

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2021.12.1362

· 论 著 ·

基于改善缺氧仿生纳米递送体系的构建及其体外评价

李鹃鹃¹, 宫春爱², 韩治敏¹, 陈昕璐¹, 郭欢欢¹, 高 申^{1*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)长海医院药学部, 上海 200433

2. 上海交通大学医学院附属第九人民医院药剂科, 上海 200011

[摘要] **目的** 制备 pH 敏感融合膜(MP) 包覆的载多柔比星(Dox) 的中空介孔二氧化锰(H-MnO₂) 纳米粒(MP@H-MnO₂-Dox 纳米粒), 并在体外对其进行初步评价。**方法** 以固体实心二氧化硅为模板, 用碱刻蚀的方法合成 H-MnO₂, 制备载 Dox 的 H-MnO₂ (H-MnO₂-Dox), 进行 MP 的包覆构建 MP@H-MnO₂-Dox 纳米粒。对上述仿生纳米体系进行粒径、载药量、MP 包覆载体比例的考察, 用三(4,7-联苯-1,10-邻菲罗啉) 二氯化钌(RDPP) 探针进行产氧能力的评价, 透析法考察药物体外释放, 激光扫描共聚焦显微镜考察其胞内摄取分布情况。**结果** 成功制备了 H-MnO₂, 其载药率和包封率分别为 (79.0±8.7)% 和 (75.1±7.5)%, MP 与 H-MnO₂ 质量比为 1 : 1 时能较好地包裹 H-MnO₂。MP@H-MnO₂-Dox 粒径为 (178.0±9.5) nm, RDPP 测定结果显示 H-MnO₂ 具有优越的产氧能力。体外药物释放结果显示, MP 可以延缓 Dox 的释放, 24 h 时 MP@H-MnO₂-Dox (pH=6.5) 的 Dox 累计释放量低于 H-MnO₂-Dox (pH=6.5) [(42.0±5.1)% vs (60.0±3.7)%]。胞内摄取分布实验结果显示 MP@H-MnO₂-Dox 纳米粒在 pH=6.5 条件下具有很强的细胞摄取能力。**结论** 成功构建了 MP@H-MnO₂-Dox 纳米粒, 该仿生纳米体系有望成为缓解缺氧并靶向乳腺癌的多功能药物递送载体。

[关键词] 缺氧; 化学治疗; 仿生纳米粒; 乳腺肿瘤; 靶向治疗**[中图分类号]** R 737.9; R 943.42**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2021)12-1362-07

Construction and *in vitro* evaluation of a biomimetic nano-delivery system for alleviating hypoxia

LI Juan-juan¹, GONG Chun-ai², HAN Zhi-min¹, CHEN Xin-lu¹, GUO Huan-huan¹, GAO Shen^{1*}

1. Department of Pharmacy, Changhai Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

2. Department of Pharmacy, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200011, China

[Abstract] **Objective** To prepare doxorubicin (Dox)-loaded hollow mesoporous manganese dioxide (H-MnO₂) nanoparticles encapsulated with pH-sensitive fusion membrane (MP) (MP@H-MnO₂-Dox nanoparticles), and investigate its characteristics *in vitro*. **Methods** With solid silica as template, H-MnO₂ was synthesized by alkali etching. Dox-loaded H-MnO₂ (H-MnO₂-Dox) was prepared and was coated with MP to construct MP@H-MnO₂-Dox nanoparticles. The particle size, drug loading and proportion of MP coating carriers were investigated, the oxygen production capacity was evaluated by tris(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)ruthenium(II) dichloride (RDPP) probe, the drug release *in vitro* was investigated by dialysis, and the cellular uptake and distribution were investigated by confocal laser scanning microscopy. **Results** H-MnO₂ was successfully prepared. The drug-loading rate and encapsulation efficiency were (79.0±8.7)% and (75.1±7.5)%, respectively. H-MnO₂ could be coated well with the mass ratio 1 : 1 of MP to H-MnO₂. The particle size of MP@H-MnO₂-Dox nanoparticles was (178.0±9.5) nm. The results of RDPP showed that H-MnO₂ possessed superior oxygen production capacity. *In vitro* drug release results showed that MP could delay Dox release, and the Dox cumulative release amount of MP@H-MnO₂-Dox (pH=6.5) was lower than that of H-MnO₂-DOX (pH=6.5) [(42.0±5.1)% vs (60.0±3.7)%]. The results of uptake experiments showed that MP@H-MnO₂-Dox nanoparticles had strong cellular uptake at pH=6.5. **Conclusion** MP@H-MnO₂-Dox nanoparticle is successfully constructed. This biomimetic nanosystem is expected to be a multifunctional drug delivery vehicle for alleviating hypoxia and targeting breast cancer.

