

• 药剂与工艺 •

三氧化二砷三元复合物纳米递送系统的构建及评价

王笑红^{1,2}, 张宇婷^{1,2}, 吴 婕^{1,2}, 李俊松^{1,2}, 李 文^{3*}, 王若宁^{1,2*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

2. 江苏省中药高效给药系统工程技术研究中心, 江苏 南京 210023

3. 南京中医药大学附属南京中医院, 江苏 南京 210001

摘要: 目的 以牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 为天然药物载体, 通过形成砷硫键负载三氧化二砷 (arsenic trioxide, ATO), 酰胺化反应连接光敏剂二氢卟吩 e6 (chlorin e6, Ce6), 构建基于 BSA 的载 ATO 三元复合物纳米递送系统, 旨在解决 ATO 在治疗脑胶质瘤时体内生物分布不良、难以跨越血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 等问题, 使其更有效地用于脑胶质瘤治疗。**方法** 通过形成砷硫键和酰胺化反应分别将 ATO 和 Ce6 与 BSA 结合制备三元复合物纳米粒 ATO-BSA@Ce6, 采用纳米粒度分析仪考察 ATO-BSA@Ce6 的粒径分布、多分散系数 (polydispersity index, PDI)、 ζ 电位; 透射电子显微镜 (TEM) 观察其形态; 紫外可见分光光度计 (UV-vis spectrophotometer) 考察 UV-vis 吸收光谱; 荧光分光光度计考察荧光光谱和制剂活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 产生; 傅里叶变换红外 (Fourier transform infrared, FTIR) 光谱验证 ATO 的载入; 电感耦合等离子体质谱 (inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS) 和 UV-vis 分光光度计分别测定 ATO 和 Ce6 的包封率、载药量; 透析袋法考察不同 pH 值下的体外释放行为。对 ATO-BSA@Ce6 进行细胞摄取及机制、细胞毒性、LIVE/DEAD 染色、ROS 水平和体外跨越 BBB 等体外细胞学研究, 并通过小鼠尾 iv 对其脑靶向性进行考察。**结果** 成功制备了三元复合物纳米粒 ATO-BSA@Ce6, 在 TEM 下可观察到其形态规整, 呈圆整球状分布, 大小均匀, 测得其粒径为 (112.73 \pm 4.91) nm, ζ 电位 (-10.86 \pm 1.19) mV。通过 ICP-MS 测定 ATO 的包封率为 (66.72 \pm 1.43) %、载药量为 (10.83 \pm 0.21) %; Ce6 的包封率为 (91.50 \pm 0.51) %、载药量为 (3.45 \pm 0.32) %。UV-vis 吸收光谱、荧光光谱及 FTIR 光谱结果证明 Ce6、ATO 与 BSA 的成功连接。体外 ROS 生成实验结果表明 Ce6 与 BSA 的结合不影响其 ROS 产生。体外释放实验结果表明 ATO 及 Ce6 具有 pH 响应性释放。细胞摄取和细胞毒性实验表明其具有较强的入胞能力和体外抗肿瘤活性。体内活体成像实验表明其具有较强的跨越 BBB 的能力并到达脑部。**结论** ATO-BSA@Ce6 纳米递送系统能够有效增加 ATO 跨 BBB 转运, 增强对 GL261 细胞的细胞毒性, 为脑胶质瘤治疗提供了新策略。

关键词: 三氧化二砷; 脑胶质瘤; 纳米递送系统; 二氢卟吩 e6; 牛血清白蛋白; 电感耦合等离子体质谱

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)05-1382-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.05.013

Construction and evaluation of a ternary complex nano-delivery system based on arsenic trioxide

WANG Xiao-hong^{1,2}, ZHANG Yu-ting^{1,2}, WU Jie^{1,2}, LI Jun-song^{1,2}, LI Wen³, WANG Ruo-ning^{1,2}

1. College of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Engineering Research Center for Efficient Delivery System of TCM, Nanjing 210023, China

3. The Affiliated Nanjing Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210001, China

Abstract: Objective To solve the problem of poor biological distribution and difficulty in crossing the blood brain barrier (BBB) of arsenic trioxide (ATO) in glioma treatment, a pH-responsive ternary complex drug delivery system of ATO-BSA@Ce6 was constructed

收稿日期: 2021-10-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81903557); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK20190802); 江苏省高等学校大学生创新创业训练计划项目 (省级重点) (202110315021); 康缘中药学院创新创业项目 (kyxysc12)

作者简介: 王笑红, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新剂型与新技术。Tel: 15630935866 E-mail: wxhhl1996@163.com

***通信作者:** 李 文, 女, 主任中药师, 硕士生导师, 研究方向为中药鉴定与中药制剂。Tel: 18951755118 E-mail: njzyliwen@sohu.com

王若宁, 女, 副教授, 研究方向为中药新剂型与新技术。Tel: 15852937869 E-mail: ruoningw@njucm.edu.cn; ruoningw@163.com

based on bovine serum albumin (BSA), where arsenic trioxide (ATO) was loaded through the formation of arsenic sulfur bond, and the photosensitizer chlorin e6 (Ce6) was connected through amidation reaction. **Methods** The ternary complex nanoparticle, ATO-BSA@Ce6, was prepared by combining ATO and Ce6 with BSA through arsenic-sulfur bonds and the amidation reaction, respectively. The particle size, polydispersity index (PDI), and ζ potential of ATO-BSA@Ce6 were measured by Malvern particle size analyzer. The morphology was investigated by transmission electron microscopy (TEM). UV-vis absorption spectra were measured by UV-Vis spectrophotometer. The fluorescence spectrum and the production of reactive oxygen species (ROS) were investigated by fluorescence spectrophotometer. The loading of ATO was verified by Fourier transform infrared (FTIR) spectra. The encapsulation efficiency and drug loading of ATO and Ce6 were measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and UV-vis spectrophotometer, respectively. The *in vitro* release behaviors at different pH conditions were investigated by dialysis bag method. The cellular uptake, uptake mechanism and intracellular ROS level were observed by inverted fluorescence microscope. The toxicity of free ATO and ATO-BSA@Ce6 on GL261 cells was investigated by MTT assay and LIVE/DEAD cell viability detection kit. The brain targeting was investigated by tail vein injection in mice. **Results** The drug delivery system (ATO-BSA@Ce6) was constructed successfully, and its morphology was regular, with a round spherical distribution and uniform size. The particle size and ζ potential were (112.73 ± 4.91) nm and (-10.86 ± 1.19) mV, respectively. The encapsulation efficiency of ATO was $(66.72 \pm 1.43)\%$, and drug loading efficiency was $(10.83 \pm 0.21)\%$; The encapsulation efficiency of Ce6 was $(91.50 \pm 0.51)\%$, and the drug loading efficiency was $(3.45 \pm 0.32)\%$. The results of UV-vis absorption spectrum, fluorescence spectrum and FTIR spectra proved the successful connection of Ce6 and ATO to BSA. *In vitro* ROS generation experiments showed that the combination of Ce6 and BSA did not affect its ROS production. *In vitro* release study showed that ATO and Ce6 had pH responsive drug release. Cellular uptake and cytotoxicity assay showed a strong ability of cellular uptake and anti-tumor activity *in vitro*. *In vivo* live imaging showed that ATO-BSA@Ce6 could across the BBB and reach the brain. **Conclusion** The ATO-BSA@Ce6 nano-delivery system can effectively increase the transport of ATO across the BBB, enhance the cytotoxicity to GL261 cells, providing a novel strategy for the treatment of glioma.

