



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.02.010
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.02.010
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(2):206-210.

· 基础研究 ·

载5-氟尿嘧啶聚己内酯纳米粒子对人胆管癌细胞的体外杀伤作用

李永盛¹, 贺思佳², 江翰¹, 边睿¹, 王硕¹, 郝袁¹, 王雪峰¹, 刘颖斌¹, 徐雷鸣², 施伟斌¹

(上海交通大学医学院附属新华医院 1. 普通外科 / 胆道研究所 2. 消化内科, 上海 200092)

摘要

目的: 探讨聚己内酯载5-氟尿嘧啶(5-FU)纳米粒子对人胆管癌细胞株的体外杀伤作用、安全性及机制。
方法: 超声乳化法制备载5-FU聚己内酯纳米粒子(5-FU-PCL-NP), 观察空载纳米粒子的体外溶血及5-FU-PCL-NP的体外药物释放情况, 检测5-FU-PLA-NP对人胆管癌细胞株Hccc-9810增殖抑制及凋亡诱导作用。

结果: 5-FU-PCL-NP成功合成, 其载药率为15.1%, 包封率为41.9%, 溶血试验阴性, 5-FU-PCL-NP体外释放5-FU缓慢, 其72 h释放率为62.9%。与单纯5-FU比较, 5-FU-PCL-NP对Hccc-9810细胞的增殖抑制作用明显增强, IC₅₀明显降低[(1.32 ± 0.12) μg/mL vs. (2.5 ± 0.39) μg/mL], 促Hccc-9810细胞凋亡作用明显增强(均P < 0.05)。空载纳米粒对Hccc-9810细胞凋亡无明显影响(P > 0.05)。

结论: 载5-FU聚己内酯纳米粒子5-FU-PCL-NP具有良好的药物缓释效应, 可延长5-FU的作用时间窗, 对胆管癌细胞有较好的体外杀伤作用, 且生物安全性好。

关键词

胆管肿瘤; 纳米复合物; 氟尿嘧啶

中图分类号: R735.8

Killing effect of 5-fluorouracil loaded polycaprolactone nanoparticles on human cholangiocarcinoma cells in vitro

LI Yongsheng¹, HE Sijia², JIANG Han¹, BIAN Rui¹, WANG Shuo¹, HAO Yuan¹, WANG Xuefeng¹, LIU Yingbin¹, XU Leiming², SHI Weibin¹

(1. Department of General Surgery/Research Institute of Biliary Tract Disease 2. Department of Gastroenterology, Affiliated Xinhua Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200092, China)

Abstract

Objective: To investigate the killing effect of 5-fluorouracil (5-FU) loaded polycaprolactone nanoparticles on human cholangiocarcinoma cells in vitro, and its safety and mechanism.

Methods: The 5-FU loaded polycaprolactone nanoparticles (5-FU-PCL-NPs) were prepared by ultrasonic emulsification. In vitro hemolysis of the empty nanoparticles and drug release of 5-FU-PCL-NPs was observed, and the inhibition of proliferation and induction of apoptosis of 5-FU-PCL-NPs in human cholangiocarcinoma Hccc-9810 cells were determined.

基金项目: 上海市科学技术委员会纳米科技专项课题资助项目(11nm0503700)。

收稿日期: 2014-12-05; 修订日期: 2015-01-24。

作者简介: 李永盛, 上海交通大学医学院附属新华医院住院医师, 主要从事肝胆肿瘤诊治方面的研究。

通信作者: 施伟斌, Email: weibindr@yahoo.cn

Results: The 5-FU-PCL-NPs were successfully synthesized, with drug loading rate of 15.1% and encapsulation efficiency of 41.9%. The empty nanoparticles showed a negative result in hemolysis test. 5-FU-PCL-NPs exhibited a sustained 5-FU release and the 72-h release rate was 62.9%. Compared with pure 5-FU, 5-FU-PCL-NPs had a significantly increased inhibitory effect on proliferation in Hccc-9810 cells, significantly decreased IC_{50} value $[(1.32 \pm 0.12) \mu\text{g}/\text{mL} \text{ vs. } (2.5 \pm 0.39) \mu\text{g}/\text{mL}]$, and significantly enhanced effect on apoptosis in Hccc-9810 cells (all $P < 0.05$). The empty nanoparticles exerted no obvious effect on apoptosis in Hccc-9810 cells ($P > 0.05$).

