载氟尿嘧啶的肝细胞癌靶向外泌体构建与疗效 评价

饶立威1, 覃虹锟2, 李 睿2*, 杨 勇1*

¹中国药科大学基础医学与临床药学学院, 江苏 南京 ²重庆药友制药有限责任公司, 重庆

收稿日期: 2025年5月13日; 录用日期: 2025年7月8日; 发布日期: 2025年7月17日

摘要

目的:构建一种负载氟尿嘧啶的肝细胞癌靶向外泌体,并对其疗效与安全性进行评价。方法:采用慢病 毒转染法,将磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3单克隆抗体单链可变区修饰至外泌体表面,构建肝细胞癌靶向外泌 体GPC3-Exo,用体外细胞摄取实验,研究其肝细胞癌靶向能力;采用超声处理法,将氟尿嘧啶载入外泌 体,得载药外泌体GPC3-Exo-5FU,用细胞毒性实验,研究其对肝细胞癌细胞的杀伤能力;最后构建肝细 胞癌皮下荷瘤裸鼠模型,研究载药外泌体的体内疗效及安全性。结果:成功构建肝细胞癌靶向外泌体 GPC3-Exo,用多种细胞对GPC3-Exo的靶向能力进行探究,发现GPC3-Exo可高效靶向肝细胞癌细胞;经 超声载药处理,得载药外泌体GPC3-Exo-5FU,载药率为(4.96±0.26)%,用肝细胞癌细胞对GPC3-Exo-5FU的细胞毒性进行评估,发现GPC3-Exo-5FU,载药率为(4.96±0.26)%,用肝细胞癌细胞对GPC3-Exo-5FU的细胞毒性进行评估,发现GPC3-Exo-5FU可有效抑制肝细胞癌细胞的活力;最后用肝细胞癌皮下荷 瘤小鼠评价GPC3-Exo-5FU的体内药效及安全性,发现GPC3-Exo-5FU有效抑制小鼠肿瘤增殖,抗肿瘤疗 效与安全性均强于游离氟尿嘧啶。结论:本研究成功构建了一种负载氟尿嘧啶的肝细胞癌靶向外泌体, 在肝细胞癌治疗中表现出良好的疗效及安全性。

关键词

肝细胞癌,外泌体,药物递送,氟尿嘧啶

Construction and Efficacy Evaluation of Fluorouracil-Loading Hepatocellular Carcinoma-Targeted Exosomes

Liwei Rao¹, Hongkun Qin², Rui Li^{2*}, Yong Yang^{1*}

¹School of Basic Medicine and Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing Jiangsu ²Yaoyou Pharmaceutical Co., Ltd., Chongqing

*通讯作者。

Received: May 13th, 2025; accepted: Jul. 8th, 2025; published: Jul. 17th, 2025

Abstract

Objective: This study aimed to develop a hepatocellular carcinoma (HCC)-targeted exosome system loaded with 5-fluorouracil (5-FU) and to evaluate its therapeutic efficacy and safety. Methods: Glypican-3 (GPC3)-specific single-chain variable fragment (scFv) was incorporated onto the exosome membrane via lentiviral transfection to generate GPC3-targeted exosomes (GPC3-Exo). The targeting ability of GPC3-Exo toward HCC cells was assessed using in vitro cellular uptake assays. 5-FU was loaded into GPC3-Exo by ultrasonic treatment to prepare the drug-loaded exosomes (GPC3-Exo-5FU). Cytotoxicity assays were performed to evaluate the anti-tumor activity of GPC3-Exo-5FU against HCC cells in vitro. Finally, a subcutaneous HCC xenograft nude mouse model was established to assess the in vivo therapeutic efficacy and safety of GPC3-Exo-5FU. Results: GPC3-Exo was successfully constructed and demonstrated efficient targeting toward HCC cells in various in vitro models. Following ultrasonic drug loading, GPC3-Exo-5FU was obtained with a drug-loading efficiency of 4.96% ± 0.26%. In vitro cytotoxicity assays confirmed that GPC3-Exo-5FU significantly inhibited the viability of HCC cells. In vivo studies using HCC-bearing nude mice showed that GPC3-Exo-5FU effectively suppressed tumor growth, with superior anti-tumor efficacy and safety compared to free 5-FU. Conclusion: This study successfully established a 5-FU-loaded, HCC-targeted exosome delivery system that demonstrated promising therapeutic potential and safety in the treatment of hepatocellular carcinoma.

