

线粒体靶向亚砷酸钙/多柔比星脂质纳米粒的制备及其逆转肿瘤耐药性的体外研究

张 钊¹, 岳天祥¹, 程梦莹¹, 梁曾颖¹, 朴寄纲^{1,2*}, 郑红月³, 徐恒武⁴, 李范珠^{1,2*}

(1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310000; 2. 浙江省神经药理学与转化研究重点实验室, 浙江 杭州 310000; 3. 浙江中医药大学图书馆, 浙江 杭州 310000; 4. 金华市人民医院药学部, 浙江 金华 321000)

摘要: 本研究针对P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 在肿瘤耐药性中的关键作用, 利用P-gp细胞膜转运及其外排效应的三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 依赖性, 通过水热合成法、薄膜分散法构建了线粒体靶向亚砷酸钙/多柔比星 (doxorubicin, DOX) 脂质纳米粒。结果表明, 该脂质纳米粒尺寸均一、分散性良好, 平均粒径为 (261 ± 7) nm, zeta 电位为 (-9.6 ± 1.3) mV。DOX 的载药量和包封率分别为 22.6% 和 84.0%; 体外释放具有明显的 pH 依赖性; 显著增加药物在细胞线粒体中的积累, 引起钙离子局部超载, 抑制 P-gp 以及 ATP 的生成, 逆转肿瘤耐药性, 同时释放亚砷酸根 (AsO_3^{3-}) 和 DOX, 协同杀死肿瘤细胞。综上所述, 本研究制备的脂质纳米粒粒径均一, 载药量高和包封率、稳定性好, 具有 pH 响应性及良好的逆转肿瘤耐药能力, 有应用于临床研究的潜力。

关键词: 肿瘤; 线粒体; 三氧化二砷; 脂质纳米粒; 耐药性

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)12-3243-09

Preparation of mitochondrial targeted calcium arsenite/doxorubicin lipid nanoparticles and the *in vitro* study in reversing tumor drug resistance

ZHANG Ke¹, YUE Tian-xiang¹, CHENG Meng-ying¹, LIANG Zeng-ying¹,
PIAO Ji-gang^{1,2*}, ZHENG Hong-yue³, XU Heng-wu⁴, LI Fan-zhu^{1,2*}

(1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310000, China;
2. Key Laboratory of Neuropharmacology and Translational Medicine of Zhejiang Province, Hangzhou 310000, China; 3. Libraries of Zhejiang Chinese Medical University, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310000, China; 4. Department of Pharmacy, Jinhua People's Hospital, Jinhua 321000, China)

Abstract: This study aims at the critical role of P-glycoprotein (P-gp) in tumor drug resistance, taking advantage of the adenosine triphosphate (ATP) dependence of P-gp mediated drug transport and efflux across the cell membrane. Mitochondrial targeted calcium arsenite/doxorubicin (DOX) lipid nanoparticles were constructed *via* hydrothermal method and thin-film dispersion method for reversing tumor drug resistance. The results showed that the lipid nanoparticles were uniform in size and well dispersed with a mean particle size of (261 ± 7) nm, zeta potential of (-9.6 ± 1.3) mV. The DOX loading efficiency and encapsulation efficiency were 22.6% and 84.0%. The *in vitro* drug release profile was pH-dependent; the drug accumulation at mitochondria was significantly increased, which then caused overload of calcium and inhibition of P-gp and ATP, thereby reversing tumor drug resistance. The simultaneously released arsenite ion and DOX could synergistically kill the tumor cells. In summary, the lipid nanoparticles prepared in this study have uniform particle size, high drug loading efficiency and

收稿日期: 2021-08-11; 修回日期: 2021-08-28.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82074027, 81873014); 金华市科技局公益类项目 (2019-4-037).

*通讯作者 Tel: 86-571-61768130, Fax: 86-571-61768181, E-mail: lifanzhu@zcmu.edu.cn; jgpiao@zcmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1169

encapsulation efficiency, excellent colloidal stability, pH responsiveness, and impressive ability to reverse tumor drug resistance, which may hold great potential in further clinical applications.

Key words: neoplasm; mitochondria; arsenic trioxide; lipid nanoparticle; drug resistance

肿瘤的多药耐药性是临床恶性肿瘤治疗失败、肿瘤复发的关键原因^[1-4], 如何克服肿瘤多药耐药性已成为提高化疗药效的关键性科学问题。P-糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) 是一种具有三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 结合域的单向转运跨膜蛋白^[5], 其利用 ATP 水解供能主动外排药物, 使细胞内药物浓度维持在较低水平, 产生肿瘤细胞耐药性^[6]。线粒体在肿瘤的发生和发展中起着重要作用, 是细胞的代谢中心^[7], 是生成 ATP 并最终氧化放能的场所, 破坏线粒体能够直接切断肿瘤细胞的能量供应^[8]。因此, 通过线粒体靶向, 破坏线粒体功能, 降低 P-gp 活性, 是逆转肿瘤多药耐药现象的有效途径。金属离子在细胞代谢和增长过程中起着重要作用, 离子平衡的微妙变化可能引起一系列细胞内反应, 甚至导致细胞死亡^[9]。有研究表明^[10], 钙离子局部超载能够直接损伤线粒体呼吸链复合体 I (complex I), 从而抑制 ATP 产生, 降低 P-gp 外排作用, 同时, 还能在基因水平上抑制 P-gp 合成^[11], 逆转肿瘤耐药性。

多柔比星 (doxorubicin, DOX) 是一种蒽环类抗肿瘤药物^[12,13], 作用靶点为细胞核^[14,15], 能够有效治疗癌症^[16], 但随着长期使用, 可能刺激癌细胞过度表达 P-gp、激活 DNA 修复、增加谷胱甘肽转移酶活性, 最终导致耐药性的产生^[17]。三氧化二砷 (arsenic trioxide, ATO) 是中药砒霜的有效成分, 其毒性明显^[18-21], 作为聚 ADP 核糖聚合酶 1 (poly ADP-ribose polymerase-1, PARP-1) 抑制剂, 可置换 PARP-1 中的 Zn^{2+} , 干扰 PAR 的合成和 DNA 损伤修复, 在细胞内产生 DNA 片段, 最终导致细胞凋亡^[22]。不仅如此, ATO 在非细胞毒性剂量下能够显著增加人乳腺癌耐药细胞 (MCF-7/DOX) 对 DOX 的敏感性, 增强 DOX 的治疗效果^[23], 但是 ATO 不具有分布特异性, 易产生不良反应^[24,25]。砷金属纳米粒具有良好的稳定性和 pH 响应性^[26], 将 Ca^{2+} 和亚砷酸根 (AsO_3^{3-}) 结合形成亚砷酸钙纳米粒 (NPs-CaAs), 可改善 ATO 的体内分布特异性, 降低在正常组织中的蓄积; 同时表面带正电荷的 DOX 可通过静电作用与表面带负电荷的亚砷酸钙纳米粒相结合, 实现 DOX 的高效负载^[27]。因此, ATO 和 DOX 的共同递送可以联合 Ca^{2+} 逆转肿瘤耐药性, 协同杀伤肿瘤细胞。