Key words: arsenic trioxide; glioma; nano-delivery system; Ce6; BSA; inductively coupled plasma mass spectrometry

三氧化二砷 (arsenic trioxide, ATO) 为传统中药砒霜的主要成分, 经砒石升华而得, 常温下呈白色霜状粉末, 无臭无味, 微溶于水。自古以来, 中医药就应用砷和含砷药物治疗各种难治性疾病^[1], 但其毒性限制了其医学应用。20 世纪 70 年代, 我国学者首次将 ATO 用于急性早幼粒细胞白血病 (acute promyelocytic leukemia, APL) 的治疗, 并且疗效显著^[2-4]。随着 ATO 在 APL 治疗中的成功, ATO 在其他血液肿瘤和实体瘤治疗中的应用得到了积极的研究。最近的研究表明, ATO 通过诱导肿瘤细胞自噬、凋亡等发挥抗肿瘤作用, 有效抑制肝癌、肺癌和乳腺癌等实体瘤的生长^[5-8]。在胶质瘤中, ATO 通过靶向胶质瘤相关癌基因 (glioma-associated oncogene homolog, GLI) 转录效应物对抗刺猬 (Hedgehog, Hh) 信号通路, 抑制肿瘤细胞的生长与发展^[9-10]; 通过诱导细胞凋亡和自噬、诱导细胞有丝分裂周期阻滞发挥抗肿瘤作用^[11-12]; 促进细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生, 导致氧化损伤^[13]。ATO 可以降低胶质瘤干细胞标志物 SOX2、CD133 的表达, 抑制 Hh 和 Notch 通路, 抑制其 DNA 修复能力, 降低耐药性^[14-15]。此外, ATO 还可增强放疗和化疗的效果。然而, 由于其较差的生物安全性和狭窄的药物安全窗口, 静脉给药到达肿

瘤部位并进入肿瘤细胞的量极低。高剂量下的不良反应、高肾清除率和低血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 通透性阻碍了其在胶质瘤治疗中的应用。

纳米技术的迅速发展为提高化疗疗效和降低化疗毒性提供了可能的途径。纳米粒在肿瘤组织中独特的增强渗透性和保留 (enhanced permeability and retention, EPR) 效应以及其结构特征 (单分散性、均匀性、形态、表面修饰和可调大小) 为 ATO 的肿瘤杀伤作用提供了基础。纳米材料被用作 ATO 的载体以促进其抗肿瘤作用, 克服其肿瘤富集不足的限制, 同时减少其不良反应^[16]。学者们研究了多种材料作为 ATO 的纳米载体, 包括脂质体^[17-18]、蛋白质^[19]、聚合物^[20-21]、无机纳米粒等^[7,22]。其中, 基于蛋白质的纳米载体由于其高结构稳定性、优异的生物相容性、极好的生物降解性和易于裁剪性, 已迅速成为极具吸引力的药物递送载体^[23]。

牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 是血浆中含量丰富的内源性蛋白质。BSA 不仅对血浆中的内源性溶质 (包括金属离子、脂肪酸、氨基酸和代谢物) 具有非凡的结合亲和力, 而且对许多外源性药物也具有高效的结合亲和力, 例如紫杉醇、铂基药物和二氢卟吩 e6 (chlorin e6, Ce6)^[24]。受先前研究的启发, 通过砷-硫键将 ATO 与负载光敏

剂 Ce6 的 BSA 分子结合, 开发了一种具有脑胶质瘤靶向性、促 BBB 渗透的多功能三元复合物纳米药物递送平台 (ATO-BSA@Ce6)。通过联合 Ce6 的光动力治疗 (photodynamic therapy, PDT) 作用, 起到协同抗肿瘤的效果, 增强 ATO 靶向性的同时, 降低其不良反应。

1 仪器与材料

MicroCL 21R 微量离心机、Thermo X Series 2 电感耦合等离子体质谱仪 (inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)、CO₂ 培养箱, 美国 Thermo Fisher 公司; Nano-ZS90 激光粒度仪, 英国 Malvern 公司; Infinite M200PRO 酶标仪, 瑞士 Tecan 公司; HT7800 透射电子显微镜, 日本 Hitachi 公司; FL6500 荧光分光光度计; 傅里叶变换红外 (Fourier transform infrared, FTIR) 光谱仪、小动物活体成像仪, 美国 PerkinElmer 公司; 流式细胞仪, 美国 Beckman Coulter 公司; 荧光倒置显微镜, 德国 Zeiss 公司。ATO, 质量分数 99.9%, 苏州诺德派森公司; Ce6, 索莱宝公司; BSA, 德国 BioFroxx 公司; 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 [1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC], 碧云天公司; *N*-羟基琥珀酰亚胺 (*N*-hydroxysuccinimide, NHS), 瑞士 Adamas-Beta 公司; 还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH), 索莱宝公司; 透析袋 (截留相对分子质量 12 000~14 000), Biosharp 公司; 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (2',7'-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA), 索莱宝公司; DMEM 培养液、0.25%胰蛋白酶、青-链霉素溶液、磷酸盐 (PBS) 缓冲溶液, 美国 Hyclone 公司; 胎牛血清, 美国 Gibco 公司; 氯丙嗪、甲基-β-环糊精 (methyl-β-cyclodextrin, M-β-CD), 阿拉丁公司; 阿米洛利, 美仑公司; 四甲基偶氮唑盐 (MTT), 美国 Sigma 公司; LIVE/DEAD 细胞活性检测试剂盒, 美国 Thermo Fisher 公司。鼠源性脑胶质瘤 GL261 细胞, 南京贝佳生物公司; 小鼠脑微血管内皮细胞 (bEnd.3), 中科院上海细胞库。C57BL/6 小鼠, 雌性, 6~8 周龄, 体质量 18~22 g, 动物许可证号: SCXK (豫) 2020-0005, 南京青龙山动物繁殖场。所有动物实验均遵循南京中医药大学有关实验动物管理和使用的规定, 均符合 3R 原则。

2 方法与结果

2.1 ATO-BSA@Ce6 的制备

将 0.88 mg Ce6, 0.28 mg EDC, 0.18 mg NHS 与

200 μL DMSO 混合, 室温搅拌 1 h。加入至含 BSA (2 mg/mL) 的 PBS 缓冲液中, 避光磁力搅拌过夜。14 800 r/min 离心 5 min, 去除聚集物, 此为 BSA@Ce6。将制备的 BSA@Ce6 用 60 mmol/L GSH 处理 1 h, 破坏分子内二硫键并暴露游离巯基。加入 1 mL ATO 溶液, 室温搅拌 2 h。将所得的三元复合物在超纯水中于 4 °C 下透析 (截留相对分子质量 8000~14 000) 24 h, 以去除过量的 ATO 和 GSH。

2.2 ATO-BSA@Ce6 的表征

2.2.1 UV-vis 光谱测定 通过 UV-vis 分光光度计扫描含相同 Ce6 质量浓度 (2 μg/mL) 的 Ce6、BSA@Ce6 和 ATO-BSA@Ce6 溶液, 测定其在紫外、可见和近红外范围内的吸收光谱, 以验证制备成功。结果如图 1 所示, BSA@Ce6 和 ATO-BSA@Ce6 在 404 nm 及 660 nm 处有 2 个典型的特征峰, 这与 Ce6 的紫外吸收峰保持一致, 证明 Ce6 与 BSA 的成功结合。