Conclusion: The 5-FU loaded polycaprolactone nanoparticles (5-FU-PCL-NPs) possess a sustained-release property that prolongs the suppressive effect of 5-FU, and have enhanced killing effect on human cholangiocarcinoma cells in vitro, with a satisfactory biological safety profile.

Key words

Bile Duct Neoplasms; Nanocomposites; Fluorouracil

CLC number: R735.8

胆管癌(cholangiocarcinoma)是一种较常见的消化道肿瘤,近年来国内外发病率呈上升趋势,其恶性程度高,早期诊断率较低,发现时往往处于晚期,手术切除率很低,因此目前非手术治疗仍然为胆管癌治疗的重要手段^[1-2]。在非手术治疗上传统化疗由于药物半衰期较短,因此给药量较大,对机体产生的副作用常常使晚期癌症患者无法耐受^[3]。利用纳米技术载药对恶性肿瘤进行治疗是目前生物技术领域中最前沿的研究方向之一,其中新型生物可降解纳米材料是一种良好的药物载体,其载药量大,可通过缓释作用延长药物的生物半衰期,从而减少给药次数,减轻药物毒副作用^[4-6]。本实验选择聚己内酯(PCL)为载体,制备包封5-氟脲嘧啶(5-FU)的PCL纳米粒子,评估了其生物安全性,并与单纯5-FU对比,观察其对人胆管细胞株Hccc-9810的体外杀伤效应及其作用机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

人胆管癌细胞株Hccc-9810由上海交通大学医学院胆道研究所保存;RPMI-1640培养基购自Gibco公司;胰蛋白酶购自于上海复申生物技术公司;胎牛血清购自Gibco公司;青霉素、链霉素购自于上海医药集团;5-FU、载5-FU聚己内酯基生物可降解纳米载药系统(5-FU-PCL-NP)由华东理工大学材料学院提供;CCK-8购自于同仁公司;流式细胞凋亡试剂盒购自BD公司。MCO-15AC型CO₂培养箱(日本Sanyo公司);台式离心机(美

国Thermo Science);Olympus显微镜BX-53;分光光度计(上海光谱,SP-1900);透射电镜(JEOL/JEM-1400)。

1.2 聚己内酯颗粒的合成及5-FU-PCL-NP的合成

接枝聚合物的制备通过引发羧甲基壳聚糖上的羟基开环 ϵ -己内酯聚合而成。5-FU-PCL-NP通过自组装-透析法构建,并于透射电镜(JEOL/JEM-1400),在100 keV的加速电压下观察,载药率(drug loading efficiency, DLE)平均为15.1%,包封率(encapsulation efficiency, EE)平均为41.9%。 $DLE(\%) = \text{载药纳米粒子包载5-FU的质量} / \text{载药纳米粒子总质量} \times 100\%$, $EE(\%) = \text{载药纳米粒子包载5-FU的质量} / \text{初始投药质量} \times 100\%$ 。

1.3 空载纳米粒子体外溶血试验

在红细胞悬浮液中加入蒸馏水,由于渗透压差异导致红细胞破裂作为阳性对照,在红细胞悬浮液中加入PBS使得红细胞不破裂作为阴性对照组,选取两种高浓度(2 mg/mL、1 mg/mL)的空载纳米粒子进行了溶血测试。

1.4 5-FU-PCL-NP的体外释药研究

使用分光光度计对5-FU溶液进行200~400 nm的全波长扫描,确定了5-FU在水相环境下的最大吸收波长为266.4 nm,调整至标准曲线模式,分别选择最大吸收波长作为光源,进行5-FU标准曲线的绘制,通过这条标准曲线,药物释放环境下,分别于0、12、24、36、48、72 h测得吸光度值,并根据标准曲线计算释药量,绘制释药曲线。