Keywords

Hepatocellular Carcinoma, Exosomes, Drug Delivery, 5-Fluorouracil

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc. This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0). http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

CC O Open Access

1. 引言

原发性肝癌是最常见的恶性肿瘤之一,其发病率在全部癌症类型中位居第六,死亡率位居第三[1]。 肝细胞癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)是原发性肝癌最常见的病理学类型,占全部病例的75%~85%[2]。 HCC 起病隐匿,早期症状不明显,多数患者在初次确诊时便已经处于疾病中晚期阶段,治疗方法有限[3], 晚期 HCC 患者生存期普遍较短,5年生存率仅22%[4],更高效的晚期 HCC 治疗策略亟待开发。

氟尿嘧啶(5-fluoroufacil, 5-FU)是有数十年应用历史的经典化疗药物,通过抑制胸苷酸合成酶,干扰 DNA 及 RNA 的合成,发挥抗肿瘤作用[5],在中国被批准用于晚期不可切除 HCC 的一线治疗[6]。但 5-FU 缺乏肿瘤特异性,难以在肿瘤部位蓄积,导致临床疗效差,且易引发呕吐、腹泻、脱发、骨髓抑制等 不良反应[7] [8],提示有必要探索 5-FU 肿瘤靶向递送策略,以提高药物疗效并减轻毒副作用。

外泌体(Exosomes)是一种直径 30 nm~150 nm 的天然囊泡,属于细胞外囊泡(Extracellular vesicles, EVs) 的一种亚群,可由几乎所有类型的真核细胞分泌,广泛存在于几乎所有类型的体液之中,在胞间通讯中 发挥重要作用[9]。外泌体具有以脂质双分子层包围的亲水性内部空间,可携带大量来自亲本细胞的脂质、蛋白、核酸等可溶性小分子物质[10],其脂质双分子层表面通常表达有多种蛋白标志物,如四跨膜蛋白超家族 CD9、CD63、CD81等[11],可通过膜蛋白与受体细胞发生相互作用,调节靶细胞的生理生化活动[12]。

作为天然囊泡,外泌体具有良好的生物相容性与较低的毒性及免疫原性,被认为是理想的药物递送 载体[13],但用于肿瘤药物递送时,外泌体存在靶向能力不足的问题[14]。使用化学方法或基因工程方法, 对外泌体进行修饰,可在外泌体表面连接靶向配体,增强外泌体对治疗部位的定位能力,实现肿瘤靶向 药物递送[15]。如 Wang 等[16]将抗 HER2 的 scFv 抗体 ML39 修饰在外泌体表面,实现了对 HER2 阳性乳 腺癌的 mRNA 特异性递送。

磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 (Glypican-3, GPC3)是一种 70 kDa 的跨膜蛋白,通过与糖基磷脂酰肌醇锚定结 合在细胞膜表面[17]。GPC3 在成人正常人体组织中低表达或不表达,但在多数 HCC 中高度表达,通过 激活多种癌症信号,如 Wnt、Hh、FGF 及 HGF 等,调节 HCC 细胞的增殖、转移及免疫逃逸,提示 GPC3 不仅可作为 HCC 诊断的特异性标志物,也是 HCC 治疗的重要潜在靶点之一[18]。目前已有多项针对 GPC3 的 HCC 疗法处于临床研究阶段,如科济药业的 CT011 与索拉非尼联合治疗,使两例晚期 HCC 患者获得 7 年以上无病生存[19]: 24 名晚期 HCC 患者接受西比曼生物的 C-CAR031 治疗,22 名疗效可接受评估的 患者中,90.9%患者观察到肝内及肝外肿瘤缩小,随访 9.03 个月时,预估中位总生存期为 11.14 个月[20]。

本研究拟采用 HEK-293 细胞来源的外泌体,通过基因工程方法进行表面修饰,使外泌体表面表达抗 GPC3 的 scFv 抗体,得 HCC 靶向外泌体(GPC3-Exo),使用多株 HCC 及非 HCC 细胞探究其 HCC 靶向能 力。采用超声处理法,使外泌体负载 5-FU,得载 5-FU 的 HCC 靶向外泌体(GPC3-Exo-5FU),使用 HCC 细胞,探究其对 HCC 细胞活力的抑制作用。最后,构建 HCC 皮下荷瘤裸鼠模型,尾静脉给予载药外泌 体,探究其体内抗 HCC 疗效及安全性。

2. 材料

2.1. 主要药品与试剂

DMEM 培养基(上海奥浦迈生物科技股份有限公司); RPMI-1640 培养基、青霉素/链霉素、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(翌圣生物科技(上海)股份有限公司); 胎牛血清、CellCounting-Lite 细胞活力检测试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司); 氟尿嘧啶、聚乙二醇 10000(上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 兔抗 CD63、兔抗 CD81 抗体(Cell Signaling Technology); 兔抗 GPC3、兔抗 GAPDH、兔抗 Ki67、兔抗 Cleaved Caspase 3、HRP 酶标山羊抗兔 IgG(武汉三鹰生物技术有限公司); ECL 化学发光超敏显色试剂盒(Thermo Fisher Scientific); H&E 染色试剂、DAB 显色试剂(武汉塞维尔生物科技有限公司)。

2.2. 主要仪器

Zetasizer Pro 纳米粒度分析仪(Malvern Panalytical); HT7700 透射电子显微镜(Hitachi); SpectraMax M3 微孔板检测器(Molecular Devices); Agilent 1100 高效液相色谱系统(Agilent); TBA-40FR 全自动生化分析 仪(Toshiba); BC-5000 Vet 全自动血液细胞分析仪(Mindray Animal)。

