

N-(2-羟丙基)甲基丙烯酸酰胺聚合物-5-氟尿嘧啶接合物的体外释药规律、体内分布及抗肿瘤活性研究

袁芳¹, 张志荣¹, 杨云霞², 黄园^{1*}

(四川大学 1. 华西药学院, 2. 华西基础与法医学院, 四川 成都 610041)

摘要: 考察本实验室合成的 *N*-(2-羟丙基)甲基丙烯酸酰胺 [*N*-(2-hydroxypropyl) methacrylamide, HPMA] 聚合物-5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU) 接合物 (P-FU) 的体外释药、体内分布及抗肿瘤活性。以小鼠血浆为介质, 考察 P-FU 中 5-FU 的释放规律; 以小鼠 H22 肝癌实体瘤模型 (皮下型) 为肿瘤模型, 考察接合物在荷瘤小鼠体内的分布情况、药代动力学规律及抑瘤活性。结果表明, 37 °C 时 P-FU 在小鼠血浆中具有一定的稳定性, 半衰期 ($t_{1/2}$) 为 32.4 h。与 5-FU 相比, P-FU 在荷瘤小鼠体内的循环时间明显延长 (血浆中 $t_{1/2}$ 为原药的 166 倍), 在肿瘤中的沉积量 (AUC 为 5-FU 的 3.3 倍) 及滞留时间 ($t_{1/2}$ 为 5-FU 的 2.3 倍) 均有明显增加。体内药效学研究表明, P-FU 组对荷瘤小鼠的肿瘤生长抑制率 (69.09%) 显著高于 5-FU 组 (56.49%, $P < 0.05$), 瘤块组织病理学观察结果也显示 P-FU 组小鼠肿瘤组织中细胞凋亡程度大于 5-FU 组。HPMA 聚合物可被用于 5-FU 构建一种新型实体瘤高分子给药系统。

关键词: *N*-(2-羟丙基)甲基丙烯酸酰胺聚合物; 5-氟尿嘧啶; 抗肿瘤药物

中图分类号: R943

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2008)11-1152-05

In vitro release study, *in vivo* evaluation of biodistribution and antitumor activity of HPMA copolymer-5-fluorouracil conjugates

YUAN Fang¹, ZHANG Zhi-rong¹, YANG Yun-xia², HUANG Yuan^{1*}

(1. West China School of Pharmacy, 2. West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: The *in vitro* release behavior, *in vivo* biodistribution and antitumor activity of *N*-(2-hydroxypropyl) methacrylamide (HPMA) copolymer-5-fluorouracil conjugates (P-FU) were studied. The *in vitro* release behavior was evaluated by determining the amount of 5-fluorouracil (5-FU) released from P-FU in mice plasma at 37 °C. The *in vivo* biodistribution and therapeutic evaluation were investigated with Kunming mice bearing hepatoma 22 (H22). The *in vitro* half-life ($t_{1/2}$) of P-FU in mice plasma was 32.4 h. It appeared that the circulation life time of the conjugates were 166 times longer than that of 5-FU. The AUC and $t_{1/2}$ of P-FU in tumor were 3.3 times and 2.3 times more than those of 5-FU, respectively. Therapeutic evaluation also demonstrated that the treatment with P-FU displayed stronger inhibition of the tumor growth when compared with that of 5-FU ($P < 0.05$). HPMA copolymer is a potential carrier for 5-FU for effective treatment of cancer.

Key words: *N*-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymer; 5-fluorouracil; antitumor drug

5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU) 属于抗嘧啶代

谢类药物, 是常用化疗药物之一。但它在给药后体内清除速率较快, 血浆半衰期仅 10 ~ 20 min, 且 85% 药物都在肝、肾等组织中经不可逆酶促反应分解为非活性代谢物, 直接影响其治疗效果, 限制了其在临床上的应用^[1,2]。

收稿日期: 2008-07-03.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30500636); 教育部“新世纪优秀人才支持计划” (NCET-06-0786).