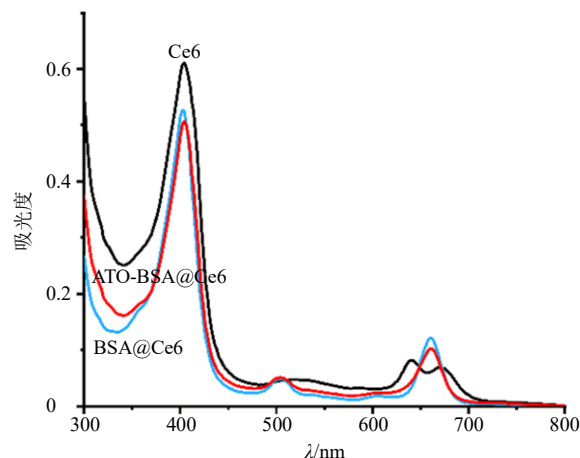


图1 含相同 Ce6 浓度的 Ce6、BSA@Ce6 和 ATO-BSA@Ce6 的紫外-可见吸收光谱

Fig. 1 UV-vis absorbance spectra of Ce6, BSA@Ce6, and ATO-BSA@Ce6 with the same Ce6 concentrations

2.2.2 荧光光谱 通过荧光分光光度计扫描含相同 Ce6 质量浓度 (2 μg/mL) 的 Ce6、BSA@Ce6 和 ATO-BSA@Ce6 溶液, 测定其在 500~800 nm 的荧光光谱。如图 2 所示, BSA@Ce6 和 ATO-BSA@Ce6 在 665 nm 处有明显的发射峰, 相较于 Ce6 在 650 nm 处的发射峰位置有所偏移, 这可能是酰胺键的形成导致发射峰发生偏移。

2.2.3 FTIR 光谱 采用 KBr 压片法对 ATO、BSA、BSA@Ce6、ATO+BSA+Ce6 的物理混合物、ATO-BSA@Ce6 进行红外光谱分析以验证 ATO 的成功载入。光谱波长记录范围为 400~4000 cm⁻¹, 分辨率

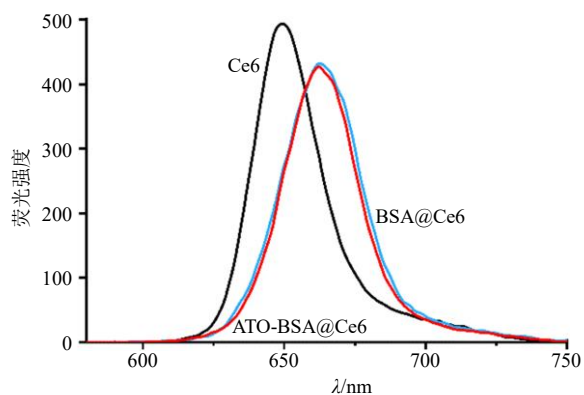


图2 含相同Ce6浓度的Ce6、BSA@Ce6和ATO-BSA@Ce6的荧光光谱图

Fig. 2 Fluorescence spectra of Ce6, BSA@Ce6, and ATO-BSA@Ce6 with same Ce6 concentrations

2 cm⁻¹。研究了游离未结合BSA的3种模式, 包括由C=O拉伸(1700~1600 cm⁻¹)产生的酰胺带I、由N-H弯曲和CN伸缩振动(1600~1480 cm⁻¹)产生的酰胺带II和由于C-N拉伸模式与面内N-H弯曲和3300 cm⁻¹处的N-H振动耦合产生的酰胺带III(1400 cm⁻¹)。ATO、BSA、BSA@Ce6、ATO+BSA+Ce6的物理混合物、ATO-BSA@Ce6的FTIR光谱如图3所示。在ATO的光谱中, 于800 cm⁻¹处检测到特征As-O峰。在ATO+BSA+Ce6的物理混合物组中也可以看到相同的峰以及具有BSA特征的其他峰, 且基本仅是图谱的叠加, 说明ATO与BSA未发生反应, 仅是简单的混合物形式存在。在与ATO相互作用后, 纯BSA在1395 cm⁻¹处的酰

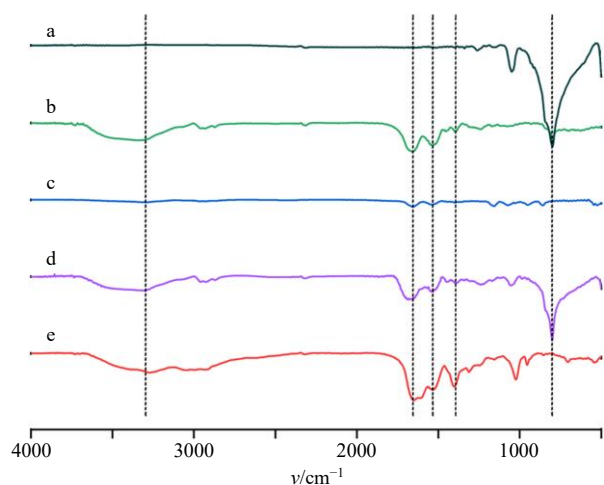


图3 ATO(a), BSA(b), BSA@Ce6(c), ATO+BSA+Ce6物理混合物(d)和ATO-BSA@Ce6(e)的FTIR图谱

Fig. 3 FTIR spectra of ATO (a), BSA (b), BSA@Ce6 (c), ATO + BSA + Ce6 physical mixture (d) and (e) ATO-BSA@Ce6

胺III带移至1402 cm⁻¹, 且强度增强^[25]。物理混合物组显示存在BSA的所有峰, 没有峰位移。相对于纯BSA和BSA@Ce6, ATO-BSA@Ce6峰的偏移表明与ATO的成功结合。

2.2.4 粒径与ζ电位考察 分别取BSA@Ce6和ATO-BSA@Ce6纳米粒溶液少许, 加入适量蒸馏水稀释, 使用动态光散射激光粒度仪测定其粒径、PDI和ζ电位, 结果见表1。BSA@Ce6的平均粒径为(66.15±0.58) nm, PDI为0.231±0.060, 负载ATO后的ATO-BSA@Ce6粒径明显增大, 为(112.73±4.91) nm, PDI为0.269±0.020, ζ电位由BSA@Ce6的(-5.76±0.99) mV降低至(-10.86±1.19) mV。粒径增大也表明ATO的成功负载。

表1 BSA@Ce6及ATO-BSA@Ce6的粒径、PDI和ζ电位(̄x±s, n=3)

Table 1 Particle size, PDI, and ζ potential of BSA@Ce6 and ATO-BSA@Ce6 (̄x±s, n=3)

样品	粒径/nm	PDI	ζ 电位/mV
BSA@Ce6	66.15±0.58	0.231±0.06	-5.76±0.99
ATO-BSA@Ce6	112.73±4.91	0.269±0.02	-10.86±1.19

