基于IS-CID技术的多载药聚乙二醇化伊立替康偶联物的细胞药动学研究

邹雨晴, 刘可欣, 赵佳旺, 张卓凡, 宋诗文*

(海南大学药学院, 海南 海口 570100)

摘要: 聚合物−药物偶联物在药物递送领域展现出巨大潜力, 然而现有系统水平的药动学数据难以阐明其细胞层面的药动学行为。本研究以多载药聚乙二醇化伊立替康偶联物 (PEG-[irinotecan]$_3$) 作为模型药物, 构建基于多形态组分相互关系以解析其细胞药动学的研究思路, 建立基于源内碰撞诱导解离 (IS-CID) 技术的HPLC-MS/MS分析方法, 实现PEG-[irinotecan]$_3$及其胞内多形态组分的精准定量分析, 全面阐明其胞内摄取、外排及亚细胞分布特征。摄取研究表明细胞内存在键合型药物 (PEG-[irinotecan]$_{x\,(x=3,2,1)}$)、释放材料 (PEG20K)、游离型药物 (伊立替康) 及活性代谢产物 (SN-38) 等多形态组分。亚细胞分布研究表明键合型药物和释放材料主要分布在细胞质, 伊立替康主要分布在细胞质与细胞核。本研究拓展了聚合物−药物偶联物的细胞药动学研究体系, 所获关键信息对指导药物设计、阐明细胞内药动学行为及推动临床转化具有重要价值。

关键词: 聚合物−药物偶联物; 细胞药代动力学; 源内碰撞诱导解离技术; HPLC-MS/MS; 聚乙二醇; 伊立替康

中图分类号: R969 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2026)02-0577-09

Cellular pharmacokinetics study of multi-loaded pegylated irinotecan conjugate based on IS-CID

ZOU Yu-qing, LIU Ke-xin, ZHAO Jia-wang, ZHANG Zhuo-fan, SONG Shi-wen*

(*School of Pharmacy, Hainan University, Haikou 570100, China*)

Abstract: Polymer-drug conjugates have shown great potential in the field of drug delivery, but existing systemic pharmacokinetic data are difficult to clarify their pharmacokinetic behavior at the cellular level. In this study, multi-loaded pegylated irinotecan conjugate (PEG-[irinotecan]$_3$) was used as a model drug to build a research idea based on the interaction of polymorphic components to analyze its cellular pharmacokinetics. An HPLC-MS/MS analysis method based on in-source collision-induced dissociation (IS-CID) technology was established to achieve accurate quantitative analysis of PEG-[irinotecan]$_3$ and its intracellular polymorphic components, and comprehensively clarify its intracellular uptake, efflux and subcellular distribution characteristics. Uptake studies have shown the presence of polymorphic components in cells such as bonded drugs (PEG-[irinotecan]$_{x\,(x=3,2,1)}$), release material (PEG20K), free drug (irinotecan) and active metabolite (SN-38). Subcellular distribution studies have shown that bonded drugs and release materials are mainly distributed in the cytoplasm, while irinotecan is mainly distributed in the cytoplasm and nucleus. This study expands the cellular pharmacokinetic research system of polymer-drug conjugates, and the key information obtained is of great value in guiding drug design, clarifying intracellular pharmacokinetic behavior, and promoting clinical transformation.

Key words: polymer-drug conjugate; cellular pharmacokinetics; in-source collision-induced dissociation;

收稿日期: 2025-09-26; 修回日期: 2025-12-03.

基金项目: 海南省自然科学基金项目 (825QN288).

*通讯作者 E-mail: ssw@hainanu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-1152

HPLC-MS/MS; polyethylene glycol; irinotecan

恶性肿瘤是全球范围内严重威胁人类健康的主要疾病之一[1], 当前化疗策略仍面临疗效有限与系统性毒性显著的双重挑战[2-4]。因此, 开发高效低毒的新型药物递送系统已成为抗肿瘤研究的重点方向。聚合物−药物偶联物 (polymer-drug conjugates, PDCs) 通过将药物共价连接于聚合物载体, 可显著改善药物溶解性和药代动力学行为[5], 并借助实体瘤的高通透与滞留效应 (enhanced permeability and retention effect, EPR) 实现被动靶向, 为化疗药物的增效减毒开辟了新途径[6,7], 具有广阔的临床转化前景。其中, 聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 凭借其优异的生物相容性和“隐形”特性[8,9], 成为构建 PDCs (尤其是多载药系统) 的理想载体。

尽管 PDCs 在系统药动学优化与被动靶向方面表现突出, 其最终疗效仍高度依赖于细胞内复杂的动态过程, 尤其是活性药物在胞内的有效释放。理想的 PDCs 需高效完成 CAPIR 过程[10]: 循环 (circulation, C)、蓄积 (accumulation, A)、渗透 (penetration, P)、内化 (internalization, I) 与释放 (release, R)。胞内释放作为药物递送的“最后一公里”, 直接决定活性分子能否抵达靶点并发挥药效, 是发挥疗效的关键步骤。然而, 现有研究多集中于系统或组织层面的药动学评价[11], 对细胞内药动学行为—尤其是 PDCs 在胞内的精细动态过程—仍研究不足, 亟待深入探索[12]。

PDCs 细胞药代动力学研究的核心难点在于胞内药物形态复杂且高度动态。PDCs 在体内同时存在键合型药物、释放材料和游离型药物等多形态组分[13]。游离型药物浓度直接决定药效强度, 而键合型药物与释放材料的浓度则影响药物的释放效率与蓄积安全性。传统研究思路多围绕胞内总药物浓度[14], 由于缺乏合适的分析手段, 难以区分不同形态药物组分及其动态变化, 无法精确阐释胞内释药规律, 难以建立药效−动力学之间的内在联系[15-17], 已成为 PDCs 理性设计与评价的主要瓶颈。

