

卓越医见: 子儿童肿瘤

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.004152

共载 Menin 抑制剂与砷剂的 PEG 化纳米递送系统: 制备、表征及抗 AML 作用研究

林笑宇¹, 戴嘉彤¹, 宋诗尧¹, 陈嘉杰¹, 黄芷雯², 何蕾洁², 樊重¹, 唐燕来¹

(1. 中山大学附属第一医院儿科, 广州 510080; 2. 中山大学中山医学院, 广州 510080)

【摘要】目的: 针对赖氨酸甲基转移酶 2A (lysine methyltransferase 2A, KMT2A) 重排高危急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 临床治疗方案有限、Menin 抑制剂易产生耐药性、砷剂毒性较大等问题, 构建共载 Menin 抑制剂瑞维美尼 (Revumenib) 与三价砷剂亚砷酸钠 (sodium arsenite, NaAsO₂) 的聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 修饰双药纳米颗粒 (Revumenib-sodium arsenite PEG-modified nanoparticles, Revu-As@PEG-NP), 评价其体外抗 AML 效应, 为高危 AML 精准联合治疗提供新策略。**方法:** 采用动态光散射法 (dynamic light scattering, DLS)、电感耦合等离子体质谱 (inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS) 及高效液相色谱 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 表征纳米颗粒理化性质、瑞维美尼包封率与亚砷酸钠包封率; 以 MOLM-13、MV-4-11 细胞为模型, 通过细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8)、流式细胞术及荧光显微镜检测其对细胞增殖、凋亡、分化及内吞摄取的影响; 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 Tukey's 多重比较检验。**结果:** Revu-As@PEG-NP 粒径均一、稳定性良好, Revumenib 与 NaAsO₂ 包封率分别为 (42.11 ± 0.09)%、(20.19 ± 0.19)%, 可被 AML 细胞高效内吞摄取。在 MOLM-13 和 MV-4-11 细胞中, 该纳米颗粒可浓度依赖性抑制细胞增殖、促进髓系分化, 其诱导细胞凋亡的作用显著强于亚砷酸钠组与 Revumenib 组 ($P < 0.001$), 整体药效优于两种游离单药, 存在联合增强趋势。**结论:** 本研究成功构建 Revu-As@PEG-NP, 该纳米颗粒理化性质良好, 可实现 Revumenib 与 NaAsO₂ 的高效共递送, 体外可通过多途径抑制 KMT2A 重排 AML 细胞恶性表型, 具备可观的体外抗白血病作用潜力, 可为 KMT2A 重排 AML 靶向联合治疗的相关研究提供新思路与实验基础。

【关键词】 急性髓系白血病; Menin 抑制剂; 三氧化二砷; 药物靶向治疗; 纳米颗粒

【中图分类号】 R733.7; R944

【文献标志码】 A

PEGylated nanodelivery system co-loaded with menin inhibitor and arsenic agent: preparation, characterization, and anti-acute myeloid leukemia effects

Lin Xiaoyu¹, Dai Jiatong¹, Song Shiyao¹, Chen Jiajie¹, Huang Zhiwen², He Leijie², Fan Zhong¹, Tang Yanlai¹

(1. Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University;

2. Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University)

【Abstract】Objective: To construct PEG-modified dual-drug nanoparticles co-loaded with revumenib and sodium arsenite (Revu-As@PEG-NP), so as to address the issues of limited clinical regimens, acquired drug resistance to Menin inhibitors, and high systemic toxicity of sodium arsenite in acute myeloid leukemia (AML) with KMT2A rearrangement. We further evaluate its in vitro anti-leukemia effects, and provide a novel idea for precise combination therapy of this high-risk AML subtype. **Methods:** Dynamic light scattering (DLS), inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and high-performance liquid chromatography (HPLC) were adopted to characterize the physicochemical properties of nanoparticles, as well as the encapsulation efficiencies of revumenib and sodium arsenite. Two KMT2A-rearranged AML cell lines (MOLM-13 and MV-4-11) were used as cell models. CCK-8 assay, flow cytometry and fluorescence microscopy were applied to detect the impacts of Revu-As@PEG-NP on cell proliferation, apoptosis, myeloid differentiation and cellular internalization. One-way analysis of variance (one-way ANOVA) was used for multi-group

作者介绍: 林笑宇, Email: linxy337@mail2.sysu.edu.cn,

研究方向: 儿童血液肿瘤。

通信作者: 唐燕来, Email: tangylai@mail.sysu.edu.cn。

基金项目: 广东省自然科学基金青年提升资助项目 (编号: 2023A1515030060)。

优先出版: <https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20260629.1737.012>
(2026-06-30)

comparison, and Tukey's multiple comparison test was adopted for pairwise intergroup comparison. **Results:** Revu-As@PEG-NP possessed uniform particle size and favorable colloidal stability. The encapsulation efficiencies of revumenib and sodium arsenite reached (42.11 ± 0.09)% and (20.19 ± 0.19)%, respectively, and the nanoparticles could be efficiently internalized by AML cells. In

MOLM-13 and MV-4-11 cells, Revu-As@PEG-NP suppressed cell proliferation and facilitated myeloid differentiation in a concentration-dependent manner. Its pro-apoptotic capacity was markedly stronger than free sodium arsenite monotherapy and free revumenib monotherapy ($P<0.001$). Overall, the nanoparticle formulation exerted superior anti-leukemic efficacy compared with the two free single drugs, with a trend of combined enhanced activity. **Conclusion:** This study successfully fabricated Revu-As@PEG-NP with favorable physicochemical properties, which enables efficient co-delivery of revumenib and sodium arsenite. The nanoparticles could inhibit the malignant phenotypes of KMT2A-rearranged AML cells via multiple pathways in vitro and exhibit promising in vitro anti-leukemic potency. This work offers an in vitro novel regimen and experimental basis for targeted combination therapy against KMT2A-rearranged AML.