大部分药物进入肿瘤细胞后靠随机分布与包括线粒体在内的亚细胞器作用, 导致只有少量药物进入线

粒体^[28]。三苯基膦 (triphenylphosphine, TPP) 是一种可穿透线粒体膜的双亲性阳离子化合物, 其化学结构中的 3 个苯基使其具有很强的脂溶性^[29]。不仅如此, 磷原子上的正电荷能够分布到 3 个苯基上, 形成离域正电荷, 使其对线粒体具有亲和性^[30]。因此, 可以通过 TPP 修饰来提高药物制剂载体的线粒体靶向性。

综上, 本文通过水热法制备亚砷酸钙纳米粒, 利用静电相互作用力将 DOX 负载至 NPs-CaAs, 最终采用薄膜水化法制备线粒体靶向亚砷酸钙/多柔比星脂质纳米粒 (TPP-LPs-CaAs/DOX)。该脂质纳米粒进入肿瘤细胞后, 将药物靶向递送至线粒体, 并通过以下机制逆转肿瘤耐药: ① 引起线粒体中 Ca^{2+} 局部超载, 破坏线粒体离子平衡, 抑制 P-gp 合成; ② 抑制线粒体呼吸链复合体 I 活性, 减少细胞内 ATP 生成, 降低 P-gp 外排作用。最后, 释放出 ATO 和 DOX, 协同杀死肿瘤细胞。详细作用机制见图 1。

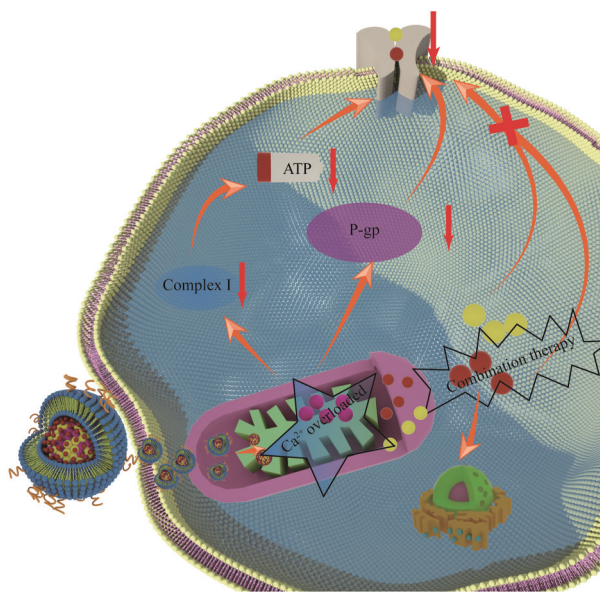


Figure 1 Schematic diagram of TPP-LPs-CaAs/DOX treatment of drug-resistant breast cancer. P-gp: P-glycoprotein; ATP: Adenosine triphosphate; DOX: Doxorubicin; TPP-LPs-CaAs: Triphenylphosphine-liposome-calcium arsenite

材料与方法

仪器 ICAP 7400 等离子体发射光谱仪、1510 酶标仪、311 CO_2 培养箱、超低温冰箱 (美国 Thermo Fisher 公司); 反应釜 (上海秋佐科学仪器有限公司); 水热釜

磁力搅拌加热套 (郑州碳邦仪器有限公司); 透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM; 日本日立公司); Nano-ZS90 粒度分析仪 (英国 Malvern 仪器有限公司); ZD-85 恒温振荡器 (上海力辰仪器科技有限公司); R-502 旋转蒸发仪 (上海申胜生物技术有限公司); FB-01T 真空抽滤系统 (上海摩速科学器材有限公司); 紫外可见近红外光谱仪 (日本岛津公司); CP225D 电子天平 (德国 Sartorius 公司); Milli-Q 超纯水仪 (美国 Millipore 公司); DF-101S 集热式恒温磁力搅拌器 (郑州科创仪器有限公司); Optima Max 超速低温离心机 (美国 Beckman 公司); 超声波细胞粉碎仪 (宁波新芝生物科技股份有限公司); SW-CJ-1FD 超净工作台 (苏州净化设备有限公司); HHS-11-1 恒温水浴锅 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂); 激光共聚焦显微镜 (德国 Carl Zeiss 公司)。

药品与试剂 亚砷酸钠 (NaAsO_2 ; 纯度: 97%; 山东西亚化学工业有限公司); 盐酸多柔比星 (doxorubicin hydrochloride, $\text{DOX}\cdot\text{HCl}$)、硝酸 (65%~68%) (上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 一水合醋酸钙 [calcium acetate monohydrate, $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2\cdot\text{H}_2\text{O}$; 上海凌峰化学试剂有限公司]; 胎牛血清 (FBS; 杭州四季青公司); 磷酸盐缓冲液 (PBS)、4% 多聚甲醛 (Biosharp 生物科技公司); RPMI-1640 培养基、0.25% 胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司); 二甲基亚砜 (DMSO; 广东光华科技股份有限公司); 合成磷脂 (DSPC)、胆固醇和聚乙二醇化二硬脂酰磷脂酰乙醇胺 (DSPE-PEG_{2000}) (上海艾韦特医药科技有限公司); DSPE-PEG_{2000} -TPP (上海炎怡生物科技有限公司); 二氯甲烷和无水乙醇 (国药集团化学试剂有限公司); 2-(4-amidinophenyl)-6-indolecarbamidine dihydrochloride (DAPI)、线粒体绿色荧光探针 (mitotracker green) 和 ATP 检测试剂 (S0026) (上海碧云天生物技术有限公司); 线粒体复合体 I 活性检测试剂盒 (BC0515; 北京索莱宝科技有限公司); 超纯水由 Milli-Q 超纯水仪净化得到; 四甲基偶氮唑盐 (MTT; 源叶生物科技有限公司); P-gp 一抗 (ab170904)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 一抗 (ab181602)、二抗 IgG (ab6721) (美国 Abcam 公司); 牛胰岛素 (上海钰博生物科技有限公司)。

