

· 论 著 ·

## 载 5-FU 免疫纳米微粒的体外释药及其抗癌效应研究 \*

黄开红 刘建化 王凌云 朱兆华 陈其奎 闵 军<sup>①</sup> 陈汝福<sup>①</sup>  
中山大学附属第二医院消化内科 (广州市 510120)

**摘要** 目的:研究生物可降解抗癌药载 5-FU 免疫纳米微粒的释药特点,鉴定其体外杀伤肿瘤细胞的活性。方法:采用恒温振荡透析法和一阶导数紫外分光光度法测定了载 5-FU 免疫纳米微粒的药物释放特性;MTT 法测定了不同时间相载 5-FU 免疫纳米微粒对 5 种肿瘤细胞株的杀伤活性。结果:载 5-FU 免疫纳米微粒具有良好的缓释功能,半量释放期  $t_{1/2}$  为 10.4 天。载 5-FU 免疫纳米微粒对 5 种肿瘤细胞株均有较强的杀伤活性,且杀伤活性与作用时间和释药量呈正相关关系。结论:载 5-FU 免疫纳米微粒中药物分布均匀;载 5-FU 免疫纳米微粒制备和溶蚀过程对 5Fu 的药效无影响。载 5-FU 免疫纳米微粒具有良好的缓释功能。能在较长时间内维持有效的杀伤活性。

**关键词** 载 5-FU 免疫纳米微粒 缓释 抗癌效应

## Slow-Release In Vitro Characteristics and Anticancer Effects of 5-fluorouracil-Loaded Immunological Nanoparticles

Huang Kaihong Liu Jianhua Wang Lingyun et al

*Institute of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital of Sun Yatsen University, Guangzhou*

**Abstract Objective:** To investigate the slow-release characteristics and antitumor effects of the bio-soluble 5-fluorouracil-loaded immunological nanoparticles, prepared by attaching anti-VEGF monoclonal antibodies to 5-fluorouracil-loaded polylactic acid nanoparticles (5-FU-PA-NPs), in order to assess their anti-tumor activity in vitro. **Methods:** Constant temperature vibration dialysis and MTT colorimetric assays were used. **Results:** The 5-FU-PA-NPs showed appropriate extended release with a half-life of 10.4 days. There was a positive correlation between the anti-tumor activity and the reaction time and dose of the controlled release. **Conclusion:** The 5-FU-PA-NPs show a uniform drug deposition, and the therapeutic effect is not affected by preparation and metabolic breakdown of the drug. The 5-FU-PA-NPs have a well-controlled release which can maintain effective tumor-killing activity for an extended period.

**Key words** 5-FU-PA-NPs Controlled release Anti-tumor effect

具有靶向给药功能的免疫纳米微粒靶向制剂可在抗体引导将药物有效定位于相应抗原部位,减少网状内皮系统的吞噬<sup>[1]</sup>。本研究以 5-FU (5-fluorouracil) 为靶向药物,以具有生物相容性、可降解性和缓释性的聚乳酸作为载体材料,以抗 VEGF121 抗

体为导向抗体,制备了载 5-FU 的免疫纳米微粒,它具备可定向植入和缓慢溶蚀释放的特性,不仅能提高药物的利用率,增强对肿瘤细胞的通透并保留效应,提高抗肿瘤效果,而且还可减轻药物的全身性毒副作用,具有良好的开发和应用前景<sup>[2]</sup>。本研究对载

\* 本文课题受国家自然科学基金(编号:30670951)、广东省自然科学基金(编号:06021322)、

广州市科技攻关项目基金资助(编号:2003Z3-E0351)

通讯作者:黄开红 huangkaih@21cm.com

5-FU 免疫纳米微粒进行了体外释药特性和肿瘤杀伤活性的测定,为载 5-FU 免疫纳米微粒用于临床肿瘤的介入治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验仪器与材料

JY92-型超声波细胞粉碎机购自上海新芝生物技术研究所,HITACHIX-650 型扫描电子显微镜为 Philips 公司产品,100CX-透射电子显微镜 Geol 光学显微镜为日本 Olympus 光学工业公司产品,PHI-1600 光电子能谱仪购自 Perkin-Elmer 公司,UV-9100 型紫外-可见分光光度计为北京瑞利分析仪器有限公司;5-FU 原料药购自天津旭东海普药业有限公司,聚乳酸(DL 型,MW=30 000)购自山东济南医药研究所,牛血清白蛋白购自天津血液研究所,MTT (四甲基氮唑蓝)为 Sigma 产品。载 5-FU 免疫纳米微粒由中山大学附属第二医院消化内科采用超声乳化法制备载 5-FU 纳米微粒<sup>[2]</sup>,与抗 VEGF 单克隆抗体偶联而成<sup>[3]</sup>,微粒平均直径 210nm,含药量 15.2%。胰腺癌细胞 SW1990;人肝癌 Hep G2、人胃癌 MGC803、人结肠癌细胞株 SW480 和食道癌细胞株 Eca9706 均引自上海细胞研究所。