[Key words] acute myeloid leukemia; menin inhibitor; arsenic trioxide; targeted therapy; nanoparticles

急性髓系白血病 (acute myeloid leukemia, AML) 是起源于骨髓造血干细胞的高度异质性恶性血液肿瘤。赖氨酸甲基转移酶 2A (lysine methyltransferase 2A, KMT2A) 重排是 AML 中的关键高危基因异常, 在儿童及成人急性白血病中总体发生率为 5%~15%。伴有 KMT2A 重排的白血病患者整体预后极差, 在缺乏针对 KMT2A 重排急性白血病的有效治疗药物的情况下, 5 年总体生存率低于 25%, 是目前临床公认的不良预后因素^[1-2]。

在 KMT2A 重排 AML 中, Menin 是关键的致癌辅因子。因此, Menin 抑制剂成为针对该通路的重要靶向治疗策略, 其核心优势在于可特异性阻断 Menin-KMT2A 相互作用, 从而抑制 HOXA/MEIS1 转录程序, 而该程序是 KMT2A 重排 AML 细胞增殖和存活的关键驱动因素^[2-3]。代表药物瑞维美尼 (Revumenib) 在复发/难治性 KMT2A 重排 AML 中显示出明确临床活性, 单药总体缓解率 (overall response rate, ORR) 约 63%, 联合治疗可进一步提升疗效^[4]。但单药治疗仍存在局限性, 目前已报道的临床研究中, 其完全缓解率 (complete remission, CR) 仅为 20%~40%, 提示多数患者治疗效果有限; 且已有研究表明 MEN1 体细胞突变可介导 Menin 抑制剂的获得性耐药, 这类突变可削弱抑制剂与 menin 的结合并影响其临床疗效, 进而导致疾病复发^[3-4]。

为提高 Menin 抑制剂的疗效、减少耐药的发生, 联合治疗已成为当前值得关注的策略之一。近年来, 围绕 KMT2A 重排 AML 的靶向治疗研究不断推进, 如何选择具有合理的机制基础且具备临床转化潜力的联用药物, 成为提升治疗效果的关键问题。在众多备选联用药物中, 砷剂作为经典抗白血病药物, 已在急性早幼粒细胞白血病中显示出明确疗效, 其主要作用机制包括诱导氧化应激、调控凋亡相关信号通路^[5-6, 9]。砷剂凭借其明确的抗白血病活性及丰富的临床应用经验, 成为 Menin 抑制剂联合

治疗的合理候选药物。二者作用机制相互独立且高度互补, Menin 抑制剂主要通过阻断 Menin-KMT2A 复合物结合、沉默异常 HOXA/MEIS1 转录网络以抑制肿瘤细胞恶性增殖, 而砷剂可通过加剧氧化应激、诱导 DNA 损伤及激活内源性凋亡通路直接杀伤 AML 细胞, 形成“抑增殖+促凋亡”的联合增强效应, 这是多数化疗药物或靶向药物难以实现的联合增效作用模式。砷剂的细胞毒性机制可能缓解 Menin 抑制剂对耐药克隆的选择压力, 二者的机制互补性为联合应用提供了合理依据。此外, 砷剂在部分高危 AML 亚型中具备明确的抗白血病活性及联用基础, 已有大量文献证实其与靶向药物联用的安全性和增效潜力^[5-6]。但砷剂同样存在关键缺陷: QT 间期延长、心肌损伤等毒副作用较强, 且在白血病部位富集不足, 难以实现高效低毒的目标^[7-8]; 更重要的是, 两药游离联用易引发毒性叠加、骨髓及白血病细胞靶向富集不足等问题, 限制了其临床直接应用。

纳米递送系统有望改善 Menin 抑制剂与砷剂联合治疗中的递送效率与安全性。近年来, 针对 AML 的靶向纳米递送及双药共递送体系已得到较多探索^[10-13]。将两药共包载于聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 修饰纳米载体中, 可提升药物稳定性并延长体内循环时间, 从而增加白血病相关部位的药物暴露, 促进细胞内同步释放, 增强联合治疗效应, 并降低正常组织非特异性分布所致的毒性, 尤其是砷剂相关心脏毒性及联合用药的毒性叠加风险。然而现有砷剂纳米递送体系普遍存在包封率偏低、制备流程烦琐等局限, 难以同步兼顾高药物包封率与简便制备工艺, 这也进一步凸显了本研究构建 PEG 修饰双药纳米颗粒的必要性。

基于此, 本研究构建共载 Revumenib 与三价砷剂亚砷酸钠 (sodium arsenite, NaAsO_2) 的 PEG 修饰双药纳米颗粒 (Revumenib-sodium arsenite

PEG-modified nanoparticles, Revu-As@PEG-NP), 在 MOLM-13、MV-4-11 2 株 AML 细胞系中系统评价其体外抗 AML 活性, 为双药纳米递送系统面向 KMT2A 重排高危 AML 的临床转化提供体外实验依据, 为此类白血病的靶向联合干预提供新思路。

1 材料与方法

1.1 双药纳米药物的制备

本研究采用课题组前期自主研制并已申请专利二的硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇(distearoyl phosphoethanolamine-polyethylene glycol, DSPE-PEG)修饰铜-亚砷酸钠原位配位自组装体系, 共包载砷剂与 Menin 抑制剂 Revumenib。分别配制: 氯化铜溶液(5 $\mu\text{mol/L}$)、DSPE-PEG 溶液(1 mg/mL)、亚砷酸钠溶液(10 $\mu\text{mol/L}$)及 Revumenib 溶液(10 mg/mL)。先将 5 μL Revumenib 溶液加入 2 mL DSPE-PEG 溶液中充分混匀, 得到载 Revumenib 的 DSPE-PEG 混合液。取 1 mL 氯化铜溶液加入 6 mL 去离子水混匀, 再将上述含药 DSPE-PEG 混合液缓慢滴入其中, 室温搅拌反应 30 min; 随后于 50~60 $^{\circ}\text{C}$ 条件下滴加 1 mL 亚砷酸钠溶液, 继续搅拌反应 2 h, 即制得 Revu-As@PEG-NP 双药纳米粒, 控制 Cu/As 摩尔比为 1:2。该比例主要基于纳米材料组分设计与结构构建的需求, 其中铜作为材料组成元素及配位/结构调控因素存在, 整体含量较低。根据既往研究报道, 低剂量铜基材料通常具有良好的生物相容性, 据此推测, 本研究中铜组分不会对后续生物学评价造成明显干扰^[14-16]。

1.2 纳米颗粒表征

采用动态光散射法(dynamic light scattering, DLS)测定纳米颗粒的水合粒径、多分散指数(polydispersity index, PDI)及 Zeta 电位; 将纳米颗粒室温静置 5 d, 每日检测粒径与 PDI 变化, 以评价储存稳定性。采用电感耦合等离子体质谱(inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS)测定砷元素含量, 计算亚砷酸钠包封率; 采用高效液相色谱(high-performance liquid chromatography, HPLC)测定 Revumenib 含量, 计算 Revumenib 包封率。