细胞 人乳腺癌耐药细胞 (MCF-7/DOX; 上海钰博生物科技有限公司) 培养于含 10% FBS、 $0.5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DOX、 $0.01\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 牛胰岛素、 $100\ \text{u}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素和 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素的 RPMI-1640 培养基中, 置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中避光培养。

水热法制备 NPs-CaAs 精密称取 $30.00\ \text{mg}\ \text{NaAsO}_2$ 和 $150.00\ \text{mg}\ \text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2\cdot\text{H}_2\text{O}$, 分别溶于 $10\ \text{mL}$ 超

纯水中, 混合后装入 $50\ \text{mL}$ 圆底烧瓶中, 常温下反应 $30\ \text{min}$ 。取出液体加入反应釜中, 在 $120\ ^\circ\text{C}$ 下反应 $24\ \text{h}$ 。反应完成后冷却至室温, 于超速低温离心机中以 $10\ 000\times\text{g}$ 离心 $30\ \text{min}$, 收集沉淀, 用超纯水洗涤 3 次, 重复 3 次, 沉淀即为 NPs-CaAs。

制备 NPs-CaAs/DOX 在上述方法得到的 NPs-CaAs 溶液中缓慢加入 $2\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ $\text{DOX}\cdot\text{HCl}$, 总计 $2\ \text{mL}$, 常温下持续搅拌 $12\ \text{h}$, 于超速低温离心机中以 $10\ 000\times\text{g}$ 离心 $30\ \text{min}$, 收集沉淀, 用超纯水洗涤 3 次, 直至上清液无色, 沉淀即为 NPs-CaAs/DOX。

制备 TPP-LPs-CaAs/DOX 精密称取 DSPE-PEG_{2000} $0.72\ \text{mg}$ 、 DSPE-PEG_{2000} -TPP $0.18\ \text{mg}$ 、DSPC $6.30\ \text{mg}$ 、胆固醇 $2.80\ \text{mg}$, 置于 $100\ \text{mL}$ 圆底烧瓶中, 加入 $5\ \text{mL}$ 二氯甲烷和 $10\ \text{mL}$ 无水乙醇, 超声至完全溶解。于 $40\ ^\circ\text{C}$ 减压旋转成膜, 除去有机溶剂。加入一定量 NPs-CaAs/DOX 分散液, 于 $40\ ^\circ\text{C}$ 水化 $20\ \text{min}$, 随后取出至 EP 管中超声 $4\ \text{min}$, 即得 TPP-LPs-CaAs/DOX。脂质体悬液于 $8\ 000\times\text{g}$ 离心 $10\ \text{min}$, 除去空囊泡和磷脂碎片。

粒径、zeta 电位及形态表征 配制一定浓度 NPs-CaAs、NPs-CaAs/DOX 和 TPP-LPs-CaAs/DOX 悬液, 采用马尔文粒度分析仪分别测定其粒径和 zeta 电位; 用 $100\ \mu\text{L}$ 移液枪吸取适量纳米悬液, 滴于 100 目碳支持膜铜网的有膜正面, 置于红外干燥箱中快速干燥, 随后通过 TEM 拍摄纳米粒的外貌形态。

紫外吸收测定 取一定量 $\text{DOX}\cdot\text{HCl}$ 、NPs-CaAs/DOX 和 TPP-LPs-CaAs/DOX 悬液于石英比色皿中, 用紫外可见近红外光谱仪测 $200\sim 700\ \text{nm}$ 处的紫外吸收曲线。

体外释放研究 选用 pH 值分别为 7.4 、 5.0 的 PBS 为释放介质, 精密量取含 TPP-LPs-CaAs/DOX 的悬液 (DOX 浓度 $50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) $1\ \text{mL}$, 置于预处理的透析袋 (相对分子质量 $8\ 000\sim 14\ 000$) 中, 排除气泡后密封, 置于 $10\ \text{mL}$ 释放介质中, 于 $(37.0\pm 0.5)\ ^\circ\text{C}$ 恒温水浴振荡 ($100\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$), 分别于 0 、 1 、 2 、 4 、 6 、 8 、 12 、 $24\ \text{h}$ 取样 $1\ \text{mL}$, 并立即补加等量同温同 pH 值新鲜释放介质, 样品用酶标仪测 $450\ \text{nm}$ 处吸收值, 计算累积释药率并绘制释药曲线。

体外协同作用评价 取对数生长期的 MCF-7/DOX 细胞, 以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板上, 于 $37\ ^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养 $12\ \text{h}$, 除去培养基后加入含有不同 DOX 和 ATO 比例 ($1:0.5$ 、 $1:1$ 、 $1:2$, ATO 以砷元素的量计算, 下同) 的不含 FBS 培养基, 培养 $12\ \text{h}$ 后更换培养基为含 $0.5\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MTT 的培养基, 继续培养 $4\ \text{h}$ 后除去培养基, 加入 $150\ \mu\text{L}$ DMSO 溶解甲瓩并用排枪吹匀; 用酶标仪测定 $490\ \text{nm}$ 处的吸光度, 并通过 Chou-Talalay 方法计算联合指数 (combination index, CI), 分

析两药协同作用效果。

体外毒性评价 取对数生长期的 MCF-7/DOX 细胞, 以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板上, 于 37°C 恒温培养箱中培养 12 h, 除去培养基后加入含有 DOX·HCl、ATO 或各组纳米粒的不含 FBS 培养基 (NPs-CaAs/DOX 和 TPP-LPs-CaAs/DOX), DOX 含量分别为 2、5、10、15、20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。培养 12 h 后除去培养基, 加入含 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MTT 的培养基, 继续培养 4 h 后除去培养基, 加入 150 μL DMSO 溶解甲瓚并用排枪吹匀; 用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度, 并计算细胞存活率及药物抑制率。