* 通讯作者 Tel / Fax: 86-28-85501617,

E-mail: huangyuan0@yahoo.com.cn

与小分子抗癌药物相比,水溶性高分子聚合物-抗癌药物接合物具有两大优点:①能避免被肾脏快速清除,从而延长了药物在血液循环中的半衰期;②对实体瘤具有倾向性沉积作用,称为“增强的透过和滞留效应”(enhanced permeability and retention effect, EPR 效应)^[3]。这种效应产生的原因主要是由于肿瘤组织血管丰富,且肿瘤血管能产生血管坏死因子、渗透因子等物质使其通透性增加,聚合物易于通过血液循环到达实体瘤组织;同时,肿瘤部位的淋巴循环较正常组织的渗透率低,从而使得聚合物很难通过淋巴循环排出,最终进入肿瘤细胞。

水溶性 *N*-(2-羟丙基)甲基丙烯酰胺 [*N*-(2-hydroxypropyl) methacrylamide, HPMA] 聚合物作为抗癌药物载体的研究已有 30 多年的历史^[4]。它具有良好的生物相容性、非免疫原性、无毒性及可根据使用目的对结构进行修饰的特点^[5]。小分子抗癌药物可通过甘氨酸苯丙氨酸亮氨酸甘氨酸 (methacryloylglycyl-*DL*-phenylalanyl-*L*-leucyl-glycine, GFLG) 四肽间隔基被连接至 HPMA 聚合物载体。接合物通过 EPR 效应进入实体瘤组织后,再通过胞饮作用进入肿瘤细胞,被溶酶体吞噬后经溶酶体酶分解多肽间隔基而释放出药物^[5]。研究表明,此类接合物能显著改善小分子药物在体内的分布和药代动力学特性^[6,7]。HPMA 聚合物-阿霉素接合物等 HPMA 聚合物-抗癌药物接合物已进入临床 I、II 期试验^[5]。但目前对 HPMA 聚合物类接合物的研究主要局限于具有伯氨基或仲胺基的药物,如何将其应用于更多的小分子药物并考察其对不同肿瘤模型的活性是 HPMA 聚合物的发展方向之一。

因此,本实验设计采用 5-FU 为模型药物,将其衍生物 1,3-二羟甲基-5-氟尿嘧啶通过 GFLG 四肽间隔基与 HPMA 聚合物偶联,成功合成了具有较高载药量的 HPMA 聚合物-5-FU 接合物 (P-FU)^[8]。本文系统研究其体外释药规律,体内分布及药代动力学规律,并对其体内抗肿瘤活性进行初步评价,为实体瘤高分子靶向给药系统的研究提供了一定的理论依据。

材料与方 法

仪器 ALLTECH2426-201 高效液相色谱仪; OLYMPUS ZI145 解剖显微镜。

试剂与药品 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 购自江苏南通制药厂;HPMA 聚合物-5-氟尿嘧啶接合物 (P-FU)

由本实验室自制^[8],载药量为 $(3.92 \pm 0.02)\%$ (*w/w*); 5-溴尿嘧啶 (5-bromouracil, 5-BU) 购自 Sigma 公司; 甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

动物与瘤株 雌性昆明种小鼠 (18 ± 2) g 及鼠源性 H22 肝癌瘤株由四川大学基础医学院药理教研室提供。

P-FU 在小鼠血浆中的降解动力学研究 将昆明种小鼠眼眶取血后处死,全血至肝素钠离心管内 $5\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后,取上清液,用 $0.05\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 稀释成 30% 的血浆,加入适量 P-FU,使其含量为 $5.0\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,充氮气后置于 $(37 \pm 0.5)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 空气浴振荡器中,于不同时间取样 $100\ \mu\text{L}$,加入甲醇 $400\ \mu\text{L}$,涡旋振荡 5 min 后, $14\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液 $20\ \mu\text{L}$ 进样,测定 5-FU 的释放量。色谱条件: Alltech 2426-201; 色谱柱: Alltech C_{18} -ODS 柱 ($250\ \text{mm} \times 4.6\ \text{mm}, 5\ \mu\text{m}$); 流动相: 去离子水; 柱温: $30\text{ }^{\circ}\text{C}$; 检测波长: $266\ \text{nm}$; 流速: $1\ \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