前期研究表明 PEG-[irinotecan]$_3$ 进入机体同时存在多形态组分[13], PEG-[irinotecan]$_3$ 系统水平药动学行为和细胞水平的药动学行为是生物体内两个层次上截然不同的体内过程。那么, PEG-[irinotecan]$_3$ 最终以何种形态进入肿瘤细胞? PEG-[irinotecan]$_3$ 进入肿瘤细胞被代谢后会生成哪些形态组分? PEG-[irinotecan]$_3$ 最终以何种形态排出细胞? PEG-[irinotecan]$_3$ 以何种形态分布于亚细胞器? 此外, 细胞样本中各待测组分的浓度显著低于系统水平, 样本的制备、分离及分析面临一系列挑战。本研究以多载药聚乙二醇化伊立替康偶联物 (PEG-[irinotecan]$_3$) 作为模型药物, 其组成包括分子质量 20 kDa 的 PEG 链、寡肽基连接子和三当量伊立替康, 建立源内碰撞诱导解离 (in-source collision-induced dissociation, IS-CID) 技术[18,19]系统解析其细胞水平药动学行为: 一方面, 通过对特征离子碎片的高灵敏、特异性检测, 实现胞内键合型药物 (PEG-[irinotecan]$_{x\,(x=3,2,1)}$)、释放材料 (PEG20K)、游离型药物 (伊立替康) 及活性代谢产物 (SN-38) 等多形态组分的精准区分与定量; 另一方面, 通过监测这些形态随时间的变化信号, 动态解析胞内释药动力学, 全面揭示 PDCs 在细胞内的命运轨迹。本研究有望为 PDCs 的细胞药动学研究提供关键数据支撑, 促进该类药物的临床转化进程。

材料与方法

仪器 G6495C 型三重四极杆液质联用系统和 Agilent 5 TC-C18 色谱柱 (美国 Agilent Technologies 公司); XSR204/AC 型电子天平 (瑞士 METTL TOLEDO 公司); H1 750R 型高速台式冷冻离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); DW-25L262 型医用低温保温箱 (青岛海尔生物医疗股份有限公司); VX-200 型漩涡混合仪 (美国 Labnet 公司); KQ-15L-SC 型数显超声波清洗机 (巩义市予华仪器有限责任公司); 移液器 (德国 Eppendorf 公司)。

药品和试剂 PEG-[irinotecan]$_3$ (批号: 20091601)、PEG-[irinotecan]$_2$ (批号: 20210507)、PEG-[irinotecan] (批号: 20210723) 和 PEG20K (批号: 20210826) 由天津键凯科技有限公司提供; 伊立替康 (批号: C14007299)、利血平 (批号: A2510190)、甲酸 (批号: C15093885)、7-乙基-10-羟基喜树碱 SN-38 (货号: E861385-20mg) 和二甲基亚砜 (终浓度不超过 0.5%, 批号: C15354200) 购于上海麦克林生化科技有限公司; 胰蛋白酶 (批号: GA2501005)、胎牛血清 FBS (批号: 2800811) 和 DMEM 培养基 (批号: 6124555) 购于美国 Gibco Life Sciences 公司; Cell Counting Kit-8 (货号: C0038) 购于上海碧云天生物科技股份有限公司; NE-PER™ 细胞核和细胞质提取试剂盒 (批号: YD374051) 购于美国 Thermo Fisher 公司; 蒸馏水 (香港屈臣氏集团有限公司); 色谱级乙腈、甲醇和质谱级异丙醇 (美国 Fisher Scientific 公司)。

细胞 人肺癌细胞系 A549, 购自武汉普诺赛生物科技有限公司。

标准品和内标溶液的制备 精密称定伊立替康和SN-38各10 mg, 分别加入二甲基亚砜溶解配制成2.00 mg·mL^{-1}的储备液。精密称定PEG-[irinotecan]$_3$、PEG-[irinotecan]$_2$、PEG-[irinotecan]和PEG20K各10 mg, 分别加入乙腈溶解配制成2.00 mg·mL^{-1}的储备液。精密称定利血平10 mg, 加入乙腈溶解配制成2.00 mg·mL^{-1}的内标 (internal standard, IS) 储备液。

样品处理 将细胞样品从−80 ℃冰箱取出, 解冻后涡旋进行混匀, 精密吸取50 μL于1.5 mL离心管中, 加入内标工作液50 μL、乙腈150 μL, 涡旋1 min, 4 ℃、13 000 r·min^{-1}离心10 min, 吸取上清液与纯水1:1混匀后进样分析。

HPLC-MS/MS条件 Agilent 5 TC-C18色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相0.1%甲酸水 (A) 和含0.1%甲酸的甲醇−乙腈 (1∶1, B), 梯度洗脱和分离: 0～2 min, 10%～70% B; 2～10 min, 70%～95% B; 10～16 min, 95% B; 16～16.1 min, 95%～10% B; 16.1～20 min, 10%～10% B。采用多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 正离子模式, 键合型药物与释放材料、伊立替康、SN-38和内标的离子对分别为*m*/*z* 747.4→133.0、587.3→124.0、393.3→349.4 和 609.3→195.1。

特异性考察 分别取空白细胞样本、定量下限样本及孵育36 h的样本, 按“样品处理”方法处理后, 样本平行6份进样分析。

标准曲线和线性范围 将标准曲线样品按“样品处理”方法处理后进行分析, 采用加权最小二乘法 (权重1/x^2) 对数据进行线性回归拟合, 得到各待测物的标准曲线方程及相关系数 (*r*)。

精密度和准确度 制备各待测物的不同浓度质控样本 (*n* = 6), 具体浓度如下: PEG-[irinotecan]$_3$, 1、2.5、8、40 μg·mL^{-1}; PEG-[irinotecan]$_2$、PEG-[irinotecan]和PEG20K, 0.5、1、8、40 μg·mL^{-1}; 伊立替康, 50、120、800、4 000 ng·mL^{-1}; SN-38, 1、2.5、80、120 ng·mL^{-1}。将质控样本按“样品处理”方法处理, 连续考察3个分析批。结果以相对误差 (relative error, RE) 表示准确度和相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 表示精密度。