细胞摄取 取对数生长期的 MCF-7/DOX 细胞, 以 5×10^5 个/孔接种于激光共聚焦皿中, 于 37°C 恒温培养箱中培养 12 h, 加入含有 DOX 或各组纳米粒的不含 FBS 培养基 (NPs-CaAs/DOX 和 TPP-LPs-CaAs/DOX), DOX 含量为 $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 对照组为不含药物和 FBS 的培养基组。培养 6 h 后除去培养基, PBS 洗 3 次, 用线粒体绿色荧光探针 ($100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 染色 45 min, 除去染料后, PBS 洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 10 min, 随后吸除, 并用 PBS 洗 3 次; 然后加入含有核酸染料 DAPI ($0.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的培养基孵育 20 min, PBS 洗 3 次除去细胞表面的染料, 最后置于激光扫描共聚焦显微镜 (confocal laser scanning microscope, CLSM) 下观察。

线粒体呼吸链复合体 I 活性测定 取对数生长期的 MCF-7/DOX 细胞, 以 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 于 37°C 恒温培养箱中培养 12 h, 加入含有 DOX 或各组纳米粒的不含 FBS 培养基 (NPs-CaAs/DOX 和 TPP-LPs-CaAs/DOX), DOX 含量为 $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。培养 12 h 后除去培养基, PBS 洗 3 次, 用细胞刮刀收集细胞于 1 mL 离心管中, 线粒体呼吸链复合体 I 活性检测用线粒体复合体 I 活性检测试剂盒测定。

细胞中 ATP 含量测定 取对数生长期的 MCF-7/DOX 细胞, 以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 于 37°C 恒温培养箱中培养 12 h, 加入含有 DOX 或各组纳米粒的不含 FBS 培养基 (NPs-CaAs/DOX 和 TPP-LPs-CaAs/DOX), DOX 含量为 $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。培养 12 h 后除去培养基, PBS 洗 3 次, ATP 含量用检测试剂盒进行测定。

蛋白免疫印迹杂交 (Western blot) 法检测 P-gp 蛋白含量 取对数生长期 MCF-7/DOX 细胞, 以 5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 于 37°C 恒温培养箱中培养 12 h, 加入含有 DOX 或各组纳米粒的不含 FBS 培养基 (NPs-CaAs/DOX 和 TPP-LPs-CaAs/DOX), DOX 含量为 $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。培养 12 h 后除去培养基, 提取细胞内总蛋白, 用 BCA 法测定蛋白浓度, 取 20 μg 总蛋白进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS polyacrylamide gel electro-

phoresis, SDS-PAGE), 转膜, 5% 脱脂牛奶封闭非特异性抗原, 分别加入 P-gp 一抗 ($1:1\ 000$ 稀释) 于 4°C 孵育过夜, TBST 洗膜后加入二抗 ($1:5\ 000$) 室温孵育 2 h, TBST 洗膜后用显影成像, 得到蛋白免疫印记条带, 以 GAPDH 蛋白条带作为参照。

结果与讨论

1 NPs-CaAs、NPs-CaAs/DOX 和 TPP-LPs-CaAs/DOX 的形态表征

TPP-LPs-CaAs/DOX 制备过程见图 2A。首先, 通过水热法合成 NPs-CaAs, 利用静电吸附作用负载 DOX, 最后采用薄膜水化法制备 TPP-LPs-CaAs/DOX。如图 2B 所示, 透射电镜结果显示制备的 NPs-CaAs、NPs-CaAs/DOX 及 TPP-LPs-CaAs/DOX 均呈球状结构且粒径均一。采用动态光散射仪测定各组制剂平均水合粒径以及 zeta 电位, 如图 2C 所示, NPs-CaAs 的高表面能导致纳米粒呈团聚状态, 水合粒径为 $(921 \pm 12) \text{ nm}$, zeta 电位为 $(-23.3 \pm 0.8) \text{ mV}$; 采用静电吸附法负载 DOX, 负载 DOX 后 NPs-CaAs/DOX 的分散性有所改善, 水合粒径减少至 $(403 \pm 19) \text{ nm}$, zeta 电位为 $(-14.9 \pm 0.9) \text{ mV}$; 经磷脂双分子层包裹后, TPP-LPs-CaAs/DOX 的分散性进一步改善, 水合粒径为 $(261 \pm 7) \text{ nm}$, zeta 电位为 $(-9.6 \pm 1.3) \text{ mV}$ 。如图 2D 所示, TPP-LPs-CaAs/DOX 中 DOX 的载药量和包封率分别为 22.6% 和 84.0%, ATO 的载药量和包封率为 23.1% 和 75.2%。由紫外-可见光吸收谱可知 (图 2E), NPs-CaAs/DOX 与 TPP-LPs-CaAs/DOX 在 450 nm 处吸收值有所增加, zeta 电位变化情况表明 DOX 的负载与脂质囊泡包裹成功。

2 TPP-LPs-CaAs/DOX 体外释放研究

为考察 TPP-LPs-CaAs/DOX 的 pH 响应释放 DOX 特性, 分别选用 pH 值为 7.4、5.0 的 PBS 作为释放介质。结果如图 2F 所示, 在 pH 7.4、5.0 的 PBS 中 DOX 的释放百分率分别为 15%、60%, 证明 TPP-LPs-CaAs/DOX 在酸性环境中具有良好 DOX 释放能力, 在正常生理环境 pH 条件下稳定。

3 DOX 和 ATO 的细胞毒性及协同作用

为了证明 DOX 和 ATO 的体外协同作用, 采用 MTT 法测试了单独 DOX 和 ATO 对 MCF-7/DOX 细胞的毒性作用, 并计算两种单药的 IC_{50} 值。如图 3A~C 所示, MCF-7/DOX 细胞中 DOX 的 IC_{50} 值为 $15.0 \pm 0.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, ATO 的 IC_{50} 值为 $17.2 \pm 1.8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。接下来基于 Chou-Talalay 方法进一步研究了 DOX 和 ATO 的协同作用, 并利用 CI 进行系统评估。结果分析 (图 3D) 显示, 在受累细胞分数 (fraction affected) 等于 0.5 处, ATO 和 DOX 的质量比为 2:1 时具有最好的协同抑制效果, 比值为 1:1