P-FU 及 5-FU 的荷瘤小鼠体内分布研究 取雌性昆明种小鼠,每鼠右腋皮下接种 H22 腹水瘤悬液 $0.2\ \text{mL}$ (约含癌细胞 1×10^6 个)。接种后 d 9,肿瘤生长稳定后,将荷瘤小鼠随机分为 19 组,每组 5 只。其中实验组为 10 组,尾静脉注射以灭菌生理盐水分散的 P-FU 水溶液;另外 9 组作为对照组,注射 5-FU 生理盐水溶液。实验组按 5-FU 给药量均为 $24\ \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,注射体积为 $0.02\ \text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 。实验组和对照组分别于给药后 0.5、1、2、4、8、12、24、36、48、72 h 和 0.08、0.25、0.5、1、2、4、8、12、18 h 眼眶取血后迅速处死小鼠,取出心、肝、脾、肺、肾和肿瘤,将每组 5 只小鼠的相同器官和血样分别混合。各组器官分别精密称重后,加入 2 倍量水匀浆。全血置肝素化塑料离心管中 $5\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后,取上清液。取血浆 (或组织匀浆) $0.5\ \text{mL}$,精密加入适量 5-BU 水溶液作为内标,再精密加入 $3\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠 $40\ \mu\text{L}$ 后室温水解 15 min (对照组的生物样品可不进行水解),磷酸盐缓冲液 (pH 3.0) $40\ \mu\text{L}$ 及 $6\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸 $20\ \mu\text{L}$ 将样品 pH 值调至弱酸性 (约 pH 5),涡旋混匀后加入饱和硫酸铵 $1\ \text{mL}$ 涡旋混匀 5 min, $14\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min; 转移上清液,并加入乙酸乙酯 $6\ \text{mL}$,涡旋萃取 8 min, $3\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,吸取乙酸乙酯层, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 空气流烘干,残渣以 $250\ \mu\text{L}$ 流动相超声溶解, $14\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后取上清液 $20\ \mu\text{L}$ 进样分析。色谱条件同上。

P-FU 及 5-FU 的抑瘤作用研究 H22 荷瘤小鼠模型的建立方法同上。将荷瘤小鼠随机分为 3 组 ($n=5$): 生理盐水组(对照组)、5-FU 组和 P-FU 组。各组于接种后 d 4 开始给药, 给药体积为 $0.02 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$, 连续给药 4 d, 每天 1 次, 其中 5-FU 组和 P-FU 组按 5-FU 给药剂量均为 $18 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。从给药 d 1 开始每天用游标卡尺测量肿瘤的长径和短径, 测量时间持续至 d 8。于 d 8 测量结束后将小鼠处死, 解剖后称取瘤重, 并计算各实验组抑瘤率。

肿瘤体积 = 长径 \times 短径²/2, 其中长径: 表示与瘤块表面平行的最长直径; 短径: 表示与瘤块表面平行且垂直于长径的直径。

抑瘤率(%) = [(对照组的平均瘤重 - 实验组的平均瘤重)/对照组的平均瘤重] \times 100

瘤块组织病理学检查 将实验 d 8 处死后的 3 组荷瘤小鼠解剖后, 分别取其新鲜瘤块组织置于 4% 中性甲醛固定液中固定 48 h 后, 用梯度乙醇脱水, 再在二甲苯中透明化, 石蜡包埋。将包埋好的蜡块固定于切片机上, 切成薄片, 放 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 的水中烫平, 再贴到载玻片上, 置于 $45 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温箱中烘干, 留做 HE 染色, 光镜下观察、拍照。

统计学分析 数据采用 SPSS 10.0 软件进行统计学处理, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 组间差异采用两样本均数比较的 t 检验。

结果

1 P-FU 的体外降解动力学研究

P-FU 在血浆中前 12 h 内释放量低于 25%, 所有药物在 60 h 内基本释放完全。

为判断 P-FU 的释药规律, 评价药物释放过程的动力学特征, 应用常见的零级释放模型、一级释药模型(即单指数模型)、Peppas 方程、Niebergull 方程、Hixson-Crowell 方程及 Higuchi 方程对 P-FU 在血浆中的释药曲线进行拟和。其中零级释药模型的残差平方和(residual sum of squares, R_e)、AIC 值最小, 拟合度(fitting degree, r^2)最大, 为 P-FU 在血浆中释药过程的最佳拟合模型。由该模型的拟合方程计算得到 P-FU 在血浆中的半衰期为 32.4 h。

2 P-FU 及 5-FU 的荷瘤小鼠体内分布及药代动力学研究

按上述生物样品处理方法分别制备加药血浆及组织的标准曲线(由于药物浓度范围较大, 故均作了高、低两个范围的标准曲线)。血浆样品中 5-FU 浓度 $0.0501 \sim 5.010 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 及 $5.010 \sim 300.6$

