

载精氨酸和葡萄糖氧化酶的聚乳酸纳米粒子制备与体外评价

杨美洋^{1,2}, 陈伟军¹, 邱立朋^{1*}, 陈敬华^{1*}

(1. 江南大学生命科学与健康工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 过氧化氢 (hydrogen peroxide, H₂O₂) 和一氧化氮 (nitric oxide, NO) 由于其在生理环境中的半衰期短、生物利用度低、肿瘤靶向性差和全身不良反应限制了它们的应用。本研究采用超声乳化-纳米沉淀法合成了载有 L-精氨酸 (L-arginine, L-Arg) 和葡萄糖氧化酶 (glucose oxidase, GOx) 的双十烷基二甲基溴化铵 (didecyl dimethyl ammonium bromide, DDAB)/聚乳酸 (polylactic acid, PLA) 纳米粒子 (GADP), 并考察了体外抗肿瘤活性。通过静电吸附作用使其表面吸附 GOx, 对纳米粒子的粒径、电位、包埋率、产生 H₂O₂/NO 的能力等性能进行考察, 同时采用人肝癌细胞 (HepG2) 进行体外抗肿瘤效果评价。结果显示, 制备的 L-Arg-DDAB/PLA (ADP) 纳米粒子为粒径 225.7 ± 6.33 nm 的球形粒子, 电位为 +23.5 ± 0.12 mV, GOx 的吸附率为 87.23% ± 0.02%, L-Arg 的载药量为 15.6% ± 0.22%。通过测定葡萄糖溶液 pH 值的变化和 H₂O₂ 的量表明, GADP 具有良好的催化活性。体外细胞实验表明, 空白纳米粒子 DDAB/PLA 对细胞毒性较小, 载药纳米粒子 GADP 对肿瘤细胞具有较强的杀伤作用, 并能抑制肿瘤细胞迁移。低剂量的纳米级 NO 递送系统 GADP 能够有效地抑制肿瘤细胞的迁移, 杀伤肿瘤细胞, 从而产生治疗益处。

关键词: L-精氨酸; 葡萄糖氧化酶; 聚乳酸; 过氧化氢; 一氧化氮

中图分类号: R944

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2024)01-0225-07

Preparation and *in vitro* evaluation of polylactic acid nanoparticles containing arginine and glucose oxidase

YANG Mei-yang^{1,2}, CHEN Wei-jun¹, QIU Li-peng^{1*}, CHEN Jing-hua^{1*}

(1. School of Life Science and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Hydrogen peroxide (H₂O₂) and nitric oxide (NO) has a short half-life, low bioavailability, poor tumor targeting and systemic adverse reactions in the physiological environment. In this study, phacoemulsification and nano-precipitation were used to synthesize didecyl dimethyl ammonium bromide (DDAB)/polylactic acid nanoparticles (PLA), then L-arginine (L-Arg) and glucose oxidase (GOx)-loaded nanoparticles (GADP) were prepared, and the *in vitro* antitumor activity was investigated. The particle size, potential, embedding rate and the ability to produce H₂O₂/NO of the nanoparticles were investigated. Meanwhile, *in vitro* cell cytotoxicity against human hepatoma cells (HepG2) was evaluated. The results showed that the prepared L-Arg-DDAB/PLA (ADP) nanoparticles were spherical particles. And the particle size and zeta potential were (225.7 ± 6.33) nm and (+23.5 ± 0.12) mV, respectively. The adsorption rate of GOx was 87.23% ± 0.02%. The drug loading of L-Arg was 15.6% ± 0.22%. The pH value of glucose solution and the amount of H₂O₂ showed that GADP had good catalytic activity. *In vitro* cytotoxicity experiments showed that blank nanoparticles were nontoxic, while the drug-loaded nanoparticles presented enhanced antitumor effect on HepG2 cells. And can inhibit tumor cell migration. The low dose nano-

收稿日期: 2023-03-12; 修回日期: 2023-06-30.

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2021YFC2103100).

*通讯作者 Tel: 86-510-85329042, E-mail: qiulp@jiangnan.edu.cn;

Tel: 86-510-85911900, E-mail: chenjinghua@jiangnan.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0293

scale NO delivery system GADP can effectively inhibit the migration of tumor cells and kill tumor cells, thus producing therapeutic benefits.