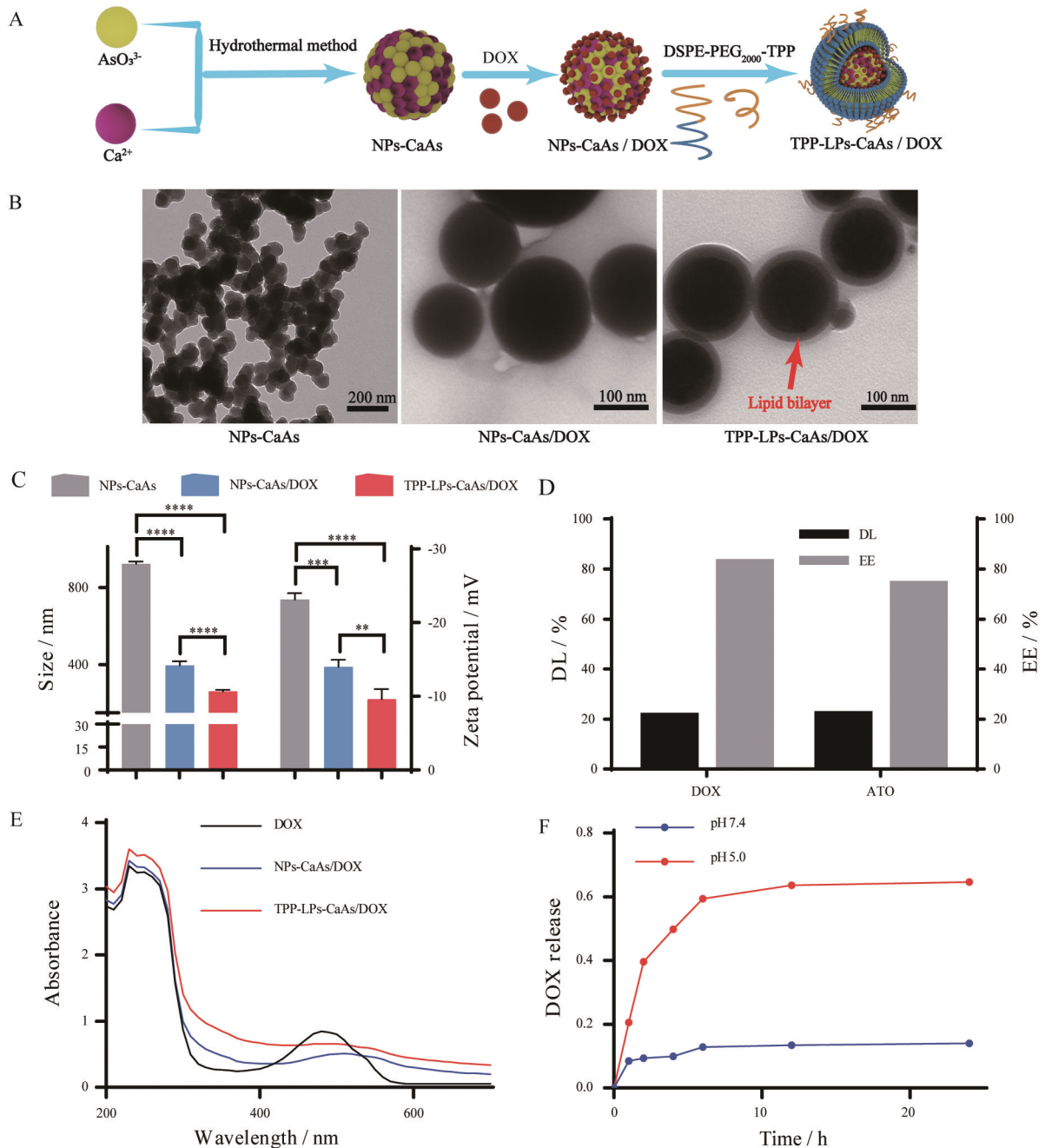


Figure 2 Synthesis and characterization of NPs-CaAs, NPs-CaAs/DOX, and TPP-LPs-CaAs/DOX. A: Preparation process of NPs-CaAs, NPs-CaAs/DOX, and TPP-LPs-CaAs/DOX; B: Representative transmission electron microscope (TEM) images of various nano-formulations; C: Particle size and zeta potential of various nano-formulations ($n = 3$); D: Drug loading efficiency (DL) and encapsulation efficiency (EE) of ATO and DOX in TPP-LPs-CaAs/DOX; E: UV-vis spectrum of free DOX, NPs-CaAs/DOX, and TPP-LPs-CaAs/DOX; F: The pH-responsive DOX release from TPP-LPs-CaAs/DOX at different pH values. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$. ATO: Arsenic trioxide; NPs: Nanoparticles; DSPE: Distearoyl phosphoethanolamine; PEG₂₀₀₀: Polyethylene glycol-2000; AsO₃³⁻: Arsenite ion; Ca²⁺: Calcium ion

时次之, 0.5:1时协同抑制效果最差; 由于载药量限制, TPP-LPs-CaAs/DOX中药物质量比只能达到1:1, 但仍具有较好协同抑制效果。

4 细胞摄取

为研究细胞对药物的摄取情况, 采用激光共聚焦

法观察药物在细胞中的分布情况。如图4A所示, DOX组由于外排蛋白P-gp的存在, 只有少量药物进入细胞, 红色荧光极弱可忽略不计, NPs-CaAs/DOX组及TPP-LPs-CaAs/DOX组的红色荧光较强且分布在细胞质中, 证明纳米粒大部分被细胞摄取。由图4B可知,