[收稿日期] 2021-03-19 **[接受日期]** 2021-08-26**[基金项目]** 国家自然科学基金(81972891), 国家临床重点专科-临床药军队建设项目, 上海市科学技术委员会基础研究项目(18JC1414200). Supported by National Natural Science Foundation of China (81972891), Military Construction Project of National Key Specialist-Clinical Pharmacy, and Basic Research Program of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (18JC1414200).**[作者简介]** 李鹃鹃, 硕士生. E-mail: lijuanjuanemail@126.com

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81873715, E-mail: ggss99@126.com

[Key words] hypoxia; chemotherapy; biomimetic nanoparticles; breast neoplasms; targeted therapy

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2021, 42(12): 1362-1368]

根据 WHO 国际癌症研究机构 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 2020 年最新数据, 乳腺癌已成为全球发病率最高的癌症。据统计, 约有 70% 的乳腺癌患者对化疗耐药或很快出现化疗耐药^[1]。无论是初始的耐药还是获得性的耐药都会降低乳腺癌患者的无病生存时间和总生存时间。乳腺癌作为一种实体瘤, 肿瘤中心因混乱的血管结构导致一些区域无法通过血液循环供给氧气, 而且肿瘤细胞旺盛的代谢进一步加剧了缺氧的程度^[2-3]。肿瘤组织的缺氧会加速刺激缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor 1 α , HIF-1 α), 并使血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达上调, 刺激新生血管形成, 促进肿瘤侵袭和转移, 同样也通过多种机制对肿瘤治疗产生抵抗作用^[4-5]。因此, 缓解肿瘤部位缺氧状况以提高治疗效果为乳腺癌治疗提供了一种新思路。

研究表明, 二氧化锰纳米结构通过与肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 内的 H⁺ 或谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 反应并分解产生 Mn²⁺, 能增强 T1 磁共振成像信号从而实现肿瘤特异性成像和检测^[6-7]。同时, 二氧化锰纳米结构能够催化 TME 内的 H₂O₂ 分解为水和氧气, 从而缓解肿瘤缺氧^[8-9], 并在体内代谢为无害的、水溶性的 Mn²⁺ 经肾脏迅速排出体外。中空介孔二氧化锰 (hollow mesoporous manganese dioxide, H-MnO₂) 的中空介孔结构使其具有很大的比表面积, 载药率较高。纳米载药系统可以通过被动或主动靶向递送药物至肿瘤部位, 发挥抗肿瘤效应, 减少药物的不良反应。

纳米药物在实际运用中仍然面临着诸多挑战, 例如纳米药物多数是通过静脉给药, 血浆中多种蛋白成分迅速吸附至纳米药物表面, 加速巨噬细胞的识别与吞噬, 使得大部分的药物还未到达肿瘤部位就被网状内皮系统清除。针对上述难点, 可对纳米递送载体进行修饰, 制备具有主动趋向性、低免疫原性、可穿过生理屏障等特点的仿生膜伪装纳米粒。该粒子同时具有细胞膜的天然生物特性和合成纳米粒子可改装的物理特性, 可用于递送治疗药物在肿瘤部位富集, 提高治疗效果^[10-13]。

本研究以 H-MnO₂ 为载体递送多柔比星

(doxorubicin, Dox), 以 pH 敏感脂质体和巨噬细胞膜融合膜 (pH-sensitive fusion membrane, MP) 包覆在 H-MnO₂ 上, 构建了仿生纳米体系 MP@H-MnO₂-Dox 纳米粒 (图 1)。该纳米粒能够靶向肿瘤部位并在肿瘤酸性微环境下裂解暴露 H-MnO₂, 分解 TME 中的 H₂O₂ 产生氧以缓解缺氧, 同时 Dox 被肿瘤细胞吞噬发挥抗肿瘤作用。

