



近红外荧光染料 IR-783 介导的肿瘤成像

张彩勤, 张海, 赵勇, 毛峰峰, 白冰, 师长宏

(第四军医大学实验动物中心, 西安 710032)

【摘要】 目的 评估近红外荧光染料 IR-783 在犬自发性肿瘤中的特异性成像。方法 将 IR-783 染料(5 $\mu\text{mol}/\text{kg}$)腹腔注射荷瘤裸鼠,通过活体成像仪检测 IR-783 的代谢周期,在此基础上,将 IR-783 染料(1.5 $\mu\text{mol}/\text{kg}$)通过后肢静脉注射入自发肿瘤犬体内,5 d 后手术切除肿瘤组织,分别进行荧光成像、组织切片 HE 染色、冰冻切片荧光观察。结果 IR-783 染料注射荷瘤裸鼠后可以在肿瘤部位检测到特异性荧光,连续观察 8 d,仍有较强的荧光。IR-783 注射自发肿瘤犬 5 d 后,可在肿瘤组织中检测到特异性荧光。结论 近红外荧光染料 IR-783 能够被肿瘤组织特异性吸收,可用于犬自发性肿瘤的特异性诊断,具有重要的临床应用前景。

【关键词】 近红外荧光;IR-783;肿瘤成像;裸鼠;犬

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 02-0017-03

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.02.004

Near infrared heptamethine cyanine dye IR-783-mediated tumor imaging

ZHANG Cai-qin, ZHANG Hai, ZHAO Yong, MAO Feng-feng, BAI Bing, SHI Chang-hong*

(Laboratory Animals Center of the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of near infrared heptamethine cyanine dye IR-783-mediated specific tumor imaging in spontaneous tumor of dogs. **Methods** IR-783 was intraperitoneally injected to nude mice models of transplanted tumor in a dose of 5 $\mu\text{mol}/\text{kg}$. The metabolic time course of IR-783 was detected by in vivo imager. Based on the results of above observation, IR-783 was injected to dogs with spontaneous tumor in a dose of 1.5 $\mu\text{mol}/\text{kg}$. The site of intravenous injection was the hind leg. Tumor and peri-tumoral tissues were removed at 5 days after IR-783-injection for fluorescence imaging, pathology and frozen section fluorescence examinations. **Results** After i. p. IR-783 injection to nude mice models of transplanted tumor, the transplanted tumor tissues of nude mice had stronger specific fluorescence than normal tissues by imaging at 8 days after injection. After i. v. IR-783 injection to four dogs with spontaneous tumor, the fluorescence signal in the tumor tissues was stronger than that in the normal tissues at 5 days after injection. **Conclusions** Near infrared fluorescent dye IR-783 could be specifically taken up by tumor tissues, and can be used for specific diagnosis of tumor. It has an important clinical application prospect.

【Key words】 Heptamethine cyanine IR-783; Near infrared fluorescence; Tumor imaging; mouse; Dog.

近红外荧光染料(near infrared dye, NIR)是一类聚甲基菁染料的杂环化合物,自发荧光低^[1],但与体内大分子结合后由于荧光团的聚集展示出强的荧光素;利用近红外荧光进行活体成像具有非侵袭性、分辨率高、无辐射、可动态成像等优点^[2],目前成为分子影像的研究热点,并广泛应用于肿瘤研究

领域。事实上利用荧光染料进行肿瘤的检测和诊断还面临一系列的问题^[3,4],如常用的肿瘤成像是将近红外荧光染料通过与肿瘤特异的配体发生化学偶联来实现的,肿瘤特异的配体包括代谢底物、适体、生长因子和抗体等,已有文献报道 NIR 荧光染料与细胞膜受体、胞外基质、癌细胞特异的标志分子和新

[基金项目]陕西省科技统筹创新工程计划项目,陕西省实验动物质量检测体系研究及其共享服务平台建设(2011FWPT-01)。

[作者简介]张彩勤(1981-),女,助教,E-mail: zhangcaiqin-beibei@163.com

[通讯作者]师长宏(1973-),男,教授,研究方向:人类疾病动物模型,E-mail: changhong@fmmu.edu.cn

生血管内皮细胞特异的标志分子等作用的机制^[5]。上述 NIR 染料肿瘤成像的缺陷是只能检测到部分具有特异表面标志的癌细胞类型,而且这种化学偶联机制可能改变靶标配体的特异性和亲和力^[6]。因此,迫切需要开发一种 NIR 荧光染料,使肿瘤成像变得更简单、更有效。

IR-783 是一种七次甲基荧光染料,它既可以被激发出近红外荧光,又可以作为靶标配体,能够被癌细胞摄取并富集,而不需要通过化学偶联的途径^[7],具有成像和靶分子的双重功能。本实验主要通过观察近红外荧光染料 IR-783 在自发性肿瘤犬中的成像效果,探索 IR-783 用于临床肿瘤诊断的前景。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 荧光染料

近红外荧光染料 IR-783 (excitation, 760 ~ 800 nm; emission, 820 ~ 860 nm), 由美国洛杉矶 Cedars-Sinai Medical Center 馈赠^[7]。