1.2 体外释药特性测定

精密称取载 5-FU 免疫纳米微粒 50mg,装入透析袋内,扎紧后放入盛有 100ml PBS(pH7.4)的烧杯中,烧杯置 37℃水平恒温振荡器(频率 60r/min),并开始计时。于一定时间取样 5ml,同时补加 5ml 空白 PBS,所取样本用 UV-9100 型紫外-可见分光光度计测定 5-FU 含量,以 3 次实验取均值,绘制药物释放表,计算半量释放时间(t<sub>1/2</sub>)。

1.4 MTT 法检测载 5-FU 免疫纳米微粒的肿瘤杀伤活性

收集生长良好的肿瘤细胞,制成 1×10<sup>5</sup>/ml 悬液,加入 96 孔平底板,0.1ml/孔。载 5-FU 免疫纳米微粒用,用 PBS 倍比稀释至所需浓度,0.1ml/孔加样。每样品重复 3 份,同时设单纯裸药 5-FU、空载纳米及培养液空白对照组(5-FU 对照组以不同时间内释药量给药,作用 24h 后撤药补新鲜 RPMI21640)。37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养 2、4、7 天,于测定前 4h 加入 MTT 0.01ml/孔。测定时一次甩干板中上清,加入 DMSO 0.2ml/孔,酶标仪(DG3022A 型)570nm 测 A 值,计算杀伤百分率:

杀伤百分率=空白组 A 值-实验组 A 值/空白组 A 值×100%

2 结果

2.1 载 5-FU 免疫纳米微粒的释药作用

载 5-FU 免疫纳米微粒,经 3 批实验测得 T<sub>1/2</sub> 为 5.3 天在 0.5,1,2,3,5,7,9,11 天的释放率分别为 23.8%,26.3%,31.6%,38.8%,48.2%,65.8%,92.7%,94.9%。

2.2 肿瘤杀伤效应

2.2.1 载 5-FU 免疫纳米微粒对肿瘤细胞的杀伤效应

载 5-FU 免疫纳米微粒对 5 种肿瘤细胞株的杀伤活性有很大差异,作用 4 天时的杀伤活性见表 1。载 5-FU 免疫纳米微粒在本实验浓度范围内对肿瘤的杀伤率随浓度升高有上升趋势。空载纳米微粒和对照组肿瘤细胞生长良好无杀伤作用。

2.2.2 载 5-FU 免疫纳米微粒的肿瘤细胞杀伤动力学

载 5-FU 免疫纳米微粒的肿瘤杀伤活性虽因肿瘤类型而异,但随作用时间的延长,5-FU 释放量的增加,载 5-FU 免疫纳米微粒对 5 种瘤株的杀伤率均显著提高,杀伤活性与作用时间和药物释放量呈显著的正相关,见图 1。

表 1 载 5-FU 免疫纳米微粒对 5 种肿瘤细胞的杀伤活性 (%)

瘤株	药物浓度(mg/ml)					
	0.32	0.64	1.28	2.56	5.12	10.24
Hep G2	2.1±1.2	4.7±1.5	11.5±1.4	27.8±1.8	31.4±2.0	39.9±2.8
MGC803	11.4±3.5	26.8±3.0	38.9±4.1	54.9±4.8	76.8±3.2	91.5±4.4
SW480	14.6±4.6	29.5±3.1	41.7±4.8	64.2±3.4	83.9±5.7	93.8±4.6
SW1990	6.7±3.5	10.2±3.7	22.3±3.0	37.9±4.3	54.6±4.7	78.2±5.1
Eca9706	8.9±3.5	16.8±4.8	27.9±5.8	42.8±3.6	66.2±4.6	85.6±6.2

3 讨论

3.1 载 5-FU 免疫纳米微粒的体外缓释功能

纳米载药体系是粒径为 10~500nm 的固体胶状粒子,活性成分(药物、生物活性材料等)通过溶解包裹作用位于粒子内部,该系统可增溶疏水性药物,保

护药物活性,增加药物稳定性,增加药物在靶器官中的累积,提高治疗指数,减少毒副作用<sup>[4]</sup>。聚乳酸(PLA)作为一种可生物降解的生物医学高分子材料在人体内降解的最终产物是 CO<sub>2</sub> 和水,具有良好的生物相容性,降解产物可通过肾脏排出体外<sup>[5]</sup>。5-氟

尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)作为抗代谢药物, 抗癌谱较广, 是常用的肿瘤化疗药物之一。通常5-FU是经口服或静脉滴注给药, 连续使用可出现神经系统毒性等毒副反应, 限制了使用剂量和周期<sup>[6]</sup>。本研究用超声乳化法制备了PLA包载5-FU的生物降解性纳米粒, 粒径在200nm内, 经测定5-FU在微球中分布均匀, 具有良好的缓释功能<sup>[7]</sup>。我们选择抗VEGF单克隆抗体结合“弹头”药物5-FU-NPs, 成功地制备具有靶向和免疫功能的载5-FU免疫纳米微粒, 可用液体载体的流动形式经静脉给药, 其容易透过天然膜结构, 有利于提高靶点局部药物浓度发挥抗药物的抗肿瘤效应, 同时减少全身毒性。因此, 研制缓释效果好, 杀瘤活性高的抗癌微球药在临床肿瘤靶向介入治疗中具有重要的意义。

图1 载5-FU免疫纳米微粒的肿瘤杀伤活性与作用时间呈正相关

### 3.2 载5-FU免疫纳米微粒的肿瘤杀伤活性

5-FU的临床用量为750mg/周, 以每日100mg计, 血药浓度为0.02g/L。5-FU血浆半衰期约为6min, 其代谢产物80%12h内可被排出<sup>[8]</sup>。因此, 我们在设计和测定载5-FU免疫纳米微粒抗癌活性的同时, 根据释药特性, 做了不同作用时间(2d、4d、7d)相应释放剂量5-FU的对照观察, 结果表明纳米微粒的制备和释放过程对5-FU的药效无影响。人类消化系肿瘤对5-FU的作用均敏感, 但不同器官来源的肿瘤细胞对5-FU敏感程度不同。5-FU免疫纳米微粒的作用于胰腺癌细胞SW1990; 人肝癌Hep G2、人胃癌MGC803、人结肠癌细胞株SW480和食道癌细胞株Eca9706均敏感, 其中以胃癌和结肠癌更为敏感<sup>[9]</sup>。比较载5-FU免疫纳米微粒和5-FU的肿瘤杀伤动力学可以发现: 药物分别作用2天和4天时, 载5-FU免疫纳米微粒的杀伤活性略低于或

相当于5-FU的活性, 但随作用时间的延长(7天), 5-FU释放量的增加, 载5-FU免疫纳米微粒的肿瘤杀伤活性显著增强(杀伤活性比5-FU高10%~15%), 提示5-FU为时间效应性药物, 载5-FU免疫纳米微粒的缓释功能可维持较长时间的抗癌作用<sup>[10]</sup>。5-FU在血浆中半衰期短, 化疗时需大量频繁给药, 患者常出现明显的毒副反应, 载5-FU免疫纳米微粒具有可定向及缓释功能, 能较好地解决这一问题, 其研制和开发在肿瘤靶向介入治疗中具有良好的应用前景, 本研究结果为此类药的临床应用提供了初步的实验依据。

### 参考文献

- 1 Yi YM, Yang TY, Pan WM. Preparation and distribution of 5-fluorouracil (125) I sodium alginate-bovine serum albumin nanoparticles[J]. World J Gastroenterol, 1999, 5(1): 57~60
- 2 黄开红, 朱兆华, 刘建化, 等. 聚乳酸载药纳米微粒制备及其释药效能[J]. 癌症, 2005, 24(8): 1023~1026
- 3 黄开红, 王凌云, 赵晓龙, 等. 抗VEGF单克隆抗体偶联5-FU纳米微粒的初步研究[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(2): 258~261
- 4 Kukowska-Latallo JF, Candido KA, Cao Z, et al. Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer [J]. Cancer Res, 2005, 65(12): 5317~5324
- 5 Panyam J, Zhou WZ, Prabha S, et al. Rapid endo-lysosomal escape of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery[J]. FASEB J, 2002, 16(10): 1217~1226
- 6 Kim YA, Chung HC, Choi HJ, et al. Intermediate dose 5-fluorouracil-induced encephalopathy [J]. Jpn J Clin Oncol, 2006, 36(1): 55~59
- 7 黄开红, 赵晓龙, 朱兆华, 等. 5-氟尿嘧啶聚乳酸载药纳米微粒对人胃癌和结肠癌细胞株的体外杀伤效应 [J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22(5): 606~608
- 8 Peters GJ, van Groeningen CJ. Clinical relevance of biochemical modulation of 5-fluorouracil[J]. Ann Oncol, 1991, 2(7): 469~480
- 9 Aghi M, Kramm CM, Chou TC, et al. Synergistic anticancer effects of ganciclovir/thymidine kinase and 5-fluorocytosine/cytosine deaminase gene therapies [J]. J Natl Cancer Inst, 1998, 90(5): 370~380
- 10 Shen LF, Zhang YD, Shen HJ, et al. Liver targeting and the delayed drug release of the nanoparticles of adriamycin polybutylcyanoacrylate in mice [J]. Chin Med J (Engl), 2006, 119(15): 1287~1293

(2007-02-06 收稿)

(2007-03-19 修回)

(孙慧校对)