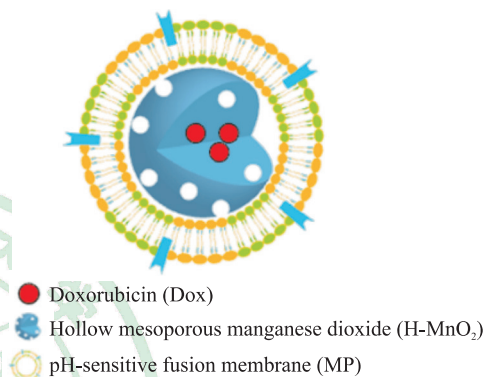


图 1 MP@H-MnO₂-Dox 纳米粒示意图

Fig 1 Sketch of MP@H-MnO₂-Dox nanoparticle

1 材料和方法

1.1 细胞、仪器和试剂

巨噬细胞 RAW264.7 和小鼠乳腺癌细胞 4T1 由中国科学院生命科学研究院细胞库提供。水浴锅 (河南予华仪器有限公司); 高速冷冻离心机 (美国 Eppendorf AG 公司); 旋转蒸发仪 (常州英峪予华仪器有限公司); ZS90 粒度电位分析仪 (英国 Malvern 公司); JEM-2010 型透射电镜 (日本 JEOL 公司); 激光扫描共聚焦显微镜 (德国 Leica 公司); 紫外-可见分光光度计 (上海奥谱勒仪器有限公司); 自动吸附仪器 (美国 Quantachrome 公司); X 射线光电子能谱 (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS) 分析仪 (美国 ThermoFisher Scientific 公司)。正硅酸乙酯、氨水、无水乙醇、无水碳酸钠 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 高锰酸钾 (国药集团化学试剂有限公司); 胆固醇、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚 (2-乙基-2-噁唑啉) [1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-poly(2-ethyl-2-oxazoline), DSPE-PEOZ]、卵磷脂 (西安瑞禧生物科技有限公司); FBS、DMEM 培养基、RPMI

1640培养基(美国Gibco公司);苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)、细胞膜蛋白与细胞质蛋白抽提试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);BCA蛋白定量试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司);三(4,7-联苯-1,10-邻菲罗啉)氯化钌[tris(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline) ruthenium(II) dichloride, RDPP]购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 细胞培养 巨噬细胞RAW264.7用含有10% FBS的DMEM培养基在5% CO₂、37℃条件下培养,每2 d传代1次,约80%细胞融合时进行实验。小鼠乳腺癌细胞4T1用含有10% FBS的RPMI 1640培养基在5% CO₂、37℃条件下培养,每天传代1次,约80%细胞融合时进行实验。

1.3 H-MnO₂的合成与鉴定 采用碱刻蚀法^[14]制备H-MnO₂。量取14 mL无水乙醇、2 mL去离子水和500 μL浓NH₃·H₂O(28%)置于50 mL的锥形瓶中,待溶液混匀后,缓慢滴加100 μL正硅酸乙酯和4 mL无水乙醇的混合溶液,置于45℃水浴锅里反应至溶液呈现微弱的蓝色乳光,收集、离心、洗涤得固体实心二氧化硅(solid silica, sSiO₂)备用。取上述制备的sSiO₂ 40 mg分散在10 mL水中,在超声条件下将10 mL高锰酸钾(300 mg)水溶液用微量注射泵逐滴滴加到sSiO₂溶液中,滴加完毕后置于磁力搅拌器上搅拌整夜,溶液经冷冻高速离心机离心,获得沉淀SiO₂@MnO₂。将SiO₂@MnO₂溶解在2 mol/L碳酸钠水溶液中,在60℃下刻蚀12 h,离心获得沉淀,用水洗涤3次,即得H-MnO₂。使用XPS分析仪判断其组成及结构,用氮气吸脱附实验验证其介孔大小及比表面积,用粒径分析仪测定其粒径及电位。

1.4 H-MnO₂对Dox的装载实验 精密称取10 mg Dox,置于100 mL容量瓶中,加去离子水溶解并定容,混匀,即得质量浓度为100 μg/mL的Dox标准储备液。用上述储备液配制质量浓度分别为1、2、5、10、20、30、40、50 μg/mL的Dox溶液。以PBS为空白对照,用紫外-可见分光光度计测定480 nm波长处的光密度(D)值。以D对Dox质量浓度(C)进行线性回归,绘制标准曲线。

H-MnO₂与Dox分别以1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7的质量比混合,避光搅拌孵育整夜,溶液经高速离心收集上清和沉

淀,沉淀用等量去离子水洗涤3次,离心收集上清未负载的Dox,所得上清液合并用紫外-可见分光光度计测定D₄₈₀,根据标准曲线计算游离Dox的质量浓度,并按公式计算载药率和包封率:载药率(%)=(Dox投入总质量-游离Dox质量)/载药纳米粒的质量×100%,包封率(%)=(Dox投入总质量-游离Dox质量)/体系中药物的总质量×100%。

1.5 MP的制备 离心收集巨噬细胞,加入一定量含PMSF的膜蛋白抽提试剂A,冰浴反应10~15 min。将上述溶液置于液氮里反复冻融3次破碎细胞,然后于4℃ 700×g离心10 min,收集上清以去除细胞核和未破碎的细胞。上清于4℃ 14 000×g离心30 min,收集沉淀即得细胞膜,用BCA法测定蛋白含量。

将卵磷脂、胆固醇、DSPE-PEOz以摩尔比2:1:0.4分散在二氯甲烷与甲醇体积比为2:1的混合液中,置于50 mL圆底烧瓶中旋转蒸发1 h,取下圆底烧瓶加入等质量的巨噬细胞膜溶液进行水化、超声形成MP的透明悬浮液。

1.6 MP的包覆及表征 将MP与H-MnO₂分别按质量比1:5、1:4、1:3、1:2、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1进行超声融合,离心纯化除去未成功负载的细胞膜,用BCA法测定MP@H-MnO₂-Dox上膜蛋白的含量,根据膜蛋白含量和投入比的相关性筛选包覆效率最高的膜-核质量比。使用上述方法分别制备H-MnO₂-Dox、MP@H-MnO₂-Dox纳米粒进行实验,并考察粒径、电位,在透射电镜下观察纳米粒。

