

[文章编号] 1000-4718(2007)09-1706-04

载 5-FU 纳米微粒抗肿瘤的实验研究*

黄开红¹, 刘建化¹, 王凌云¹, 朱兆华^{1△}, 陈其奎¹, 闵军², 陈汝福²
(中山大学附属第二医院¹ 消化内科,² 普通外科, 广东 广州 510120)

[摘要] 目的: 研究抗癌药 5-FU 纳米控释静脉注射微粒的制备工艺及其体内外抗肿瘤作用。方法: 以聚乳酸 (PLA) 作为基质材料, 采用超声乳化-溶剂挥发法制备 PLA 包载 5-FU 的纳米微粒 (5-FU-NPs)。扫描电镜观察 5-FU-NPs 形态, 通过激光光散射实验测定 5-FU-NPs 的粒径分布。利用高效液相色谱 (HPLC) 测定 5-FU-NPs 的载药率, 以 MTT 方法检测 5-FU-NPs 体外杀伤癌细胞效应, 用 5-FU-NPs 不同剂量、给药频度条件下体内抑瘤实验。结果: 电镜观察 5-FU-NPs 为表面光滑的球形微粒, 粒径分布平均值是 191.1 nm, 呈正态分布。5-FU-NPs 载药率为 15.2%。体外 MTT 实验提示 5-FU-NPs 作用明显优于 5-FU ($P < 0.05$)。体内抑瘤实验表明: 5-FU-NPs 间隔给药疗效优于未包载药物每日给药的疗效, 量-效关系明显, 且毒性减低。结论: 5-FU-NPs 可以作为 5-FU 的有效载体, 实现药物控制释放并减低毒性, 发挥药物更佳的抗肿瘤作用。

[关键词] 纳米微粒; 氟尿嘧啶; 肿瘤; 缓释作用

[中图分类号] R733 **[文献标识码]** A

Experimental study of 5-fluorouracil loaded polylactic acid nanoparticles control-releasing preparation on tumor

HUANG Kai-hong¹, LIU Jian-hua¹, WANG Ling-yun¹, ZHU Zhao-hua¹, CHEN Qi-kui¹, MIN Jun², CHEN Ru-fu²

(¹ Institute of Gastroenterology, ² Department of General Surgery, The Second Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China. E-mail: huangkaih@21cn.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the preparation techniques and anti-tumor effects both *in vitro* and *in vivo* of a novel nanoparticles control-releasing preparation of 5-fluorouracil (5-FU) by intravenous injection. **METHODS:** With polylactic acid (PLA) as matrix materials, we adopted ultrasound emulsification method to prepare PLA enveloped 5-FU nanoparticles (5-FU-NPs). Scanning electric microscope was used to observe the morphology of 5-FU-NPs and laser optical scattering experiment was conducted to determine its diameter distribution. The drug-carrying capacity (ratio) of the nanoparticles was determined by means of high-power liquid chromatography (HPLC) and MTT test was used to observe cytotoxicity *in vitro*. The anti-tumor effects were determined at different dosages, frequencies of taking drugs *in vivo*. **RESULTS:** Scanning electron microscope showed that the 5-FU-NPs were globular particles with smooth surface in an average particle diameter of 191.9 nm with a normal distribution, and the drug-carrying capacity of 5-FU-NPs was 15.2%. 5-FU-NPs had the same anti-cancer effect as unenveloped drug *in vitro* and showed typical dose-effect relationship. Compared to naked 5-FU, 5-FU-NPs presented significant difference ($P < 0.05$) in anti-cancer effect. **CONCLUSION:** Nanoparticles may serve as effective carrier for controlled release of 5-FU, which lead to reasonable administration of 5-FU with less toxicity.