2.3. 实验细胞与培养方法

人肝星状细胞 LX-2、人肝癌细胞 Hep3B、人肝癌细胞 Huh7、人胚胎肾细胞 HEK-293、人胚胎肾细胞 HEK-293T (武汉普诺赛生物科技有限公司),人恶性黑色素瘤细胞 A375、人肝癌细胞 HepG2 (南京科 佰生物科技有限公司)培养于 DMEM 培养基内,人非小细胞肺癌细胞 H1568 培养于 RPMI-1640 培养基 内,培养基添加 10%胎牛血清及 1%青霉素/链霉素,置于恒温培养箱内 37℃,5% CO2 培养。

2.4. 实验动物

SFP级 Nu/Nu 裸鼠(四川维通利华实验动物技术有限公司),雌性,4-6 周龄,许可证号:SCXK(川)2023-0040。本研究严格遵循动物福利伦理原则,动物实验经中国药科大学实验动物伦理委员会的批准。

3. 方法

3.1. 细胞转染

在 GPC3 单克隆抗体 scFv 片段序列[21]的 5'端连接 Igκ leader 信号肽及 His 标签序列, 3'端连接 PDGFR 跨膜结构域, 插入慢病毒载体质粒 pLenti-CMV-GFP-Blast, 构建慢病毒载体 pLenti-GPC3Exo, 靶向肽序列结构可总结为 Igκ leader-His 标签-GPC3 scFv-PDGFR 跨膜结构域-GFP, 在跨膜结构域及信号肽 作用下可向胞外分泌并锚定于细胞膜表面。

按照制造商说明书, pLenti-GPC3Exo 与慢病毒包装质粒 psPAX2 及 pMD2.G 以 1.5 μg:1 μg:0.5 μg 比 例,通过 Lipofectamine 3000 转染 HEK-293T 细胞,培养 48 h 后收集含慢病毒培养上清。

HEK-293 接种于 6 孔板内,培养至汇合度达 70%,加入慢病毒及 10 μg/mL 的 Polybrene 转染 24 h,更换新鲜培养基继续培养 24 h 后,向培养基内加入 10 μg/mL 的 Blasticidin S,继续培养 7 d,筛选稳细胞 系 GE-293。

3.2. 外泌体纯化

GE-293 细胞系培养于含 10%无外泌体血清及 1%青霉素/链霉素的 DMEM 培养基中,无外泌体血清 参考文献方法[22],通过超速离心法,以 4℃,100,000×g 条件离心 18h 制备。细胞培养 48h 后收集培养 上清,使用聚合物沉淀法纯外泌体,培养上清在 4℃下 300×g 离心 10 min、2000×g 离心 10 min、10,000×g 离心 30 min,取上清以 0.45 µm 微孔滤膜过滤,加入 8% PEG10000 及 0.5 M 氯化钠,充分混匀,4℃沉淀 过夜,后在 4℃下 16,000×g 离心 60 min,弃上清,以 PBS 缓冲液重悬沉淀,得工程化外泌体 GPC3-Exo, -20℃保存备用。

3.3. 外泌体表征

3.3.1. 外泌体粒径表征

取适当浓度的外泌体溶液(1 mg/mL,以总蛋白量计)100 μL 置于样品池中,以 PBS 稀释至 1 mL,使用 Zetasizer Pro 测定外泌体粒径分布。

3.3.2. 外泌体形貌表征

取外泌体溶液 10 μL 滴加于铜网上,室温吸附 10 min,小心吸去多余液体,随后向铜网滴加 10 μL 2%醋酸双氧铀染色液,室温染色 2 min,小心吸去多余染色液,室温干燥,铜网置于透射电子显微镜下, 80 kV 检测拍照。

3.3.3. 外泌体蛋白标志物表征

GPC3-Exo 外泌体及 GE-293 细胞以 RIPA 裂解液裂解,使用 BCA 蛋白检测试剂盒检测总蛋白浓度 并调节至相同。与 SDS-PAGE Loading Buffer 混合后 100℃加热 5 min 以变性蛋白,冰浴冷却至常温后短 暂离心,10% SDS-PAGE 凝胶加样电泳。电泳结束后,100 mA 恒流湿法转膜 1.5 h,将蛋白转移至 PVDF 膜上。根据目标蛋白分子量,于适当位置裁剪 PVDF 膜,以 5% BSA 室温封闭 1.5 h,并与相对应一抗 (CD81、CD63、GAPDH、His)在 4℃下孵育过夜。次日以 TBST 洗膜 3 次,再与酶标二抗室温避光孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次,最终加入 ECL 发光液显色,在化学发光成像系统中检测发光信号并拍照记录。