1.7 仿生纳米体系的考察

1.7.1 体外药物释放 采用透析法考察H-MnO₂-Dox纳米粒、MP@H-MnO₂-Dox纳米粒的体外释放情况,选截留分子量为8 000~12 000的透析袋,透析介质为pH=6.5和pH=7.4的PBS溶液。将2 mL H-MnO₂-Dox纳米粒、MP@H-MnO₂-Dox纳米粒溶液移入透析袋中,放置于含有50 mL释放介质中,于100 r/min、37℃进行透析。分别于0.5、1、2、4、6、8、10、12、24 h取1 mL外液,同时补足释放介质。利用紫外分光光度法测定其浓度,并绘制体外释放曲线。

1.7.2 产氧能力 将50 μL 0.01 mol/L RDPP乙醇溶液加入1 mL的待测样品中,含H-MnO₂浓度为

20 $\mu\text{g/mL}$, 用 $\text{pH}=6.5$ 的 PBS 重悬。将上述混合物转移到试管中, 加入 250 μL H_2O_2 (0.1 mmol/L) 后, 每 2 min 记录 1 次 RDPP 的荧光强度 ($\lambda_{\text{ex}}=455 \text{ nm}/\lambda_{\text{em}}=615 \text{ nm}$)。

1.7.3 胞内摄取评价 采用激光扫描共聚焦显微镜考察仿生纳米粒的胞内摄取。将圆形玻璃片在 75% 乙醇中浸泡 30 min 后取出, 在酒精灯上烤干后放入 24 孔板中, 将 4T1 细胞以 1×10^5 个细胞每孔的密度接种到 24 孔板, 在 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中培养, 24 h 后更换含有 Dox、H-MnO₂-Dox、MP@H-MnO₂-Dox ($\text{pH}=6.5$)、MP@H-MnO₂-Dox ($\text{pH}=7.4$) 的新鲜培养基, 共孵育 4 h。吸去旧的培养基, 用 PBS 洗涤 1 次, 再用预冷的多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗涤 3 次。吸取 8 μL 含有 DAPI 的封片液滴于载玻片上, 将圆形盖玻片取出, 使含有细胞的一面贴于含有 DAPI 液的载玻片上。在激

光扫描共聚焦显微镜下观察并记录 Dox 在 4T1 细胞内的荧光分布情况。

1.8 统计学处理 用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析。正态分布数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 H-MnO₂ 纳米粒的结构鉴定 XPS 分析结果如图 2A, 在纳米粒中约 653、641 eV 处发现了 2 个明显峰, 分别归属于二氧化锰 $\text{Mn}2\text{p}_{1/2}$ 和 $\text{Mn}2\text{p}_{3/2}$, 表明二氧化锰颗粒具有 +4 的氧化态。氮气吸脱附实验结果如图 2B 所示, 氮气等温吸脱附曲线为 IV 型, 且滞后环为 H1 型, 表明材料为介孔型且介孔均匀。经氮气吸脱附实验测试法计算比表面积为 335.475 m^2/g , 孔容对孔径分布见图 2C, 平均孔径为 4.5 nm。结果表明 H-MnO₂ 成功合成, 且孔径大小适合装载小分子药物。

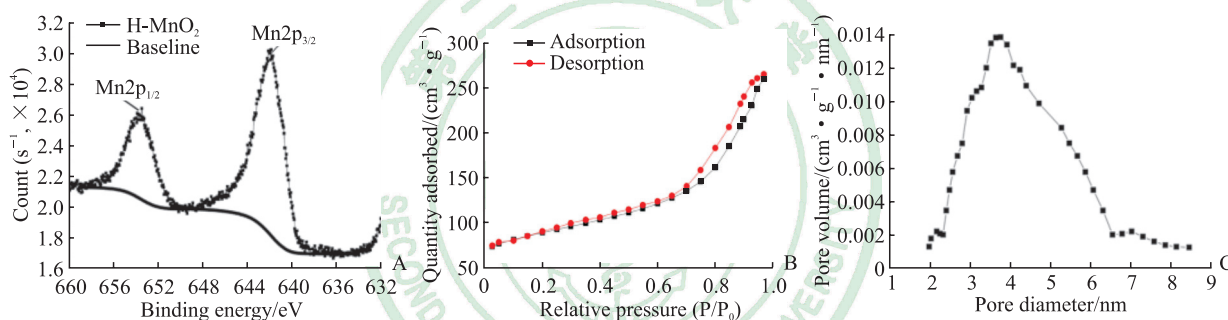


图 2 H-MnO₂ 纳米粒的结构鉴定结果

Fig 2 Characterization results of H-MnO₂ nanoparticles

A: X-ray photoelectron spectroscopy analysis; B: Nitrogen adsorption/desorption isotherms test; C: Pore-size distribution curve. H-MnO₂: Hollow mesoporous manganese dioxide.