1.5 细胞培养

Hccc-9810细胞在含10%胎牛血清的1640培养基中, 37 ℃, 5% CO₂饱和度下培养。

1.6 CCK-8 法测定肿瘤细胞增殖抑制实验

取处于对数生长期的Hccc-9810细胞, 接种于96孔板, 调节细胞浓度, 使每孔细胞数为8 000个, 37 ℃, 5% CO₂饱和度下培养箱孵育过夜, 待细胞贴壁后, 分按空白NP组, 单纯5-FU组, 5-FU-PCL-NP组(按载药率折算5-FU的量), 分别按5-FU药物浓度0、5、10、15、20、40、80 μg/mL, 每个浓度组设立5个复孔, 共培养48 h, 后均用CCK-8法检测各孔存活细胞吸光度。细胞存活率=(处理组OD值-空白对照组OD值)/(对照组OD值-空白对照组OD值)×100%。同时计算半数有效浓度(IC₅₀)值。

1.7 流式细胞仪检测细胞凋亡率

取处于对数生长期的Hccc-9810细胞, 接种于6孔板, 调节细胞浓度, 使每孔细胞数为2×10⁵个, 将细胞分为: 空白对照组、空载纳米粒组、单纯5-FU组、5-FU-PCL-NP组; 根据CCK-8实验所筛选出半数有效浓度, 按5-FU 1.5 μg/mL分别加药共培养细胞48 h, 用不含EDTA的胰酶消化收集收集6孔板细胞, PBS清洗2遍, 加入500 μL的结合缓冲液悬浮细胞, 加入分别5 μL Annexin V, 5 μL Propidium Iodide混匀; 避光, 室温下反应15 min, 后上机检测细胞凋亡率。

1.8 统计学处理

所有实验均重复3次, 统计资料结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组间比较采用t检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用SNK法, P<0.05表示差异有统计学意义。使用SPSS 19.0软件进行统计分析。

2 结果

2.1 5-FU-PCL-NP 形态观察

透射电镜照片所示, 5-FU-PCL-NP呈现出完好的球形形态, 分布均匀无粘连情况, 表明成功合成相关载药纳米材料, 并且结构稳定(图1)。

2.2 空载纳米粒子体外溶血试验

体外溶血试验结果显示, 阳性对照组出现明

显溶血, 阴性对照组及2个浓度的空载纳米粒子组均未出现溶血(图2)。

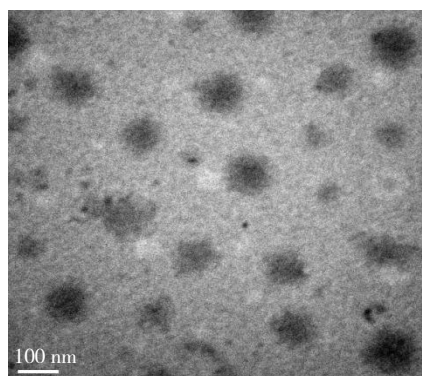


图1 5-FU-PCL-NP(浓度1 mg/mL)电镜图片(×100 000)
Figure 1 View of 5-FU-PCL-NPs (concentration 1 mg/mL) under TEM(×100 000)

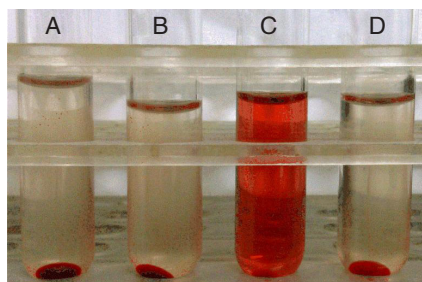


图2 溶血试验 A: 空载纳米粒溶液 1 mg/mL; B: 空载纳米粒溶液 2 mg/mL; C: 蒸馏水; D: 生理盐水

Figure 2 Hemolysis test A: Solution of empty nanoparticles (1 mg/mL); B: Solution of empty nanoparticles (2 mg/mL); C: Distilled water group; D: Physiological saline Group