3.4. 5-FU 装载与载药率检测

1 mg/mL 外泌体溶液及 1 mg/mL 5-FU 溶液各取 5 mL 混匀,超声破碎仪处理,超声功率 150 W,超 声处理 30 s,暂停 60 s,重复 6 次[23],全程冰浴。超声处理结束后,溶液置于 37℃继续孵育 1 h 促进外 泌体膜修复。外泌体溶液转移入 100 kDa MWCO 超滤离心管内,25℃,4000×g 离心 30 min,去除游离 5-FU,以 PBS 重悬管内沉淀,得载药外泌体 GPC3-Exo-5FU,分装,保存于-20℃备用。

载药率通过高效液相色谱法测定,取载药外泌体溶液 100 μL,加等体积 RIPA 裂解液裂解 30 min,加入 1 mL 乙酸乙酯/异丙醇(85:15, V/V)萃取液,涡旋震荡 5 min,后 4℃,16,000×g 离心 10 min,吸取上 层有机相 900 μL,温和氮气流干燥,残留物以 100 μL PBS 重新溶解,高效液相色谱进样检测。色谱条件:色谱柱,Waters Atlantis T3 (4.6×150 mm, 3 μm);流动相 A, 0.1%甲酸水溶液(V/V);流动相 B,甲醇;流动相流速,0.8 mL/min;洗脱梯度,0~2 min,10% B, 2~2.1 min,10%~40% B, 2.1~5 min,40% B, 5~5.1 min,40%~10% B, 5.1~12 min,10% B; VWD 检测器波长,265 nm,柱温,35℃;进样量,20 μL。

同时配置外加 5-FU1、10、20、50、75、100 μg/mL 的系列外泌体溶液,同法测定,以色谱峰面积对 5-FU 浓度做标准曲线,用于计算样品中 5-FU 浓度,GPC3-Exo-5FU 载药率计算方法为:

Loading capacity
$$\binom{\%}{=} \frac{W_{D}}{W_{E}} \times 100$$

其中 W_D表示载药外泌体中 5-FU 含量, W_E表示载药外泌体中外泌体含量(以外泌体总蛋白浓度计)。

3.5. 细胞摄取实验

细胞以 2×10⁶/mL 密度接种于 12 孔板,每孔 1 mL,培养过夜。浓度 1 mg/mL 的外泌体以 5 μM DiD 染料标记 30 min,100 kDa MWCO 超滤离心管 25℃,4000×g 离心 30 min,去除游离染料。10 μL 标记外 泌体与细胞共孵育 4 h, PBS 洗涤细胞 2 次,胰酶消化收集细胞,流式细胞仪检测细胞 DiD 荧光强度。

3.6. 细胞增殖实验

细胞以1×10⁴/mL密度接种于96孔板,每孔100μL,培养过夜。以PBS将GPC3-Exo-5FU稀释至 5-FU浓度50μg/mL,向细胞中加入1μL上述GPC3-Exo-5FU溶液,同时设置由同浓度5-FU处理的5-FU组、仅以PBS处理的空白对照组及仅含培养基的矫正组,每组设6个复孔,孵育3d,每日按照 CellCounting-Lite细胞活力检测试剂盒说明书检测各组细胞活力,并按照以下公式计算细胞抑制率:

Inhibition Rate(%) =
$$\frac{[L_{c} - L_{s}]}{[L_{c} - L_{B}]} \times 100$$

其中 L_s表示实验孔(含细胞、培养基、药物溶液及 CCL 试剂)辉光强度; L_e表示对照孔(含细胞、培养基及 CCL 试剂,不含药物)辉光强度; L_b表示校正孔(含培养基、CCL 试剂,不含细胞及药物)辉光强度。

3.7. HCC 裸鼠模型

处于对数生长期的 HepG2 细胞以 DMEM 培养基稀释至 3 × 10⁷/mL,与等体积基质胶混合,裸鼠右 侧腋下接种细胞悬液 200 μL。接种 14 d 后,裸鼠按平均瘤体积随机分为三组: PBS 组、5-FU 组及 GPC3-Exo-5FU 组,每组 5 只裸鼠,瘤体积计算方法如下:

Tumer Volume $(mm^3) = 0.5 \times a \times b^2$

其中 a 为肿瘤长径, b 为肿瘤短径。

分组日记为0d,自0d起各组分别尾静脉通过尾静脉给予PBS、5-FU及GPC3-Exo-5FU,给药剂量以5-FU计30mg/kg,给药体积10ml/kg,每3日给药一次,共给药5次。

给药周期内,每2日记录裸鼠体重及肿瘤体积。15d结束给药,16d时裸鼠摘眼球取血,测定肝肾功能生化指标 ALT、AST、CREA、UREA 及外周白细胞数量。取肿瘤组织,称重并拍照记录,做苏木精 - 伊红 (Hematoxylin-Eosin Staining, H&E) 染色检测肿瘤组织坏死情况,以免疫组织化学染色

(Immunohistochemistry, IHC)检测肿瘤组织内 Ki67 及 Cleaved Caspase 3 表达水平,取主要脏器做 H&E 染 色,评估各组器官损伤情况。