2.2 Dox 的载药率与包封率 Dox 测定的标准曲线为: $D=0.0211C+0.0119$ ($R^2=0.9991$, $n=3$), 线性范围为 1~50 $\mu\text{g/mL}$ 。H-MnO₂ 在 480 nm 处没有紫外吸收, 不影响 Dox 的测定。如图 3 所示, 随着 Dox 占比的增加, 载药率逐渐升高、包封率降低; 当 Dox 与 H-MnO₂ 的质量比为 5 : 1 时, H-MnO₂ 纳米粒载药率和包封率达到相对稳定的较高值, 分别为 $(79.0 \pm 8.7)\%$ 和 $(75.1 \pm 7.5)\%$, 选用此比例进行后续实验。

2.3 MP 的包覆及表征 测定 MP 包覆 H-MnO₂-Dox 的仿生纳米粒表面膜蛋白的含量, 结果如图 4A, 在 MP 与 H-MnO₂ 的质量比为 1 : 1 以下时, 仿生纳米粒的表面膜蛋白含量与质量比具有一定的相关性; 大于 1 : 1 时, 仿生纳米粒的表面膜蛋白含量开

始趋近饱和。结果表明质量比为 1 : 1 时 MP 足以将 H-MnO₂ 包裹, 后续以此比例进行实验。

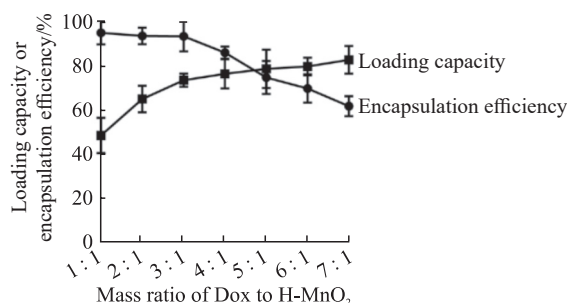


图 3 H-MnO₂ 纳米粒对 Dox 的载药率及包封率

Fig 3 Drug-loading capacity and encapsulation efficiency of Dox in H-MnO₂ nanoparticles

$n=3$, $\bar{x} \pm s$. H-MnO₂: Hollow mesoporous manganese dioxide; Dox: Doxorubicin.

激光粒径分析仪测定结果如图4B, H-MnO₂-Dox的粒径为(169.0±6.5) nm, 聚合物分散性指数 (polymer dispersity index, PDI) 为 0.141±0.024, MP@H-MnO₂-Dox的粒径为(178.0±9.5) nm, PDI 为 0.206±0.008; H-MnO₂-Dox 电位为(-34.0±4.2) mV, MP@H-MnO₂-Dox 电位为(-40.0±5.5) mV, 与

MP 的电位(-39.0±3.4) mV 相近, 可初步表明 MP 的成功包覆。透射电镜结果如图4C, H-MnO₂-Dox 为规则介孔样球形, 粒径约为 182 nm, 这与水合粒径相符; 电镜图可以明显看到 MP@H-MnO₂-Dox 外有一层膜包衣, 呈现“核壳”结构, 进一步证明了 MP 的成功包覆。