1.3 细胞来源与培养

本研究采用的人急性髓系白血病细胞系 MV-4-11 和 MOLM-13 均购自美国典型培养物研究所, 两者均为 KMT2A 基因重排阳性的 AML 模型细胞系, 已被广泛用于 Menin-KMT2A 相互作用的药理学与机制研究^[17-18]。细胞使用 RPMI 1640 培养基(Gibco)培养, 培养基中添加 10% 胎牛血清(FBS, Gibco)与 1% 青霉素-链霉素双抗溶液(Gibco), 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度培养箱中进行常规传代, 取对数生长期的细胞用于后续实验。

1.4 CCK-8 法检测细胞增殖活力

将 MV-4-11 和 MOLM-13 细胞以 5×10^5 个/mL 的密度接种于 96 孔板, 分为空白对照组、NaAsO₂ 组、Revumenib 组、Revu-As@PEG-NP 组, 设置 6 个浓度梯度, 每组每个浓度设 5 个复孔。药物处理 48 h 后, 每孔加入细胞计数试剂盒-8

(cell counting kit-8, CCK-8)试剂, 继续孵育 1 h, 使用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(absorbance, A)值, 计算细胞存活率。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡

将 MV-4-11 和 MOLM-13 细胞以 5×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔板, 每孔加入 2 mL 细胞悬液, 分为空白对照组、NaAsO₂ 组、Revumenib 组、Revu-As@PEG-NP 组, 各组统一采用 6 $\mu\text{mol/L}$ 药物浓度进行体外处理。药物处理 48 h 后收集各组细胞, 采用 Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒避光染色, 通过流式细胞仪检测细胞凋亡比例, 评估纳米颗粒的凋亡诱导效应。

1.6 细胞内摄取实验

为评估 Revu-As@PEG-NP 的细胞内摄取效率, 采用罗丹明 B(rhodamine B)对纳米颗粒进行荧光标记。实验共设置三组: 空白对照组、罗丹明 B 组、Revu-As@PEG-NP 组。取 MV-4-11 与 MOLM-13 细胞以 5×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔板, 每孔加入 2 mL 细胞悬液, 分别加入对应处理液孵育 4 h; 其中罗丹明 B 组加入等量游离罗丹明 B 溶液, Revu-As@PEG-NP 组加入罗丹明 B 标记的 Revu-As@PEG-NP 悬液, 空白对照组加入等体积培养基。处理结束后弃去培养液, 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)温和清洗细胞 2~3 次, 4% 多聚甲醛固定后, 使用荧光显微镜(Olympus/FV300)观察并记录纳米颗粒在细胞内的荧光分布与摄取情况。

1.7 流式细胞术检测细胞分化

取 MV-4-11 与 MOLM-13 细胞以 5×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔板, 每孔加入 2 mL 细胞悬液, 分为空白对照组、NaAsO₂ 组、Revumenib 组、Revu-As@PEG-NP 组, 各组统一采用 6 $\mu\text{mol/L}$ 药物浓度进行体外处理, 药物处理 48 h 后, 收集各组细胞, PBS 洗涤 2 次, 以 PBS 按 1:100 比例稀释 CD11b、CD14 荧光抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。PBS 洗涤并重悬细胞后, 使用流式细胞仪检测细胞表面分化抗原阳性表达率, 评价纳米颗粒对 AML 细胞的分化诱导作用。

1.8 统计学方法

所有实验数据采用 GraphPad Prism 10.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示; 2 组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间整体比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 Tukey's 多重比较检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 Revu-As@PEG-NP 纳米颗粒的理化表征

本研究成功制备了共载 Revumenib 与亚砷酸钠(sodium arsenite, NaAsO₂)的 Revu-As@PEG-NP 纳米颗粒, 并对其关键理化性质(包括粒径分布、Zeta 电位、储存稳定性及药物包封率)进行了系统表征(图 1)。DLS 结果显示, Revu-As@PEG-NP 的平均水合粒径为 136 nm, PDI 为 0.23(图 1A), 表明纳米颗粒粒径分布较均一、分散性良好。Zeta 电位分析结果显示, Revu-As@PEG-NP 表面电位为 -0.10 mV(图 1B), 接近中

性,有利于降低体内调理作用与非特异性清除,提升体内循环效率。储存稳定性评估结果显示,Revu-As@PEG-NP在室温条件下连续储存 5 d,其粒径与 PDI 均未出现明显波动(图 1C),提示该纳米体系稳定性良好,可满足体外实验与后续应用要求。药物包封率检测结果表明,Revu-As@PEG-NP 对 Revumenib 的包封率为 $(42.11 \pm 0.09)\%$,对 NaAsO_2 的包封率为 $(20.19 \pm 0.19)\%$ (图 1D);上述数据均为 3 次独立实验的平均值,2 种药物均呈现较高包封水平,该纳米载体可实现两种药物的有效包封。

2.2 Revu-As@PEG-NP 在 MOLM-13 与 MV-4-11 细胞中的内吞摄取

为验证 Revu-As@PEG-NP 是否能被 AML 细胞有效内吞,本研究采用罗丹明 B 对纳米颗粒进行荧光标记,并通过荧光显微镜观察其在细胞内的分布情况(图 2)。在 MOLM-13 细胞中,空白对照组未见明显红色荧光信号;罗丹明 B 组仅见微弱的点状荧光分布;而 Revu-As@PEG-NP 组的细胞质内可见红色荧光信号更强(图 2A)。在 MV-4-11 细胞中也观察到类似的趋势:Revu-As@PEG-NP 组的细胞内红色荧光信号比罗丹明 B 组与空白对照组更强(图 2B)。上述结果表明,Revu-As@PEG-NP 可被 MOLM-13 与 MV-4-11 细胞有效摄取,且强于罗丹明 B 组,为纳米颗粒在胞内释放药物、发挥抗 AML 效应提供了直接证据。