2.2.5 外观形态 分别取少量BSA@Ce6和ATO-BSA@Ce6纳米粒溶液, 用蒸馏水稀释至合适的浓度, 取10 μL滴于200目碳膜铜网上, 室温晾干后, 用2%磷钨酸负染, 滤纸吸去磷钨酸染液, 室温静置, 晾干后在透射电镜下观察。结果如图4所示, ATO-BSA@Ce6粒径略大于BSA@Ce6, 进一步表明ATO的成功荷载。ATO-BSA@Ce6呈规则球形, 形态规整, 分散均匀, 粒径在60 nm左右, 略小于动态光散射激光粒度仪测定结果。

2.2.6 包封率和载药量测定 ICP-MS测定载ATO的包封率和载药量。取ATO-BSA@Ce6纳米粒溶液0.2 mL, 依次加入浓硝酸、30%过氧化氢以及浓盐酸加热消解。用超纯水稀释消解液至5 mL后过0.45

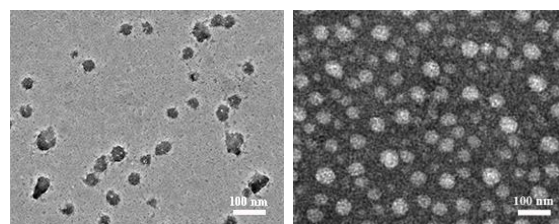


图4 BSA@Ce6和ATO-BSA@Ce6的TEM图(标尺为100 nm)

Fig. 4 TEM image of BSA@Ce6 and ATO-BSA@Ce6 (scale is 100 nm)

μm 滤膜, ICP-MS 进样测定。设定 ICP-MS 仪器测试参数: 射频功率 1150 W, 等离子体体积流量 13 L/min, 辅助气体积流量 0.7 L/min, 雾化气体积流量 0.9 L/min, 载气高纯氩气。根据以下公式计算 ATO 的包封率和载药量分别为 (66.72±1.43)%、(10.83±0.21)%。通过测定紫外吸收测定 Ce6 的包封率和载药量分别为 (91.50±0.51)%、(3.45±0.32)%。

2.2.7 放置稳定性考察 将 ATO-BSA@Ce6 纳米粒溶液放置在 4 °C 避光保存, 在 0、2、4、6 d 取适量, 测定粒径、ζ 电位, 考察放置稳定性。结果如表 2 所示, 4 °C 放置 6 d ATO-BSA@Ce6 粒径和电位无明显变化, 表明三元复合物纳米粒在溶液状态下具有良好的放置稳定性。

表 2 ATO-BSA@Ce6 的放置稳定性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Storage stability of ATO-BSA@Ce6 during storage ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

放置时间/d	粒径/nm	ζ 电位/mV
0	114.30±2.62	-9.96±0.77
2	115.80±1.70	-9.14±1.26
4	114.90±2.14	-10.78±0.45
6	116.10±2.30	-9.84±0.93

2.3 ATO-BSA@Ce6 ROS 生成考察

光敏剂在适当波长的激光照射下可产生 ROS, 从而诱导细胞损伤和凋亡。利用活性氧荧光探针 DCFH-DA 检测 ATO-BSA@Ce6 在激光照射过程中产生的 ROS。将 DCFH-DA 用 NaOH (0.01 mol/L) 处理 30 min, 使其水解形成 DCFH, 随后激光照射 (635 nm, 120 mW/cm²) 含相同 Ce6 质量浓度 (2 μg/mL) 的 Ce6、BSA@Ce6 和 ATO-BSA@Ce6 溶液 5 min, 产生的 ROS 能氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的 DCF, 通过荧光分光光度计测定在激发波长 504 nm、发射波长 529 nm 处的荧光强度。由表 3 可知, ATO-BSA@Ce6 与 BSA@Ce6、Ce6 产生的 ROS 荧光强度无显著性差异, 表明 Ce6 经过制剂制备及 ATO 负载后其性质未发生改变, 依然展现良好

表 3 Ce6、BSA@Ce6 和 ATO-BSA@Ce6 的 ROS 生成 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	荧光强度
Ce6	608.28±31.32
BSA@Ce6	615.99±23.29
ATO-BSA@Ce6	576.74±41.13

的 ROS 生成能力。

2.4 体外释放考察

三元复合物纳米粒的体外药物释放行为采用透析法进行, 使用 pH 7.4 或 pH 6.5 的 PBS 缓冲溶液为释放介质, 或加 10 mmol/L 的 GSH。将透析袋 (截留相对分子质量 8000~14 000) 剪成合适长度的小段, 置于 20 mg/mL 的 NaHCO₃ 和 1 mmol/L EDTA 中煮沸 10 min 进行预处理, 并用超纯水洗净。吸取 1 mL ATO-BSA@Ce6 溶液加入到处理好的透析袋中, 两端用透析夹夹紧。置于 100 mL PBS 溶液 (漏槽条件) 中, 温度为 (37.0±0.5) °C, 转速 100 r/min, 分别在 0.5、1、2、4、6、8、12、24 h 的时间点吸取 0.2 mL 透析介质中的溶液, 并立即补充 0.2 mL 新鲜的相应透析介质。样品加入 2% 硝酸溶液稀释至 5 mL, 放置过夜, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 通过 ICP-MS 测定其中 As³⁺ 的含量, Ce6 含量参照上述测定步骤进行 UV-vis 分析, 计算累积释药率, 并绘制释药曲线。体外释放结果如图 5, 游离 ATO 在不同 pH 值条件下释放较快, 前 2 h 释放量已经达到 90%; 相反, 纳米粒中 ATO 在 pH 7.4 条件下释放较为缓慢, 24 h 后累积释药率为 (57.03±2.61)%。在 pH 6.5 条件下初始释放速度较快, 2 h 时即有 (43.51±2.29)% 的累积释药率, 具备明显的 pH 敏

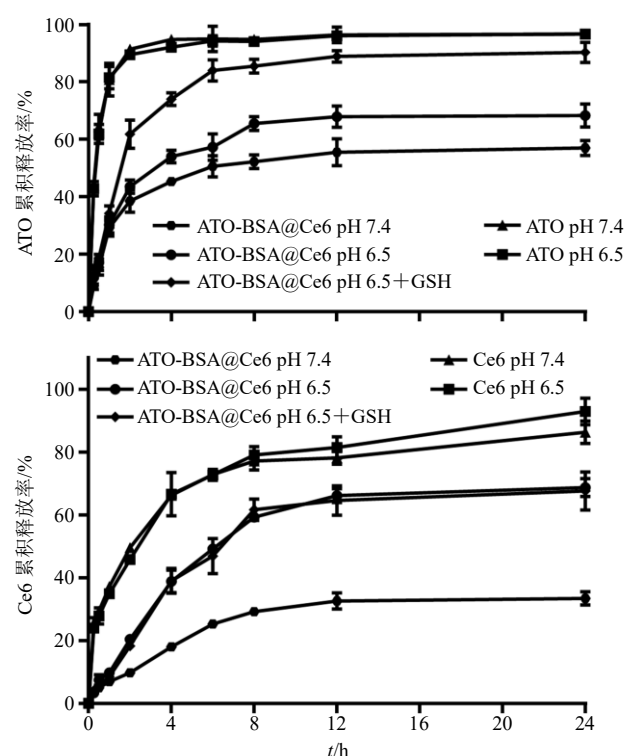


图 5 ATO-BSA@Ce6 的体外释放曲线

Fig. 5 In vitro release profiles of ATO-BSA@Ce6 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