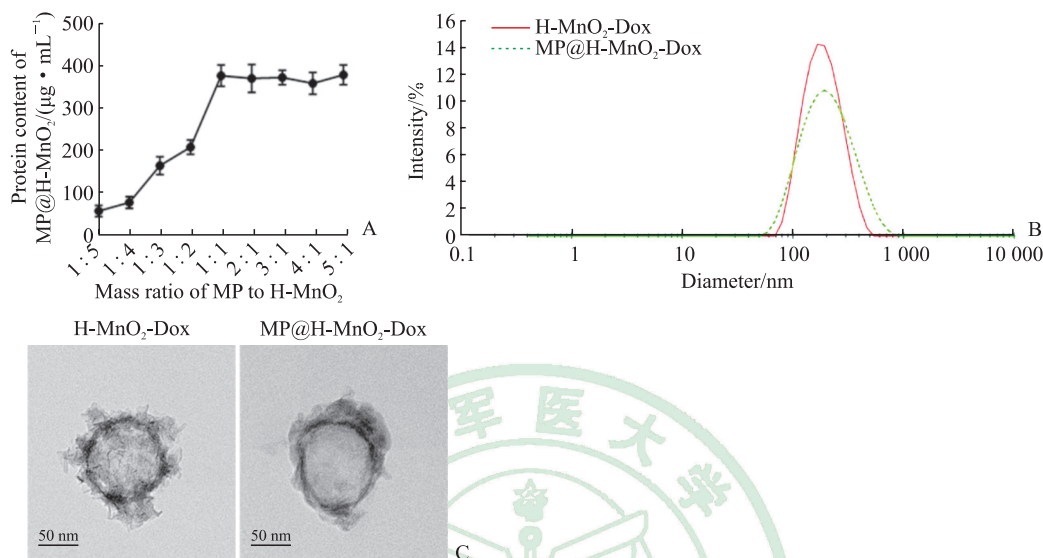


图4 MP 的包覆及表征结果

Fig 4 Coating and characterization results of MP

A: Optimizing the ratio mass of MP to H-MnO₂ nanoparticles by bicinchoninic acid assay ($n=3, \bar{x} \pm s$); B: Particle size of MP@H-MnO₂-Dox nanoparticles and H-MnO₂-Dox nanoparticles; C: Transmission electron microscopic image of H-MnO₂-Dox nanoparticles and MP@H-MnO₂-Dox nanoparticles. MP: pH-sensitive fusion membrane; H-MnO₂: Hollow mesoporous manganese dioxide; Dox: Doxorubicin.

2.4 仿生纳米体系体外药物释放考察 体外药物释放结果如图5, 24 h时 MP@H-MnO₂-Dox (pH=7.4)、MP@H-MnO₂-Dox (pH=6.5)、H-MnO₂-Dox (pH=7.4)、H-MnO₂-Dox (pH=6.5) 的 Dox 累计释放量分别为 (15.0±4.5)%、(42.0±5.1)%、(38.0±2.1)%、(60.0±3.7)%。结果表明 MP 发挥了 pH 响应的作用, 二氧化锰在酸性条件下分解为 Mn²⁺, 促进了药物的释放; 同一 pH 条件下 MP 可以延缓 Dox 的释放, 表明 MP 包覆具有一定的缓释作用。

的。H-MnO₂-Dox+H₂O₂ 组 RDPP 的荧光强度也在 6 min 内淬灭, 且随后保持在较低水平, 说明二氧化锰具有高效的产氧能力, 且随时间的增加 2 种纳米粒在 10 min 时达到相近的产氧效果。

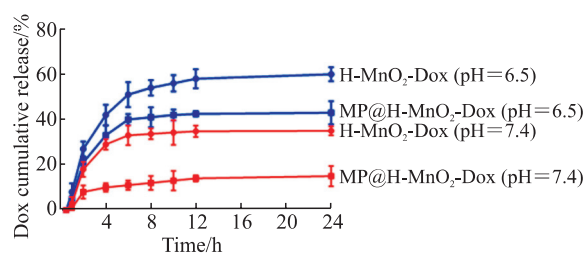


图5 MP@H-MnO₂-Dox 和 H-MnO₂-Dox 纳米粒在不同 pH 条件下的释放曲线

Fig 5 Release curve of MP@H-MnO₂-Dox nanoparticles and H-MnO₂-Dox nanoparticles at different pH values

$n=3, \bar{x} \pm s$. MP: pH-sensitive fusion membrane; H-MnO₂: Hollow mesoporous manganese dioxide; Dox: Doxorubicin.

2.5 仿生纳米粒的产氧能力考察 结果如图6, 向 MP@H-MnO₂-Dox 纳米粒悬浮液 (溶剂为 pH=6.5 的磷酸盐缓冲液) 中加入 H₂O₂ 后, RDPP 的荧光强度在 6 min 内淬灭, 并在随后的 4 min 内维持在较低水平, 表明溶液中氧浓度升高; 而 MP-Dox+H₂O₂ 组和 MP@H-MnO₂-Dox 组荧光强度没有降低, 进一步证实氧的产生是由二氧化锰氧化 H₂O₂ 引起

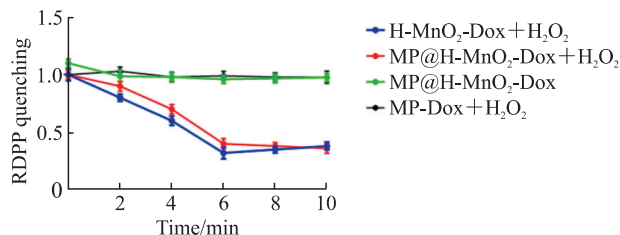


图 6 不同纳米粒的产氧能力考察结果

Fig 6 Oxygen production capacity of different nanoparticles

$n=3, \bar{x} \pm s$. H-MnO₂: Hollow mesoporous manganese dioxide; Dox: Doxorubicin; MP: pH-sensitive fusion membrane; RDPP: Tris(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)ruthenium(II) dichloride.