提取回收率和基质效应 以空白细胞配制低、中、高浓度质控样本 (*n* = 6), 测定其色谱峰面积 (*X*); 在处理后的样本中加入待测物和内标工作液, 测定其色谱峰面积 (*Y*), 按“*X*/*Y*×100%”计算提取回收率。另用水溶液代替细胞样本, 制备低、高浓度无基质的样本, 测定色谱峰面积 (*Z*), 按“*Y*/*Z*×100%”计算基质效应。

稳定性 制备低、高浓度质控样本 (*n* = 3), 分别考察以下条件的稳定性: 室温放置2 h、进样器中放置24 h和反复冻融3次。

CCK-8法检测细胞活性 鉴于PEG-[irinotecan]$_3$在Ⅲ期临床试验中已展现出对肺癌的显著治疗潜力, 本研究选用人肺癌A549细胞系作为细胞模型。收集处于对数生长期的A549细胞, 计数后用无血清的培养基稀释细胞悬液, 将细胞浓度调整为每毫升6×10^{4}个。将细胞悬液加入96孔板, 每孔加100 μL (含6 000个细胞)。为避免边缘效应, 96孔板四周孔用PBS缓冲液填充, 随后将96孔板放入培养箱中培养至细胞完全贴壁。吸弃孔内旧培养基, 分别加入PEG-[irinotecan]$_3$和伊立替康溶液 (分别含伊立替康浓度为300 μmol·L^{-1}, 并依次倍半稀释至2.343 75 μmol·L^{-1})。同时设置两组对照, 空白对照组为不含任何细胞与药物的无血清培养基, 细胞对照组为含细胞但不含药物的无血清培养基, 每组设3个平行孔。加样后将96孔板放回培养箱, 进行孵育72 h。孵育结束后, 吸弃旧培养基, 每孔加入CCK-8工作液100 μL, 继续孵育15 min后使用酶标仪在450 nm波长下检测各孔的吸光度值并依据吸光度值计算细胞存活率。

培养时间对A549细胞摄入的影响 待A549细胞完全贴壁后, 取出培养皿, 吸弃孔内旧培养基, 用预热至37 ℃的PBS缓冲液轻柔洗涤细胞两次以去除残留培养基和细胞碎片。随后向培养皿中分别加入4 mL含PEG-[irinotecan]$_3$或伊立替康的无血清培养基, 将培养皿放回培养箱继续孵育, 分别于孵育2、8、12、24、36、48和60 h时取出样本, 每个孵育时间点设置3个平行培养皿, 以保证实验重复性。取出培养皿, 弃去含药培养基, 沿培养皿侧壁缓慢加入PBS缓冲液, 轻柔洗涤细胞5次, 以彻底去除表面残留药物和细胞碎片; 操作过程中避免吹打以防细胞脱落。弃尽PBS缓冲液后, 加入胰蛋白酶消化细胞; 待细胞消化完全后, 离心去除上清液, 所得细胞沉淀再用PBS缓冲液洗2次。将洗净的细胞沉淀收集至1.5 mL离心管中, 加入500 μL屈臣氏水后轻柔吹打细胞使细胞膜充分破碎。随后将细胞悬液置于超声仪中超声30 min, 再转移至低温超速离心机中4 ℃、13 000 r·min^{-1}离心10 min后收集上清液, 作为细胞样本用于后续的分析。

细胞样本提取 取50 μL细胞样本置于1.5 mL离心管中, 加入50 μL浓度为200 ng·mL^{-1}的内标工作液, 充分混匀后加入150 μL乙腈进行蛋白沉淀; 涡旋振荡40 s后, 于4 ℃、13 000 r·min^{-1}条件下离心10 min, 取上清液200 μL加入屈臣氏水200 μL, 混合均匀后涡旋瞬离取100 μL上清液转移至进样瓶中进样分析。

PEG-[irinotecan]$_3$和伊立替康的外排研究 待A549细胞完全贴壁后取出, 弃去旧培养基, 用PBS缓

冲液洗涤2次; 随后向培养皿中加入4 mL含有PEG-[irinotecan]$_3$或伊立替康的无血清培养基, 放入培养箱中继续孵育36 h。孵育36 h后, 弃去含药培养基, 用PBS缓冲液洗净残留药物和细胞碎片, 再加入4 mL不含药物的无血清培养基, 继续孵育并设置6个时间点(0、0.5、1、2、3和4 h)。每个时间点设置3个平行培养皿, 分别在对应时间点取出培养皿。收集细胞, 作为细胞外排胞内样本, 用于后续胞内药物排出情况分析; 吸出并留存培养基, 作为胞外样本, 用于后续分析胞外排出药物的情况分析。后续细胞样本的提取与分析步骤参考“细胞样本提取”方法进行。

PEG-[irinotecan]$_3$和伊立替康亚细胞器分布 待A549细胞完全贴壁后取出培养皿, 弃去旧培养基, 用PBS缓冲液洗涤2次。向培养皿中分别加入4 mL含PEG-[irinotecan]$_3$或伊立替康的无血清培养基, 放入培养箱中继续孵育, 设置4个时间点(12、24、36和48 h), 每个时间点设置3个平行培养皿。当细胞孵育至对应时间点后弃去含药培养基, 用PBS缓冲液轻柔洗涤细胞5次, 吸尽残留PBS缓冲液。加入胰蛋白酶消化细胞, 离心后去除上清液, 收集细胞沉淀, 采用细胞核和细胞质提取试剂盒进行组分提取。提取得到的细胞器组分置于−80 ℃冰箱保存备用。后续细胞样本的提取与分析步骤参考“细胞样本提取”方法进行。