感性，而后逐渐趋于平缓，24 h 的累积释放率为 (68.37±4.03) %。在含 GSH 的弱酸性条件下，纳米粒中 ATO 在 24 h 时累积释放率为 (90.37±3.49) %，接近释放完全。游离 Ce6 与纳米粒中的 Ce6 在不同释放介质中均缓慢释放，且 ATO-BSA@Ce6 中 Ce6 释放同样具有 pH 响应性，在 pH 6.5 条件下，24 h 时累积释放率为 (68.72±2.90) %。

2.5 GL261 细胞对 ATO-BSA@Ce6 的细胞摄取

为了验证 ATO-BSA@Ce6 是否能够有效地被肿瘤细胞摄取，比较了 Ce6 和 ATO-BSA@Ce6 在 GL261 细胞中的摄取行为。将 GL261 细胞以 1×10^6 个/孔的密度接种于 12 孔培养板中，在 37 °C 培养 24 h 后，吸去培养液，PBS 洗涤 3 次，分别加入含 Ce6 和 ATO-BSA@Ce6 (Ce6 2 μg/mL) 的无血清培养液孵育 4 h，随后用冷的 PBS 洗涤细胞 3 次，胰蛋白酶消化，收集细胞，并通过流式细胞术进行分析。结果见图 6，GL261 细胞对 ATO-BSA@Ce6 纳米粒的摄取远高于 Ce6，表明 ATO-BSA@Ce6 增强了 GL261 细胞对 Ce6 摄取的能力。纳米粒中药物细胞摄取量的增加有望提高抗肿瘤效果。

2.6 GL261 细胞对 ATO-BSA@Ce6 的细胞摄取机制考察

为了考察 ATO-BSA@Ce6 增强 Ce6 摄取的机制，分别在以下条件孵育贴壁细胞：(1) 5 mmol/L 氯丙嗪以抑制网格蛋白介导的胞吞作用；(2) 10 mmol/L 甲基-β-环糊精以抑制小窝蛋白介导的胞吞作用；(3) 5 mmol/L 阿米洛利以抑制巨胞饮作用^[24]。将 GL261 细胞以 1×10^6 个/孔的密度接种于 12 孔

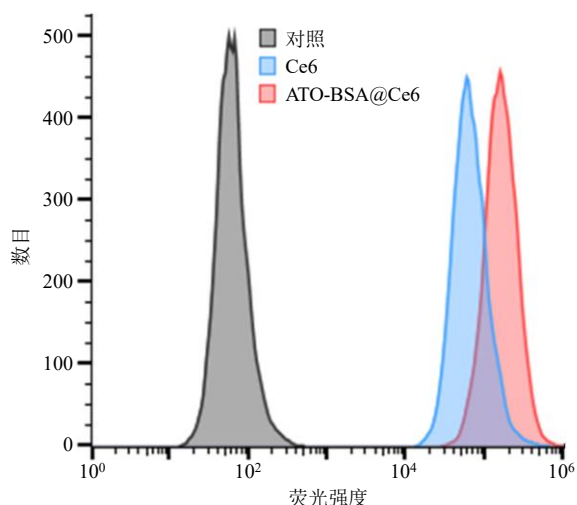


图 6 GL261 细胞对 Ce6、ATO-BSA@Ce6 的摄取
Fig. 6 Flow cytometry analysis of Ce6 and ATO-BSA@Ce6 uptake by GL261 cells

培养板中，在 37 °C 培养 24 h 后，吸去培养液，PBS 洗涤 3 次，用各抑制剂预处理贴壁肿瘤细胞 30 min，再加入 ATO-BSA@Ce6 制剂，孵育 2 h。吸弃上层的培养基，随后用冷的 PBS 洗涤细胞 3 次，胰蛋白酶消化，收集细胞，并通过流式细胞术进行分析细胞摄取效率。摄取机制实验结果如图 7 所示，ATO-BSA@Ce6 被 GL261 细胞摄取受到氯丙嗪和甲基-β-环糊精抑制，相对摄取率分别减少至 (61.21±4.76) %、(75.52±7.83) %，表明 ATO-BSA@Ce6 可以通过网格蛋白和小窝蛋白介导的细胞内吞 2 种途径进入 GL261 细胞内，从而增强 Ce6 内化到肿瘤细胞的能力。

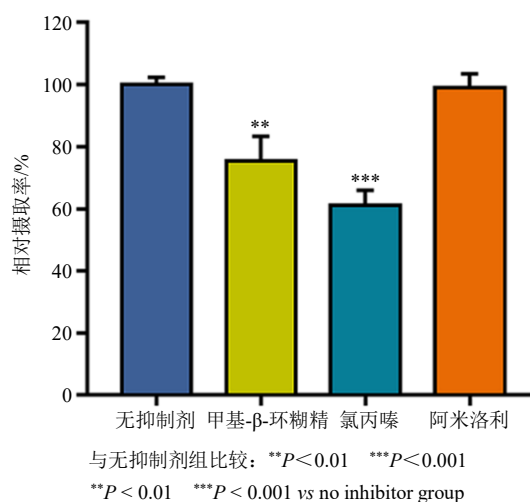


图 7 不同抑制剂对细胞摄取的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 7 Effects of different inhibitors on cell uptake ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.7 ATO-BSA@Ce6 的体外协同作用考察

取处于对数生长期的 GL261 细胞以 5×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔板，37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h。移弃培养液，分别加入含梯度浓度的 Ce6、ATO、Ce6+ATO 和 ATO-BSA@Ce6。其中含 Ce6 组给药后 4 h 用波长为 635 nm 的激光器照射细胞 (120 mW/cm², 1 min)。以未给药的含细胞组为对照组，无细胞孔为空白组，每组设 6 个复孔。培养至 24 h 后，吸弃含药培养基，每孔加入 100 μL 含 MTT 的无血清培养液，于 37 °C 继续孵育 4 h 后，吸弃 MTT，加入 200 μL DMSO，37 °C 避光摇晃 10 min，用酶标仪测定其在 490 nm 处的吸光度 (A) 值，根据公式计算细胞存活率。

细胞存活率 = $(A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$
 $A_{\text{实验}}$ 为实验组的 A 值， $A_{\text{对照}}$ 为对照组的 A 值， $A_{\text{空白}}$ 为空白组的 A 值

通过 Synergy Finder 软件计算药物协同得分, 得分 < -10 分: 表示 2 种药物之间为相互拮抗的作用; 得分 -10~10 分: 表示 2 种药物之间为加和的相互作用; 得分 > 10 分: 表示 2 种药物之间为相互协同的作用。计算的药物协同得分为 10.637, 表明 ATO+Ce6 对 GL261 细胞为协同效果。如图 8 所示, 不同质量浓度的 ATO+Ce6+激光照射和 ATO-BSA@Ce6+激光照射对 GL261 细胞的增殖均有一定的抑制作用, 且随质量浓度的增加, 抑制作用明显增加。ATO-BSA@Ce6 组对 GL261 细胞的抑制作用优于 ATO+Ce6 组。ATO+Ce6+激光照射处理 GL261 的 IC₅₀ 值为 0.54 μg/mL, 制备为 ATO-BSA@Ce6 后, IC₅₀ 值下降为 0.33 μg/mL。说明制备为 ATO-BSA@Ce6 后, IC₅₀ 值更低, 具有更强的抑制胶质瘤细胞活力的能力。