2.3 5-FU 载药纳米粒子的体外药物释放

体外释药实验结果显示, 单纯5-FU在8 h内即达峰值; 而5-FU-PCL-NP的释放比较平缓, 在前24 h达50%, 在72 h后达到62.9%(图3)。

2.4 5-FU-PCL-NP 对 Hccc-9810 细胞增殖抑制作用

单纯5-FU及5-FU-PCL-NP分别按按5-FU药物浓度0、5、10、15、20、40、80 μg/mL与Hccc-9810细胞共培养48 h之后, 细胞活性随药物浓度上升而下降, 5-FU-PCL-NP组对细胞的增殖抑制作用明显强于单纯5-FU(P<0.05)。5-FU-PCL-NP组与单纯5-FU组的IC₅₀分别为(1.32±0.12) μg/mL和(2.5±0.39) μg/mL, 差异有统计学意义(P<0.05)(图4)。

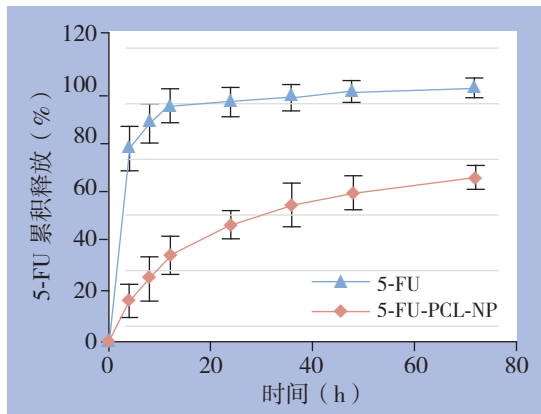


图3 体外药物释放曲线

Figure 3 Curves of in vitro Ddrug release curve in vitro

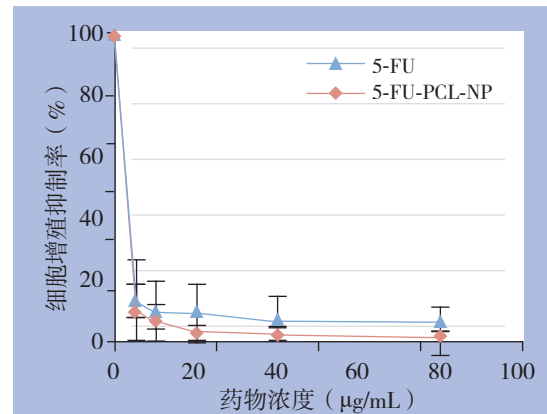


图4 单纯5-FU与5-FU-PCL-NP对Hccc-9810细胞增殖的抑制作用

Figure 4 Inhibition ory effect of pure 5-FU and 5-FU-PCL-NPs on proliferation of c Hccc-9810 cellsdifferent dose drugs

2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡率

流式细胞仪检测结果显示,空白对照组和空载纳米粒子组凋亡率分别为(6.5 ± 2.4)%、(7.2 ± 3.1)%,两组间差异无统计学意义(P>0.05);

5-FU-PCL-NP组凋亡率为(37.5 ± 4.5)%,而单纯5-FU组细胞凋亡率分别为(26.4 ± 3.2)%,组间比较差异有统计学意义(P<0.05)(图5)。