3.8. H&E 染色

器官及肿瘤组织以 10%甲醛溶液固定。以 50%、70%、85%、95%、100%梯度乙醇脱水 1 h,再以无 水乙醇/二甲苯(1:1)浸泡 20 min,二甲苯透化 10 min 2 次。石蜡包埋,切5 μm 薄片。切片 65℃烤片 1 h, 以二甲苯脱蜡 2 次,各 10 min,再以 100%、95%、85%、70%梯度乙醇各水化 5 min,蒸馏水冲洗 5 min。 以苏木精染色液染色 5 min, 以 1%盐酸乙醇分化数秒, 0.6%氨水反蓝, 后用伊红染色液染色 2 min。染色 结束后,依次以75%、85%及无水乙醇脱水5min,二甲苯透化2次,每次10min,切片干燥后,以中性 树胶封片,显微镜下白光观察。

3.9. IHC

肿瘤组织切片 65℃烤片 1 h 后以二甲苯脱蜡 2 次, 各 10 min, 再以 100%、95%、85%、70%梯度乙 醇各水化 5 min,蒸馏水冲洗 5 min。加入抗原修复液,100℃修复 15 min,冷却至室温,PBS 洗涤,以 3% 过氧化氢溶液孵育 30 min 以阻断内源性过氧化物酶, PBS 洗涤后以 5% BSA 室温封闭 30 min, 加入一抗 (Ki67、Cleaved Caspase 3), 4℃孵育过夜。次日取出切片, 以PBS 漂洗, 加入酶标二抗, 室温孵育 60 min, PBS 漂洗。加入 DAB 显色液孵育,切片呈现棕色后以大量蒸馏水终止显色,最后用苏木精核染,依次以 75%、85%及无水乙醇脱水 5 min, 二甲苯透化 2 次, 每次 10 min, 切片干燥后, 以中性树胶封片, 显微 镜下白光观察。

3.10. 统计学分析

实验数据采用 GraphPad Prism 10.2.2 进行分析,两组数据间比较采用 t 检验,多组数据间比较采用 *One-Way ANOVA* 分析,数据结果以(Mean ± SEM)形式呈现,P < 0.05 表示有统计学差异。

4. 结果

4.1. GPC3-Exo 与 GPC3-Exo-5FU 构建及表征

CODOL

外泌体表征结果如图 1 及表 1 所示。通过透射电镜,观察到 GPC3-Exo 呈现典型一侧凹陷的半球形 结构,经超声处理装载 5-FU 的 GPC3-Exo-5FU 形态未发生明显改变(图 1(A))。通过动态光散射系统测量 外泌体粒径大小,结果显示 GPC3-Exo 与 GPC3-Exo-5FU 平均粒径分别为(151.6 ± 3.2) nm 及(191.8 ± 8.3) nm(图 1(B)、表 1), GPC3-Exo-5FU 粒径显著增大,可能是由于 5-FU 被载入外泌体中所导致。通过免疫 印记实验,检测外泌体蛋白标志物,结果表明,外泌体阳性特征蛋白 CD63 及 CD81 在 GPC3-Exo 中高表 达,阴性蛋白 GAPDH 在 GPC3-Exo 中几乎未见表达,且在 GPC3-Exo 中检测到了 His 标签标记的 GPC3 scFv 抗体(图1(C)),表明 GPC3 靶向肽成功整合到 GPC3-Exo 中。使用高效液相色谱法检测,GPC3-Exo-5FU 载药率为(4.96±0.26)%。

Table 1. Particle size of GPC3-Exo and GPC3-Exo-5FU (n = 3, *: P < 0.05)	
表 1. GPC3-Exo 与 GPC3-Exo-5FU 的粒径(n = 3, *: P < 0.05)	

样品	分散介质	平均粒径(nm)
GPC3-Exo	PBS 缓冲液	151.6 ± 3.2
GPC3-Exo-5FU	PBS 缓冲液	$191.8 \pm 8.3^{*}$



 Figure 1. Characterization of GPC3-Exo and GPC3-Exo-5FU

 图 1. GPC3-Exo 及 GPC3-Exo-5FU 表征

4.2. GPC3-Exo 与 GPC3-Exo-5FU 在体外靶向 HCC 细胞



Figure 2. GPC3-Exo and GPC3-Exo-5FU targeting HCC cells in vitro (***: P < 0.001, ns: no significant difference) 图 2. GPC3-Exo 与 GPC3-Exo-5FU 在体外靶向 HCC 细胞 (***: P < 0.001, ns: 无显著差异) 按照 2.7.3 中免疫印记实验方法,检测 HepG2、Huh7、Hep3B、LX-2、H1568、A375 细胞的 GPC3 表达水平,结果如图 2(A)所示,GPC3 在 HCC 细胞系 HepG2、Huh7 中高表达。按照 2.9 中方法,以 DiD 染料标记 GPC3-Exo,与上述细胞系共孵育 4 h,检测各细胞系平均荧光强度,结果表明 HepG2 及 Huh7 细胞平均荧光强度显著高于其他细胞,与GPC3表达水平检测结果相符合,表明 GPC3-Exo 通过靶向 GPC3,实现对 HCC 细胞的靶向(图 2(B))。按照 2.9 中方法,以 DiD 染料标记 GPC3-Exo 及 GPC3-Exo-5FU,分别与 HepG2 及 Huh7 细胞系共孵育 4 h,检测细胞平均荧光强度,结果表明 GPC3-Exo 与 GPC3-Exo-5FU 组细胞平均荧光强度没有明显差异(图 2(C)),表明经超声处理后,GPC3-Exo-5FU 的 HCC 细胞靶向能力 未发生改变。