使用 LIVE/DEAD 细胞活性检测试剂盒考察细胞毒性。取处于对数生长期的 GL261 细胞以 1×10⁴ 个/孔的密度接种于 96 孔板, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h。吸弃培养液, 分别加入含 ATO+Ce6 和 ATO-BSA@Ce6 (Ce6 0.1 μg/mL) 的无血清培养基, 给药后 4 h 用波长为 635 nm 的激光器照射细胞 (120 mW/cm², 1 min), 以未给药的含细胞组为对照组。再孵育 8 h, 将细胞用 PBS 洗涤 3 次, 用 Calcein

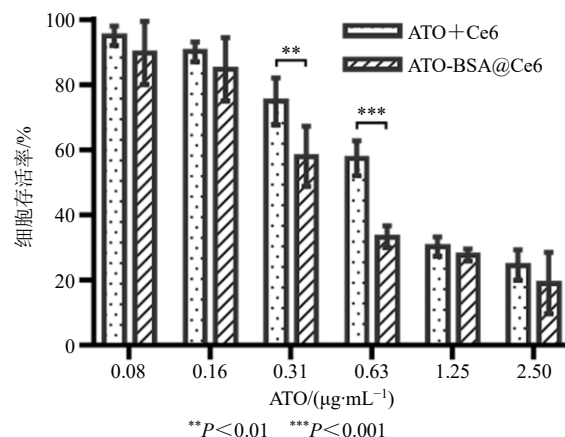


图 8 ATO+Ce6 和 ATO-BSA@Ce6 对 GL261 细胞的细胞毒性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Cytotoxicity of ATO+Ce6 and ATO-BSA@Ce6 on GL261 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

AM 和 EthD-1 共染色 30 min, 然后使用荧光倒置显微镜观察并拍照。其中活细胞显示绿色荧光 (Calcein AM), 死细胞显示红色荧光 (EthD-1)。

结果如图 9 所示, 对照组、单独激光照射处理的细胞显示绿色荧光, 表明单独激光照射处理不会导致细胞死亡。ATO-BSA@Ce6+激光照射治疗 GL261 胶质瘤细胞比 ATO+Ce6+激光照射治疗表现出更强的红色荧光, 表明 ATO-BSA@Ce6+激光照射可以更有效地杀伤 GL261 胶质瘤细胞。

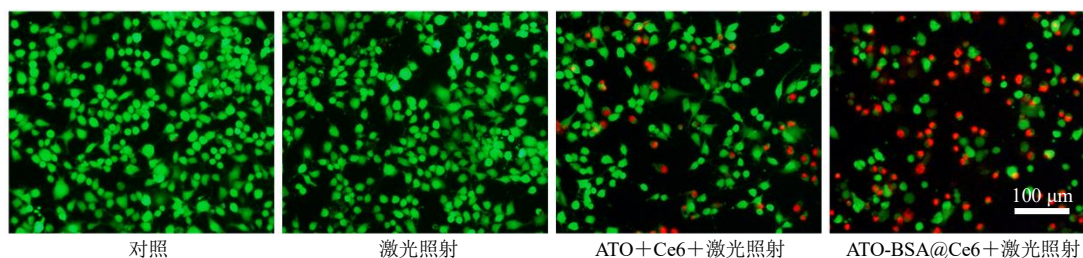


图 9 不同处理后 GL261 细胞的活/死染色 (标尺为 100 μm)

Fig. 9 LIVE/DEAD staining of GL261 cells after different treatments (scale bar is 100 μm)

2.8 细胞内 ROS 生成测定

使用 DCFH-DA 检测经激光照射后 GL261 细胞中的 ROS 水平。将处于对数生长期的 GL261 细胞以 5×10⁴ 个/孔的密度接种于 24 孔培养板, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h。移弃培养液, 分别加入含 Ce6 和 ATO-BSA@Ce6 的无血清培养基。给药 4 h 后, 加入 DCFH-DA (10 μmol/L), 并将细胞在 37 °C 下孵育 30 min。用 PBS 洗涤 3 次后, 将细胞用 635 nm 激光照射 1 min。光照结束后, PBS 洗涤 3 次, 加入 DAPI 染色 5 min 后于荧光倒置显微镜下观察, 荧光强度与细胞内 ROS 产生呈正相关。结果如图

10 所示, 与 Ce6 相比, 经 ATO-BSA@Ce6+激光处理的 GL261 细胞内 Ce6 和 ROS 的荧光强度更强烈, 叠加图显示出二者在细胞内的共定位, 表明将 Ce6 制备成三元复合物纳米粒可在 GL261 细胞内诱导显著的 ROS 生成。

2.9 体外跨 BBB 转运考察

取处于对数生长期的 bEnd.3 细胞以 1×10⁵ 个/孔的密度接种于 24 孔 Transwell 培养板上室 (膜嵌套直径 6.5 mm, 平均孔径 0.4 μm, 比表面积 0.33 cm², 美国 Corning 公司)。培养 3 d 后, 用细胞电阻仪监控并测定跨细胞电阻 (trans epithelial electric resistanc,

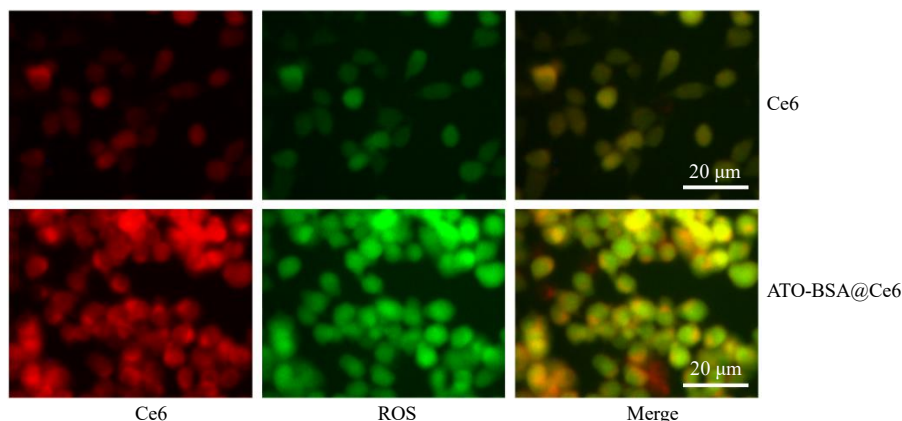


图 10 给药后细胞内 ROS 生成 (标尺为 20 μm)

Fig. 10 ROS generation in GL261 cells with different treatments (scale bar is 20 μm)

TEER), 当细胞单层跨细胞电阻大于 200 Ω/cm² 时方可进行后续实验。对于构建成功的 Transwell 孔, 分别加入含 Ce6 和 ATO-BSA@Ce6 (Ce6 2 μg/mL) 的无血清培养基, 于给药后 0.5、1、2、4、6、8、12 h 在下室中吸取样品 100 μL, 并及时补充等量新鲜介质。取样结束后, 通过酶标仪测定 Ce6 的荧光强度。体外 BBB 透过率通过公式计算。结果如图 11 所示, 随着时间的推移, ATO-BSA@Ce6 通过 BBB 的量明显多于 Ce6 组, 表明 ATO-BSA@Ce6 能有效地穿透 BBB。

