEG 纳米粒制备、表征和神经保护活性评价 [J]. 中草药, 2019, 50(7): 1562-1568.
- [10] Zhang N, Liu X Y, Hou R R, *et al.* Ultrasound-triggered gas-generating doxorubicin poly(lactic-co-glycolic acid)-nanoparticles for cancer therapy [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2019, 19: 5463-5468.
- [11] Qi P, Bu R X, Zhang H, *et al.* Goserelin acetate loaded

- poloxamer hydrogel in PLGA microspheres: Core-shell di-depot intramuscular sustained release delivery system [J]. *Mol Pharm*, 2019, 16(8): 3502-3513.
- [12] 陈云云, 姚文栋, 谢先泽, 等. 载 As_2O_3 pH敏感钙磷复合物脂质体的制备及体外评价 [J]. *中草药*, 2020, 51(21): 5447-5453.
- [13] Chi X, Zhang R, Zhao T, *et al.* Targeted arsenite-loaded magnetic multifunctional nanoparticles for treatment of hepatocellular carcinoma [J]. *Nanotechnology*, 2019, 30(17): 175101.
- [14] Shooshtary S, Behtash S, Nafisi S. Arsenic trioxide binding to serum proteins [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2015, 148: 31-36.
- [15] 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.
- [16] 高彩芳, 夏加璇, 朱颖, 等. 纳米技术在改善中药有效成分成药性中的应用 [J]. *中草药*, 2018, 49(12): 2754-2762.
- [17] Ke C J, Chiang W L, Liao Z X, *et al.* Real-time visualization of pH-responsive PLGA hollow particles containing a gas-generating agent targeted for acidic organelles for overcoming multi-drug resistance [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(1): 1-10.
- [18] Bossa F, Annese V, Valvano M R, *et al.* Erythrocytes-mediated delivery of dexamethasone 21-phosphate in steroid-dependent ulcerative colitis: A randomized, double-blind Sham-controlled study [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2013, 19(9): 1872-1879.
- [19] 孙雅楠, 张秀梅, 马欣, 等. 红细胞膜包裹 PLGA 纳米粒的制备和体外毒性及药物释放初探 [J]. *中国新药杂志*, 2017, 26(19): 2352-2357.
- [20] 王岩. 不同分子量的 MPEG-PLGA 纳米药物载体的体外降解和药物释放行为研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2014.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] Peng Y, Zhao Z, Liu T, *et al.* Smart human-serum-albumin- As_2O_3 nanodrug with self-amplified folate receptor-targeting ability for chronic myeloid leukemia treatment [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, 56(36): 10845-10849.
- [24] Cupic K I, Rennick J J, Johnston A P, *et al.* Controlling endosomal escape using nanoparticle composition: Current progress and future perspectives [J]. *Nanomedicine*, 2019, 14(2): 215-223.
- [25] Zhou N, Zhang N, Zhi Z, *et al.* One-pot synthesis of acid-degradable polyphosphazene prodrugs for efficient tumor chemotherapy [J]. *J Mater Chem B*, 2020, 8(46): 10540-10548.
- [26] 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.
- [27] Wyrsh P, Blenn C, Pesch T, *et al.* Cytosolic Ca^{2+} shifts as early markers of cytotoxicity [J]. *Cell Commun Signal*, 2013, 11(1): 11.
- [28] Zhang L H, Hao W B, Xu L, *et al.* A pH-sensitive methenamine mandelate-loaded nanoparticle induces DNA damage and apoptosis of cancer cells [J]. *Acta Biomater*, 2017, 62: 246-256.
- [29] Karmali P P, Kotamraju V R, Kastantin M, *et al.* Targeting of albumin-embedded paclitaxel nanoparticles to tumors [J]. *Nanomedicine*, 2009, 5(1): 73-82.

[责任编辑 郑礼胜]