Key words: *L*-arginine; glucose oxidase; polylactic acid; hydrogen peroxide; nitric oxide

自1998年以来, NO作为一种多功能信号分子, 在神经活动、心血管稳态、免疫反应等一系列生物化学和生理过程中起着关键的调节作用^[1-3]。近年来大量科学研究表明, NO不仅能增强化疗、放疗或光疗的疗效, 而且当浓度高于 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 还能通过破坏线粒体和DNA直接诱导肿瘤细胞凋亡, 已成为一种治疗癌症的有效制剂^[4-6]。因此不同NO供体和NO递送载体成为了研究的热点。然而, 大部分NO供体(有机硝酸盐/亚硝酸盐和S-亚硝基硫醇和无机金属亚硝基化合物)在生理环境中的半衰期短、生物利用度低、肿瘤靶向性差和全身不良反应限制了它们在体内的应用^[7,8]。幸运的是, *L*-精氨酸 (*L*-arginine, *L*-Arg) 作为人体内的一种必需氨基酸, 在NO合成酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 或活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的作用下, 能持续生成NO, 成为NO的天然前体, 在癌症治疗中具有很大的应用前景^[9-11]。尽管这种疗法具有治疗癌症的潜力, 但开发一种具有临床应用价值的基于药理学的癌症疗法仍然是一个重大挑战。据报道, 实体瘤内部 H_2O_2 含量远远高于正常组织 (低于 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 这就为将 *L*-Arg 氧化为具有抗癌作用的NO提供了原料基础^[12]。但是实体瘤内部的 H_2O_2 仍是有限的, 不能为 *L*-Arg 提供充足的氧化剂, 强化NO气体治疗。

癌症饥饿疗法以通过血管栓塞阻断营养供应来抑制肿瘤生长而闻名。与正常组织相比, 恶性肿瘤需要摄取更高的葡萄糖来维持肿瘤的快速增殖, 本研究通过葡萄糖代谢反应消耗肿瘤内的葡萄糖, 在葡萄糖氧化酶 (glucose oxidase, GOx) 的催化下, 葡萄糖被分解成 H_2O_2 和葡萄糖醛酸, 造成肿瘤细胞营养不足, 产生“饥饿”效应。因此GOx在肿瘤部位的聚集增加了内源性 H_2O_2 的含量, 不仅直接杀伤肿瘤, 而且“饥饿”效应抑制肿瘤细胞的快速增殖^[11,13,14]。高浓度 H_2O_2 引发癌细胞死亡的主要原因是 H_2O_2 作为一种非极性分子, 可通过细胞膜扩散并进入不同的细胞器, 抑制肿瘤细胞的生长及肿瘤细胞的其他恶性特征。因此, H_2O_2 的高效生成可对肿瘤细胞产生氧化损伤, 产生明显的抗肿瘤作用。此外, H_2O_2 作为一种活性氧, 浓度的升高有助于加速将 *L*-Arg 氧化为NO, 抑制肿瘤转移^[9], 增强NO气体治疗的疗效。

聚乳酸 (polylactic acid, PLA) 及其共聚物是无毒的

可生物降解高分子材料, 被FDA批准用于药物载体材料, 对生物医学的发展具有重要意义, 可经主动和被动控制, 进入预定靶器官或组织, 缓慢释放药物, 降低其不良反应, 并提高其生物利用度, 而PLA最终被完全降解为二氧化碳和水, 在体内无积聚问题^[14-16]。为实现癌症饥饿疗法和气体治疗的协同作用, 本研究采用生物相容性的PLA作为药物载体, 加入表面活性剂DDAB, 成功合成表面带正电荷包埋 *L*-Arg 的纳米载体, 利用静电引力表面吸附GOx, 并对其性质进行考察。

材料与方法

试剂与药品 *L*-Arg (批号: H2113189) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; GOx (批号: A21GS158514) 购自上海源叶生物科技有限公司; 聚乙烯醇 (PVA, 批号: L1409024)、二氯甲烷 (批号: 20190829) 均购自国药集团化学试剂有限公司; PLA ($M_w \approx 10$ 万) 购自山东岱罡生物工程有限公司; 胰酶 (批号: 304W021) 和双十烷基二甲基溴化铵 (DDAB, 批号: 0000099147) 购自美国Sigma-Aldrich (AR) 公司; BCA试剂盒 (批号: 027E1212LA) 购自上海诺唯赞生物科技股份有限公司; H_2O_2 检测试剂盒 (批号: FC04DA0004)、活性氧检测试剂盒 (批号: 060722220818)、一氧化氮检测试剂盒 (批号: 022421210906)、DAPI染色液 (批号: 032519190515) 和SDS-PAGE凝胶配制试剂盒 (批号: 031721210409) 均购自上海碧云天生物技术有限公司; 细胞活力染色试剂盒 (批号: C8225990) 购自上海翌圣生物技术有限公司; 噻唑蓝 (methyl thiazolyltetrazolium, MTT, 批号: C10769614) 购自上海生工生物工程有限公司; 新生牛血清 (批号: 20271129) 购自浙江天杭生物科技股份有限公司; 细胞培养基 (DMEM, 批号: 8122774) 购自美国Gibco Invitrogen公司; 其他试剂均为市售分析纯。