[KEY WORDS] Nanoparticles; Fluorouracil; Neoplasms; Sustained-release

纳米控释技术所制备的超微纳米微粒粒径只有 200 纳米 (nm) 左右, 进入人体循环能顺利地通过任何血管达到靶部位, 并可被细胞吸收, 因此是一种理想的导向载体^[1]。我们选择生物相容、可降解的聚乳

酸 (polylactic acid, PLA) 材料作辅料, 通过调整 PLA 的分子量来控制药物的释放, 以达到预期效果。本研究以超声乳化法用 PLA 包载 5-FU 制备载 5-FU 纳米控释抗肿瘤药物静脉制剂在动物的体内外进行

[收稿日期] 2006-10-10 [修回日期] 2006-11-30

* [基金项目] 广州市科技攻关资助项目 (No. 2003Z3-E03851); 国家自然科学基金资助项目 (No. 30670951); 广东省自然科学基金资助项目 (No. 06021322); 广东省科技攻关项目 (No. 2005B31211002)

△通讯作者 E-mail: huangkaih@21cn.com

研究,以期能成功应用于消化道肿瘤的临床治疗。

材 料 和 方 法

1 载药纳米微粒的制备

1.1 载药纳米微粒的制备 采用超声乳化法,以PLA(山东济南医药研究所提供)为辅料,制备5-FU(天津药物研究所提供)纳米级微粒^[2]。本研究的前期试验进行:①5-FU-NPs表征检测:扫描电镜观察微粒形态,通过激光光散射实验测定纳米微粒的粒径分布;②5-FU-NPs载药率:用高效液相色谱方法测定。

2 体外载药制剂抑瘤实验

2.1 采用MTT方法进行评价 根据预试验结果,按每孔500细胞接种胃癌MGC803细胞(购于中科院上海细胞研究所)于24孔板孔中(每孔2 mL培养液)。当细胞生长进入对数生长期后,加入试验用药物50 μL ,作用4 h后,从每孔中吸弃1.7 mL培养液上清,回加0.7 mL无血清RPMI-1640,接着加入MTT液,每孔50 μL ,继续培养4 h,培养结束后每孔加入1 mL酸性异丙醇。用巴斯德吸管吹打混匀,使蓝紫色结晶完全溶解。将溶解液移入比色杯中,用721分光光度计,以570 nm波长测定吸光度值。

2.2 实验分组(药物最佳作用浓度通过预实验完成)

①培养对照组:肿瘤细胞株培养,不加入任何药物。
②阳性对照组:5-FU裸药组配制浓度为40.0 mg/L。
③空载纳米微粒对照组:生理盐水+未载药纳米微粒组。
④实验组:(A)预释放组,用棕色释放瓶预先无菌振荡释放48 h,以0.22 μm 膜过滤;(B)未预释放组,不经任何预先药物释放,直接以5-FU-NPs进行实验。各组释放液均含以相当于5-FU-NPs 0.1 mg/L药物浓度为供预释放的初始浓度。预释放48 h应可以有效释放出40%的包载药物,与对照组浓度一致。

抑制肿瘤生长效果计算公式:抑制率(%) = [对照培养(A值) - 实验孔(A值)] / 对照培养(A值)。

3 体内抑瘤试验方法

3.1 实验 I 药物制剂及给药途径对抑瘤作用的影响: SCID小鼠80只,雌雄各半,体重18-22 g(中山大学实验动物中心提供),按照抗肿瘤新药药效学指导原则方法用胃癌MGC803细胞异位(后肢腹侧)接种小鼠。接种前1 d(主要目的是使控释药物得以放出)将动物随机分为8组,每组为10只。实验组给予不同药物制剂A(载药率15.2%)和B(载药率30.0%),给药总剂量相同(实验用5-FU-NPs用生理盐水配成均匀淡白色浊液,每毫升制剂含2.0 mg有效药物)。5-FU裸药阳性对照组给予未

包载药物,阴性对照组给予相应的生理盐水+空载纳米微粒。分别予腹腔注射(ip)/静脉注射(iv),各组分别给药7 d,于停药24 h后处死动物,称体重,解剖剥离瘤块,称瘤重。抑瘤疗效评价公式:肿瘤抑制率 = (给药组平均瘤重 - 对照组平均瘤重) / 对照组平均瘤重 $\times 100\%$ 。

3.2 实验 II 主要研究药物不同剂量对肿瘤生长抑制作用的影响: (1)实验动物和实验方法同实验 I。(2)实验分组,动物共50只,雌性,随机分为5组。设阴性对照组、裸药对照组及纳米高、中、低剂量组,其中裸药组剂量设定同实验中剂量组,各组给药的途径和频度相同。(3)实验用生理盐水将5-FU-NPs配成淡白色乳浊液,每1 mL制剂含3.0 mg有效药物。