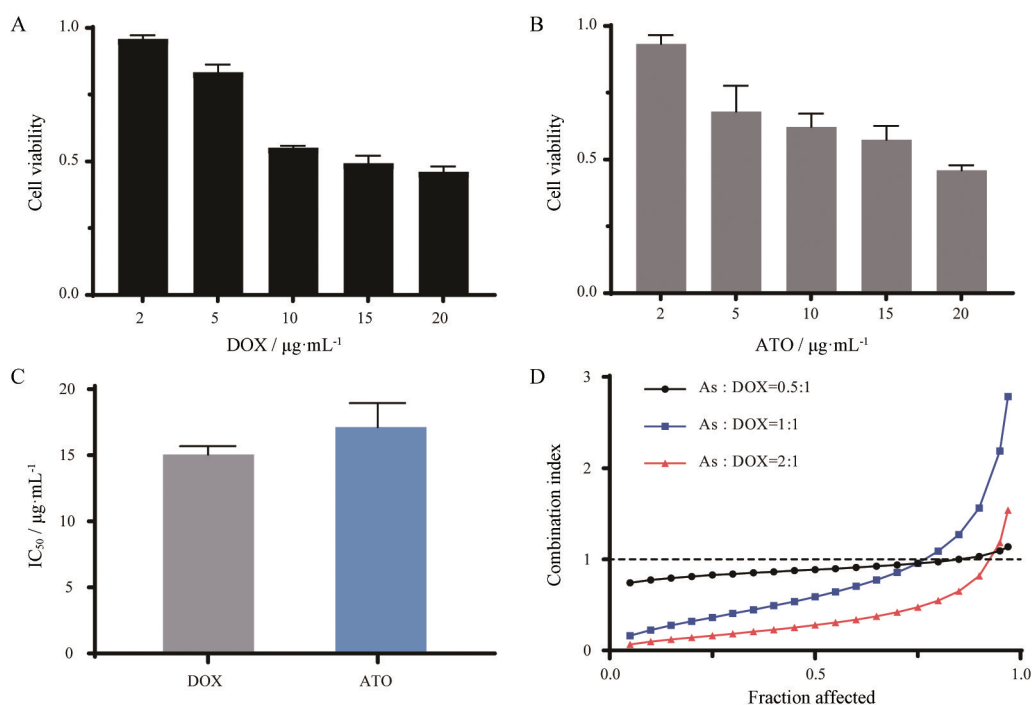


Figure 3 Effects of DOX and ATO on the cell viability and half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of MCF-7/DOX. After treated with various concentrations of DOX and ATO for 12 h, the cell viability (A, DOX; B, ATO) and IC_{50} (C) were examined, respectively; D: Trends of combination index (CI) with different ratiometric mixtures of DOX and arsenic (As) for MCF-7/DOX. $n = 3, \bar{x} \pm s$

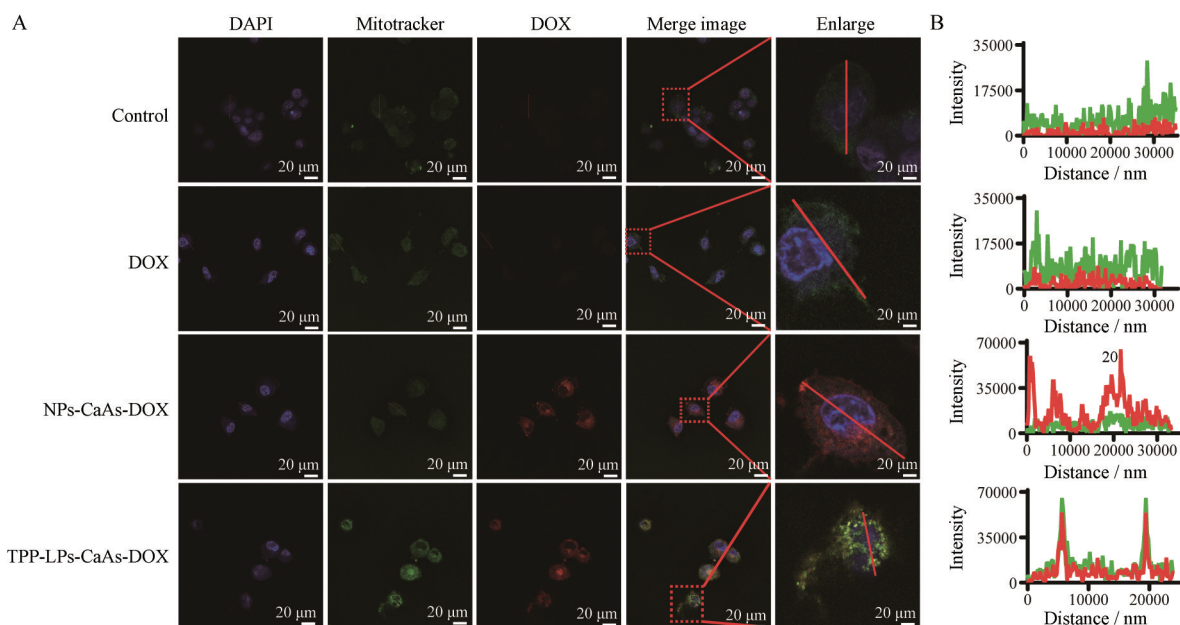


Figure 4 The distribution of drug in the MCF-7/DOX cells. A: Representative CLSM images of treated with DOX, NPs-CaAs/DOX, TPP-LPs-CaAs/DOX, respectively. All the groups have the same concentration of DOX. Cell nuclei: Blue fluorescence; DOX: Red fluorescence; Mitochondria: Green fluorescence; B: Fluorescence intensity profiles of regions of interest (along red lines in the images). The group of control treated with blank medium. Red channel: λ_{ex} 514 nm (2%), λ_{em} 605 nm, detector gain 700; Green channel: λ_{ex} 488 nm (5%), λ_{em} 514 nm, detector gain 700; Blue channel: λ_{ex} 405 nm (2%), λ_{em} 453 nm, detector gain 500. CLSM: Confocal laser scanning microscope; DAPI: 2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamide dihydrochloride

NPs-CaAs/DOX组的红色荧光与绿色荧光强度曲线不同步,表明药物虽被细胞摄取但只有少量进入线粒体,

而TPP-LPs-CaAs/DOX组的红色荧光和绿色荧光高度重叠,证实了其良好的线粒体靶向效果。

5 体外细胞毒性研究

采用 MTT 法考察 NPs-CaAs/DOX 和 TPP-LPs-CaAs/DOX 对 MCF-7/DOX 细胞的毒性作用和 IC_{50} 。如图 5A 所示, 当具有 DOX 耐药性的 MCF-7/DOX 细胞经不同组药物处理后, 均表现出一定的浓度依赖性肿瘤杀伤作用; 由于 Ca^{2+} 的存在降低了细胞的耐药性以及 ATO 和 DOX 的联合用药, NPs-CaAs/DOX 组的细胞存活率低于 DOX 组 (图 5A、3A), 但由于缺乏线粒体靶向性, 只有部分 Ca^{2+} 发挥作用; TPP-LPs-CaAs/DOX 具有对细胞最强的杀伤效果, 由于 TPP 的修饰显著提高线粒体 Ca^{2+} 局部浓度, 显著增加细胞损伤程度。图 5B 表明, NPs-CaAs/DOX 和 TPP-LPs-CaAs/DOX 的 IC_{50} 分别为 $10.2 \pm 0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $6.47 \pm 0.18 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 其中 TPP-LPs-CaAs/DOX 组的毒性显著高于 NPs-CaAs/DOX 组, 其耐药逆转倍数相对于 DOX 组为 2.33。

