

七甲川菁近红外荧光染料对胃癌原位移植模型的靶向识别

赵勇, 张彩勤, 赵宁宁, 谭邓旭, 赵亚, 张海, 师长宏*

(第四军医大学实验动物中心, 西安 710032)

【摘要】 目的 研究七甲川菁近红外荧光(NIRF)染料在胃癌原位移植模型活体成像中的应用效果。方法 将标记荧光酶素的人胃癌细胞系 HepG2 原位移植裸鼠建立肿瘤模型,同时诱发制备胃溃疡模型;对上述模型分别采用生物发光成像和 NIRF 成像,观察胃癌组织对近红外荧光染料的吸收;探索缺氧和阴离子转运肽(OATP)对胃癌组织吸收 NIRF 染料的影响,明确 NIRF 染料靶向识别肿瘤细胞的特异性。结果 NIRF 信号与生物发光信号在胃癌原位移植模型活体成像中具有较好的相关性。胃癌组织部位可获得较强的 NIRF 荧光信号,而胃溃疡部位未检测到荧光信号。缺氧能够增强胃癌细胞对 NIRF 染料的吸收,而阴离子转运肽特异性抑制剂磺溴酞钠(BSP)能够显著降低肿瘤细胞对 NIRF 染料的吸收。结论 七甲川菁近红外荧光染料能够靶向识别胃癌原位移植模型。

【关键词】 近红外荧光染料;胃癌;肿瘤原位移植模型;裸鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0567-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.003

Tumor targeting of near-infrared fluorescence heptamethine cyanine dye in orthotopically transplanted gastric carcinoma in mice

ZHAO Yong, ZHANG Cai-qin, ZHAO Ning-ning, TAN Deng-xu,
ZHAO Ya, ZHANG Hai, SHI Chang-hong*

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

【Abstract】 Objective To determine the target recognition ability of the near-infrared fluorescence (NIRF) heptamethine cyanine dye in mouse models of orthotopically transplanted gastric carcinoma with optical imaging. **Methods** The orthotopically transplanted model of gastric carcinoma was established by implantation of luciferase-tagged-HepG2 cells into the stomach in nude mice, and gastric ulcer model was induced by absolute ethanol. Both bioluminescence (BIL) signal and NIRF signal in those two animal models were observed with optical imaging respectively, and the absorption of NIRF dye in gastric carcinoma tissues was determined. We further explored the effect of hypoxia and OATP on the absorption of the NIRF dye in gastric carcinoma tissues. The specific targeting ability of NIRF dye to tumor cells was evaluated. **Result** A good positive correlation was observed between NIRF signal and BIL signal ($R^2 = 0.995$). Strong NIRF signal was observed in gastric carcinoma region, but no signal was found in the gastric ulcer model. Moreover, hypoxia further promoted the uptake of NIRF dye in gastric carcinoma, but OATP specific inhibitor BSP significantly reduced the absorption of NIRF dye in tumor cells. **Conclusions** The NIRF heptamethine cyanine dye can be applied to identify the orthotopically transplanted gastric carcinoma in nude mouse models.

【Key words】 Near-infrared fluorescent dye; Near-infrared fluorescence; Gastric cancer; Orthotopically transplanted tumor model; Nude mouse.

Corresponding author: SHI Chang-hong. E-mail: changhong@fmmu.edu.cn

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31572340);陕西省统筹科技资源项目(2016FWPT-02)。