4 统计学处理

肿瘤体积和MTT吸光度指标的测定值用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 10.0软件包进行组间方差ANOVA分析。

结 果

1 纳米控释制剂体外评价

(1)药物溶解性:合成的5-FU-NPs经超声分散后可溶于生理盐水;(2)药物外观:用药样品淡黄白色,为均匀分散在注射用水中的超细微粒制剂;(3)5-FU-NPs粒径分布:粒径在(191 \pm 17) nm,呈正态分布;(4)电镜观察:5-FU-NPs表面光滑、形态均匀的球体(图1);(5)药物包载率测定:5-FU-NPs载药率按如下公式计算:载药率 = (纳米微粒5-FU含量/纳米微粒质量) $\times 100\%$,所测定的5-FU-NPs载药率为15.2%。

2 体外抑制肿瘤生长实验结果

体外MTT实验结果显示,5-FU-NPs可以有效释放,并在提前预释放的前提下,在第48 h达到接近裸药组体外杀癌细胞作用水平,与未经提前释放和对照组差异显著(表1)。

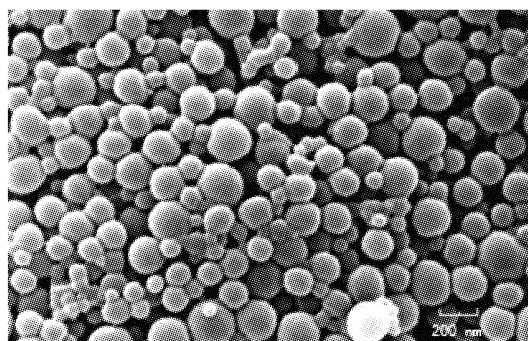


Fig 1 Image of 5-FU-NPs (SEM) (bar represents 200 nm).

图1 扫描电镜下5-FU-NPs的形态

表 1 药物在体外对胃癌 MGC803 细胞生长的抑制作用

Tab 1 Inhibitory effects of 5-FU-NPs on MGC803 growth *in vitro*

Group	Wells	Photometric value(A)	Inhibitory rate(%)
Blank control	4	0.951 ± 0.129	3.3
5-FU	4	0.499 ± 0.081**	47.5
NS + empty NPs	4	0.890 ± 0.127	6.4
5-FU-NPs (pre-released)	4	0.511 ± 0.110***	46.3
5-FU-NPs	6	0.801 ± 0.141 ^Δ	15.8

** P < 0.01 vs blank control or NS + empty NPs; # P < 0.05 vs 5-FU-NPs; ^Δ P < 0.05 vs 5-FU.

表 2 两种控释制剂 (A/B) 不同途径 (ip/iv) 对移植性胃癌 MGC803 生长抑制作用

Tab 2 Inhibitory effects of two carriers (NPs B-3 vs NPs B-1) on transplanted tumor (MGC803) growth *in vivo* ($\bar{x} \pm s$)

Group	Administration route (time)	Animal population		Weight of animal (g)		Survival (d)	Weight of tumor (g)	Inhibitory rate (%)
		Beginning	End	Beginning	End			
Negative control	ip(1,4,7 d)	10	9	20.1 ± 1.6	25.6 ± 1.4	8	1.51 ± 0.21	2.8
5-FU	ip(1-7 d)	10	8	20.2 ± 1.7	23.4 ± 1.5	8	0.86 ± 0.26*	43.1
NPsA-1	ip(1,4,7 d)	10	10	20.0 ± 1.3	24.0 ± 1.6	8	0.82 ± 0.28**	45.7
NPsA-2	ip(1,4 d)	10	10	19.8 ± 1.7	24.9 ± 1.6	8	0.88 ± 0.23*	41.7
NPsA-3	iv(1,4 d)	10	9	19.4 ± 1.5	23.6 ± 1.8	8	0.93 ± 0.20*	38.4
NPsB-1	ip(1,4,7 d)	10	10	20.2 ± 1.6	25.1 ± 1.5	8	0.85 ± 0.25*	43.7
NPsB-2	ip(1,4 d)	10	9	20.1 ± 1.4	22.4 ± 1.6	8	0.78 ± 0.20**	48.3
NPsB-3	iv(1,4 d)	10	10	19.4 ± 1.7	24.1 ± 1.4	8	0.70 ± 0.22***	53.3

* P < 0.05, ** P < 0.01 vs negative control; # P < 0.05 vs NPsB-1.