6 克服耐药性机制研究

6.1 ATP 及相关酶活性研究

线粒体是细胞能量工厂, 线粒体呼吸链复合体 I 是氧化呼吸过程中起关键作用的酶, 一旦其活性降低, 下游呼吸链就会被阻断, 细胞内 ATP 产生受到抑制。如图 5C 所示, DOX 组复合体 I 的活性变化甚微, 其他组处理后复合体 I 的活性均有不同程度的降低, 而 TPP-LPs-CaAs/DOX 组对复合体 I 的活性抑制率最大。外排蛋白 P-gp 转运至细胞

膜发挥细胞对药物的外排作用需要依靠 ATP 供能, ATP 的减少能够很大程度地抑制这种作用。图 5D 显示不同组药物处理后细胞中 ATP 的变化, 结果表明 DOX 组 ATP 生成显著增多, 可能是 DOX 加入引起细胞的耐药反应所致, NPs-CaAs/DOX 组能够在一定程度上抑制 ATP 的生成, 而 TPP-LPs-CaAs/DOX 组具有抑制 ATP 生成的最佳效果, 抑制率达到了 94.22%。

6.2 细胞中外排蛋白 P-gp 表达

外排蛋白 P-gp 作为肿瘤耐药性产生的关键蛋白, 其在肿瘤细胞中的表达高低可能直接影响药物能否更好发挥治疗效果。采用 Western blot 技术, 测定耐药细胞中 P-gp 蛋白的表达活性。如图 5E、F 所示, DOX 组对 P-gp 蛋白表达影响不明显, NPs-CaAs/DOX 组对 P-gp 蛋白表达有一定的抑制作用 ($P\text{-gp}/GADPH = 0.65$), TPP-LPs-CaAs/DOX 组具有最强的抑制效果 ($P\text{-gp}/GADPH = 0.53$)。结果表明, TPP-LPs-CaAs/DOX 通过 TPP 的靶向作用将 Ca^{2+} 输送至细胞线粒体中, 导致 Ca^{2+} 失衡进而抑制 P-gp 蛋白的表达。

结论

本研究构建了负载 DOX 的亚砷酸钙线粒体靶向脂质体, 达到克服耐药性以及联合治疗肿瘤的预期目标。该脂质体能够通过 TPP⁺ 的线粒体靶向作用, 特异

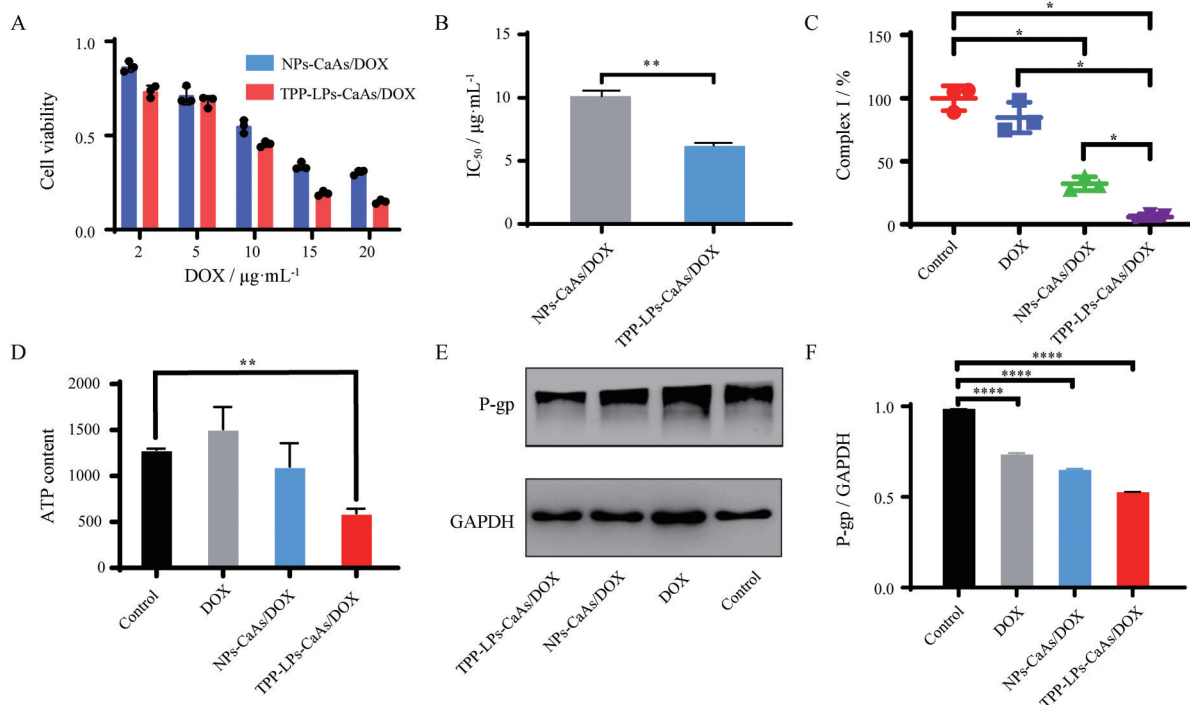


Figure 5 Cell viability (A) and IC_{50} (B) of MCF-7/DOX cells after treated with various concentrations nanoparticles for 12 h; C: The relative activity of complex I; D: ATP content of MCF-7/DOX cells; E: Western blot analysis of P-gp in MCF-7/DOX; F: Corresponding gray analysis of P-gp from Western blot. All the groups have the same concentration of DOX. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.1$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$. GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

性递送 Ca^{2+} 至线粒体, 破坏细胞水平的离子平衡, 抑制外排蛋白 P-gp 表达; 通过降低线粒体呼吸链复合体 I 酶的活性, 减少 ATP 生成, 阻止外排蛋白 P-gp 向细胞膜转运。除克服肿瘤耐药性之外, 利用 Ca^{2+} 和 AsO_3^{3-} 形成的纳米粒, 联用 DOX 协同杀死肿瘤细胞。结果表明, TPP-LPs-CaAs/DOX 有良好的 pH 响应性, 较高的线粒体靶向性及摄取率, 从而显著降低 ATP 生成以及外排蛋白 P-gp 表达, 表明其能够克服肿瘤细胞耐药性。与单独使用 DOX 相比, TPP-LPs-CaAs/DOX 对肿瘤细胞的杀伤程度更高, 证实 DOX 与 ATO 联用能够提高肿瘤的治疗效果。综上所述, 克服肿瘤耐药性以提高药物化疗效果是临床治疗癌症的关键, 本研究通过破坏 Ca^{2+} 浓度平衡以克服肿瘤耐药性, 并进一步联用药物实现协同治疗, 为解决临床上肿瘤耐药性、联合用药问题提供新策略与新方法。