2.3 Revu-As@PEG-NP 对 MOLM-13 与 MV-4-11 细胞增殖的抑制作用

为评估 Revu-As@PEG-NP 对 AML 细胞的增殖抑制效应,采用 CCK-8 法检测不同浓度 NaAsO_2 、Revumenib 与

Revu-As@PEG-NP 处理 48 h 后, MOLM-13 和 MV-4-11 细胞的相对活力(图 3)。结果显示,游离亚砷酸钠、游离 Revumenib 与 Revu-As@PEG-NP 对 2 株细胞的增殖抑制均呈浓度依赖性,随药物浓度升高,细胞活力显著下降。在 MOLM-13 细胞中(图 3A),Revu-As@PEG-NP 增殖抑制效应优于游离亚砷酸钠和 Revumenib:低浓度($\leq 10 \mu\text{mol/L}$)时 Revu-As@PEG-NP 组细胞活力下降更明显,高浓度($20 \sim 40 \mu\text{mol/L}$)时降至约 15%,低于亚砷酸钠组的约 35% 与 Revumenib 组的约 50%。在 MV-4-11 细胞中(图 3B),Revu-As@PEG-NP 同样展现出优于游离亚砷酸钠和 Revumenib 的抑制效果:各浓度下 Revu-As@PEG-NP 组的细胞活力均低于亚砷酸钠组和 Revumenib 组,尤其在低浓度(如 $5 \mu\text{mol/L}$)时差异最为明显,提示双药纳米颗粒对 MV-4-11 细胞的增殖抑制效应更强。综合来看,Revu-As@PEG-NP 可抑制 2 株 AML 细胞增殖,且作用效果优于两种游离单药,体现出双药共递送体系具备联用增益的体外抗白血病潜力。

2.4 Revu-As@PEG-NP 对 MOLM-13 与 MV-4-11 细胞分化的诱导作用

为评估 Revu-As@PEG-NP 对 AML 细胞分化的诱导效应,本研究以 CD11b 与 CD14 为分化标志物,通过流式细胞术检测药物处理 48 h 后, MOLM-13 与 MV-4-11 细胞表面分化抗原的表达变化(图 4),每组实验独立重复 3 次($n=3$)。结果显示,在 MOLM-13 细胞中,与空白对照组相比, NaAsO_2 组与 Revumenib 组均可不同程度地上调 CD11b 和 CD14 的表达;Revu-As@PEG-NP 组的 CD11b(图 4A)与 CD14(图 4B)荧光峰位置明显右移、荧光信号更强,提示 Revu-As@PEG-NP

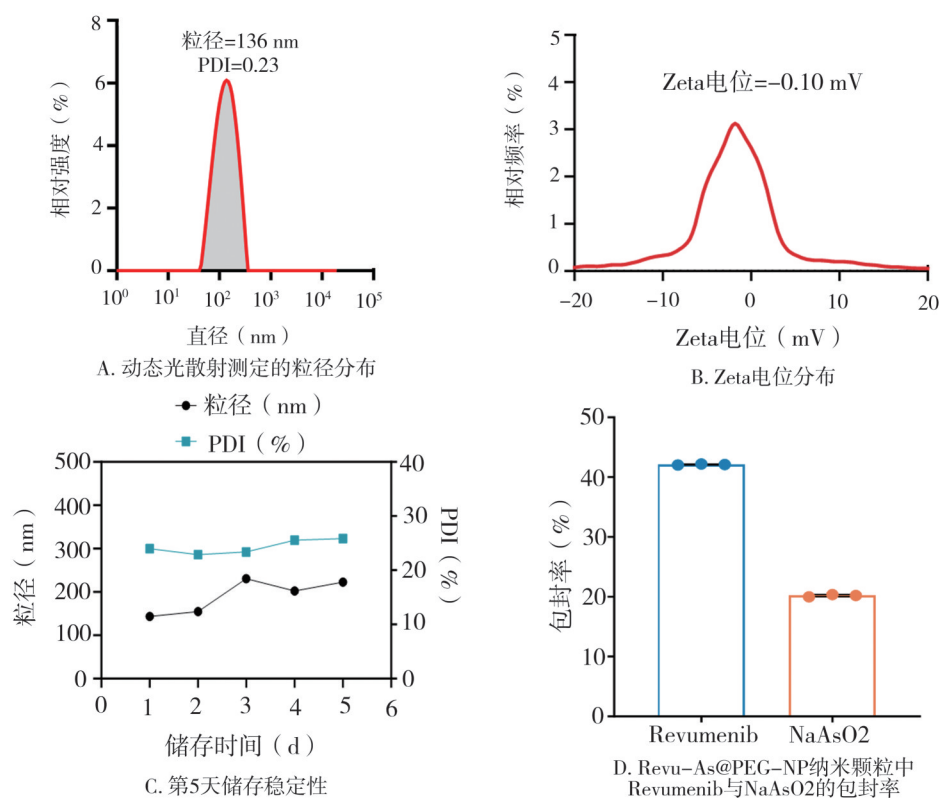


图 1 Revu-As@PEG-NP 纳米颗粒的理化表征

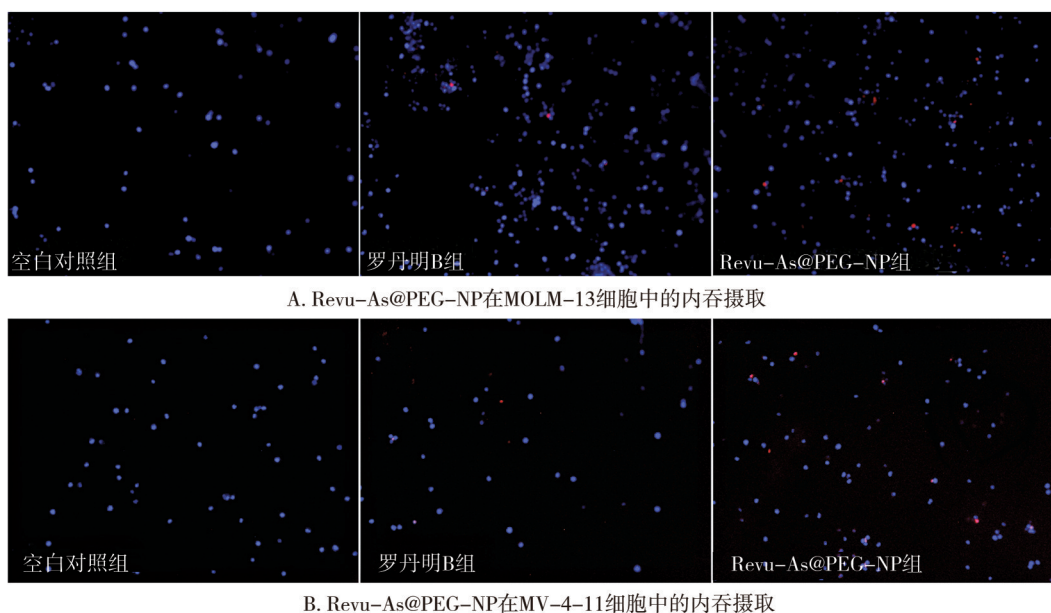


图2 荧光显微镜观察 Revu-As@PEG-NP 在 MOLM-13 与 MV-4-11 细胞中的内吞摄取 (罗丹明 B 标记)