表 3 不同剂量药物对移植性肿瘤 (胃癌 MGC803) 生长的抑制作用

Tab 3 Inhibitory effects of different dose on transplanted tumor (MGC803) growth ($\bar{x} \pm s$)

Group	Animal population		Animal weight (g)		Survival (d)	Weight of tumor (g)	Inhibitory rate (%)
	Beginning	End	Beginning	End			
Blank control	10	10	20.1 ± 1.6	22.4 ± 1.2	8	1.21 ± 0.30	2.1
5-FU	10	7	20.2 ± 1.7	23.9 ± 1.4	8	0.68 ± 0.29*	43.8
NPs (high)	10	9	20.0 ± 1.3	21.1 ± 1.3	8	0.54 ± 0.25*	55.4
NPs (moderate)	10	10	19.8 ± 1.7	21.6 ± 1.4	8	0.69 ± 0.22*	43.0
NPs (low)	10	10	19.4 ± 1.5	24.1 ± 1.1	8	0.85 ± 0.28**	29.8

* P < 0.01 vs control; # P < 0.05 vs moderate or high dose NPs.

讨 论

5-FU 是治疗多种恶性肿瘤的一线药物,给药途径有两种,包括静脉推注和静脉灌注,连续静脉灌注与静脉推注相比,有较高的缓解率,并能延长生存时间。5-FU 剂量限制性毒性为骨髓抑制,因此,开发新型、缓释的 5-FU 新剂型对提高疗效、降低毒性具有重要的临床意义。本研究以可降解生物相容 PLA 作辅料,以超声乳化法制备了 PLA 包载 5-FU 的纳米微粒^[3],经电镜测试显示其具有超微小体积,粒径在 (191 ± 17) nm,呈球形或椭圆形,表面光滑,

3 体内抑制肿瘤药效实验

3.1 实验结果 I 各实验组及裸药组肿瘤抑制率与对照组比较均有显著差异,而各实验组之间肿瘤抑制率没有明显差别;制剂 B 的静脉途径 2 次给药的肿瘤抑制率与腹腔 3 次给药组比较均有显著差异 (表 2)。

3.2 实验结果 II 各实验组及裸药组肿瘤抑制率与对照组比较均有显著差异,随着载药纳米载药量增高,其肿瘤抑制率亦增加;裸药组动物死亡率为 3/10,而在纳米制剂组中剂量组 (已经达到同样剂量水平) 无 1 只动物死亡 (表 3)。

可用液体载体的流动形式经静脉给药,能通过血管壁内皮细胞间隙,蓄积在肿瘤组织中缓慢释放达到有效浓度发挥抗肿瘤效应,同时减少全身毒性^[4],大大提高 5-FU 的生物利用度,体内外实验均证实该制剂具有良好的抑瘤效果。本研究 MTT 实验结果显示,5-FU-NPs 可以有效释放 5-FU,并在提前预释放的前提下,在第 48 h 达到接近裸药组体外杀瘤细胞作用水平,其杀伤作用呈剂量和时间依赖性。5-FU-NPs 经体外释药后,5-FU-NPs 在 1d 时释放的总药量已接近 50% 以上^[2],因此,本研究选择第 2 d 来着重观察药物的剂量依赖性杀伤效应较为客

观合适。由于 5-FU-NPs 的缓释作用,它的抗癌时间依赖性杀伤效应一直呈持续状态,证实了本研究制备的 5-FU-NPs 没有降低其内 5-FU 成份的抗癌活性,即它对入胃癌细胞具有强的杀伤作用,其杀伤作用呈时间和剂量依赖性,可为动物实验和临床实验提供必要的依据^[5-8]。