[作者简介] 赵勇(1982-),男,实验师,研究方向:人类疾病动物模型。Email: zhaoyong8@aliyun.com

[通讯作者] 师长宏(1973-),男,教授,博士生导师。Email: changhong@fmmu.edu.cn

近红外荧光(near infrared fluorescence, NIRF)染料吸收和发射光谱均位于近红外区(700 ~ 1000 nm),自发荧光低,但与化合物结合后可诱导较强的荧光^[1,2]。由于该类染料所产生的荧光组织穿透性强,目前已成为良好的影像探针,广泛应用于动物模型和人体的成像研究^[2]。前期我们实验室联合弗吉尼亚大学合成并筛选了一系列七甲川菁(heptamethine cyanine)近红外荧光染料,这类聚甲基菁染料的杂环化合物,是由甲基链组成的大 π 共轭体系,常见的有 IR-783 和 MHI-148^[3]。该类染料有着较高的体内消除率和较大的斯托克斯位移,不需要化学修饰,可直接被人胃癌肿瘤细胞吸收呈特异性聚集,从而用于胃癌裸鼠皮下移植模型活体成像^[4,5,6]。本研究为进一步明确该染料的肿瘤靶向性和组织穿透能力,制备了人胃癌裸鼠原位移植模型,测试该类染料对肿瘤的靶向识别能力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 BALB/c 雄性裸鼠 10 只,体重 20 ~ 25 g, 6 ~ 7 周龄。购自北京维通利华实验动物科技有限公司[SCXK(京)2012-0001],随机分为胃癌原位移植模型组和胃溃疡模型组。动物饲养在第四军医大学实验动物中心 SPF 级屏障环境中[SYXK(陕)2014-001]。

1.1.2 主要试剂和仪器

胃癌传代肿瘤细胞 SGC-7901,由第四军医大学实验动物中心保存,标记荧光素酶 luciferase 的 SGC-7901 (luc-SGC-7901) 细胞由腺病毒感染后制备^[7]。七甲川菁 NIRF 染料 IR-783 由美国 Cedars-Sinai Medical Center, Leland Chung 教授提供^[8]。水合氯醛浓度为 7 g/100 mL, DAPI 染色液由北京雷根生物技术有限公司提供。HIF1 α 兔抗人单克隆抗体购自艾博抗体上海贸易有限公司, OATP1B3 鼠抗人单克隆抗体购自 GeneTex 公司。

1.2 方法

1.2.1 人胃癌裸鼠原位移植模型和胃溃疡模型的制备

取 5 只 6 ~ 7 周龄雄性裸鼠,腹腔注射水合氯醛 100 μ L,浓度为 7 g/100 mL。用眼科剪从裸鼠腹中线开口,暴露完整胃,在胃底部进针达肌层,注射人

胃癌传代细胞 luc-SGC-7901, 体积为 50 μ L, 数量为 1×10^6 。将胃送回腹腔,手术缝合腹部肌层和皮肤。10 d 后裸鼠腹腔注射 NIRF 染料 IR-783, 剂量为每只 10 μ mol, 24 h 后,用 Caliper Lumina II 小动物光学成像系统测定肿瘤部位 NIRF 强度 ROI (regions of interest); 同时腹腔注射荧光素酶底物, 剂量为每只 1.5 mg, 活体成像测定肿瘤部位生物发光强度并获得 ROI 值。每 5 d 测量一次,绘制荧光强度与生物发光强度的相关性曲线。同时,取 5 只 6 ~ 7 周龄裸鼠,禁食、禁水 12 h 后,灌胃 750 μ L 无水乙醇,连续 2 d,制备胃溃疡模型。按同样的方法注射 NIRF 染料 IR-783, 并进行活体成像。

1.2.2 胃癌组织对 NIRF 染料的吸收

将人胃癌裸鼠原位移植模型和裸鼠胃溃疡模型分别处死,处死前 24 h 注射 IR-783,处死前 10 min 注射荧光素酶底物。将裸鼠的胃和心脏、肝、脾、肺、肾分别取出,在用 Caliper Lumina II 小动物光学成像系统测定肿瘤部位 NIRF 强度和生物发光信号 (bioluminescence, BL) 强度。

1.2.3 PDX 模型肿瘤组织免疫组织化学分析

取原位肿瘤移植模型的胃组织和胃溃疡模型的胃组织分别用 4% 多聚甲醛固定后,石蜡包埋,组织切片并进行 H&E 和免疫组织化学染色,一抗为 HIF1 α 兔抗人单克隆抗体和 OATP1B3 鼠抗人单克隆抗体,二抗分别为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔和羊抗鼠抗体。