仪器 Zetasizer Nano ZS纳米粒度仪和MULTISKAN GO酶标仪 (英国Malvern公司); JY92 IIN超声波细胞粉碎机 (宁波新芝生物科技股份有限公司); UV 1800紫外可见分光光度计 (日本Shimadzu公司); Ti2-E+A1激光共聚焦显微镜 (日本尼康公司); SU8100 (Regulus8100) 场发射扫描电子显微镜 (日本株式会社日立高新技术); Cytoflex A00-1-1102流式细胞仪 [贝克曼库尔特生物科技 (苏州) 有限公司]。

细胞培养 人肝癌细胞HepG2 (中国科学院典型

培养物保藏委员会细胞库)在含有10%新生牛血清和双抗青霉素/链霉素的DMEM培养基中培养,置于含5% CO₂、37 °C的孵箱中培养。

L-Arg-DDAB/PLA (ADP) 的合成方法 采用超声乳化-纳米沉淀法制备ADP纳米粒子。称取PLA 100 mg和DDAB 30 mg溶于10 mL二氯甲烷中,形成有机相,取100 mg·mL⁻¹的精氨酸溶液1 mL加入到有机相中,超声10 min形成初乳液,将初乳液加入到30 mL含有2% PVA的水溶液中,再次超声乳化20 min,得到复乳液,置于磁力搅拌器上过夜固化,挥发有机溶剂。13 000 r·min⁻¹离心20 min,弃去上清,用超纯水洗3次,得到ADP纳米粒子悬液,置于4 °C保存备用。

GOx吸附 取一定量的GOx和ADP,将两者按质量比为1:2混合,4 °C下垂直混合吸附3~5 h,13 000 r·min⁻¹离心10 min,得到的沉淀即为GADP。通过SDS-PAGE确定GOx负载到ADP表面。

粒径、Zeta电位的测定及表面形貌观察 将ADP和GADP纳米粒子混悬液用少量去离子水稀释成半透明状,取1 mL稀释好的混悬液加入至石英杯和电位杯中,置于动态光散射粒度仪的样品池中测定粒径和电位。采用扫描电子显微镜观察纳米粒子的表面形貌,吸取稀释后纳米粒子混悬液滴加到平整干净的锡箔纸上,室温下晾干,剪刀剪取锡箔纸,贴于样品台上,将样品台置于离子溅射仪上喷金(30 mV, 120 s)后,观察纳米粒子表面形貌。

L-Arg载药量和GOx吸附率的测定 用坂口试剂(α -萘酚和2,3-丁二酮)定量法测定L-Arg的含量。具体操作如下:取10 mg ADP纳米粒子,将其悬浮于1 mL氢氧化钠溶液(0.5 mol·L⁻¹)中,在4 °C下垂直混合过夜,使纳米粒子充分降解,离心(13 000 g, 10 min),取上清液30 μ L,分别加入1 mL 2,3-丁二酮(0.5 μ g·mL⁻¹)和1 mL α -萘酚(80 mg·mL⁻¹),置于40 °C水浴中40 min后用紫外可见分光光度计测定其在525 nm的吸光度,结合L-Arg已知的标准曲线,计算上清液中L-Arg的浓度,进而计算纳米粒子所包埋L-Arg含量。载药量(%)=(投入的L-Arg总质量-上清液中L-Arg质量)/纳米粒子的总质量 \times 100%。

取过夜吸附后GADP纳米粒子的上清液,采用MicroBCA法测定上清液中GOx浓度,减量法计算得到纳米粒子对GOx的吸附率。吸附率(%)=(投入GOx量-吸附后上清液中GOx量)/投入GOx量 \times 100%。

GOx催化活性测定 GOx分解葡萄糖后产生葡萄糖醛酸和H₂O₂,因此通过测定葡萄糖溶液pH值的变化及H₂O₂的量考察GOx的催化活性。将1 mL含有GOx 0.3 mg·mL⁻¹的GOx和GADP混悬液分别加入到

10 mL 0.1 mg·mL⁻¹的葡萄糖溶液中,混合后在37 °C下搅拌12 h。用pH计检测不同时间点的pH值。

将1 mL含有GOx 0.3 mg·mL⁻¹的GADP混悬液加入不同浓度(0.02、0.04、0.06、0.08和0.1 mg·mL⁻¹)的葡萄糖溶液,37 °C条件下搅拌15 min,根据说明书,按H₂O₂定量分析试剂盒要求在570 nm处用酶标仪检测其吸光度,并计算H₂O₂的产率。