透过率 = 跨细胞单层的纳米粒累积量 / 纳米粒初始量

2.10 体内靶向性考察

将 C56BL/6 小鼠随机分为 2 组: Ce6 和 ATO-BSA@Ce6 (每组 n=3), 麻醉, 脱毛。尾静脉注射 Ce6 和 ATO-BSA@Ce6 (Ce6 2.5 mg/kg), 给药后不同时间点 (0.5、1、2、4、6、12、24 h) 使用小动

物活体成像仪观察 Ce6 荧光强度 ($E_x=640\text{ nm}$, $E_m=680\text{ nm}$)。并在 24 h 的时间点拍摄后, 处死小鼠, 解剖, 取出脑和主要组织 (心、肝、脾、肺、肾), 使用小动物活体成像仪拍摄, 并用 Living Image 软件半定量荧光强度, 观察 ATO-BSA@Ce6 在各组织中的分布及跨越 BBB 进入脑的情况。结果如图 12 所示, ATO-BSA@Ce6 可在较短时间内跨越 BBB 到达小鼠脑部, 并且经过 24 h 后小鼠脑部仍然存在有明显的荧光信号, 而 Ce6 只在前 2 h 有少部分可以到达脑部, 4 h 后几乎没有任何荧光信号。表明 ATO-BSA@Ce6 能够有效穿透 BBB 进入脑部, 这对于提高 ATO 的治疗效果同时降低对正常脑组织的毒性有很大帮助。

2.11 统计学处理

所有结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并使用 Graphpad Prism 8.0 绘制。

3 讨论

脑胶质瘤是最常见的恶性原发性脑肿瘤, 预后差, 复发率高, 死亡率高。目前胶质瘤的标准治疗方式是最大限度的手术切除联合放疗和化疗。即使采用了这些积极的治疗方法, 总体预后仍然很差, 长期生存率很低, 只有 15~17 个月^[26]。ATO 又称亚砷酸, 是中国传统中药砒霜的主要有效成分, 常用于治疗溃疡、瘟疫、疟疾等, 在现代是治疗 APL 的有效药物。近年来, 大量的研究发现 ATO 对多种实体瘤具有明显的抑制作用, 尤其对于脑胶质瘤具有较好的抗肿瘤活性^[16]。然而作为一种水溶性无机盐, ATO 靶向性差、生物体内分布不良, 被实体肿瘤细胞摄取的情况较差, 又因其大剂量使用会导致毒性副作用, 这大大增加了运用 ATO 治疗脑胶质瘤

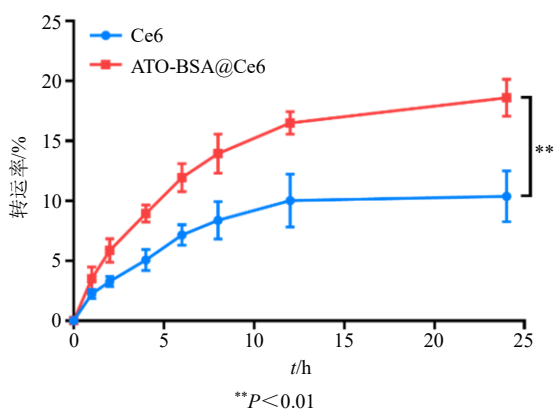


图 11 Ce6 和 ATO-BSA@Ce6 在体外通过 BBB 的透过率 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

Fig. 11 Transport ratio of nanoparticles across BBB in vitro ($\bar{x} \pm s$, n=3)

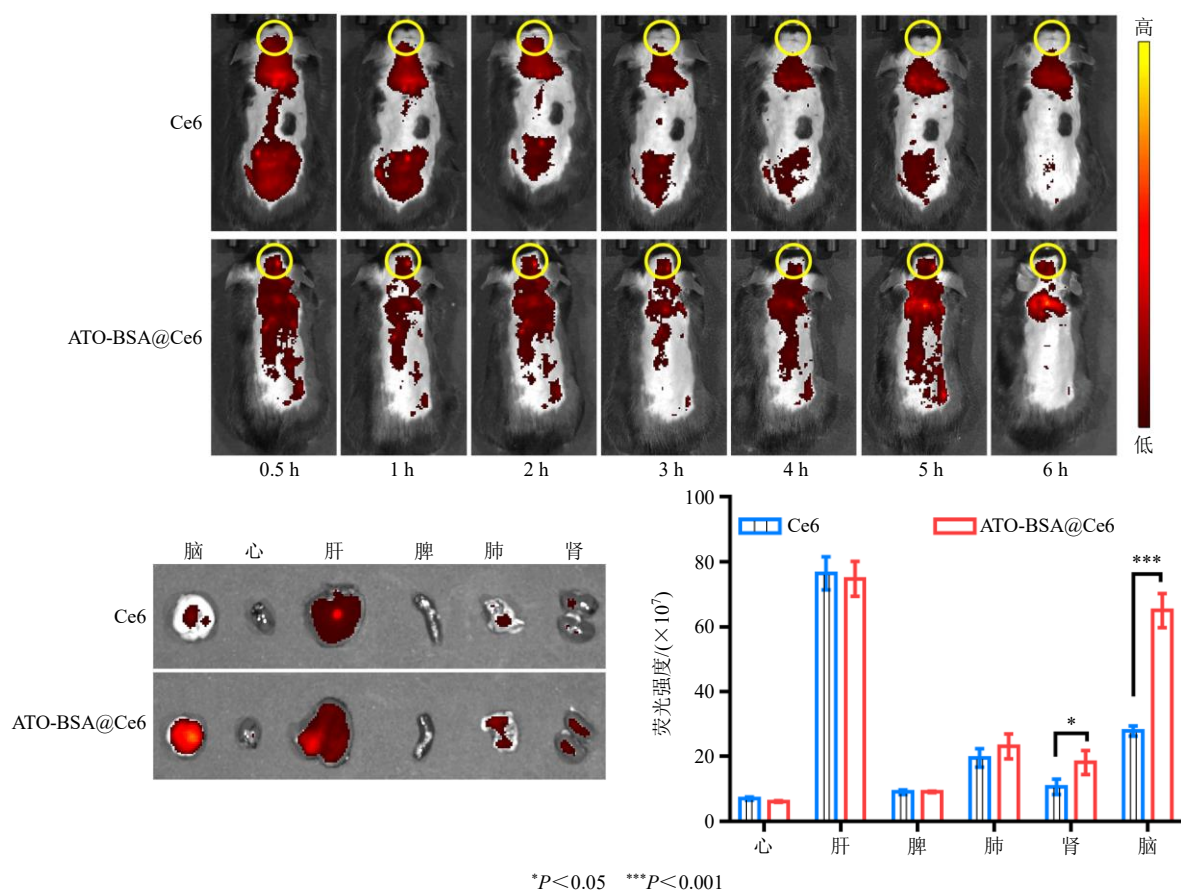


图 12 尾静脉注射 Ce6 和 ATO-BSA@Ce6 后不同时间的活体成像图 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 12 *In vivo* images of mice after treated with Ce6 and ATO-BSA@Ce6 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