1.2.4 缺氧和 OATP 抑制剂对胃癌细胞吸收 NIRF 染料的影响

将 HepG2 肿瘤细胞培养于 24 孔板内 (1×10^6), 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后,加入 IR-783, 终浓度为 5 μ mol/L, 在 1% O_2 中培养 1 h, 或加入 OATP 抑制剂 BSP (终浓度为 250 μ mol/L, 购自 Sigma 公司) 同样 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, PBS 洗去多余的染料, 4% 多聚甲醛固定后, DAPI 染核。同样方法处理对照组, 用配备有 ICG 滤光片的荧光显微镜观察。

2 结果

2.1 NIRF 信号与生物发光信号的相关性

将人胃癌细胞 luc-SGC-7901 接种裸鼠胃部后, 分别进行 NIRF 和生物发光活体成像, 测定不同时间点肿瘤部位 NIRF 强度与生物发光强度。结果见图 1, 在不同时间点两种信号强度具有较好的相关性, 拟合曲线中 R^2 值达到 0.995。

2.2 胃癌原位移植模型与胃溃疡模型活体成像结果比较

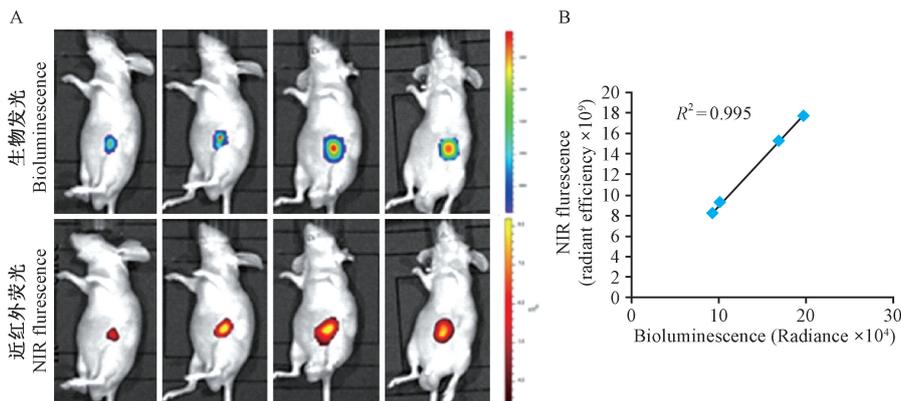
胃癌原位移植模型通过 NIRF 成像可在胃部获得较强的荧光信号,而胃溃疡模型并未检测到荧光信号。处死裸鼠后分离完整的胃,通过成像检测在胃部依旧可以发现荧光信号和生物发光信号,与发生溃疡的胃组织具有显著差别(图 2)。

2.3 NIRF 信号在胃癌组织中的分布

比较胃肿瘤组织与其他脏器 NIRF 信号强度,发现二者具有显著差异,生物发光与 NIRF 成像结果一致(见图 3)。

2.4 胃肿瘤组织和胃溃疡组织的病理形态

将胃癌模型和胃溃疡模型中的胃组织剥离后, PBS 冲洗,肉眼可看到肿瘤模型在胃部形成明显的隆起,呈肿瘤样结构,而溃疡模型在胃部形成炎细胞浸润,局部坏死和缺损。结果见图 4。