MTT检测细胞抑制增殖 取处于对数期的HepG2细胞,胰酶消化后计数,将细胞以每孔8 000个细胞的密度铺于96孔板中。置于37 °C、5% CO₂细胞培养箱培养过夜。弃去孔板中培养液,加入100 μ L含系列浓度的空白载体、游离GOx和载药纳米粒子完全培养液,培养24 h,吸出培养基加入MTT避光孵育4 h,加入100 μ L二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),通过酶标仪测定570 nm处的吸光值计算出细胞存活率。

细胞活力检测 在每个共聚焦皿中接种1 \times 10⁵个HepG2细胞。待细胞贴壁后,分别向共聚焦皿中加入含GOx、ADP和GADP的完全培养基。继续孵育24 h,丢弃培养基, PBS洗涤,用钙黄素乙酰氧基甲基(calcein-AM)和碘化丙啶(PI)共同染色20 min,在激光共聚焦显微镜下观察活细胞与死细胞并拍照。

细胞摄取考察 采用流式细胞术定量考察HepG2细胞对制剂的摄取情况。在6孔板中接种HepG2细胞(每孔接种3 \times 10⁵个细胞)。待细胞贴壁后,加入含GADP的完全培养基,共孵育2、6、12 h后,收集细胞,用流式细胞仪分析细胞对制剂的摄取情况。在每个共聚焦皿中接种1 \times 10⁵个HepG2细胞,过夜培养后,加入含GADP的完全培养基,共孵育2、6、12 h后,用PBS洗涤后,4%多聚甲醛固定细胞15 min,加入DAPI染色30 min, PBS洗涤两遍,最后加入200 μ L PBS溶液,用激光共聚焦显微镜观察细胞的摄取情况。

细胞内ROS考察 将HepG2细胞接种在共聚焦皿中(每个共聚焦皿含有1 \times 10⁵个细胞),在37 °C、5% CO₂的条件下培养24 h,弃去培养基,加入1 mL含游离的GOx或GADP纳米粒子的完全培养基共孵育4 h。按活性氧检测试剂盒说明书,加入含2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) (10 μ mol·L⁻¹)的培养基继续孵育30 min, PBS洗两遍,4%多聚甲醛固定后,加入200 μ L DAPI对细胞核染色30 min。最后加入200 μ L PBS用激光共聚焦显微镜观察。

细胞内NO产生能力 取对数期的HepG2细胞经消化离心后,以每孔2 \times 10⁵个细胞均匀地加入12孔板中,并放入培养箱中过夜培养使细胞贴壁,加入1 mL含游离的L-Arg、L-Arg+H₂O₂或GADP纳米粒子的完全培养基共孵育12 h。按一氧化氮检测试剂盒说明书

测定细胞内中NO浓度。

抗细胞迁移作用 取对数期的HepG2细胞经消化离心后,以每孔 4×10^5 个细胞接种于12孔板中,放入培养箱中培养,当细胞汇合率达100%时,用200 μ L移液器枪头划过预先标记好的线,制造划痕伤口。并用PBS洗涤以除去漂浮的细胞。加入1 mL空白完全培养基、含游离的L-Arg、L-Arg+H₂O₂和GADP纳米粒子的完全培养基,分别于0、12和24 h用光学显微镜拍照,观察细胞迁移情况。

统计学方法 所有分析均使用GraphPad Prism 8.0软件,方法为Student's test或ANVOA。数据表示为平均值 \pm 标准误差。

结果与讨论

1 ADP纳米粒子的合成与表征

采用超声乳化-纳米沉淀法制备ADP纳米粒子,分别利用动态光散射法和扫描电子显微镜对纳米粒子的粒径、电位和形态进行考察。结果显示,ADP和GADP纳米粒子的粒径都较为均一,成正态分布,分布范围窄(图1A、B),ADP粒径和电位分别是 (225.7 ± 6.33) nm(图1A)和 $(+23.5 \pm 0.12)$ mV(图1C),利用坂口试剂检测L-Arg的载药量,通过紫外可见分光光度计观察到L-Arg在525 nm处有明显的吸光度,GADP纳米粒子能产生同样的反应(图2),根据标准曲线计算出L-Arg的载药量为 $15.6\% \pm 0.22\%$ 。为了证明GADP的成功制备,从图1C可以看出GOx吸附到ADP纳米粒子表面的电位变为 (-9.89 ± 1.06) mV,GADP纳米粒子的粒径为 283.9 ± 11.01 nm。另外,如图3A所示通过SDS-PAGE观察到GOx有明显的条带,GADP在相同的位置也能观察到同样的条带,但未负载GOx的ADP纳米粒子未出现条带,说明GOx成功负载到ADP纳米粒子上,同时利用BCA试剂盒检测离心后上清液中的GOx量,经计算得出GADP中GOx的吸附率为 $87.23\% \pm 0.02\%$ 。