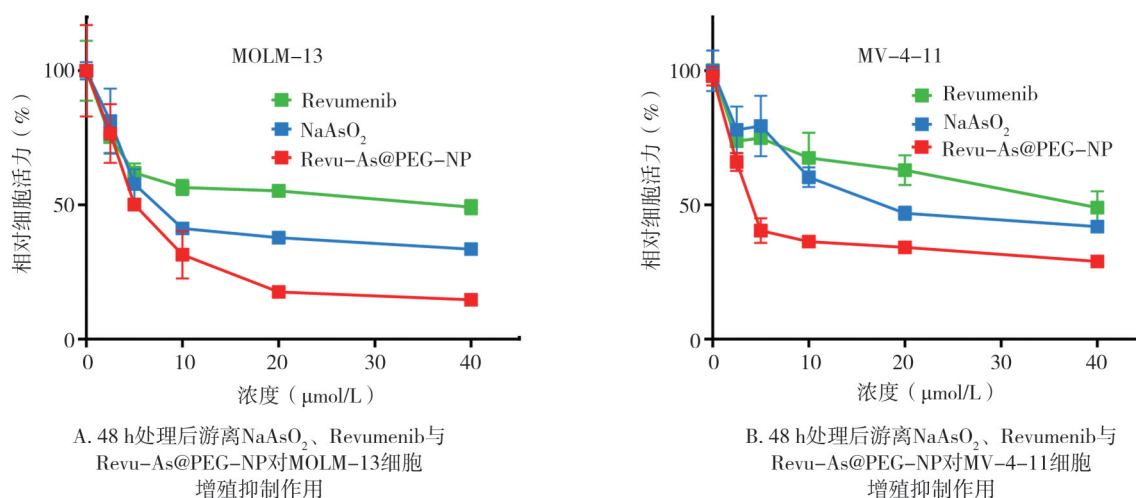


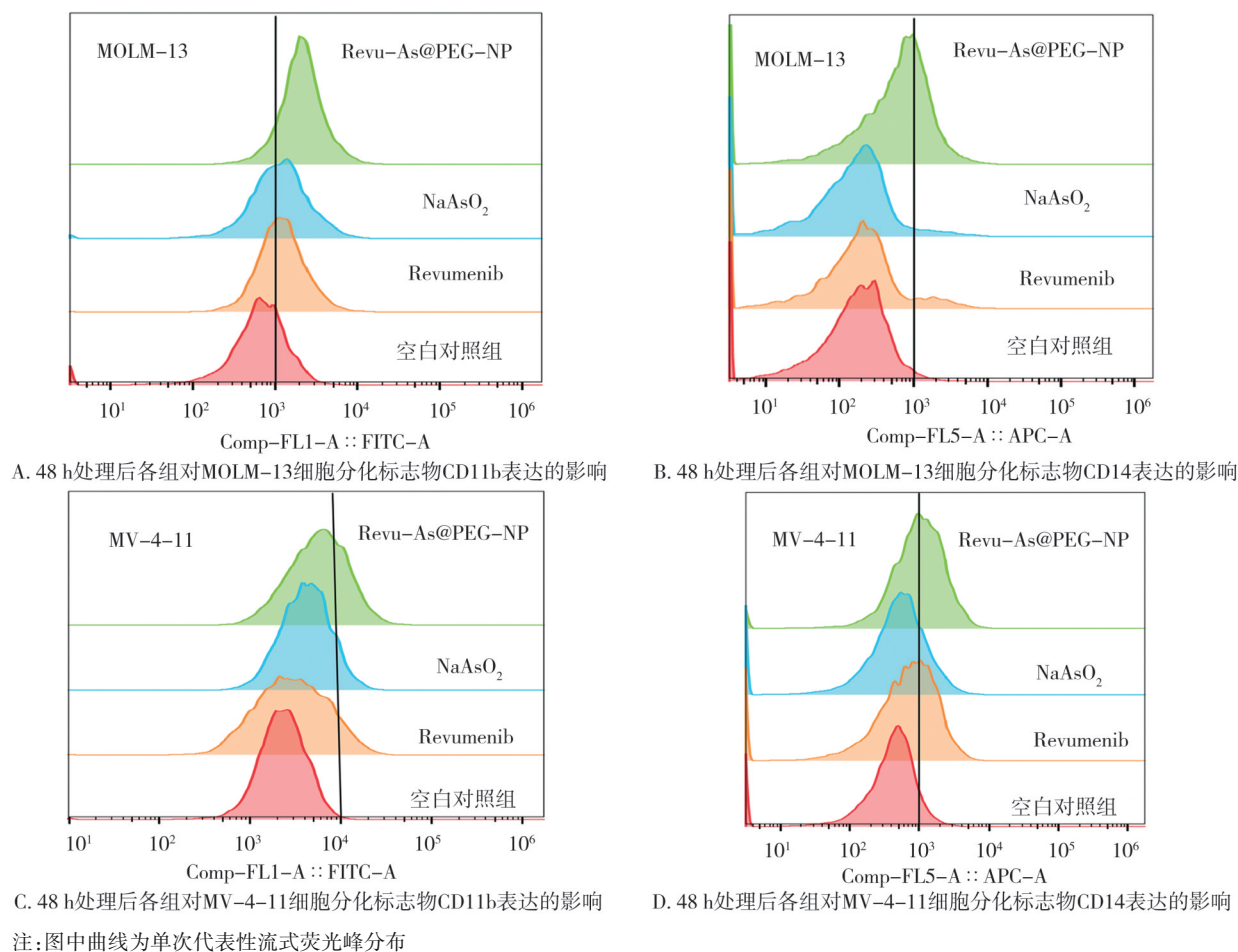
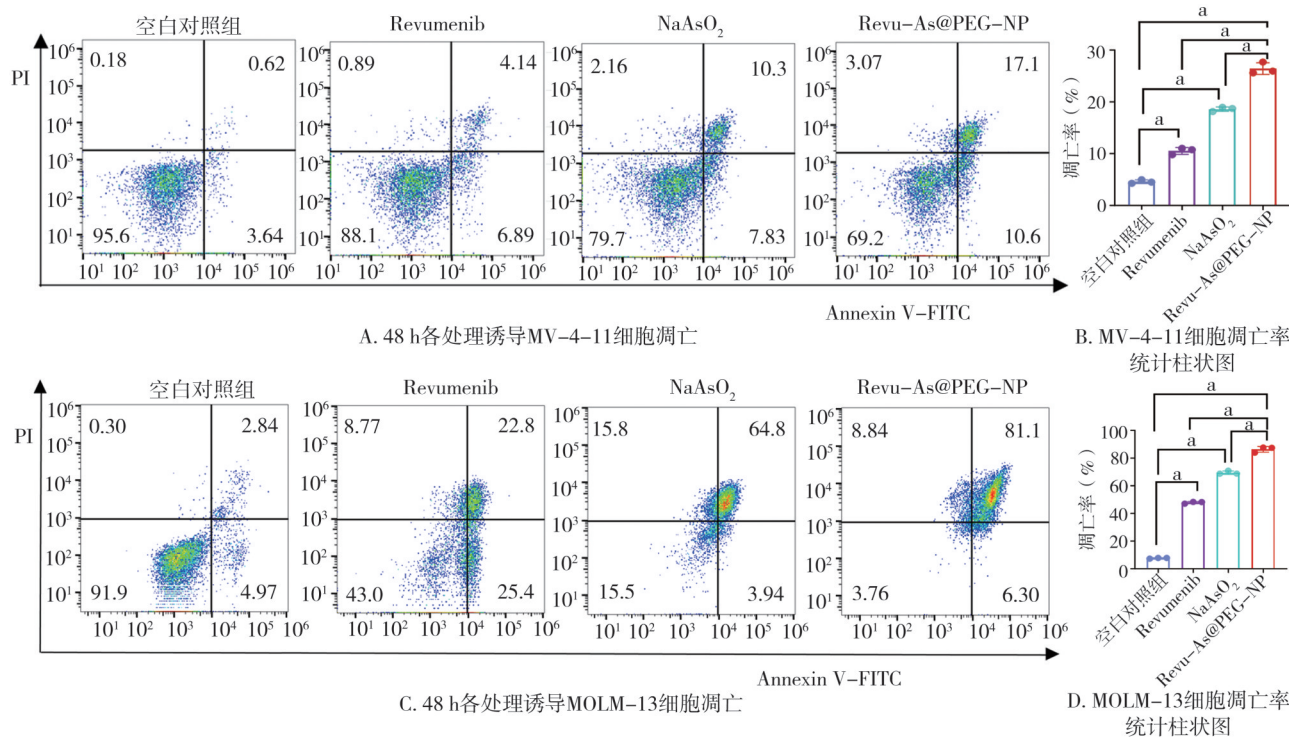
图3 游离 NaAsO₂、Revumenib 与 Revu-As@PEG-NP 处理 48 h 后对 AML 细胞的增殖抑制作用