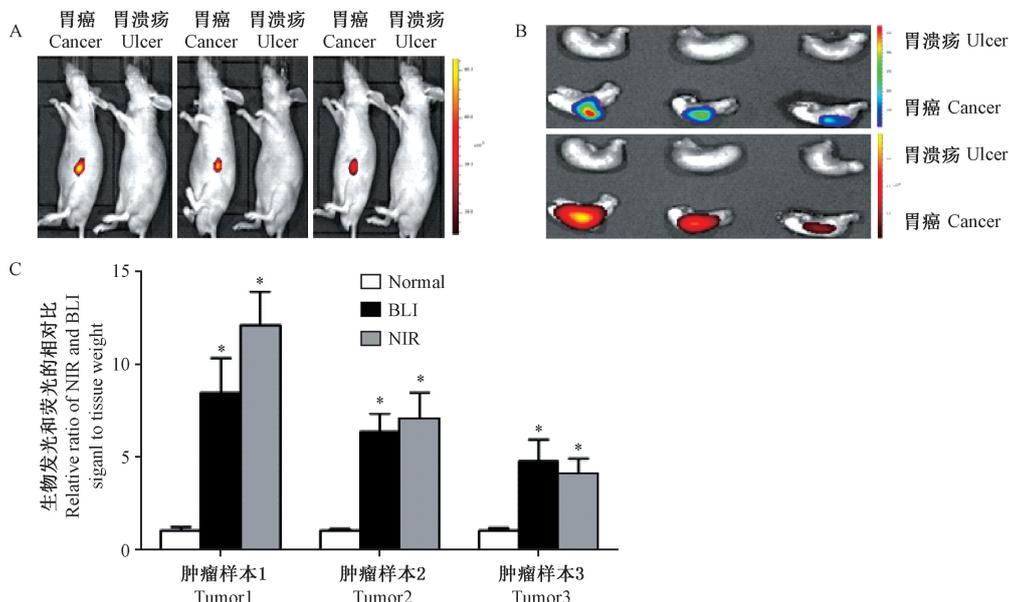


注:A. 胃癌细胞原位移植裸鼠不同时间点获取的生物发光 (bioluminescence) 信号和近红外荧光 (NIRF) 信号; B. 肿瘤部位生物发光和近红外荧光 ROI 值的相关性。

图 1 胃癌裸鼠原位移植模型中生物发光与近红外荧光信号的相关性

Note: A. BL signals and NIRF signals at different time points in the orthotopic gastric carcinoma model. B. Correlation of ROI value between BL and NIRF signal intensities.

Fig.1 Correlation between BL and NIRF imaging signals in the gastric cancer of nude mice.

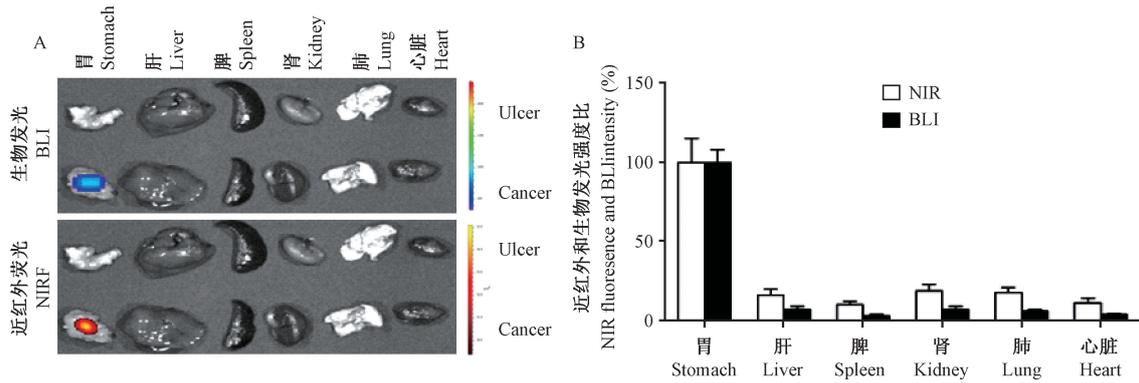


注:A. 胃癌和胃溃疡模型 NIRF 活体成像结果; B. 胃癌和胃溃疡组织 NIRF 成像和生物发光成像结果; C. 胃癌和胃溃疡组织成像结果比值。* $P < 0.05$ Vs 正常组。

图 2 胃癌和胃溃疡组织活体成像结果

Note. A. In vivo NIRF imaging results of gastric cancer and gastric ulcer tissues. B. Ex vivo NIRF and BL imaging results of gastric cancer and gastric ulcer tissue. C. Relative ratio of NIRF and BIL signals to tissue weight. * $P < 0.05$ Vs normal.