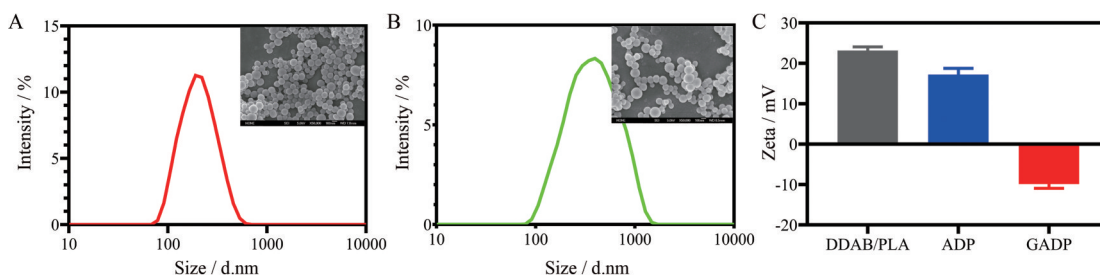


Figure 1 Characterization of didecyl dimethyl ammonium bromide/polylactic acid (DDAB/PLA), L-arginine (L-Arg)-didecyl dimethyl ammonium bromide/polylactic acid (ADP) and glucose oxidase@L-arginine-didecyl dimethyl ammonium bromide/polylactic acid (GADP) nanoparticle. A: Scanning electron microscope images and size of ADP nanoparticle; B: Scanning electron microscope images and size of GADP nanoparticle; C: The potential of DDAB/PLA, ADP and GADP nanoparticle

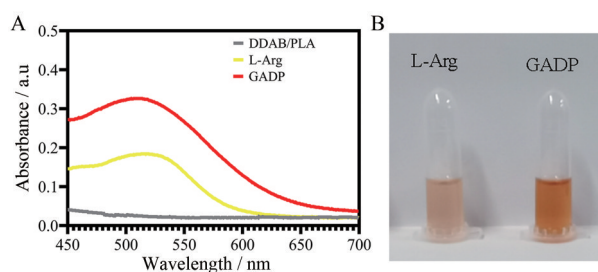


Figure 2 Ultraviolet-visible spectrum (UV-Vis) characterization of GADP nanoparticle. A: UV-Vis absorption spectrum of DDAB/PLA, L-Arg, GADP; B: Reaction picture of Sakaguchi reagent

2 GOx的催化活性

为了确保GOx负载到ADP纳米粒子后仍具有生物活性,能发挥抗肿瘤的作用,本实验利用GOx分解葡萄糖后产生葡萄糖醛酸和H₂O₂,能够引起溶液pH值变化,因此可以通过测定溶液的pH值和H₂O₂的产量考察GOx的催化活性。如图3B所示,游离的GOx在2 h时即可使葡萄糖溶液的pH值下降至3.6左右,而GADP在10 h后可使溶液pH值下降至3.6左右,这说明GADP仍然保留了GOx的催化活性,但由于GOx通过静电引力被负载到纳米粒子表面,在葡萄糖溶液中存在一个缓慢解吸释放的过程,因此溶液的pH变化更缓慢。从图3C中可以看出GOx和GADP的催化不同浓度的葡萄糖溶液最终产生的H₂O₂的量无显著区别。

3 肿瘤细胞生长抑制试验

采用MTT测定了ADP纳米粒子对HepG2细胞毒性,结果如图4A所示,随着载体浓度的增加,细胞存活率略有降低,当加入细胞的ADP纳米粒子浓度为 $150 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,纳米粒子对细胞的生长和存活几乎没有影响,细胞的增殖率约为85%,表明ADP纳米粒子没有显著的细胞毒性。随后对GADP纳米粒子的细胞生长抑制作用进行了评价(图4B),结果显示,随着GOx浓度的增加,肿瘤细胞存活率明显下降,表明游

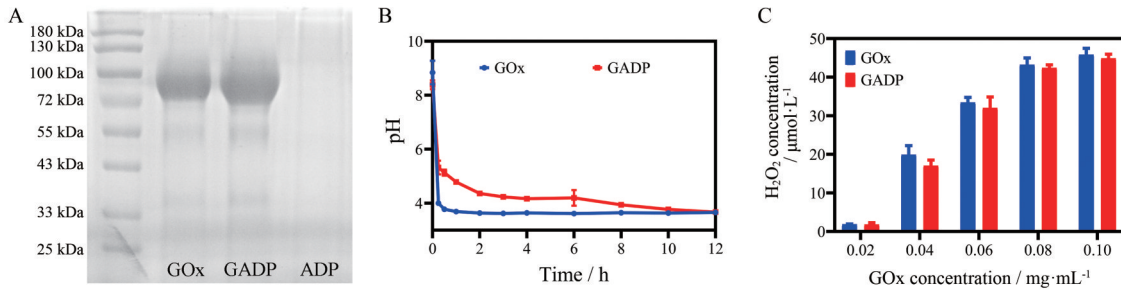


Figure 3 Activity of glucose oxidase (GOx). A: Electrophoretogram of different nanoparticles; B: pH curve of glucose solutions incubated with GOx or GADP during 12 h; C: The relationship between hydrogen peroxide (H_2O_2) concentration and glucose concentration treated with GOx and GADP. $n = 4, \bar{x} \pm s$