能更有效地诱导 MOLM-13 细胞向成熟髓系细胞分化。在 MV-4-11 细胞中也观察到一致的趋势: Revu-As@PEG-NP 组的 CD11b (图 4C) 与 CD14 (图 4D) 荧光峰同样相较空白对照组、游离 NaAsO₂ 组及 Revumenib 组明显右移, 荧光强度更高, 表明 Revu-As@PEG-NP 同样具备更强的诱导 MV-4-11 细胞分化成熟的能力。上述结果表明, Revu-As@PEG-NP 可通过双药协同作用, 上调 AML 细胞表面成熟分化标志物的表达, 有效诱导 AML 细胞分化, 为其抗 AML 效应提供了新的实验依据。

2.5 Revu-As@PEG-NP 对 MOLM-13 与 MV-4-11 细胞凋亡的诱导作用

为评估 Revu-As@PEG-NP 对 AML 细胞凋亡的诱导效应, 采用 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术, 检测 48 h 药物处理后 MV-4-11 与 MOLM-13 细胞的凋亡水平 (图 5)。每组实验独立重复 3 次 ($n=3$), 结果重复性良好。在 MV-4-11 细

胞中 (图 5A、B), 4 组细胞凋亡率整体差异有统计学意义 [$F(3, 8)=542.5, P<0.001$]; 空白对照组凋亡率约 5%, Revumenib 组凋亡率约 10%, NaAsO₂ 组凋亡率约 18%, Revu-As@PEG-NP 组凋亡率高达 25%, 显著高于其他 3 组 (均 $P<0.001$)。在 MOLM-13 细胞中 (图 5C、D), 凋亡趋势与 MV-4-11 细胞一致; 4 组细胞凋亡率整体差异有统计学意义 [$F(3, 8)=2147, P<0.001$]; 空白对照组凋亡率约 8%, Revumenib 组凋亡率约 48%, NaAsO₂ 组凋亡率约 70%, Revu-As@PEG-NP 组凋亡率显著升高至 88%, 显著高于单药处理组 (均 $P<0.001$)。2 组细胞 Brown-Forsythe 方差齐性检验 ($P>0.05$), 满足单因素方差分析适用条件。上述结果表明, Revu-As@PEG-NP 可显著诱导 AML 细胞凋亡, 且效果明显优于游离亚砷酸钠和游离 Revumenib 单药, 提示双药纳米颗粒通过联合增强作用发挥了更强的促凋亡效应, 为其高效抗 AML 作用提供了关键实验证据。

图4 流式检测NaAsO₂、Revumenib、Revu-As@PEG-NP处理48 h后对AML细胞分化标志物CD11b、CD14表达的影响图5 流式检测NaAsO₂、Revumenib、Revu-As@PEG-NP处理48 h后诱导AML细胞凋亡情况