Fig.2 Comparison of the imaging results of gastric ulcers and gastric cancers.



注:A. 胃癌组织与肝、脾、肾、肺和心脏生物发光与荧光信号的成像结果; B. 胃癌组织与肝、脾、肾、肺和心脏生物发光与荧光信号的比值。

图 3 胃癌组织和胃炎组织体外成像结果比较

Note. A. *Ex vivo* BL and NIRF imaging of mice bearing orthotopic luc-tagged gastric carcinoma xenografts or gastric ulcer, including gastric carcinoma, liver, spleen, kidney, lung, and heart. B. Quantification of the BL and NIRF signal in the gastric cancer, liver, spleen, kidney, lung and heart.

Fig. 3 The imaging results of gastric carcinoma or gastric ulcer compared with other organ imaging results

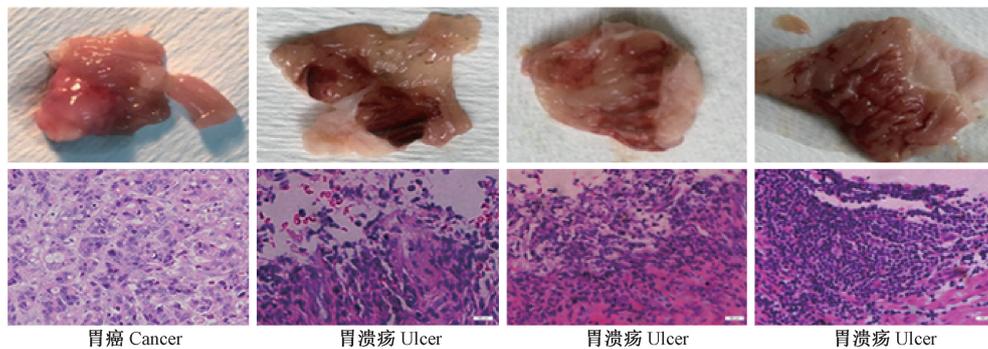


图 4 胃癌组织和胃溃疡组织的病理形态

Fig. 4 Pathology of gastric carcinoma and gastric ulcers

2.5 胃癌组织和胃溃疡组织的免疫组织化学结果

免疫组织化学检测胃癌组织和胃溃疡组织中 OATP1B3 和 HIF1 α 的表达,结果如图 5, OATP1B3 和 HIF1 α 在胃癌组织呈高表达,而在胃溃疡和正常胃组织中表达量较低,与肿瘤组织相比有显著差别。

2.6 缺氧和 OATP 调控胃癌肿瘤细胞对 IR-783 染料的吸收

缺氧和 OATP1B3 在调控肿瘤细胞特异性识别 NIRF 染料的过程中发挥了重要作用。培养的胃癌细胞在缺氧状况下对 NIRF 染料 IR-783 的吸收显著增加,而当加入 OATP 抑制剂 BSP 后胃肿瘤细胞对 IR-783 的吸收显著减弱,结果见图 6。