统计学分析 实验结果采用GraphPad Prism软件进行统计分析。组间比较采用One-way ANOVA和Two-way ANOVA检验分析, $P < 0.05$为差异有统计学意义。

结果

1 PEG-[irinotecan]$_3$的质谱裂解规律解析

由于PEG20K存在分子量大、分布宽及电荷多分散性的特点, 本研究采用串联质谱技术, 重点考察基于解簇电压(declustering potential, DP)的源内诱导裂解行为。本研究通过维持较低且恒定的碰撞能(collision energy, CE), 调节DP变化以探究PEG-[irinotecan]$_3$在离子源内的裂解规律, 目标是筛选出响应强度高、特异性好的特征性离子碎片并完成结构归属, 明确其质谱裂解规律, 为后续的定性定量研究奠定基础。在此过程中, 通过逐步增大DP的源内诱导裂解方式, 发现了PEG-[irinotecan]$_3$的特征性碎片离子*m/z* 747.4 (图1)。

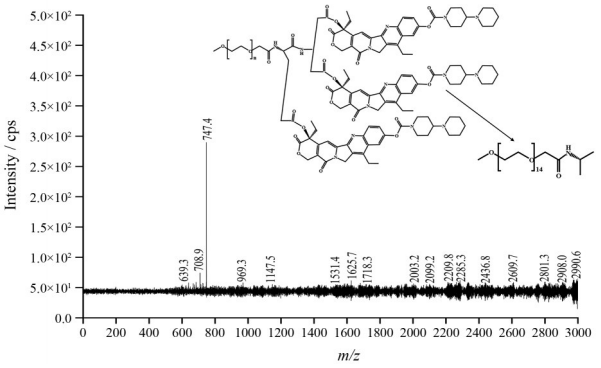


Figure 1 Characteristic fragment ions of PEG-[irinotecan]$_3$ at DP 100 V and CE 35 eV. DP: Declustering potential; CE: Collision energy

2 方法学验证

2.1 特异性 空白细胞样本、定量下限样本及孵育36 h的样本的色谱图见图2, 在该检测条件下, 待测物和内标在保留时间内无干扰, 且基质中的内源性组分不影响待测物及内标的测定, 表明所建立的分析方法具有良好特异性。

2.2 标准曲线和线性范围 PEG-[irinotecan]$_3$及其五种代谢产物: PEG-[irinotecan]$_2$、PEG-[irinotecan]、PEG20K、伊立替康和SN-38的线性回归方程分别是$y = 0.024\,940\,x + 0.039\,634$, $r > 0.998$; $y = 0.025\,546\,x + 0.089\,179$, $r > 0.991$; $y = 0.063\,477\,x + 0.016\,973$, $r > 0.995$; $y = 0.050\,345\,x + 0.013\,704$, $r > 0.991$; $y = 0.005\,614\,x + 0.008\,049$, $r > 0.994$; $y = 0.005\,880\,x + 0.011\,427$, $r > 0.993$。各待测组分的相关系数r均大于0.991, 且线性范围分别为: PEG-[irinotecan]$_3$ (1～50 μg·mL^{-1})、PEG-[irinotecan]$_2$ (0.5～50 μg·mL^{-1})、PEG-[irinotecan] (0.5～50 μg·mL^{-1})、PEG20K (0.5～50 μg·mL^{-1})、伊立替康(0.05～5 μg·mL^{-1})和SN-38 (0.001～0.15 μg·mL^{-1}), 表明该定量分析方法线性关系良好。

2.3 精密度与准确度 各待测物的定量下限、低、中、高浓度细胞样本的日内和日间RSD均小于15%, RE均在±15%以内, 表明方法精密度与准确度符合要求。

2.4 提取回收率和基质效应 各待测物的提取回收率为93.6%～113% (RSD < 15%); 基质效应为94.1%～106% (RSD < 15%)。表明提取回收率稳定, 且无明显基质效应。

2.5 稳定性 各待测物的低、高浓度质控样本的RSD均小于15%, RE均在±15%以内, 表明样本稳定性良好, 该分析方法稳定性符合要求。

3 细胞药动学研究

3.1 CCK-8细胞毒性实验考察 体外细胞毒性实验是药物研发与安全性评价的核心环节, 也是连接药物发现与临床应用的关键桥梁。对于PEG-[irinotecan]$_3$和伊立替康而言, 过高的细胞毒性会导致细胞死亡, 严重制约其治疗有效性与安全性, 因此本研究重点考察了二者对A549细胞的体外毒性。结果如图3所示: PEG-[irinotecan]$_3$组的细胞毒性要小于伊立替康组; 随着