3 讨 论

KMT2A 重排 AML 由于 HOXA/MEIS1 通路持续异常激活,导致细胞分化阻滞、凋亡逃逸,临床预后极差,是目前亟待突破的治疗难点^[19-20]。Menin-KMT2A 相互作用是维持该类白血病恶性表型的核心分子节点,Revumenib 作为高选择性 Menin 抑制剂,可特异性阻断二者结合并下调 HOXA/MEIS1 转录程序,解除分化阻滞并诱导凋亡,已在临床中展现明确疗效^[21-24]。砷剂可通过诱导活性氧蓄积、触发 DNA 损伤并激活线粒体凋亡通路杀伤白血病细胞,在非 APL 型 AML 中具备良好联合增效潜力^[25-27]。然而,Revumenib 易出现 MEN1 基因突变介导的耐药,砷剂则存在心脏毒性及靶向性不足等问题,二者单独应用均存在显著局限性^[8,19]。

纳米递送系统可实现双药同步胞内释放,理论上能够提高药物肿瘤富集、降低全身毒性,是优化联合治疗方案的理想手段^[28-29]。但传统砷剂纳米制剂普遍存在包封率偏低、制备复杂、稳定性差等问题,难以满足临床转化需求^[30-31]。基于此,本研究采用铜-砷原位配位自组装技术,构建 PEG 修饰的双药纳米颗粒 Revu-As@PEG-NP,实现 Revumenib 与砷剂的高效共包载与胞内协同递送。

理化性质表征显示,Revu-As@PEG-NP 粒径均一、分散性与胶体稳定性良好,近中性表面有助于减少非特异性吸附并延长体内循环时间,为肿瘤靶向递送奠定基础;同时该纳米体系对两种药物的包封率优于常规砷单药纳米载体,可实现双药有效包裹。既往文献已证实砷剂纳米递送可提升砷剂抗 AML 活性、降低全身毒性^[32],但不同砷剂纳米体系的包封率仍受载体类型和制备工艺等因素影响,存在较大差异。本研究所制备的体系对砷剂的包封率为 20.19%,虽然并非最高水平,但已能够支持后续药效学研究。更重要的是,目前尚缺乏将砷剂与 Menin 抑制剂共同负载于同一纳米平台的相关报道,本研究在联合递送策略方面具有一定创新性和潜在转化价值。结合细胞摄取实验结果证实其可被 MOLM-13 与 MV-4-11 细胞高效内吞,为胞内双药同步起效提供前提。

体外实验表明,Revu-As@PEG-NP 对 KMT2A 重排 AML 细胞的增殖抑制效果优于游离单药。CCK-8 检测结果显示,该纳米药物可呈浓度依赖性抑制 AML 细胞增殖,双药联用增效作用明显。流式

细胞术凋亡分析显示,其可显著提升 AML 细胞凋亡水平,在 MOLM-13、MV-4-11 细胞中效果均优于游离单药组。其发挥作用的潜在机制如下:Revumenib 通过阻断 Menin-KMT2A 相互作用,下调 HOXA/MEIS1 异常转录,增强肿瘤细胞的凋亡敏感性^[24];砷剂则促进胞内活性氧大量蓄积,诱发 DNA 损伤并激活线粒体凋亡通路,直接诱导 AML 细胞凋亡^[27]。2 种药物作用机制互补、效应叠加,共同强化抗 AML 作用,这也与本研究 Revu-As@PEG-NP 组凋亡率显著高于单药组的趋势一致。

分化实验进一步证实,Revu-As@PEG-NP 可上调髓系分化标志物 CD11b、CD14 的表达水平,有效诱导 KMT2A 重排 AML 细胞向成熟髓系细胞分化,分化诱导效果优于游离单药。一方面,Revumenib 能够有效解除 AML 细胞的分化阻滞;另一方面,砷剂可辅助推动髓系终末分化进程。二者联用实现抑制干性、促成熟的双重调控,从根源上逆转 AML 细胞的恶性表型。

Menin 抑制剂通过阻断 Menin-KMT2A 复合物形成,抑制 HOXA/MEIS1 通路异常激活;砷剂主要通过诱导氧化应激、DNA 损伤及线粒体凋亡通路发挥直接抗肿瘤作用。现有研究已证实 2 种药物联用具备体外协同潜力,但砷剂逆转 Menin 抑制剂获得性耐药的具体机制与临床证据仍较为匮乏。本研究仅验证了 Revu-As@PEG-NP 的体外抗 AML 效应,其体内治疗效果及双药联合作用的深层分子机制,仍有待后续实验进一步探究。

综上,本研究成功构建了 PEG 修饰的 Menin 抑制剂-砷剂双药纳米颗粒 Revu-As@PEG-NP。该纳米体系理化性质稳定、包封率较高且可被 AML 细胞高效摄取,体外可抑制 KMT2A 重排 AML 细胞增殖、诱导细胞凋亡、促进髓系分化,具备显著体外抗白血病活性,可为 KMT2A 重排 AML 的靶向联合干预提供体外研究新思路,具备良好的基础研究价值。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 林笑宇:研究方案设计、实施研究、分析数据、论文撰写;戴嘉彤、陈嘉杰:实验技术指导、实施研究、分析数据;宋诗尧、樊重:研究方案设计、实验技术指导;黄芷雯、何蕾洁:数据收集;唐燕来:研究方案设计、研究指导、论文修改

参 考 文 献

- [1] DiNardo CD, Erba HP, Freeman SD, et al. Acute myeloid leukaemia[J]. Lancet, 2023, 401 (10393): 2073-2086.
- [2] Issa GC, Aldoss I, DiPersio J, et al. The menin inhibitor revumenib