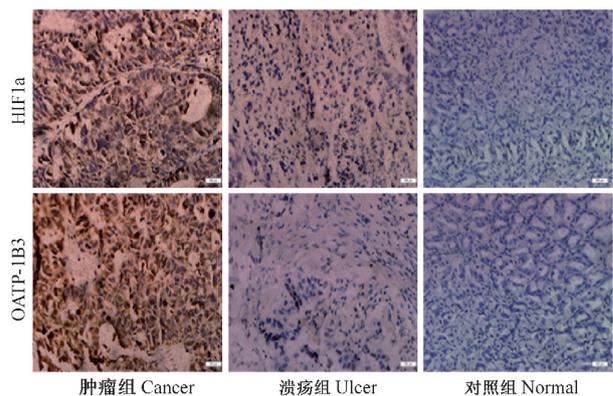
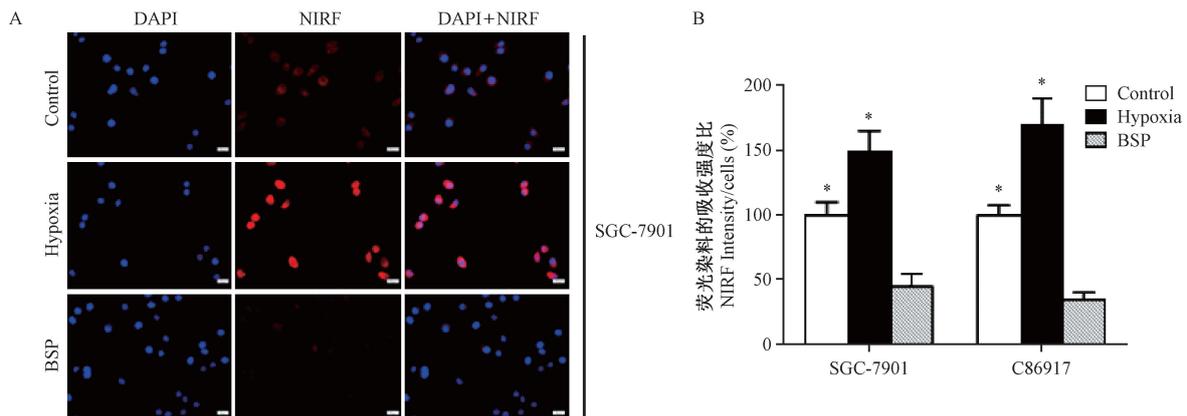


图 5 胃癌和溃疡组织中 OATP1B3 和 HIF1 α 的表达

Fig. 5 Expression of OATP1B3 and HIF1 α in the gastric carcinoma and gastric ulcer tissues



注:A. 缺氧促进肿瘤细胞对 IR-783 染料的吸收,OATP 抑制剂 BSP 减弱肿瘤细胞对 IR-783 染料的吸收;B. 肿瘤细胞对 IR-783 染料的吸收强度变化的比值。* $P < 0.05$ Vs 正常对照。

图 6 缺氧和 OATP 抑制剂对胃癌细胞吸收 NIRF 染料的影响

Note. A. Hypoxia promotes the uptake of IR-783 dye and OATP inhibitor BSP decreased the NIRF dyes accumulation in gastric cancer cells. B. The intensity ratio of IR-783 dye accumulation in gastric cancer cells under hypoxia or OATP inhibitor. * $P < 0.05$ Vs normal.

Fig. 6 The effect of hypoxia and OATP inhibitor on NIRF dye accumulation in gastric cancer cells

3 讨论

与传统的皮下移植模型相比,胃的原位移植较好的模拟了肿瘤发生的过程,形成的肿瘤组织结果与临床胃癌组织较为相似,用于近红外荧光染料的测试可以获得与临床相近的实验结果,从而验证了该类染料的特异性和可靠性^[9,10]。使用转染荧光素酶(luciferase)标记的传代肿瘤细胞接种裸鼠形成肿瘤移植模型,注射底物后检测生物发光信号,是肿瘤模型较常采用的活体成像技术,该方法特异性和灵敏度均较高^[11]。本研究将靶向近红外荧光活体成像技术与生物发光技术进行比较,两者呈现出较好的相关性。

常规近红外荧光染料需要结合特异性的靶片段才能识别肿瘤细胞,比如肿瘤特异性抗原、多肽、酶的底物和肿瘤标志物等^[9,11]。而本研究使用近红外荧光染料具有成像和靶分子的双重特性,不需连接靶向片段便可直接识别肿瘤细胞,避免了化学结合和繁琐的探针制备过程。前期实验证实该类七甲川菁染料特异性的聚集于肿瘤部位主要与肿瘤低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor1a, HIF1 α)和有机阴离子转移肽(organic anion transporter peptides, OATPs)相关^[12,13]。肿瘤细胞中缺氧和活化的 HIF1 α /OATPs 信号分子,提供了不同分子之间的调控作用,促进了 NIRF 染料的吸收。当我们将胃癌细胞培养于低氧环境时能显著促进肿瘤细胞对 NIRF 染料的吸收;相反,当加入 OATP 抑制剂 BSP