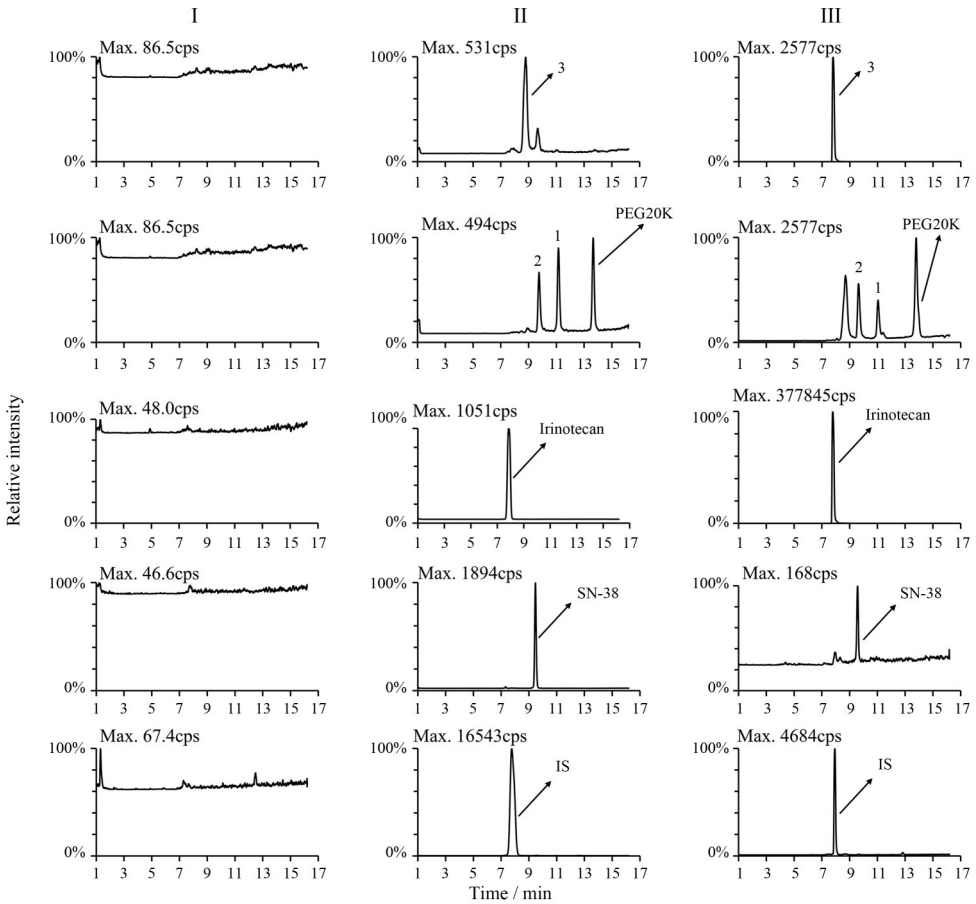


Figure 2 Representative chromatograms of PEG-[irinotecan] (1), PEG-[irinotecan]$_2$ (2), PEG-[irinotecan]$_3$ (3), PEG20K, irinotecan, SN-38 and IS in cell samples. I: Blank cell sample; II: Blank cell sample spiked with LLOQ; III: Cell sample at 36 hours after administration. IS: Internal standard; LLOQ: Lower limit of quantitation

PEG-[irinotecan]$_3$和伊立替康浓度的逐步升高, A549细胞存活率呈下降趋势, 细胞毒性增强, 表明二者对A549细胞的毒性作用具有明显的浓度依赖性, 即细胞毒性会随着药物浓度的增加而加剧。基于上述结果, 后续细胞摄取实验的浓度选择需同时满足两大核心需求: 一是保证细胞维持相对良好的活性状态, 二是能清晰观察并量化PEG-[irinotecan]$_3$和伊立替康的细胞摄取行为。

3.2 孵育时间对细胞摄取的影响 由于不同摄取时间下细胞摄取的表现可能存在差异, 为探究孵育时间对细胞摄取的影响, 本研究设置了一系列时间点去探究孵育时间与细胞摄取的关系, 以确定实现最高摄取效率的最佳孵育时间。如图4A所示, 在2 h时间点对细胞内PEG-[irinotecan]$_3$及其多形态组分含量进行定量分析, 结果显示细胞内同时存在PEG-[irinotecan]$_3$及其释放的伊立替康。键合型药物和释放材料的吸收曲线如图4B、C所示, PEG-[irinotecan]$_{x\,(x=1,2)}$和PEG20K的浓度在第一个时间点最低, 随后逐渐升高; PEG-[irinotecan]$_3$的浓度在36 h达到峰值后快速下降。释放药物和活性代谢产物的吸收曲线如图4D、E所示, PEG-[irinotecan]$_3$给药后形成的伊立替康和SN-38的药物浓度显著低于伊立替康给药组, 且SN-38还存在持续上升的趋势。

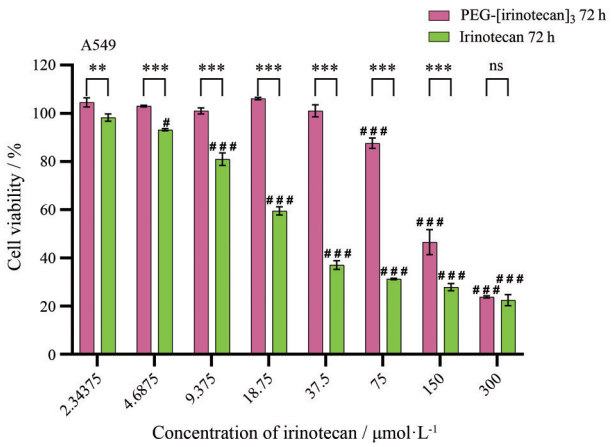


Figure 3 Cytotoxicity of A549 cells co-incubated with PEG-[irinotecan]$_3$ and irinotecan for 72 h. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$. $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#\#}P < 0.001$ *vs* group 2.343 75 μmol·L^{-1}. ns: Not significant