离 GOx 和 GADP 对细胞的生长抑制均呈现出浓度依赖性。游离 GOx 和 GADP 的 IC_{50} 值分别为 87.94 和 84.79 $ng \cdot mL^{-1}$, 说明游离 GOx 和 GADP 纳米粒子均能进入细胞发挥作用。通过激光共聚焦显微镜观察细胞的活力进一步验证了上述结果 (图 4C)。

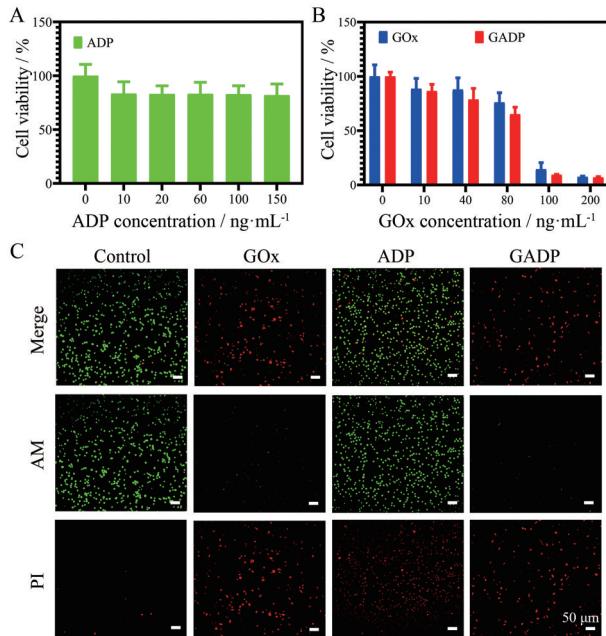


Figure 4 Cytotoxicity of different concentration of ADP and GO_x in HepG2 cells. A: Cytotoxicity of prepared nanoparticles by the methyl thiazolyltetrazolium (MTT) assay; B: Cytotoxicity of HepG2 cells treated with different nanoparticles and various GO_x concentrations; C: Live/Dead fluorescent images of HepG2 cells treated with different nanoparticles. Green fluorescence (calcein-AM) represents living cells and red fluorescence (PI) represents dead cells. Scale bar: 50 μm . $n = 4, \bar{x} \pm s$

4 细胞摄取

为了评价肿瘤细胞对纳米粒子的摄取能力, 本部分实验用香豆素标记的 GADP 纳米粒子, 通过流式细胞术检测纳米粒子与 HepG2 细胞共孵育 2、6 和 12 h 后绿色荧光强度, 分析了给药系统的细胞摄取。结果如

图 5A 所示, 细胞对纳米粒子的摄取存在时间依赖性, 给药 12 h 时细胞内的荧光强度显著增加, 因此纳米粒子能够被细胞摄取产生抗肿瘤作用。采用激光共聚焦显微镜进一步观察纳米粒子在细胞中的内化情况 (图 5B), 与流式结果相一致。

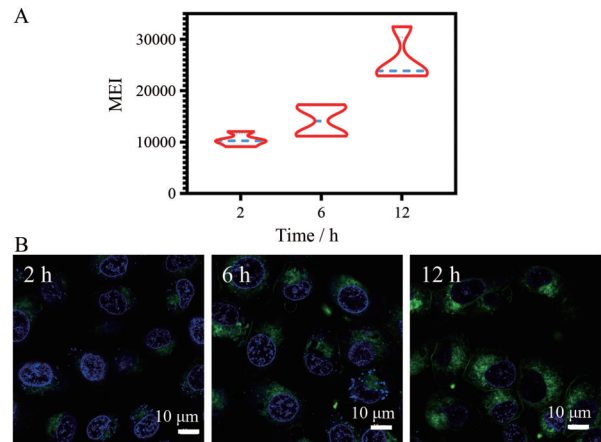


Figure 5 Cell uptake of GADP nanoparticles. A: Flow cytometry; B: Laser scanning confocal microscope images. Scale bar was 10 μm