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 肿瘤样品中 5-FU 浓度 $0.1002 \sim 5.010 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 及 $1.002 \sim 50.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 心、肝、脾、肺和肾样品中 5-FU 浓度 $0.0501 \sim 5.010 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 及 $1.002 \sim 50.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 浓度与峰面积比的线性关系良好。心、肝、脾、肺、肾、血浆和肿瘤样品中 5-FU 高、中、低 3 种浓度(0.250 5, 2.505, 25.05 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的平均回收率及 RSD 分别为 98.06%, 2.92%; 96.60%, 2.45%; 96.05%, 1.37%; 99.13%, 3.49%; 99.67%, 1.76%; 99.77%, 4.69%; 99.58%, 3.62%。日内及日间精密密度均小于 10%。

以不同时间血浆及各组织中的 5-FU 的含量占总给药量(total administration dose, TAD)的百分数评价 5-FU 及 P-FU 在荷瘤小鼠体内的分布, 结果见表 1 和表 2。

Table 1 Percentage of total administration dose (TAD) of free 5-FU in plasma and tissues

	TAD/%						
	Heart	Liver	Spleen	Lung	Kidney	Tumor	Plasma
0.08 h	0.051	0.099	0.022	0.100	0.011	0.150	4.940
0.25 h	0.026	0.082	0.006	0.029	0.057	0.179	2.110
0.5 h	0.004	0.066	0.005	0.005	0.022	0.096	0.710
1 h	0.002	0.061	0.003	0.005	0.022	0.039	0.063
2 h	0.001	0.034	0.003	0.002	0.019	0.055	0.019
4 h	0	0.065	0.002	0.001	0.010	0.035	0.018
8 h	0	0.054	0.002	0	0.009	0.044	0
12 h	0	0.030	0.001	0	0.004	0.046	0
18 h	0	0.015	0.001	0	0	0.008	0

Table 2 Percentage of TAD of P-FU in plasma and tissues

	TAD/%						
	Heart	Liver	Spleen	Lung	Kidney	Tumor	Plasma
0.5 h	0.112	2.35	0.130	0.284	0.522	0.336	88.03
1 h	0.056	1.12	0.129	0.244	0.401	0.641	83.81
2 h	0.041	0.561	0.016	0.107	0.264	0.240	38.30
4 h	0.042	0.738	0.021	0.086	0.142	0.115	22.16
8 h	0.020	0.044	0.015	0.050	0.105	0.075	14.11
12 h	0.014	0.261	0.010	0.027	0.061	0.089	9.49
24 h	0.005	0.168	0.005	0.008	0.024	0.026	1.56
36 h	0.002	0.114	0.002	0	0.008	0.018	0.55
48 h	0	0.064	0	0	0	0.015	0.35
72 h	0	0.033	0	0	0	0.008	0.22

应用 DAS 2.0 药动力学分析软件对小鼠血浆及各组织的药时数据进行处理, 表 3 为接合物及原药在肿瘤和血浆中的主要药动力学参数。

由表 1~3 可知, P-FU 与 5-FU 在荷瘤小鼠体内的分布具有明显的差异。5-FU 给药后可迅速代谢

Table 3 Major pharmacokinetic parameters of P-FU and free 5-FU in plasma and tumors ($n=5$)

	Plasma		Tumor	
	P-FU	5-FU	P-FU	5-FU
$AUC_{0-\infty}/mg \cdot L^{-1} \cdot h$	1 302.161	5.103	59.881	18.296
$t_{1/2}/h$	26.657	0.160	17.239	7.438
$CL/L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1}$	0.018	3.420	0.615	1.488

并分布至各组织,5 min 时各组织的药物浓度即达峰值,血浆中的 TAD 仅 4.94%,2 h 时已无法检出;接合物大大延长了药物的血液循环时间,血浆中 0.5 h 时的 TAD 为 88.03%,72 h 时仍有 0.22%,其血浆半衰期为原药的 166 倍。5-FU 在肿瘤中的最大分布为 0.179% (15 min),并在 18 h 基本完全消除(0.008%);而 P-FU 在肿瘤中的分布于 1 h 达到最大值(0.641%),36 h 时仍有 0.018%,72 h 降至 0.008%,其 AUC 为原药的 3.3 倍, $t_{1/2}$ 为原药的 2.3 倍,说明接合物能够增加 5-FU 在肿瘤中的分布并延长其滞留时间。尽管与原药相比,接合物在心、肝、脾、肺、肾中的分布有所增加,但其浓度均在较短时间(1~2 h)后开始迅速下降,至 48 h 除肝脏外均已无法检出,而肝中的 TAD 在 72 h 时降至 0.033%。