1.1.2 仪器设备

Caliper Lumina II 小动物光学成像系统; Olympus IX71 荧光显微镜。

1.1.3 实验动物

裸鼠, 雌性, 8 ~ 10 周, 6 只, 来源于第四军医大学实验动物中心【SCXK(军)2012-0007】, 饲养于第四军医大学实验动物中心【SYXK(军)2012-0023】; 犬由第四军医大学实验动物中心宠物医院提供, 实验过程均经过第四军医大学实验动物伦理委员会的批准, 并按照实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

前列腺癌细胞 PC-3 和胃癌细胞 SGC-7901 由第四军医大学实验动物中心提供, 将这两株细胞培养至对数生长期, 1000 r/min 离心, 用无血清 RPMI-1604 培养液制成细胞悬液, 在裸鼠后肢背侧皮下注射, 每点 0.2 mL, 注射量为 2×10^6 个细胞, 3 只裸鼠注射 PC-3 细胞, 另外 3 只裸鼠注射 SGC-7901 细胞。

1.2.2 IR-783 在裸鼠肿瘤模型中的代谢试验^[8,9]

当裸鼠的皮下细胞瘤长至直径约 0.5 cm 时, 将 IR-783 染料按照 5 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 的剂量腹腔注射 PC-3 肿瘤和 SGC-7901 肿瘤裸鼠各 2 只, 另外两只荷瘤裸

鼠作为无注射对照。注射后每天在 Caliper Lumina II 小动物光学成像系统中进行活体荧光成像 (ex: 745 nm, em: ICG), 连续观察 9 d。

1.2.3 IR-783 在犬自发肿瘤中的靶向研究

4 只自发肿瘤犬, 分别编为 1、2、3、4 号犬。1 号犬是乳房肿瘤, 2 号犬是面部肿瘤, 3 号犬为多脏器转移肿瘤, 4 号犬为肛门部位肿瘤。将 IR-783 按照 1.5 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 后肢静脉注射 4 只实验犬, 在注射后第 5 天手术切除肿瘤组织, 并取部分正常组织作对照, 将切除的组织在 Caliper Lumina II 小动物光学成像系统中进行荧光显影, 成像后将各部分组织分别用 4% 多聚甲醛固定, 制作 HE 染色切片进行组织病理学观察, 制作冰冻切片用于观察组织的 IR-783 近红外荧光。

2 结果

2.1 IR-783 在裸鼠肿瘤模型中的代谢实验

荷瘤裸鼠腹腔注射 5 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 的荧光染料 IR-783 后, 活体荧光成像连续观察 9d, 如图 1 (彩插 2) 所示, 8 d 后, 体内正常组织非特异性结合的荧光染料基本消失, 而在肿瘤组织中仍有很强的特异性荧光显影。

2.2 IR-783 在犬自发肿瘤中的成像研究

2.2.1 1 号犬的成像结果与组织病理分析

将 1 号犬切除的肿瘤组织在小动物活体成像仪中进行荧光成像, 结果在肿瘤组织中有明显的荧光信号, 而在肿瘤附近正常的肌肉组织中无荧光出现 (见图 2, 彩插 2)。病理 HE 结果显示荧光强的组织内部分乳腺细胞的核深染, 细胞核大小不均一, 具有明显的肿瘤细胞特征 (见图 2, 彩插 2)。

2.2.2 2 号犬的成像结果与组织病理分析

将 2 号犬的肿瘤组织及附近肉眼正常的组织同时做荧光成像、HE 染色切片和冰冻切片, 结果发现肿瘤部位有较强的荧光, 而肉眼正常的组织上只有较弱的荧光 (见图 3, 彩插 3)。HE 病理结果诊断该肿瘤组织为淋巴瘤 (见图 3, 彩插 3), 附近的组织同时有肿瘤细胞侵袭。冰冻切片的荧光观察结果是肿瘤组织的荧光较强, 肿瘤附近切除的组织有较弱的荧光 (见图 3, 彩插 3), 与 HE 切片的组织病理结果一致。

2.2.3 3 号犬的成像结果与组织病理分析

3 号犬在注射 IR-783 后第 7 天死亡, 进行解剖后发现肝脏和胃已经黏连在一起, 肺脏、脾脏等都可

见明显的病理变化。切除肝脏、胃、脾脏、肺脏、十二指肠、胸腺的 8 块组织样品,组织荧光成像、HE 染色切片和冰冻切片结果均表明采集的 8 块组织均有程度不一的肿瘤细胞侵袭或坏死病变(见图 4,彩插 3)。

2.2.4 4 号犬的成像结果与组织病理分析

4 号犬在肛门部位有一个较大的肿瘤(见图 5A,彩插 3),手术切除了整个的肿瘤组织,选取较小的一块肿瘤组织和两块带有正常组织的肿瘤进行了荧光成像和 HE 切片观察,结果发现在肿瘤组织处可见较强荧光信号,正常的组织未见荧光显影(见图 5B,彩插 3)。组织病理 HE 分析结果与荧光检测一致。