作者贡献: 张钊负责文献查阅、实验设计、实验操作、数据分析、论文初稿撰写及修改; 岳天祥负责实验操作、样品采集和论文后续修改; 程梦莹、梁曾颖、徐恒武负责实验操作、文章图表格式处理及论文修改; 李范珠、朴寄纲和郑红月参与理论指导、实验设计、论文修改及定稿。

利益冲突: 本文所有作者均同意发表, 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, et al. Targeting multidrug resistance in cancer [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5: 219-234.
- [2] Housman G, Byler S, Heerboth S, et al. Drug resistance in cancer: an overview [J]. *Cancers (Basel)*, 2014, 6: 1769-1792.
- [3] Steeg PS. Targeting metastasis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16: 201-218.
- [4] Zhou ML, Li LJ, Li L, et al. Overcoming chemotherapy resistance *via* simultaneous drug-efflux circumvention and mitochondrial targeting [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9: 615-625.
- [5] Chen ZL, Shi TL, Zhang L, et al. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: a review of the past decade [J]. *Cancer Lett*, 2016, 370: 153-164.
- [6] Shi CJ, Fu LW. Advances in the study of expression and regulation of P-glycoprotein [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2007, 42: 911-916.
- [7] Paggio A, Checchetto V, Campo A, et al. Identification of an ATP-sensitive potassium channel in mitochondria [J]. *Nature*, 2019, 572: 609-613.
- [8] Han K, Zhu JY, Jia HZ, et al. Mitochondria-targeted chimeric peptide for trinitarian overcoming of drug resistance [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8: 25060-25068.
- [9] Yang D, Yang GX, Yang PP, et al. Assembly of Au plasmonic photothermal agent and iron oxide nanoparticles on ultrathin black phosphorus for targeted photothermal and photodynamic cancer therapy [J]. *Adv Funct Mater*, 2017, 27: 1700371.
- [10] Xu LH, Tong GH, Song QL, et al. Enhanced intracellular Ca^{2+} nanogenerator for tumor-specific synergistic therapy *via* disruption of mitochondrial Ca^{2+} homeostasis and photothermal therapy [J]. *ACS Nano*, 2018, 12: 6806-6818.
- [11] Yuan K, Fu RZ, Shi CW, et al. Progress in the study on reversal of multidrug resistance induced by P-glycoprotein [J]. *Med Recapit (医学综述)*, 2006, 3: 168-170.
- [12] Kuerban K, Gao XW, Zhang H, et al. Doxorubicin-loaded bacterial outer-membrane vesicles exert enhanced anti-tumor efficacy in non-small-cell lung cancer [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10: 1534-1548.
- [13] Wang PX, Wang MH, Hu YH, et al. Isorhapontigenin protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity *via* increasing YAP1 expression [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11: 680-693.
- [14] Zhang RY, Li DL, Yang Z, et al. Mechanisms of doxorubicin resistance of breast cancer MCF-7 cells mediated by exosomes [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 861-866.
- [15] Li X, Wu XH, Yang HY, et al. A nuclear targeted Dox-aptamer loaded liposome delivery platform for the circumvention of drug resistance in breast cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 117: 109072.
- [16] Chen XJ, Zou JF, Zhang K, et al. Photothermal/matrix metalloproteinase-2 dual-responsive gelatin nanoparticles for breast cancer treatment [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11: 271-282.
- [17] Deffie AM, Alam T, Seneviratne C, et al. Multifactorial resistance to adriamycin: relationship of DNA repair, glutathione transferase activity, drug efflux, and P-glycoprotein in cloned cell lines of adriamycin-sensitive and -resistant P388 leukemia [J]. *Cancer Res*, 1988, 48: 3595-3602.
- [18] Fu X, Li YS, Zhao J, et al. Will arsenic trioxide benefit treatment of solid tumor by nano-encapsulation? [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2020, 20: 239-251.
- [19] Cioloboc D, Kurtz DM. Targeted cancer cell delivery of arsenate as a reductively activated prodrug [J]. *J Biol Inorg Chem*, 2020, 25: 441-449.
- [20] Ye Y, Ricard L, Siblany L, et al. Arsenic trioxide induces regulatory functions of plasmacytoid dendritic cells through interferon- α inhibition [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10: 1061-1072.
- [21] Zhang YK, Dai CL, Yuan CG, et al. Establishment and characterization of arsenic trioxide resistant KB/ATO cells [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2017, 7: 564-570.
- [22] Liu HY, Zhang ZJ, Chi XQ, et al. Arsenite-loaded nanoparticles inhibit PARP-1 to overcome multidrug resistance in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 31009.
- [23] Wang XL, Kong L, Zhao JY, et al. Arsenic trioxide in the mechanism of drug resistance reversal in MCF-7/ADM cell line of human breast cancer [J]. *Chin J Oncol (中华肿瘤杂志)*, 2002,

- 4: 31-35.
- [24] Yue QX, Yu H, He T, et al. Research progress on anti-cancer mechanisms of arsenic trioxide and artemisinin [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 208-214.
- [25] Pace C, Dagda R, Angermann J. Antioxidants protect against arsenic induced mitochondrial cardio-toxicity [J]. *Toxics*, 2017, 5: 38.
- [26] Fei W, Li C, Tao J, et al. Construction of arsenic-metal complexes loaded nanodrugs for solid tumor therapy: a mini review [J]. *Int J Pharm*, 2020, 583: 119385.
- [27] Nguyen TN, Nguyen TT, Nghiem THL, et al. Optical properties of doxorubicin hydrochloride load and release on silica nanoparticle platform [J]. *Molecules*, 2021, 260: 3968.
- [28] Qin JB, Gong NQ, Liao ZH, et al. Recent progress in mitochondria-targeting-based nanotechnology for cancer treatment [J]. *Nanoscale*, 2021, 13: 7108-7118.
- [29] Liu AY, Hou XS, Ding Y. Advances of antineoplastic agents based on mitochondrial targeting mechanism [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 879-887.
- [30] Han X, Su RJ, Huang XQ, et al. Triphenylphosphonium-modified mitochondria-targeted paclitaxel nanocrystals for overcoming multidrug resistance [J]. *Asian J Pharm Sci*, 2019, 14: 569-580.