3 P-FU 及 5-FU 的抑瘤作用研究及瘤块组织病理学检查

由表 4 可知,P-FU 组和 5-FU 组抑瘤率分别为 69.09% 及 56.49% ($P < 0.05$),同时,P-FU 组小鼠肿瘤体积的生长速率显著性低于 5-FU 组 ($P < 0.05$) (图 1)。

图 2 为 P-FU 组、5-FU 组及对对照组荷瘤小鼠的瘤块组织病理学切片结果。结果表明 3 组小鼠肿瘤组织有不同程度的坏死及细胞凋亡,可表示如下: P-FU 组 > 5-FU 组 >> 对照组。该结果与 P-FU 和 5-FU 的抑瘤实验结果一致,进一步证实 P-FU 比 5-FU 具有更强的抑瘤作用。

Table 4 The antitumor activities of P-FU and 5-FU in H_{22} -bearing mice

Group	Tumor weight/g	Tumor growth inhibition rate/%
5-FU	0.442 ± 0.082 **	56.49
P-FU	0.314 ± 0.044 ** Δ	69.09
Control	1.016 ± 0.155	-

$\bar{x} \pm s, n=5$. ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs 5-FU group

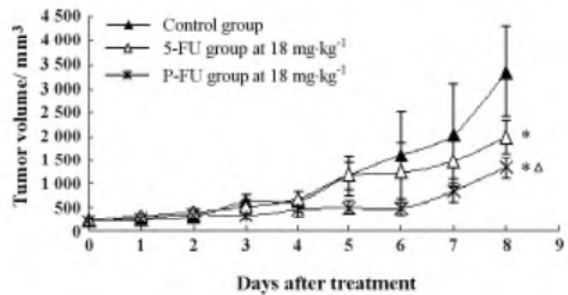


Figure 1 Growth inhibition of hepatoma 22 in mice by *iv* administration of P-FU and 5-FU. * $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs 5-FU group, $n=5$

讨论

P-FU 在体外降解动力学的研究结果表明其在血浆中具有一定稳定性, $t_{1/2}$ 达 32.4 h。说明 HPMA 聚合物给药系统可能会在一定程度上延长 5-FU 在体内的循环时间,从而为增加其在肿瘤中的分布,增强疗效提供了可能性。

由表 1 可知,原药在给药 5 min 后测得其在血浆及各组织的 TAD 总量非常低,约为 5%。推测有两种原因:① 5-氟尿嘧啶经静脉给药后,在体内各组织能迅速分布,除已检测的心、肝、脾、肺、肾、肿瘤组织外,其在腹膜、胃壁、肠壁和肌肉等组织也有较多分布^[1];② 据报道^[1,2] 5-FU 给药量的 85% 都通过二氢嘧啶脱氢酶分解代谢为无活性产物二氢

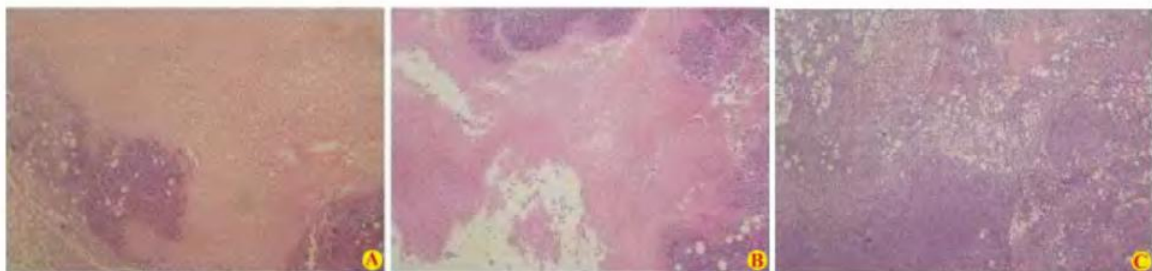


Figure 2 Histopathology of tumors from H_{22} -bearing mice: P-FU group (A), 5-FU group (B) and control group (C). ($\times 40$)

氟尿嘧啶而被排出体外。这种酶主要存在于肝脏,其次为肠道组织和肾脏。

由表 1,2 可知,P-FU 在血浆的清除速率远远小于原药,循环时间大大延长。接合物的血浆半衰期为 26.657 h,约为原药(0.16 h)的 166 倍。可能原因:① 药物连接于高分子聚合物,分子大小增加从而导致肾小球滤过率降低;② 细胞摄取机制的改变,由原药的自由扩散变为聚合物的胞饮作用,后者速率比前者慢,因此减慢了在各组织中的分布^[5];③ 5-FU 以接合物的形式存在,延缓了其在肝等组织^[1,2]的酶促分解代谢作用。