实验结果表明,5-FU-NPs 表现出良好的药物控制释放性能,制剂 A 在 1、3、6 d 给药效果已达最佳,而制剂 B 由于相对控释时间长,2 次给药效果优于 3 次给药,主要原因是释放药物在第 8 d 并不完全所致。同时,5-FU-NPs 在体内同样表现良好的药物控制释放效果,以 5-FU 裸药每天给药组作为阳性对照组,5-FU-NPs 在不同剂量均表现出较高的肿瘤抑制作用,并且显示良好的药物量-效关系。5-FU-NPs (相当于实验 I 中制剂 A) 在 1、4、7 d 分 3 次给药效果已达到甚至超过对照组 5-FU 裸药每日给药组抑瘤效果,可初步推断其体内有效控释时限在 5-8 d 范围。此外,裸药组动物死亡率为 3/10,而在 5-FU-NPs 组的中剂量组(已经达到裸药同样剂量水平)无 1 只动物死亡;在 5-FU-NPs 高剂量组(剂量明显高于裸药组)动物体重有一定的下降趋势(扣除肿瘤生长因素),仅有 1 只动物死亡。初步提示,纳米控制释放制剂的毒性减低,同时抑制肿瘤生长的药效却有所提高^[9]。

5-FU-NPs 静脉途径给药的药效优于腹腔注射,两者差异显著,主要的原因是 5-FU-NPs 静脉给药可直接进入肿瘤组织,而 5-FU-NPs 腹腔途径给药仍要经过腹膜上皮细胞间隙进入血管内,同时 5-FU-NPs 在腹腔中仍有效控释 5-FU 进入血液从而达到抗癌效果,故其药效达到裸药同样剂量水平(两者差异无显著),这对晚期胃癌腹腔转移的治疗具有实用的临床意义。此外,本研究将各组给药时机选定在接种肿瘤的前 1 d,目的是使控制释放组的药物有机会释放出来,以便在肿瘤生长最旺盛的时候发挥作用,该设计方案不影响裸药组的结果(同样提前给药),同时更为合理和接近可能的临床应用^[10]。总之,纳米载药微粒制剂具有上述独特的优越性,是一种较为理想的控释载体,尤其是对临床广泛应用的抗肿瘤药物价值更大^[11]。5-FU-NPs 有望作为一种新型载药系统,提高 5-FU 的疗效,从而促进新

药剂的合成与发展^[12]。

[参 考 文 献]

- [1] Parveen S, Sahoo SK. Nanomedicine: clinical applications of polyethylene glycol conjugated proteins and drugs [J]. Clin Pharmacokinet, 2006, 45(10): 965-988.
- [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] Greindl M, Bernkop-Schnurch A. Development of a novel method for the preparation of thiolated polyacrylic acid nanoparticles [J]. Pharm Res, 2006, 23(9): 2183-2189.
- [4] Rawat M, Singh D, Saraf S, et al. Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs [J]. Biol Pharm Bull, 2006, 29(9): 1790-1798.
- [5] Yan C, Chen D, Gu J, et al. Nanoparticles of 5-fluorouracil (5-FU) loaded N-succinyl-chitosan (Suc-Chi) for cancer chemotherapy: preparation, characterization *in vitro* drug release and anti-tumor activity [J]. J Pharm Pharmacol, 2006, 58(9): 1177-1181.
- [6] Sinha R, Kim GJ, Nie S, et al. Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery [J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(8): 1909-1917.
- [7] Croy SR, Kwon GS. Polymeric micelles for drug delivery [J]. Curr Pharm Des, 2006, 12(36): 4669-4684.
- [8] Zhang Y, Zhang QZ, Zha LS, et al. Preparation, characterization and application of pyrene-loaded methoxy poly(ethylene glycol)-poly(lactic acid) copolymer nanoparticles [J]. Colloid Polym Sci, 2004, 282(12): 1323-1328.
- [9] 李 苏, 姜文奇, 王安训, 等. 5-FU 核-壳型共聚物纳米胶束的制备及其体内释药的研究 [J]. 癌症, 2004, 23(4): 381-385.
- [10] 王华芳, 胡 豫. 聚乳酸纳米颗粒载体材料的研究现状 [J]. 华中医学杂志, 2002, 26(4): 221-222.
- [11] 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.
- [12] Hussain M, Beale G, Hughes M, et al. Co-delivery of an antisense oligonucleotide and 5-fluorouracil using sustained release poly(lactide-co-glycolide) microsphere formulations for potential combination therapy in cancer [J]. Int J Pharm, 2002, 234(1-2): 129-138.