4.3. GPC3-Exo-5FU 在体外抑制 HCC 细胞活力

如图 3 所示,GPC3-Exo-5FU 处理 HCC 细胞 3 d,其细胞抑制率均达到 50%以上,表明 GPC3-Exo-5FU 在体外具有较强 HCC 细胞抑制能力。对 GPC3 高表达 HCC 细胞 HepG2 及 Huh7,相比于游离 5-FU,GPC3-Exo-5FU 在孵育早期细胞抑制作用更强(图 3(A)、图 3(B)),此现象可能因相比于 5-FU 通过被动扩散或经 hOat2 等转运体进入细胞[24],5-FU 随外泌体被细胞摄取速度更快导致,低 GPC3 表达 HCC 细胞 Hep3B 在孵育第 1 d 时,5-FU 与 GPC3-Exo-5FU 组细胞抑制率无明显差异。HepG2 细胞在孵育第 2 d 后,5-FU 与 GPC3-Exo-5FU 组细胞抑制率差异消失,此现象可能因 HepG2 细胞倍增速度快[25],掩盖了 GPC3-Exo-5FU 与游离 5-FU 间的细胞毒性差异导致。



Figure 3. GPC3-Exo-5FU inhibits HCC cell viability in vitro (*: P < 0.05, ***: P < 0.001) 图 3. GPC3-Exo-5FU 在体外抑制 HCC 细胞活力 (*: P < 0.05, ***: P < 0.001)

4.4. GPC3-Exo-5FU 体内抗 HCC 疗效

GPC3-Exo-5FU 的体内抗 HCC 疗效如图 4 所示。HCC 皮下荷瘤裸鼠分别尾静脉注射 PBS、5-FU 及 GPC3-Exo-5FU, GPC3-Exo-5FU 治疗组裸鼠肿瘤体积为(728.97 ± 74.37) mm³,显著小于 5-FU 治疗组 ((1194.21 ± 123.7) mm³)及 PBS 组((1560.64 ± 76.23) mm³) (图 4(A)、图 4(B)),各组瘤重测量结果与瘤体积 测量结果相符,GPC3-Exo-5FU 治疗组瘤重最轻,为(1.01 ± 0.08) g,显著低于 5-FU 组((1.61 ± 0.18) g)及 PBS 组((2.14 ± 0.11) g) (图 4(C)),表明 GPC3-Exo-5FU 在体内具有抑制 HCC 的能力,且其抗 HCC 疗效 强于游离 5-FU。

为进一步探究 GPC3-Exo-5FU 对肿瘤组织增殖及凋亡的影响,取肿瘤组织进行 H&E 与 IHC 染色,结果如图 5 所示。GPC3-Exo-5FU 治疗组肿瘤组织内可见明显坏死区域,IHC 结果表明 GPC3-Exo-5FU 组肿瘤内凋亡相关蛋白 Cleaved Caspase 3 表达水平明显提升,而细胞增殖标志物 Ki67 表达水平下降,表明 GPC3-Exo-5FU 诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞增殖。



Figure 4. In vivo anti-HCC efficacy of GPC3-Exo-5FU (n = 5, *: P < 0.05, ***: P < 0.001) **图 4.** GPC3-Exo-5FU 的体内抗 HCC 疗效 (n = 5, *: P < 0.05, ***: P < 0.001)



Figure 5. H&E staining and IHC of mice tumor tissue, scale bar 50 μm 图 5. 小鼠肿瘤组织 H&E 及 IHC 染色,标尺 50 μm

4.5. GPC3-Exo-5FU 的体内安全性

治疗期间,小鼠的体重变化趋势可一定程度上反映药物的体内安全性。如图 6 所示,HCC 皮下荷瘤 小鼠尾静脉注射 PBS、5-FU 及 GPC3-Exo-5FU,PBS 组及 GPC3-Exo-5FU 组小鼠体重总体呈上升趋势, 治疗结束时 GPC3-Exo-5FU 组小鼠体重低于 PBS 组,但无显著差异。5-FU 组小鼠体重增长缓慢,治疗结 束时显著低于 GPC3-Exo-5FU 组,表明 GPC3-Exo-5FU 体内安全性高于游离 5-FU。



Figure 6. Body weight curve of mice (n = 5, *: P < 0.05, ns: no significant difference)图 6. 小鼠体重变化曲线(n=5, *: P < 0.05, ns: 无显著差异)