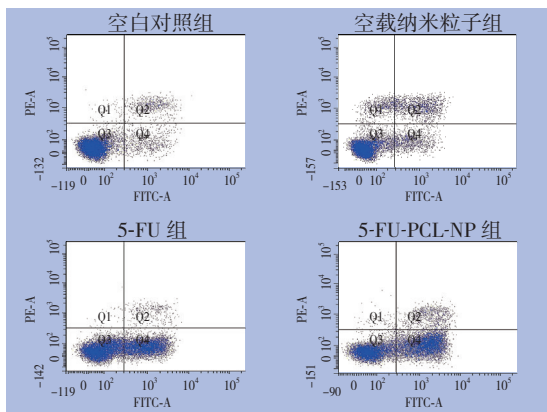


图5 细胞凋亡检测结果

A: 凋亡流式图; B: 各组细胞凋亡率比较

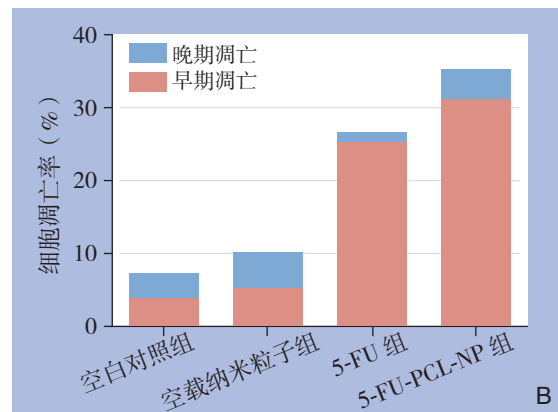


Figure 5 Effects of drug loaded nanoparticles on cell apoptosis among groups of cells

A: Flow cytometric analysis; B: Comparison of the apoptosis rates

3 讨论

胆管癌是消化道较常见的恶性肿瘤之一,发病率呈上升趋势^[1-2],由于其恶性程度高,早期诊断困难,且因其周围解剖结构复杂,容易向周围组织浸润,手术R₀切除率低(约15%~20%),预后较差,因此近年来针对胆管癌的非手术治疗逐渐成为研究的热点^[7-9]。

5-FU为治疗消化道恶性肿瘤的经典药物^[10],Thongprasert等^[11]报道以5-FU为基础的化疗组患者对胆管癌控制率可达50%。但其治疗剂量较大,为

增强疗效而加大剂量会带来毒性作用,临床上患者表现为强烈的化疗后副反应,往往不易耐受。因此通过药物的缓释,减慢药物代谢,增加作用时间窗,提高疗效具有重要的临床意义^[12-14]。

纳米微球由于粒径小、比表面积大,具有特殊的体积效应和表面效应,使之具有特殊的表面性能^[15-17],包括生物黏附性、电性、亲和性等,这有利于增加所载药物在吸收部位的接触时间和接触面积,加之其对药物具有明显的保护作用,故可大大提高药物的吸收和生物利用度,并可延长其在体内的循环时间,大大增加作用

时间窗^[15, 18-19]。聚己内酯材料是一种新型的生物可降解材料^[20-21]，本实验合成了5-FU-PCL-NP，其载药率为15.1%，包封率为41.9%，并通过透射电镜证明了其成功合成，具有稳定的形态，同时体外药物缓释实验结果表明单纯5-FU在前8 h即达峰值，而5-FU-PCL-NP的释放在前24 h达50%，说明具有一定突释作用，后释放趋于平稳，至72 h后达到62.9%，表明该材料具有良好的药物缓释作用。体外溶血试验结果表明，高浓度的纳米材料也不会引起细胞的溶血，证明了其较好的生物安全性。CCK-8增值抑制实验表明5-FU-PCL-NP对肿瘤细胞的增值抑制作用优于单纯5-FU，进一步应用流式细胞仪检测凋亡，结果提示5-FU-PCL-NP明显促进了肿瘤细胞的凋亡，表明载药纳米粒子在细胞吸收后，通过缓释作用，增强了作用时间，促进肿瘤细胞的凋亡增强了药物的杀伤作用。

综上所述，5-FU-PCL-NP具有良好的生物安全性，缓释作用，可以明显增强药物的抑制增殖效果，并能诱导人胆管癌细胞的凋亡。本研究结果为载药纳米给药系统的开发和应用提供了一定的实验基础，为胆管癌的药物治疗提供了新的思路，同时随着后期相关官能团的修饰，可以进一步实现肿瘤的靶向治疗，对于改善胆管癌患者的预后具有重要意义。