2.6 仿生纳米粒的胞内摄取评价 激光共聚焦显微镜下 Dox 在 4T1 细胞内荧光分布如图 7, 其中红色荧光代表 Dox, 蓝色荧光代表 DAPI。游离 Dox 组有较弱的荧光, H-MnO₂-Dox 组则显示出稍强的荧光, MP@H-MnO₂-Dox (pH=6.5) 组则具有最强的荧光, 表明 MP 的包覆能够有效促进纳米粒递送药物进入胞内。

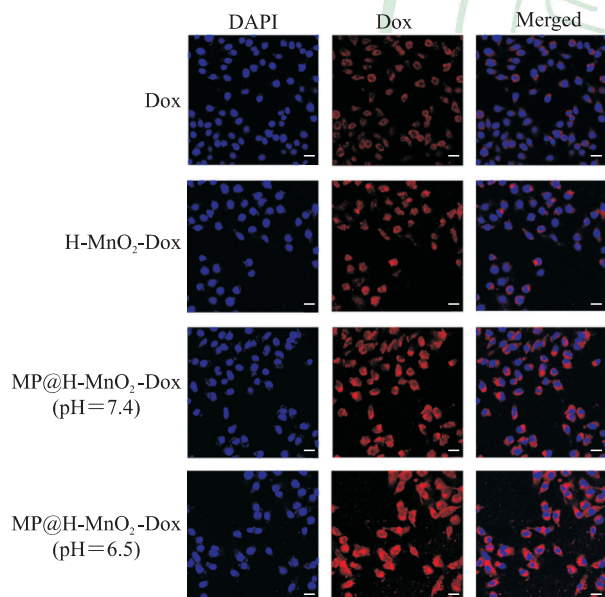


图 7 激光扫描共聚焦显微镜观察 4T1 细胞内 Dox 的摄取分布情况

Fig 7 Cellular uptake and distribution of Dox in 4T1 cells by confocal laser scanning microscopy

Scale bar=25 μ m. Dox: Doxorubicin; H-MnO₂: Hollow mesoporous manganese dioxide; MP: pH-sensitive fusion membrane; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole.

3 讨论

肿瘤缺氧微环境不仅诱导肿瘤血管的生成和

转移, 还导致许多癌症的治疗效果不佳^[15]。诸多研究提出了向肿瘤区域输送氧气的方法, 其中纳米递送系统备受青睐, 但大多都以二氧化锰颗粒或 H₂O₂ 酶作为一种治疗剂设计在纳米递送系统中, 增添了纳米系统的复杂性^[16-17]。本研究提出以 H-MnO₂ 本身作为纳米递送的载体, 同时它又可以发挥产生氧气的作用。人工制备的纳米载体在生物相容性和安全性等方面很难与一些天然物质相比, 研究者们创造性地将纳米递送系统与细胞或细胞膜结合^[18-19], 构成细胞-纳米药物递送系统。该递送系统保留了一些关键的膜蛋白和细胞的原始功能, 这有助于逃避宿主免疫反应、延长循环时间, 并具有将治疗剂输送到特定部位的靶向性。

本研究构建的 MP 包覆载 Dox 的 H-MnO₂ 仿生纳米递送体系具有均一、稳定的粒径, 仿生膜的包覆可有效增加纳米粒在血液中的稳定性并且防止药物泄露, 还同时靶向肿瘤部位并在肿瘤酸性微环境中释放药物, 发挥精准的药物作用。H-MnO₂ 的载药率与包封率分别达 (79.0 \pm 8.7)%、(75.1 \pm 7.5)%, 这与 H-MnO₂ 具有较大的比表面积及均一、较小的孔径有关, 而较高的载药率和包封率可以保证在较低剂量的载体递送下达到治疗效果。MP 本质上属磷脂双分子层, 实验表明其能够有效将 H-MnO₂ 包覆, 为 Dox 递送提供了非常安全且高效的平台。MP 在肿瘤部位响应酸性微环境, 裂解释放载药 H-MnO₂, 因此本研究在 pH=6.5 和 pH=7.4 下考察药物释放, 体外释放结果表明 MP 具有酸性条件敏感行为, 为抗肿瘤药物在 TME 中释放提供了条件。在酸性的 H₂O₂ 条件下, MnO₂ 被还原成 Mn²⁺ 和氧, 即 $2\text{H}_2\text{O}_2 + 4\text{H}^+ + \text{MnO}_2 = 4\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 + \text{Mn}^{2+}$ 。可以用氧气探针 RDPP 探究 MP@H-MnO₂-Dox 对酸性 H₂O₂ 的响应, 有氧时 RDPP 的荧光会被淬灭。考察 H-MnO₂ 的体外产氧能力结果表明, 二氧化锰在模拟 TME 的 H₂O₂ 浓度条件下具有高效的产氧能力, 对缓解肿瘤部位缺氧具有很大意义。胞内摄取结果证明 MP@H-MnO₂-Dox 纳米粒有优异的递送能力, 也证实了该仿生纳米体系递送药物的可行性。

综上所述, 本实验成功构建了 MP@H-MnO₂-Dox 纳米粒并进行了载药比例、膜包覆条件及相关体外特性的考察, 该仿生纳米体系具有成为安全、高效的体内靶向给药递送系统的潜力。后期我们将