取小鼠血液进行血生化及血常规分析,常见肝肾功能指标 ALT、AST、CREA、UREA 及外周白细胞 数量检测结果如图 7 所示。GPC3-Exo-5FU 细胞常见肝肾功能损伤指标 ALT、AST、CREA 水平降低,三 组间肾功能损伤指标 UREA 水平无明显差异,表明 GPC3-Exo-5FU 不易造成肝肾功能损伤。GPC3-Exo-5FU 组外周血白细胞计数与 PBS 组无明显差异,5-FU 组与 PBS 组相比显著降低,表明 GPC3-Exo-5FU 的血液毒性比游离 5-FU 更低。





为进一步探究 GPC3-Exo-5FU 的体内安全性,取小鼠主要脏器心、肝、脾、肺、肾进行 H&E 染色,结果如图 8 所示。各组小鼠主要脏器均未见形态异常,进一步表明 GPC3-Exo-5FU 具有良好的体内安全性。



Figure 8. H&E staining of mice major organs, scale bar 50 μm 图 8. 小鼠主要器官 H&E 染色,标尺 50 μm

5. 结论

本研究通过基因工程修饰法构建,并使用聚合物沉淀法纯化了在膜表面表达 GPC3 scFv 抗体的工程 化外泌体 GPC3-Exo,其在体外表现出对 GPC3 高表达 HCC 细胞的特异性靶向能力,展现出作为 HCC 药 物递送载体的潜力。为利用 GPC3-Exo 进行 HCC 靶向药物递送,本研究采用超声处理法,将 HCC 治疗 药物 5-FU 载入 GPC3-Exo 内,得载药外泌体 GPC3-Exo-5FU。经超声处理,GPC3-Exo-5FU 结构完整, HCC 靶向能力未发生改变,使用高效液相色谱法检测,载药率达(4.96±0.26)%,在体外可显著抑制 HCC 细胞活力,细胞毒性较游离 5-FU 更强。最后,本研究构建了 HCC 皮下荷瘤裸鼠模型,探究 GPC3-Exo-5FU 的体内抗 HCC 活性及安全性,结果表明 GPC3-Exo-5FU 可显著抑制裸鼠肿瘤生长,同时其抗肿瘤疗 效与安全性均高于同剂量游离 5-FU。本研究构建了一种具有良好 HCC 靶向能力的工程化外泌体,用作 HCC 药物递送载体时可提高药物疗效、降低毒副反应,或将为晚期 HCC 治疗提供一种新的选择。

参考文献

- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Soerjomataram, I., *et al.* (2024) Global Cancer Statistics 2022: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74, 229-263. <u>https://doi.org/10.3322/caac.21834</u>
- [2] Sia, D., Villanueva, A., Friedman, S.L. and Llovet, J.M. (2017) Liver Cancer Cell of Origin, Molecular Class, and Effects on Patient Prognosis. *Gastroenterology*, 152, 745-761. <u>https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.11.048</u>
- [3] Wang, Y. and Deng, B. (2023) Hepatocellular Carcinoma: Molecular Mechanism, Targeted Therapy, and Biomarkers. *Cancer and Metastasis Reviews*, **42**, 629-652. <u>https://doi.org/10.1007/s10555-023-10084-4</u>
- [4] Siegel, R.L., Kratzer, T.B., Giaquinto, A.N., Sung, H. and Jemal, A. (2025) Cancer Statistics, 2025. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 75, 10-45. <u>https://doi.org/10.3322/caac.21871</u>
- [5] Longley, D.B., Harkin, D.P. and Johnston, P.G. (2003) 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies.