5 HepG2 细胞内 ROS 的考察

GOx 能够分解葡萄糖产生 H_2O_2 , 造成细胞损伤。ROS 包括单重态的氧 (1O_2)、 H_2O_2 和羟自由基 ($\cdot OH$), 因此采用 DCFH-DA 荧光探针分析 HepG2 细胞中 ROS 产生情况。通过激光共聚焦显微镜图像 (图 6) 能够观察到游离的 GOx 组几乎没有 DCFH-DA 的绿色荧光, 可能是由于 GOx 容易被代谢失活, 细胞摄取量较少, 但当被负载到带有强正电性的纳米粒子上后 GOx 会随着纳米粒子一起被摄取进入到细胞中, 产生较明显的绿色荧光。说明 GOx 负载到 ADP 纳米粒子表面后更容易被细胞摄取, 分解葡萄糖释放 ROS, 杀伤肿瘤细胞。

6 细胞内 NO 产生水平和细胞迁移

L-Arg 作为人体内的一种半必需氨基酸, 在 iNOS 或

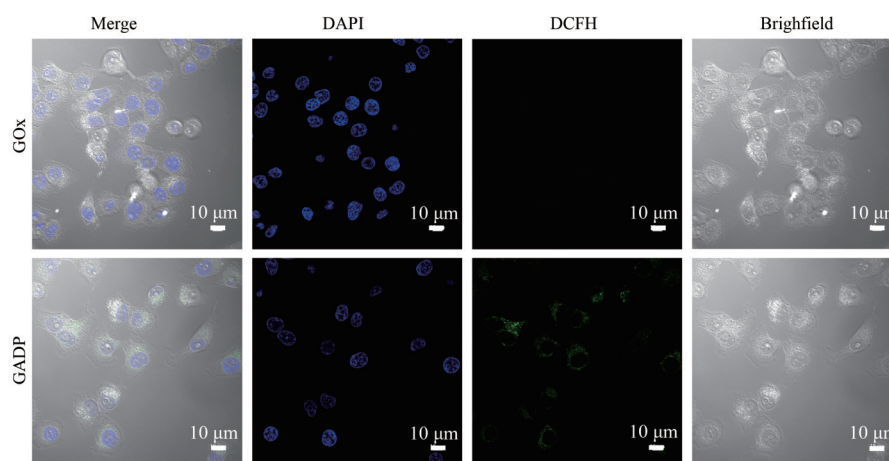


Figure 6 Laser scanning confocal microscope images of reactive oxygen species (ROS) in HepG2 cells treated with different nanoparticles. Green fluorescence represents 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA). Scale bar was 10 μm

ROS存在的情况下,能持续生成NO^[17]。通过一氧化氮试剂盒对比了GADP与L-Arg、L-Arg+H₂O₂的NO的产生能力,从图7A中可以看出GADP能够产生NO,并且产生NO的量与L-Arg+H₂O₂相当。原发性肿瘤中肿瘤血管的正常化能够抑制肿瘤转移,NO能够促进血管的正常化^[18]。因此,进一步评估了GADP对HepG2细胞体外抗转移潜力的作用。结果显示,GADP处理能显著抑制HepG2细胞的迁移(图7B)。

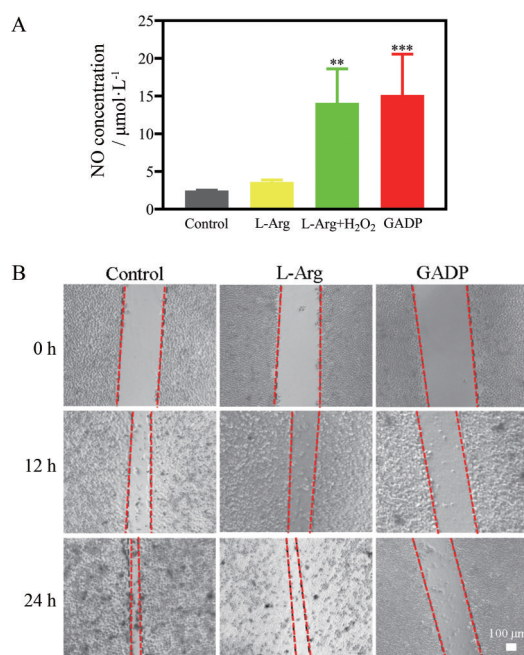


Figure 7 Intracellular nitric oxide (NO) production levels and anti-migration *in vitro*. A: The quantitative analysis of intracellular NO level; B: Wound-healing assays of HepG2 cells were performed 24 h after treatment with GADP at different doses. The experiments were repeated twice independently. Scale bars, 100 μm . $n = 4$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control