- in KMT2A-rearranged or NPM1-mutant leukaemia[J]. *Nature*, 2023, 615(7954):920-924.
- [3] Syed YY. Revumenib: first approval[J]. *Drugs*, 2025, 85(4):577-583.
- [4] Cao GJ, Zhang HX, Sun S, et al. Menin inhibitors from monotherapies to combination therapies: clinical trial updates from 2024 ASH annual meeting[J]. *J Hematol Oncol*, 2025, 18(1):63.
- [5] Kantarjian HM, DiNardo CD, Kadia TM, et al. Acute myeloid leukemia management and research in 2025[J]. *CA Cancer J Clin*, 2025, 75(1):46-67.
- [6] Kepp O, Pan H, Liu P, et al. Arsenic trioxide as an inducer of immunogenic cell death[J]. *Oncoimmunology*, 2023, 12(1):2174723.
- [7] Fang Y, Zhang Z. Arsenic trioxide as a novel anti-glioma drug: a review[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2020, 25:44.
- [8] Yan M, Wang H, Wei R, et al. Arsenic trioxide: applications, mechanisms of action, toxicity and rescue strategies to date[J]. *Arch Pharmacol Res*, 2024, 47(3):249-271.
- [9] Dai B, Wang F, Wang Y, et al. Targeting HDAC3 to overcome the resistance to ATRA or arsenic in acute promyelocytic leukemia through ubiquitination and degradation of PML-RAR α [J]. *Cell Death Differ*, 2023, 30(5):1320-1333.
- [10] Yu YH, Meng YB, Xu X, et al. A ferroptosis-inducing and leukemic cell-targeting drug nanocarrier formed by redox-responsive cysteine polymer for acute myeloid leukemia therapy[J]. *ACS Nano*, 2023, 17(4):3334-3345.
- [11] Mehrotra N, Anees M, Tiwari S, et al. Polylactic acid based polymeric nanoparticle mediated co-delivery of navitoclax and decitabine for cancer therapy[J]. *Nanomater Nanotechnol Biol Med*, 2023, 47:102627.
- [12] Gundersen ET, Førde JL, Tislevoll BS, et al. Repurposing chlorpromazine for anti-leukaemic therapy by nanoparticle encapsulation[J]. *Int J Pharm*, 2022, 612:121296.
- [13] 张少琪, 孙洁. 纳米药物递送系统在急性髓细胞白血病治疗中的应用[J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2022, 51(2):233-240.
- Zhang SQ, Sun J. Nano-drug delivery system for the treatment of acute myelogenous leukemia[J]. *J Zhejiang Univ Med Sci*, 2022, 51(2):233-240.
- [14] Dong CH, Feng W, Xu WW, et al. The copper age: copper (Cu)-involved nanotheranostics[J]. *Adv Sci*, 2020, 7(21):2001549.
- [15] 朱文俊, 张议月, 罗秀菊, 等. 铜及其复合物在心血管疾病中的作用[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2023, 48(11):1731-1738.
- Zhu WJ, Zhang YY, Luo XJ, et al. Role of copper and its complexes in cardiovascular diseases[J]. *J Cent South Univ Med Sci*, 2023, 48(11):1731-1738.
- [16] 向思佳, 刘扬中. 微量元素铜与人体生理功能和疾病[J]. *大学化学*, 2022, 37(3):1-7.
- Xiang SJ, Liu YZ. The essential trace element copper in human physiology and pathology[J]. *Univ Chem*, 2022, 37(3):1-7.
- [17] Aryal S, Curtiss BM, Zhou XY, et al. A Perturb-seq map of a differentiation hub reveals synergistic vulnerabilities in KMT2A-rearranged acute myeloid leukemia[J]. *Leukemia*, 2026, 40(5):996-1008.
- [18] Daigle SR, Olhava EJ, Therkelsen CA, et al. Selective killing of mixed lineage leukemia cells by a potent small-molecule DOT1L inhibitor[J]. *Cancer Cell*, 2011, 20(1):53-65.
- [19] Salman MY, Stein EM. Revumenib for patients with acute leukemia: a new tool for differentiation therapy[J]. *Haematologica*, 2024, 109(11):3488-3495.
- [20] Martínez-Gamboa DA, Kaner J. Revumenib: a new era in acute leukemia treatment[J]. *Trends Cancer*, 2025, 11(2):81-83.
- [21] Issa GC, Aldoss I, Thirman MJ, et al. Menin inhibition with revumenib for KMT2A-rearranged relapsed or refractory acute leukemia[J]. *J Clin Oncol*, 2025, 43(1):75-84.
- [22] Fiskus W, Boettcher S, Daver N, et al. Effective Menin inhibitor-based combinations against AML with MLL rearrangement or NPM1 mutation[J]. *Blood Cancer J*, 2022, 12(1):5.
- [23] Wang W, Li HJ, Huang ML, et al. *Hoxa9/meis1*-transgenic zebrafish develops acute myeloid leukaemia-like disease with rapid onset and high penetrance[J]. *Open Biol*, 2022, 12(10):220172.
- [24] Ahmed N, Ali S, Asif ML, et al. Menin inhibitors as targeted therapy in KMT2A-Rearranged acute leukemia: a comprehensive review of current advances and therapeutic implications[J]. *Med Oncol*, 2025, 43(1):27.
- [25] Cavali S, Tonnus W, Linkermann A. Immunological consequences of arsenic trioxide-induced necrosis[J]. *Cell Mol Immunol*, 2023, 20(3):308-309.
- [26] Huff J, Waalkes M, Nyska A, et al. Re: apoptosis and growth inhibition in malignant lymphocytes after treatment with arsenic trioxide at clinically achievable concentrations[J]. *JNCI J Natl Cancer Inst*, 1999, 91(19):1690-1691.
- [27] Chen JF, Jin ZQ, Zhang SQ, et al. Arsenic trioxide elicits prophylactic and therapeutic immune responses against solid tumors by inducing necroptosis and ferroptosis[J]. *Cell Mol Immunol*, 2023, 20(1):51-64.
- [28] Peuler K, Dimmitt N, Lin CC. Clickable modular polysaccharide nanoparticles for selective cell-targeting[J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 234:115901.
- [29] Zhu Y, Li QS, Zhou Y, et al. Baiting-enhanced extravasation of lipid nanoparticles for targeted co-delivery of decitabine and siTNF- α to the bone marrow niche in leukemia therapy[J]. *J Control Release*, 2026, 394:114874.
- [30] Yang SQ, Raza F, Li KW, et al. Maximizing arsenic trioxide's anticancer potential: Targeted nanocarriers for solid tumor therapy[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2024, 241:114014.
- [31] 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(3):239-251.
- [32] Wang CL, Zhang W, He YJ, et al. Ferritin-based targeted delivery of arsenic to diverse leukaemia types confers strong anti-leukaemia therapeutic effects[J]. *Nat Nanotechnol*, 2021, 16(12):1413-1423.

(收稿:2026-04-29;修回:2026-06-25;录用:2026-06-28)

(责任编辑:周一青)

本文引用格式:

林笑宇, 戴嘉彤, 宋诗尧, 等. 共载 Menin 抑制剂与砷剂的 PEG 化纳米递送系统: 制备、表征及抗 AML 作用研究[J]. 重庆医科大学学报, 2026, 51(8):1094-1101.