高分子接合物具有被动的肿瘤选择性沉积作用的特性。体内分布实验结果表明,P-FU 在肿瘤中的分布于 1 h 达最高值,AUC 值和消除半衰期分别为 59.881 mg·h·L⁻¹和 17.239 h,与原药(18.296 mg·h·L⁻¹,7.438 h)相比,明显增加了药物在肿瘤的分布和滞留时间。这与 HPMA 聚合物给药系统的有关文献^[6,7]报道相似,可能与 EPR 效应有关。药物在组织的沉积取决于血液循环中药物的输入量和淋巴循环的输出量。肿瘤组织血管丰富,易分泌血管渗透因子增大其血管通透性,使得水溶性高分子物质易从血管中溢出而到达肿瘤间质,而肿瘤部位的淋巴循环较正常组织差,则减少了高分子物质的排出。与小分子药物相比,高分子给药系统增强抑瘤效果的前提条件是其被动的肿瘤选择性沉积作用,而必要条件是接合物在分布至肿瘤组织后能够顺利解离释放出原形药物。药效学结果表明,接合物组的抑瘤效果明显强于原药组,证实了 HPMA 聚合物给药系统在分布至肿瘤后可有效解离出原药,达到增强药物疗效的目的。然而,P-FU 在肿瘤中的分布于 1 h 达峰后开始持续下降,其血浆和各器官的分布也在 1 h 后开始迅速下降(表 2)。这可能是由于 5-FU 与间隔基之间的酯键在体内血液循环中不够稳定,使得药物从聚合物载体上解离,游离的药物迅速被分解代谢而排出体外。因此,尚需进一步研究如何增强接合物的稳定性。

此外,由于接合物在血液中的循环时间较长,并在很大程度上延缓了药物的代谢,所以在其他组织器官中的分布总量与原药比较都有不同程度的增加,但在 72 h 内几乎均已清除。

抗癌药物体内药效学研究中常用的动物移植性

肿瘤模型分为实体瘤和非实体瘤(腹水瘤)模型。对于实体瘤模型,常以每组动物的平均瘤重作为疗效指标,此外,还可通过测量瘤体大小的方法动态观察瘤体变化^[9]。本研究以实验动物的瘤体体积变化和平均瘤重为指标,比较了 P-FU 和 5-FU 对 H22 实体瘤的治疗效果,并对各组小鼠瘤块作了组织病理学检查。

综上所述,将 5-FU 连接至 HPMA 聚合物载体后,能够明显延长其在体内的血液循环时间,增加其在肿瘤的分布和滞留时间,从而增强其治疗效果。

References

- [1] Daher GC, Harris BE, Diasio RB. Metabolism of pyrimidine analogues and their nucleosides [J]. *Pharmacol Ther*, 1990,48:189-222.
- [2] Grem JL. 5-Fluoropyrimidines [M] // Chabner BA, Longo DL. *Cancer Chemotherapy and Biotherapy Principles and Practice*. Philadelphia PA: Lippincott press, 1996:149-211.
- [3] Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent SMANCS [J]. *Cancer Res*, 1986, 46:6387-6392.
- [4] Ulbrich K, Šubr V. Polymeric anticancer drugs with pH-controlled activation [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56:1023-1050.
- [5] Kopeček J, Kopečková P, Minko T, et al. HPMA copolymer-anticancer drug conjugates: design, activity, and mechanism of action [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2000,50:61-81.
- [6] Shiah JG, Dvorak M, Kopečková P, et al. Biodistribution and antitumor efficacy of long-circulation N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymer-doxorubicin conjugates in nude mice [J]. *Eur J Cancer*, 2001,37:131-139.
- [7] Huang Y, Zhang ZR. Selective tumor-accumulation of HPMA copolymer-mitoxantrone conjugates [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2004,39:374-379.
- [8] Yuan F, Chen F, Xiang QY, et al. Synthesis and characterization of HPMA copolymer-5-FU conjugates [J]. *Chin Chem Lett*, 2008,19:137-140.
- [9] Liu JW. The construction of solid tumor animal model and therapeutic evaluation of drugs [M] // *Pharmacology experimental methodology-new technique and method (药理实验方法学——新技术与新方法)*. Beijing: Chemical Industry Press, 2003:22-23.