3 讨论

Ntziachristos 等^[10]已证实近红外荧光最大可穿透 12 cm 的乳腺或肺组织、6 cm 的肌肉组织和 5 cm 的成人脑组织,在癌症研究和肿瘤检测中显示出较多的优势^[11],各种各样的花菁衍生物被开发用于检测癌细胞^[12-14]。本研究使用的 IR-783 荧光染料发射波长(820 ~ 860 nm)较一般可见的荧光染料更长,经过前期的修饰,已具有突出的优势:不需要化学偶联即可以直接检测癌细胞和癌症转移灶;能够检测出许多不同类型的肿瘤细胞群^[7,15]。无论染料本身的稳定性还是检测结果的信噪比都相对更好,在细胞组织水平的研究中具有一定优势^[16,17]。

本实验通过荧光成像和组织病理分析证实了近红外荧光染料 IR-783 可与犬的肿瘤组织特异性结合,并在肿瘤部位富集,具有一定的靶向性能力。同时,选用不同类型的肿瘤模型表明了 IR-783 与肿瘤细胞结合的广泛性。已有的报道证实 IR-783 染料能够聚集在癌细胞的线粒体和溶酶体部位,可能是通过有机阴离子转移肽系统(OATPs)将 IR-783 运输进入癌细胞并贮留在癌细胞中而非正常细胞中。而 OATPs 在人类的多种肿瘤组织和多种肿瘤细胞系中大量表达^[18],这可能也是 IR-783 能够与肿瘤细胞特异性结合的分子机制。

已有 NIR 荧光染料成像研究均采用小鼠肿瘤模型,其实验结果与人体研究存在较大差别。研究发现犬的基因组与人的基因组相似度远远高于啮齿类动物与人^[19];犬的肿瘤模型在组织病理特点、遗传特性、生物行为学以及对治疗的反应性方面具有人体肿瘤的基本特点^[20]。同时,使用犬的肿瘤模型开展非临床研究可以解决在其他肿瘤模型中无法解决

的问题。因此,本实验在完成裸鼠肿瘤模型研究的基础上,选用犬的自发肿瘤模型开展了 IR-783 近红外荧光染料的靶向作用研究,证明了该染料与肿瘤组织结合的特异性,为其应用于临床肿瘤成像研究奠定了实验基础。

实验过程中由于 Caliper Lumina II 小动物光学成像系统的成像范围有限(一次只能成像三只小鼠),犬的表皮组织较厚,近红外染料无法穿透,导致不能在犬活体进行肿瘤组织的荧光成像,只能是将组织切除后选取病变典型的组织在活体成像仪中显影。通过活体成像对照组织病理分析结果确诊组织的形态和结构,进一步验证二者的一致性。本实验中选取了 4 只自发肿瘤犬进行研究,数量有限。后续实验将大量收集不同来源的自发肿瘤犬进行肿瘤成像的研究,累积研究结果,积极与临床病理诊断结果相比较,更加深入地研究 IR-783 染料在肿瘤检测领域的应用。

(本文图 1,2 见彩插 2,图 3 ~ 5 见彩插 3。)

参 考 文 献

- [1] Hilderbrand SA, Weissleder R. Near-infrared fluorescence: application to in vivo molecular imaging [J]. *Curr Opin Chem Biol.* 2010, 14(1):71 - 79.
- [2] 刘飞, 薛冰, 顾月清. 荧光标记在药物分析领域的应用进展 [J]. *药学进展.* 2011, 35(2):64 - 69.
- [3] Sevic-Muraca EM, Sharma R, Rasmussen JC, et al. Imaging of lymph flow in breast cancer patients after microdose administration of a near-infrared fluorophore: feasibility study [J]. *Radiology.* 2008, 246:734 - 741.
- [4] Ogasawara Y, Ikeda H, Takahashi M, et al. Evaluation of breast lymphatic pathways with indocyanine green fluorescence imaging in patients with breast cancer [J]. *World J Surg.* 2008, 32:1924 - 1929.
- [5] Rao J, Dragulescu-Andrasi A, Yao H. Fluorescence imaging in vivo: recent advances [J]. *Curr Opin Biotechnol.* 2007, 18:17 - 25.
- [6] Kondepoti VR, Heise HM, Backhaus J. Recent applications of near-infrared spectroscopy in cancer diagnosis and therapy [J]. *Anal Bioanal Chem.* 2008, 390:125 - 139.
- [7] Yang XJ, Shi CM, Tong R, et al. Near infrared heptamethine cyanine dye-mediated cancer imaging [J]. *Clin Cancer Res.* 2010, 16(10):2833 - 2844. doi:10.1158/1078 - 0432.CCR - 10 - 0059.
- [8] 彭秀华, 沈艳, 徐春华, 等. 采用小动物活体荧光成像对胃癌皮下和原位移植肿瘤生长的动态观察 [J]. *实验动物与比较医学.* 2011, 31(5):371 - 375.

(下转第 56 页)