结论

本研究构建了一种具有生物降解的载L-Arg和GO_x的PLA纳米粒子,可实现将NO输送到肿瘤部位,在促进NO气体在抗肿瘤治疗中的应用方面取得了突破。一方面,GO_x消耗肿瘤微环境中的能量,产生“饥饿”效应;另一方面,GO_x分解葡萄糖产生的H₂O₂可以氧化L-Arg生成NO。GADP能有效抑制HepG2细胞的增殖和迁移,这项工作为抗肿瘤提供了一种新的协同治疗策略。

作者贡献: 杨美洋完成了文献调研、实验方法建立、结果处理及论文初稿的撰写;陈伟军负责部分体外抗肿瘤活性考察和结果处理;邱立朋负责课题设计和论文指导、修改;陈敬华负责课题的总体进展、论文的润色并提供实验经费支持。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Farah C, Michel LYM, Balligand JL. Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease [J]. Nat Rev Cardiol, 2018, 15: 292-316.
- [2] Naghavi N, Mel AD, Alavijeh OS, et al. Nitric oxide donors for cardiovascular implant applications [J]. Small, 2013, 9: 22-35.
- [3] Bogdan C. Nitric oxide and the immune response [J]. Nat Immunol, 2001, 2: 907-916.
- [4] Sung YC, Jin PR, Chu LA, et al. Delivery of nitric oxide with a nanocarrier promotes tumour vessel normalization and potentiates anti-cancer therapies [J]. Nat Nanotechnol, 2019, 14: 1160-1169.
- [5] Wan MM, Chen H, Wang ZD, et al. Nitric oxide-driven nanomotor for deep tissue penetration and multidrug resistance reversal in cancer therapy [J]. Adv Sci (Weinh), 2021, 8: 2002525.
- [6] Jia X, Zhang Y, Zou Y, et al. Dual intratumoral redox/enzyme-

- responsive NO-releasing nanomedicine for the specific, high-efficacy, and low-toxic cancer therapy [J]. *Adv Mater*, 2018, 30: 1704490.
- [7] Jiang PFY, Liu Y, Wang C, et al. Near-infrared light-triggered NO release for spinal cord injury repair [J]. *Sci Adv*, 2020, 6: 3513.
- [8] Yang Y, Huang Z, Li LL. Advanced nitric oxide donors: chemical structure of NO drugs, NO nanomedicines and biomedical applications [J]. *Nanoscale*, 2021, 13: 444-459.
- [9] Fan NLW, Huang P, Liu YI, et al. Glucose-responsive sequential generation of hydrogenperoxide and nitric oxide for synergistic cancer starving-like/gas therapy [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017, 56: 1229-1233.
- [10] Kudo S, Nagasaki Y. A novel nitric oxide-based anticancer therapeutics by macrophage-targeted poly (*L*-arginine)-based nanoparticles [J]. *J Control Release*, 2015, 217: 256-62.
- [11] Hao H, Yu M, Yi Y, et al. Mesoporous calcium peroxide-ignited NO generation for amplifying photothermal immunotherapy of breast cancer [J]. *Chem Eng J*, 2022, 437: 135371.
- [12] Chen Q, Liang C, Sun X, et al. H₂O₂-responsive liposomal nanoprobes for photoacoustic inflammation imaging and tumor theranostics via *in vivo* chromogenic assay [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: 5343-5348.
- [13] Fu LH, Wan Y, Qi C, et al. Nanocatalytic theranostics with glutathione depletion and enhanced reactive oxygen species generation for efficient cancer therapy [J]. *Adv Mater*, 2021, 33: 2006892.
- [14] Ma Y, Zhao Y, Bejjanki NK, et al. Nanoclustered cascaded enzymes for targeted tumor starvation and deoxygenation-activated chemotherapy without systemic toxicity [J]. *ACS Nano*, 2019, 13: 8890-8902.
- [15] Lu T, Hu F, Yue H, et al. The incorporation of cationic property and immunopotentiator in poly (lactic acid) microparticles promoted the immune response against chronic hepatitis B [J]. *J Control Release*, 2020, 321: 576-588.
- [16] Yang M, Yang T, Jia J, et al. Fabrication and characterization of DDAB/PLA-alginate composite microcapsules as single-shot vaccine [J]. *RSC Adv*, 2018, 8, 24: 13612-13624.
- [17] Wu H, Zhong D, Zhang Z, et al. A bacteria-inspired morphology genetic biomedical material: self-propelled artificial microbots for metastatic triple negative breast cancer treatment [J]. *ACS Nano*, 2021, 15, 3: 4845-4860.
- [18] Shi M, Zhang J, Wang Y, et al. Tumor-specific nitric oxide generator to amplify peroxyxynitrite based on highly penetrable nanoparticles for metastasis inhibition and enhanced cancer therapy [J]. *Biomaterials*, 2022, 283: 121448.