参考文献

- [1] 肖科, 汤恢煊. 血管内皮生长因子C和微淋巴管密度与胆管癌淋巴结转移及预后的关系[J]. 中国普通外科杂志, 2012, 21(8):946-951.
- [2] 李永盛, 江翰, 王子豪, 等. 叶酸靶向修饰纳米粒加载5-氟尿嘧啶治疗胆管癌的实验研究[J]. 中国普通外科杂志, 2013, 22(8):976-981.
- [3] 李茂岚, 陆巍, 张飞, 等. 载顺铂聚乳酸纳米管复合材料对胆管癌细胞株的体外杀伤效应[J]. 中华医学杂志, 2014, 94(40):3163-3166.
- [4] Westesen K, Bunjes H, Koch MHJ. Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential[J]. J Control Release, 1997, 48:223-236.
- [5] He Q, Shi J. Mesoporous silica nanoparticle based nano drug delivery systems: synthesis, controlled drug release and delivery, pharmacokinetics and biocompatibility[J]. J Mater Chem, 2011, 21:5845-5855.
- [6] Shi WB, Le VM, Gu CH, et al. Overcoming multidrug resistance in 2D and 3D culture models by controlled drug chitosan-graft poly(caprolactone)-based nanoparticles[J]. J Pharm Sci, 2014, 103(4):1064-1074.
- [7] Khan SA, Thomas HC, Davidson BR, et al. Cholangiocarcinoma[J]. Lancet, 2005, 366(9493):1303-1314.
- [8] Murakami Y. Highlights of topic "Etiology and epidemiology of cholangiocarcinoma" [J]. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2014, 21(5):299-300.
- [9] Blechacz B, Gores G J. Cholangiocarcinoma: advances in pathogenesis, diagnosis, and treatment[J]. Hepatology, 2008, 48(1):308-321.
- [10] 刘流, 庄文, 陈忠, 等. 消化道恶性肿瘤患者术中腹腔内植入5-FU缓释剂的安全性研究[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2010, 17(2):170-174.
- [11] Thongprasert S. The role of chemotherapy in cholangiocarcinoma[J]. Ann Oncol, 2005, 16(Suppl 2):ii93-96.
- [12] Dangi R, Hurkat P, Jain A, et al. Targeting liver cancer via ASGP receptor using 5-FU-loaded surface-modified PLGA nanoparticles[J]. J Microencapsul, 2014, 31(5):479-487.
- [13] Parhi P, Mohanty C, Sahoo SK. Nanotechnology-based combinational drug delivery: an emerging approach for cancer therapy[J]. Drug Discov Today, 2012, 17(17/18):1044-1052.
- [14] Kim SY, Kim M, Kim MK, et al. Paclitaxel-eluting nanofiber-covered self-expanding nonvascular stent for palliative chemotherapy of gastrointestinal cancer and its related stenosis[J]. Biomed Microdevices, 2014, 16(6):897-904.
- [15] Sumer B, Gao J. Theranostic nanomedicine for cancer[J]. Nanomedicine, 2008, 3(2):137-140.
- [16] Marchesan S, Prato M. Nanomaterials for (Nano) medicine[J]. ACS Med Chem Lett, 2012, 4(2):147-149.
- [17] Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Nanomedicine: current status and future prospects[J]. FASEB J, 2005, 19(3):311-330.
- [18] 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.
- [19] Lvov Y, Abdullayev E. Functional polymer-clay nanotube composites with sustained release of chemical agents[J]. Prog Polym Sci, 2013, 38(S 10/11):1690-1719.
- [20] Zhang Y, Zhuo RX. Synthesis and in vitro drug release behavior of amphiphilic triblock copolymer nanoparticles based on poly(ethylene glycol) and polycaprolactone[J]. Biomaterials, 2005, 26(33):6736-6742.
- [21] Karuppuswamy P, Venugopal JR, Navaneethan B, et al. Polycaprolactone nanofibers for the controlled release of tetracycline hydrochloride[J]. Mater Lett, 2015, 141:180.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 李永盛, 贺思佳, 江翰, 等. 载5-氟尿嘧啶聚己内酯纳米粒子对人胆管癌细胞的体外杀伤作用[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(2):206-210. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.02.010

Cite this article as: LI YS, HE SJ, JIANG H, et al. Killing effect of 5-fluorouracil loaded polycaprolactone nanoparticles on human cholangiocarcinoma cells in vitro[J]. Chin J Gen Surg, 2015, 24(2):206-210. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.02.010