开展体外细胞学评价及体内的靶向性、药效学评价,并进一步探索其抗肿瘤作用的机制。

[参考文献]

- [1] NUNNERY S E, MAYER I A. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in hormone-positive breast cancer[J]. *Drugs*, 2020, 80: 1685-1697.
- [2] VAUPEL P, THEWS O, HOECKEL M. Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and Anemia[J]. *Med Oncol*, 2001, 18: 243-259.
- [3] HÖCKEL M, VAUPEL P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93: 266-276.
- [4] RANKIN E B, GIACCIA A J. Hypoxic control of metastasis[J]. *Science*, 2016, 352: 175-180.
- [5] MCEVOY L M, O'TOOLE S A, SPILLANE C D, MARTIN C M, GALLAGHER M F, STORDAL B, et al. Identifying novel hypoxia-associated markers of chemoresistance in ovarian cancer[J/OL]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 547. DOI: 10.1186/s12885-015-1539-8.
- [6] HUANG J, HUANG Y, XUE Z, ZENG S. Tumor microenvironment responsive hollow mesoporous $\text{Co}_9\text{S}_8@\text{MnO}_2$ -ICG/DOX intelligent nanoplatform for synergistically enhanced tumor multimodal therapy[J/OL]. *Biomaterials*, 2020, 262: 120346. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2020.120346.
- [7] ZHU J, XIAO T, ZHANG J, CHE H, SHI Y, SHI X, et al. Surface-charge-switchable nanoclusters for magnetic resonance imaging-guided and glutathione depletion-enhanced photodynamic therapy[J]. *ACS Nano*, 2020, 14: 11225-11237.
- [8] LIN T, ZHAO X, ZHAO S, YU H, CAO W, CHEN W, et al. O_2 -generating MnO_2 nanoparticles for enhanced photodynamic therapy of bladder cancer by ameliorating hypoxia[J]. *Theranostics*, 2018, 8: 990-1004.
- [9] CHANG C C, DINH T K, LEE Y A, WANG F N, SUNG Y C, YU P L, et al. Nanoparticle delivery of MnO_2 and antiangiogenic therapy to overcome hypoxia-driven tumor escape and suppress hepatocellular carcinoma[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12: 44407-44419.
- [10] PANG L, ZHANG C, QIN J, HAN L, LI R, HONG C, et al. A novel strategy to achieve effective drug delivery: exploit cells as carrier combined with nanoparticles[J]. *Drug Deliv*, 2017, 24: 83-91.
- [11] KRATZ F, WARNECKE A. Finding the optimal balance: challenges of improving conventional cancer chemotherapy using suitable combinations with nano-sized drug delivery systems[J]. *J Control Release*, 2012, 164: 221-235.
- [12] CHAUHAN V P, STYLIANOPOULOS T, BOUCHER Y, JAIN R K. Delivery of molecular and nanoscale medicine to tumors: transport barriers and strategies[J]. *Annu Rev Chem Biomol Eng*, 2011, 2: 281-298.
- [13] ZHANG Y H, CAO J, YUAN Z. Strategies and challenges to improve the performance of tumor-associated active targeting[J]. *J Mater Chem B*, 2020, 8: 3959-3971.
- [14] YANG G, XU L, CHAO Y, XU J, SUN X, WU Y, et al. Hollow MnO_2 as a tumor-microenvironment-responsive biodegradable nano-platform for combination therapy favoring antitumor immune responses[J/OL]. *Nat Commun*, 2017, 8: 902. DOI: 10.1038/s41467-017-01050-0.
- [15] YOUSEFI H, VATANMAKANI M, MAHDIANNASSER M, MASHOURI L, ALAHARI N V, MONJEZI M R, et al. Understanding the role of integrins in breast cancer invasion, metastasis, angiogenesis, and drug resistance[J]. *Oncogene*, 2021, 40: 1043-1063.
- [16] ZHU X F, LIU Y N, YUAN G L, GUO X, CEN J Q, GONG Y C, et al. *In situ* fabrication of $\text{MS}@\text{MnO}_2$ hybrid as nanozymes for enhancing ROS-mediated breast cancer therapy[J]. *Nanoscale*, 2020, 12: 22317-22329.
- [17] CHENG X, HE L, XU J, FANG Q, YANG L, XUE Y, et al. Oxygen-producing catalase-based prodrug nanoparticles overcoming resistance in hypoxia-mediated chemo-photodynamic therapy[J]. *Acta Biomater*, 2020, 112: 234-249.
- [18] FANG R H, KROLL A V, GAO W, ZHANG L. Cell membrane coating nanotechnology[J/OL]. *Adv Mater*, 2018, 30: e1706759. DOI: 10.1002/adma.201706759.
- [19] YOO J W, IRVINE D J, DISCHER D E, MITRAGOTRI S. Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10: 521-535.

[本文编辑] 尹 茶