Nature Reviews Cancer, **3**, 330-338. <u>https://doi.org/10.1038/nrc1074</u>

- [6] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 原发性肝癌诊疗指南(2024 年版) [J]. 临床肝胆病杂志, 2024, 40(5): 893-918.
- [7] Miura, K., Kinouchi, M., Ishida, K., Fujibuchi, W., Naitoh, T., Ogawa, H., *et al.* (2010) 5-FU Metabolism in Cancer and Orally-Administrable 5-FU Drugs. *Cancers*, **2**, 1717-1730. <u>https://doi.org/10.3390/cancers2031717</u>
- [8] Suzuki, S., Hongu, Y., Fukazawa, H., *et al.* (1980) Tissue Distribution of 5'-Deoxy-5-Fluorouridine and Derived 5-Fluorouracil in Tumor-Bearing Mice and Rats. *GANN Japanese Journal of Cancer Research*, **71**, 238-245.
- [9] Bunggulawa, E.J., Wang, W., Yin, T., Wang, N., Durkan, C., Wang, Y., et al. (2018) Recent Advancements in the Use of Exosomes as Drug Delivery Systems. *Journal of Nanobiotechnology*, 16, Article No. 81. https://doi.org/10.1186/s12951-018-0403-9
- [10] Chong, S.Y., Lee, C.K., Huang, C., Ou, Y.H., Charles, C.J., Richards, A.M., et al. (2019) Extracellular Vesicles in Cardiovascular Diseases: Alternative Biomarker Sources, Therapeutic Agents, and Drug Delivery Carriers. International Journal of Molecular Sciences, 20, Article No. 3272. <u>https://doi.org/10.3390/ijms20133272</u>
- [11] Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H. and Tang, W.H. (2019) Exosomes: Biogenesis, Biologic Function and Clinical Potential. *Cell & Bioscience*, 9, Article No. 19. <u>https://doi.org/10.1186/s13578-019-0282-2</u>
- [12] Gurung, S., Perocheau, D., Touramanidou, L. and Baruteau, J. (2021) The Exosome Journey: From Biogenesis to Uptake and Intracellular Signalling. *Cell Communication and Signaling*, **19**, Article No. 47. https://doi.org/10.1186/s12964-021-00730-1
- [13] O'Brien, K., Breyne, K., Ughetto, S., Laurent, L.C. and Breakefield, X.O. (2020) RNA Delivery by Extracellular Vesicles in Mammalian Cells and Its Applications. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21, 585-606. <u>https://doi.org/10.1038/s41580-020-0251-y</u>
- [14] Kalluri, R. and LeBleu, V.S. (2020) The Biology, Function, and Biomedical Applications of Exosomes. Science, 367, eaau6977. <u>https://doi.org/10.1126/science.aau6977</u>
- [15] Tran, P.H.L., Xiang, D., Tran, T.T.D., Yin, W., Zhang, Y., Kong, L., et al. (2019) Exosomes and Nanoengineering: A Match Made for Precision Therapeutics. Advanced Materials, 32, e1904040. <u>https://doi.org/10.1002/adma.201904040</u>
- [16] Wang, J., Forterre, A.V., Zhao, J., Frimannsson, D.O., Delcayre, A., Antes, T.J., *et al.* (2018) Anti-HER2 scFv-Directed Extracellular Vesicle-Mediated mRNA-Based Gene Delivery Inhibits Growth of HER2-Positive Human Breast Tumor Xenografts by Prodrug Activation. *Molecular Cancer Therapeutics*, **17**, 1133-1142. <u>https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-17-0827</u>
- [17] Shih, T., Wang, L., Wang, H. and Wan, Y.Y. (2020) Glypican-3: A Molecular Marker for the Detection and Treatment of Hepatocellular Carcinoma. *Liver Research*, 4, 168-172. <u>https://doi.org/10.1016/j.livres.2020.11.003</u>
- [18] Li, N., Spetz, M.R. and Ho, M. (2020) The Role of Glypicans in Cancer Progression and Therapy. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 68, 841-862. <u>https://doi.org/10.1369/0022155420933709</u>
- [19] Shi, Y., Shi, D., Chi, J., Cui, D., Tang, X., Lin, Y., et al. (2023) Combined Local Therapy and CAR-GPC3 T-Cell Therapy in Advanced Hepatocellular Carcinoma: A Proof-of-Concept Treatment Strategy. Cancer Communications, 43, 1064-1068. <u>https://doi.org/10.1002/cac2.12472</u>
- [20] Zhang, Q., Fu, Q., Cao, W., Wang, H., Xu, X., Huang, J., et al. (2024) Phase I Study of C-CAR031, a GPC3-Specific TGFβRIIDN Armored Autologous CAR-T, in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma (HCC). Journal of Clinical Oncology, 42, 4019-4019. <u>https://doi.org/10.1200/jco.2024.42.16_suppl.4019</u>
- [21] 王华茂, 宋波. 抗磷脂酰肌醇蛋白多糖-3 的抗体及其应用[P]. 中国, CN111018986B. 2023-07-18.
- [22] Tian, Y., Gong, M., Hu, Y., Liu, H., Zhang, W., Zhang, M., et al. (2019) Quality and Efficiency Assessment of Six Extracellular Vesicle Isolation Methods by Nano-Flow Cytometry. Journal of Extracellular Vesicles, 9, Article ID: 1697028. <u>https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1697028</u>
- [23] Chen, M., Li, Y., Ma, N. and Zang, J. (2022) Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Loaded with 5-Fu against Cholangiocarcinoma in Vitro. Molecular Medicine Reports, 25, Article No. 213. https://doi.org/10.3892/mmr.2022.12729
- [24] Wang, Y., Zhu, Q., Hu, H., Zhu, H., Yang, B., He, Q., et al. (2021) Upregulation of Histone Acetylation Reverses Organic Anion Transporter 2 Repression and Enhances 5-Fluorouracil Sensitivity in Hepatocellular Carcinoma. *Biochemical Pharmacology*, 188, Article ID: 114546. <u>https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114546</u>
- [25] Hatta, F.H.M., Che Omar, R.N., Ismail, M.I., Yusoff, R.M. and Ahmad Noorden, M.S. (2022) Determining the Population Doubling Time of HepG2 and Huh-7 Cells and the Toxic Effect of Dimethyl Sulfoxide (DMSO). ASM Science Journal, 17, 1-5. <u>https://doi.org/10.32802/asmsej.2022.1238</u>