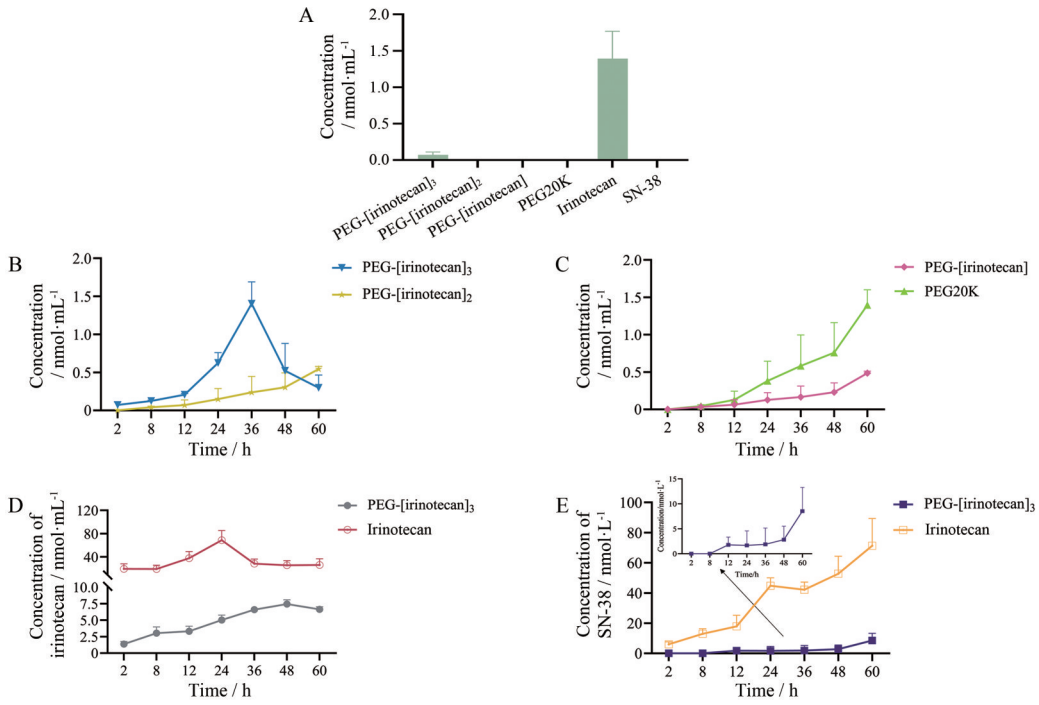


Figure 4　Content map of PEG-[irinotecan]$_3$ and its polymorphic components in cells at 2 h time point (A). Effect of incubation time on cellular uptake of PEG-[irinotecan]$_3$ and PEG-[irinotecan]$_2$ (B), PEG-[irinotecan] and PEG20K (C), irinotecan (D) and SN-38 (E). $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

3.3　细胞外排考察　药物在细胞内的累积与外排过程是决定药物疗效与安全性的关键因素。深入分析细胞外排规律, 有助于揭示药物在细胞内外的动态过程, 进而为设计更有效的药物递送系统提供科学支撑。本研究将A549细胞与PEG-[irinotecan]$_3$、伊立替康共孵育, 在摄取达峰时间点 (36 h) 时, 将含药培养基更换为不含药物的新鲜培养基, 以此作为细胞外排观察起始时间点, 持续考察A549细胞排出药物的动态过程。结果如图5所示, 胞内药物浓度呈持续下降趋势。键合型药物与释放材料的外排曲线如图5A、B所示, PEG-[irinotecan]$_{x\,(x=1,2,3)}$和PEG20K的浓度整体呈下降趋势。如图5C、D所示, 伊立替康给药后形成的伊立替康和SN-38在0～0.5 h内药物浓度下降较缓慢, 0.5～1 h期间下降速度明显加快, 3 h后, 下降趋势逐渐平缓。图5E、F为细胞外伊立替康和SN-38浓度变化情况, 二者药物浓度总体呈上升趋势, 且在0.5～1 h内上升较快, 这与胞内伊立替康和SN-38在同一时间段快速下降的情况相呼应。

3.4　亚细胞器分布　深入了解PEG-[irinotecan]$_3$与伊立替康在细胞内亚细胞水平的分布及其随时间的变化规律对精准阐释其作用规律、优化治疗方案以及评估潜在的毒副作用具有至关重要的意义。为全面探究二者在A549细胞的细胞质、细胞核等亚细胞结构中的动态变化趋势, 本研究在亚细胞层面精准测定了两种药物在不同亚细胞结构内的分布特征。PEG-[irinotecan]$_3$的细胞质分布结果如图6A、B所示, 36 h时PEG-[irinotecan]$_3$在细胞质内浓度最高, PEG-[irinotecan]$_{x\,(x=1,2)}$和PEG20K在细胞质内浓度呈平缓或上升趋势; 图6C、D显示, PEG-[irinotecan]$_3$组细胞质中的伊立替康和SN-38含量低于伊立替康组。细胞核分布结果如图6E、F所示: PEG-[irinotecan]$_3$组的伊立替康和SN-38含量同样低于伊立替康组。

讨论

本研究成功建立并验证了基于IS-CID技术的HPLC-MS/MS方法, 实现了对PEG-[irinotecan]$_3$偶联物在细胞内多形态组分 (包括键合型药物、释放材料PEG20K、游离型药物伊立替康及其活性代谢物SN-38) 的同时, 精准定量分析, 突破了传统方法仅能检测总药物浓度的局限[14]。

细胞摄取研究证实PEG-[irinotecan]$_3$可被A549细胞有效摄取并实现细胞内动态释药。2 h时间点在细胞内存在PEG-[irinotecan]$_3$及其释放的伊立替康, 这一现象提示细胞内存在更丰富的水解酶 (如溶酶体中的酸性水解酶), PEG[irinotecan]$_3$的结构可能是通过直接断裂所有PEG-药物连接键, 一次性释放游离伊立替康; 也可能偶有微量PEG-[irinotecan]$_2$/PEG-[irinotecan]生成, 其在细胞内的降解速度远快于PEG-[irinotecan]$_3$,