的局限性。

为了改善这些缺点，将这一传统中药与纳米技术相结合，构建了基于 ATO 的三元复合物纳米粒递送系统，ATO-BSA@Ce6。其中，ATO 通过形成砷硫键与 BSA 结合，该键在 GSH 和低 pH 条件下可被破坏，从而将 ATO 释放。光敏剂 Ce6 则是通过与 BSA 形成酰胺键而加载。体外释放研究表明，ATO-BSA@Ce6 具有缓释作用，且在弱酸性环境中能实现最大程度的释放。BSA 由于其庞大的结构和多个结合位点的存在，是包载或携带药物的理想选择。BSA 可以与多种底物结合，包括激素、金属离子、脂肪酸、氨基酸和多种药物。BSA 对于血浆内源性物质和外源性药物 ATO 和 Ce6 都具有高度亲和力，并且可优先被肿瘤细胞摄取。体外细胞摄取机制研究表明，ATO-BSA@Ce6 可以通过网格蛋白和小窝蛋白介导的细胞内吞 2 种途径进入胶质瘤 GL261 细胞内，增强药物内化到肿瘤细胞的能力。当 ATO-BSA@Ce6 处理的细胞暴露于特定波长激光照射时，可观察到协同抗肿瘤作用。体外抗肿瘤活性实验显示，通过载体进行包载及联合治疗后，可以降

低 ATO 的 IC₅₀ 值，在一定程度上提高了 ATO 的治疗效果。因此将 ATO 制备成纳米粒，提高 ATO 的稳定性，促进砷的胞内积累，减少胞外残留，增强对肿瘤细胞的细胞毒性的同时，降低其对正常细胞与组织的毒副作用。将化疗和光动力治疗结合，进一步降低了 ATO 的给药浓度，也解决了不良反应严重等问题。

BBB 的存在是胶质瘤治疗的最大挑战。BBB 主要由相邻的脑内皮细胞、周细胞和星形胶质细胞组成，细胞间紧密连接，仅允许小分子（如离子、溶质、葡萄糖和氨基酸等）通过细胞旁通路、跨细胞通路等保持脑内的健康环境。这种选择性转运方式严重阻碍了治疗药物在胶质瘤部位的积累，导致治疗效果不佳。建立的体外 BBB 模型表明 ATO-BSA@Ce6 可有效地跨越 BBB。体内活体成像也证明了 ATO-BSA@Ce6 的脑靶向能力，且在脑部蓄积的时间更长。

综上所述，ATO-BSA@Ce6 纳米递送系统能有效改善 ATO 在治疗脑胶质瘤方面分布缺乏特异性、难以透过 BBB 等缺点，使 ATO 具备靶向及缓释特

性,显著提高其体外抗肿瘤活性及体内外跨 BBB 能力,为 ATO 有效应用于脑胶质瘤的治疗提供了新的研究策略与参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Liu J, Lu Y, Wu Q, *et al.* Mineral arsenicals in traditional medicines: Orpiment, realgar, and arsenolite [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008, 326(2): 363-368.

[2] 张亭栋, 张鹏飞, 王守仁, 等. “癌灵注射液”治疗 6 例白血病初步临床观察 [J]. *黑龙江医药*, 1973(3): 66-67.

[3] 张亭栋, 荣福祥. 癌灵一号注射液与辨证论治治疗急性粒细胞型白血病 [J]. *黑龙江医药*, 1979(4): 7-11.

[4] Ghavamzadeh A, Alimoghaddam K, Rostami S, *et al.* Phase II study of single-agent arsenic trioxide for the front-line therapy of acute promyelocytic leukemia [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(20): 2753-2757.

[5] Miller W H Jr, Schipper H M, Lee J S, *et al.* Mechanisms of action of arsenic trioxide [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(14): 3893-3903.

[6] Kozono S, Lin Y M, Seo H S, *et al.* Arsenic targets Pin1 and cooperates with retinoic acid to inhibit cancer-driving pathways and tumor-initiating cells [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3069.

[7] Zhao Z, Wang X, Zhang Z, *et al.* Real-time monitoring of arsenic trioxide release and delivery by activatable T₁ imaging [J]. *ACS Nano*, 2015, 9(3): 2749-2759.

[8] Hu J, Dong Y, Ding L, *et al.* Local delivery of arsenic trioxide nanoparticles for hepatocellular carcinoma treatment [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2019, 4: 28.

[9] Raju G P. Arsenic: A potentially useful poison for Hedgehog-driven cancers [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(1): 14-16.

[10] Kim J, Lee J J, Kim J, *et al.* Arsenic antagonizes the Hedgehog pathway by preventing ciliary accumulation and reducing stability of the Gli2 transcriptional effector [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(30): 13432-13437.

[11] Chiu H W, Ho S Y, Guo H R, *et al.* Combination treatment with arsenic trioxide and irradiation enhances autophagic effects in U118-MG cells through increased mitotic arrest and regulation of PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways [J]. *Autophagy*, 2009, 5(4): 472-483.

[12] Kanzawa T, Zhang L, Xiao L, *et al.* Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3 [J]. *Oncogene*, 2005, 24(6): 980-991.

[13] Liu Y, Zhang X, Liang Y, *et al.* Targeting X box-binding protein-1 (XBP1) enhances sensitivity of glioma cells to

oxidative stress [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2011, 37(4): 395-405.

[14] Ding D, Lim K S, Eberhart C G. Arsenic trioxide inhibits Hedgehog, Notch and stem cell properties in glioblastoma neurospheres [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2014, 2: 31.

[15] Wu J, Ji Z, Liu H, *et al.* Arsenic trioxide depletes cancer stem-like cells and inhibits repopulation of neurosphere derived from glioblastoma by downregulation of Notch pathway [J]. *Toxicol Lett*, 2013, 220(1): 61-69.

[16] Sönksen M, Kerl K, Bunzen H. Current status and future prospects of nanomedicine for arsenic trioxide delivery to solid tumors [J]. *Med Res Rev*, 2022, 42(1):374-398.

[17] Akhtar A, Wang S X, Ghali L, *et al.* Effective delivery of arsenic trioxide to HPV-positive cervical cancer cells using optimised liposomes: A size and charge study [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(4): 1081.

[18] Zhang L, Zhang Z, Mason R P, *et al.* Convertible MRI contrast: Sensing the delivery and release of anti-glioma nano-drugs [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 9874.

[19] Peng Y, Zhao Z, Liu T, *et al.* Smart human-serum-albumin-As₂O₃ nanodrug with self-amplified folate receptor-targeting ability for chronic myeloid leukemia treatment [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, 56(36): 10845-10849.

[20] Lian Y, Wang X, Guo P, *et al.* Erythrocyte membrane-coated arsenic trioxide-loaded sodium alginate nanoparticles for tumor therapy [J]. *Pharmaceutics*, 2019, 12(1): 21.

[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 Nanomedicine*, 2018, 13: 5937-5952.

[22] Tao J, Fei W, Tang H, *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.

[23] Lee E J, Lee N K, Kim I S. Bioengineered protein-based nanocage for drug delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2016, 106(Pt A): 157-171.

[24] Zhu Y, Xue J, Chen W, *et al.* Albumin-biomaterialized nanoparticles to synergize phototherapy and immunotherapy against melanoma [J]. *J Control Release*, 2020, 322: 300-311.

[25] Hoonjan M, Sachdeva G, Chandra S, *et al.* Investigation of HSA as a biocompatible coating material for arsenic trioxide nanoparticles [J]. *Nanoscale*, 2018, 10(17): 8031-8041.

[26] Tan A C, Ashley D M, López G Y, *et al.* Management of glioblastoma: State of the art and future directions [J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70(4): 299-312.

[责任编辑 郑礼胜]