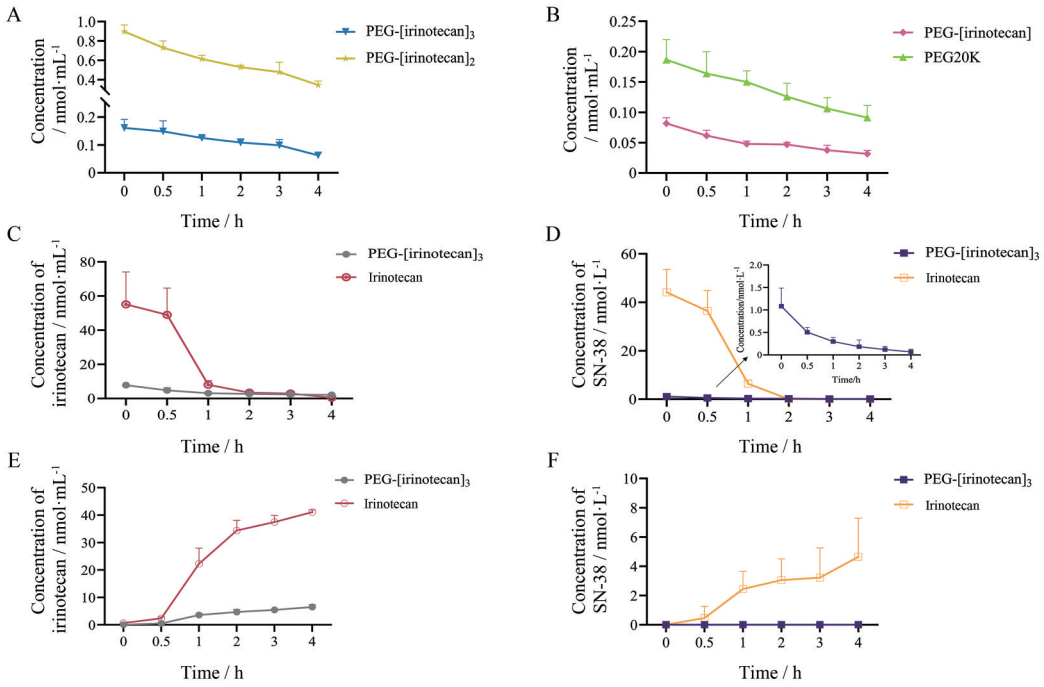


Figure 5 The efflux of PEG-[irinotecan]$_3$ and PEG-[irinotecan]$_2$ (A), PEG-[irinotecan] and PEG20K (B), irinotecan (C), and SN-38 by cells (intracellular) (D). The efflux of irinotecan (E) and SN-38 by cells (extracellular) (F). $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

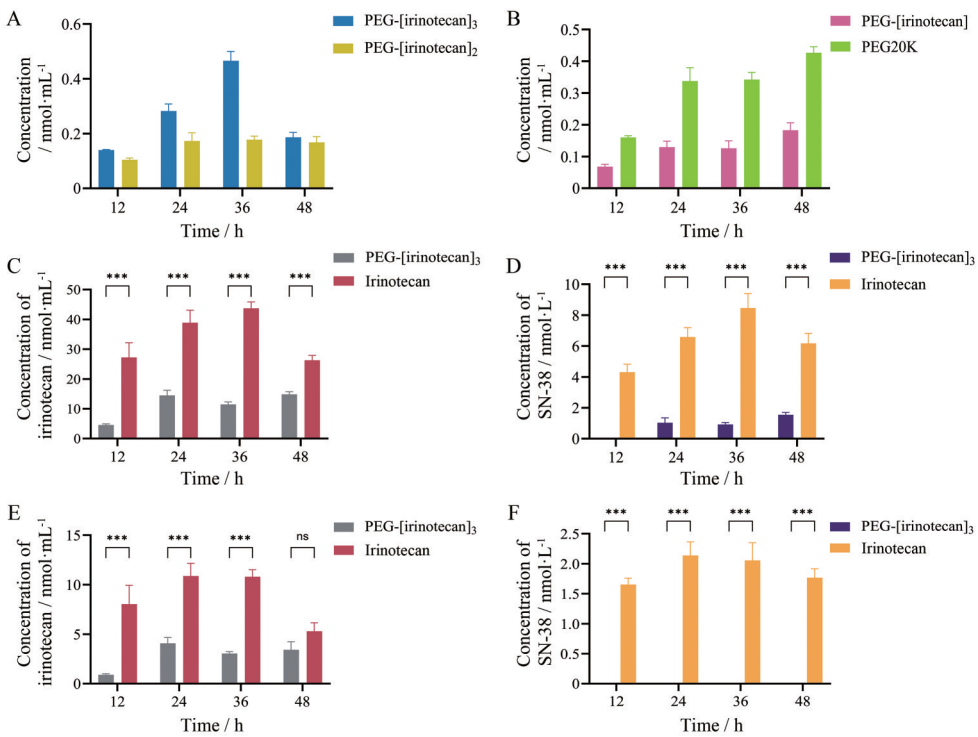


Figure 6 Distribution of PEG-[irinotecan]$_3$ in the cytoplasm: PEG-[irinotecan]$_3$ and PEG-[irinotecan]$_2$ (A); PEG-[irinotecan] and PEG20K (B). Distribution of PEG-[irinotecan]$_3$ and irinotecan in the cytoplasm: irinotecan (C); SN-38 (D). Distribution of PEG-[irinotecan]$_3$ and irinotecan in the nucleus: irinotecan (E); SN-38 (F). $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{***}P < 0.001$; ns: Not significant

瞬间转化为游离药, 无法积累到本文的定量下限。此外, 给药后活性代谢产物 SN-38 持续上升, 提示 PEG-[irinotecan]$_3$ 实现了药物缓慢持续释放并维持稳定的细胞内活性药物浓度, 这可能是其增强抗肿瘤活性的重要机制。外排研究显示键合型药物和释放材料的外排速率缓慢, 大分子组分可能因分子量大、空间构象限制

等因素不易被ABC转运体识别和外排而倾向胞内滞留[20], 提高药物有效蓄积, 为克服多药耐药提供了新策略[21]。亚细胞分布研究显示键合型药物及载体难以进入细胞核, 这与文献[22-25]报道一致, 键合型药物与载体尺寸远超核孔复合体的有效通道直径, 且缺乏核定位信号、药物与载体间的稳定键合使其难以解离, 这些因素共同导致键合型药物与载体无法穿越核膜。值得注意的是, PEG-[irinotecan]$_3$具有缓释特性, 需更长时间才可以体现完整的释药过程, 在考察亚细胞分布时, 键合型药物浓度仍呈现增长趋势, 尚未完全解离为游离药物和活性代谢产物。文献[26]报道, SN-38可在释放后进入细胞核, 并通过与核内拓扑异构酶I抑制剂形成稳定的“可切割复合物”才能发挥抗肿瘤作用。由于PEG-[irinotecan]$_3$的缓释特性, 当前观察时间点可能尚未充分释放出足量的SN-38以实现有效的核内蓄积。因此, 后续研究需通过延长时间梯度进一步考察SN-38的细胞核内分布动态变化, 并探讨其核内浓度与抗肿瘤活性的时效关系, 以全面评估该前药系统的作用机制。

综上, 本研究从细胞药动学层面系统阐明了PEG-[irinotecan]$_3$的胞内动态命运、释药规律与亚细胞分布特征, 所获数据为理性设计聚合物-药物递送系统提供了重要的动力学依据, 也为该类制剂的优化设计与临床前评价提供更全面的科学依据。

作者贡献: 邹雨晴负责实验操作、数据整理、论文撰写和论文修改; 刘可欣负责相关实验操作和论文修改; 赵佳旺和张卓凡负责资料收集; 宋诗文负责本文的选题设计、研究指导、经费支持和论文修改。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突。

References

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71: 209-249.

[2] Zafar A, Khatoon S, Khan MJ, et al. Advancements and limitations in traditional anti-cancer therapies: a comprehensive review of surgery, chemotherapy, radiation therapy, and hormonal therapy [J]. Discov Oncol, 2025, 16: 607.

[3] Lee EM, Jiménez-Fonseca P, Galán-Moral R, et al. Toxicities and quality of life during cancer treatment in advanced solid tumors [J]. Curr Oncol, 2023, 30: 9205-9216.

[4] Rieth J, Monga V, Milhem M. The decline and fall of the current chemotherapy paradigm in soft tissue sarcoma [J]. Cancers (Basel), 2025, 17: 1203.

[5] Junyaprasert VB, Thummarati P. Innovative design of targeted nanoparticles: polymer-drug conjugates for enhanced cancer therapy [J]. Pharmaceutics, 2023, 15: 2216.

[6] Zhao WJ, Sun KC, Yan JQ, et al. Therapeutic and responsive release mechanisms of polymer drug conjugates with diverse polymer skeletons [J]. Nano Today, 2024, 59: 102526.

[7] Larson N, Ghandehari H. Polymeric conjugates for drug delivery [J]. Chem Mater, 2012, 24: 840-853.

[8] Xiao X, Chen JY, Li CX, et al. Clinical application and pharmacokinetic study of nanocarriers in drug delivery system [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2023, 58: 856-866.

[9] Javia A, Vanza J, Bardoliwala D, et al. Polymer-drug conjugates: design principles, emerging synthetic strategies and clinical overview [J]. Int J Pharm, 2022, 623: 121863.

[10] Wang Y, Xia H, Chen B, et al. Rethinking nanoparticulate polymer-drug conjugates for cancer theranostics [J]. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 2023, 15: e1828.

[11] Cui YQ, Lei FB, Zhang LX, et al. Advances in bioanalysis methods and pharmacokinetics of polymer nanopharmaceuticals [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2023, 58: 844-851.

[12] Zhou F, Zhang JW, Li P, et al. Toward a new age of cellular pharmacokinetics in drug discovery [J]. Drug Metab Rev, 2011, 43: 335-345.

[13] Song SW, Sun D, Wang H, et al. Full-profile pharmacokinetics, anticancer activity and toxicity of an extended release trivalent pegylated irinotecan prodrug [J]. Acta Pharm Sin B, 2023, 13: 3444-3453.

[14] Rodell CB, Baldwin P, Fernandez B, et al. Quantification of cellular drug biodistribution addresses challenges in evaluating *in vitro* and *in vivo* encapsulated drug delivery [J]. Adv Ther (Weinh), 2021, 4: 2000125.

[15] Liu N, Tang M. Toxic effects and involved molecular pathways of nanoparticles on cells and subcellular organelles [J]. J Appl Toxicol, 2020, 40: 16-36.

[16] Nag OK, Delehanty JB. Active cellular and subcellular targeting of nanoparticles for drug delivery [J]. Pharmaceutics, 2019, 11: 543.

[17] Shi YY, Luo ZY, You J. Subcellular delivery of lipid nanoparticles to endoplasmic reticulum and mitochondria [J]. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 2022, 14: e1803.

[18] Hyldbakk A, Hansen T, Hak S, et al. Polyethylene glycol (PEG) as a broad applicability marker for LC-MS/MS-based biodistribution analysis of nanomedicines [J]. J Control Release, 2024, 366: 611-620.

[19] Parcher JF, Wang M, Chittiboyina AG, et al. In-source collision-induced dissociation (IS-CID): applications, issues and structure elucidation with single-stage mass analyzers [J]. Drug Test Anal, 2018, 10: 28-36.

[20] Robey RW, Pluchino KM, Hall MD, et al. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2018, 18: 452-464.

[21] Park S, Lu GL, Zheng YC, et al. Nanoparticle-based delivery

strategies for combating drug resistance in cancer therapeutics [J]. Cancers (Basel), 2025, 17: 2628.

[22] Nie Y, Fu G, Leng Y. Nuclear delivery of nanoparticle-based drug delivery systems by nuclear localization signals [J]. Cells, 2023, 12: 1637.

[23] Xu Z, Xie Y, Chen W, et al. Nanocarrier-based systems for targeted delivery: current challenges and future directions [J]. MedComm (2020), 2025, 6: e70337.

[24] Klughammer N, Barth A, Dekker M, et al. Diameter dependence of transport through nuclear pore complex mimics studied using optical nanopores [J]. Elife, 2024, 12: RP87174.

[25] Goyal P, Malviya R. Advances in nuclei targeted delivery of nanoparticles for the management of cancer [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2023, 1878: 188881.

[26] Pommier Y. DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition [J]. Chem Rev, 2009, 109: 2894-2902.