时,能够有效抑制肿瘤细胞对 NIRF 染料的吸收^[14],同时,通过免疫组织化学分析发现相比于胃溃疡,胃癌组织中 OATP1B3 和 HIF1 α 均呈高表达,从而进一步说明缺氧和活化的 HIF1 α /OATPs 信号分子调控了肿瘤对靶向 NIRF 染料的吸收。由于缺氧和 OATPs 的表达是肿瘤细胞中普遍存在的现象,推测该类染料也能广泛识别其他类型的肿瘤细胞^[15]。

参 考 文 献

- [1] Yang X, Shi C, Tong R, et al. Near IR heptamethine cyanine dye-mediated cancer imaging [J]. Clin Cancer Res. 2010, 16 (10): 2833 - 2844.
- [2] Gemeinhardt I, Puls D, Gemeinhardt O, et al. Near-infrared fluorescence imaging of experimentally collagen-induced arthritis in rats using the nonspecific dye tetrasulfocyanine in comparison with gadolinium-based contrast-enhanced magnetic resonance imaging, histology, and clinical score [J]. J Biomedl Optics. 2012;17(10):106008.
- [3] Yeh CS, Su CH, Ho WY, et al. Tumor targeting and MR imaging with lipophilic cyanine-mediated near-infrared responsive porous Gd silicate nanoparticles [J]. Biomaterials. 2013, 34 (22): 5677 - 5688.
- [4] Tummers QR, Boogerd LS, de Steur WO, et al. Near-infrared fluorescence sentinel lymph node detection in gastric cancer: A pilot study [J]. World J Gastroenterol. 2016, 22(13): 3644 - 3651.
- [5] Kim JS, Kodagahally R, Strekowski L, et al. A study of intramolecular H-complexes of novel bis(heptamethine cyanine) dyes [J]. Talanta. 2005, 67(5): 947 - 954.
- [6] Winstead AJ, Williams R, Hart K, et al. Microwave synthesis of near infrared heptamethine cyanine dye [J]. J Microw Power Electromagn Energy, 2008, 42(1): 35 - 41.

(下转第 578 页)

西树鼯群体在近期很可能经历过瓶颈效应,从而推断其有效群体数量近几十年可能存在不同程度的下降。此结果表明十分有必要对广西树鼯群体进行合理管理和保护。

综上所述,本研究运用 9 个荧光标记微卫星对来源于广西和云南的树鼯群体进行遗传多样性检测,结果表明这两个群体的遗传多样性都较丰富,两个群体间具有较大的遗传差异和分化程度。这些数据为推动树鼯优良品系的培育和实验动物模型的创建奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 王应祥. 中国树鼯的分类研究 [J]. 动物学研究, 1987, 8 (3): 213 - 230.
- [2] 刘瑞清, 陈玉泽. 树鼯(*Tupaia belangeri* Wagner)三个亚种的染色体比较研究 [J]. 动物学研究, 1989, 10 (3): 195 - 200, +273 - 274.
- [3] Cao J, Yang EB, Su JJ, et al. The tree shrews: adjuncts and alternatives to primates as models for biomedical research [J]. J Med Primatol, 2003, 32 (3): 123 - 130.
- [4] Grover A, Sharma PC. Development and use of molecular markers: past and present [J]. Crit Rev Biotechnol, 2016, 36 (2): 290 - 302.
- [5] Liu XH, Yao YG. Characterization of 12 polymorphic microsatellite markers in the Chinese tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) [J]. Zoolog Res, 2013, 34 (E2): E62 - 68.
- [6] Munshi-South J, Wilkinson GS. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci Bornean treeshrews (*Tupaia* spp.) [J]. Mol Ecol Notes, 2006, 6 (3): 698 - 699.
- [7] 张媛, 李晓飞, 李振宇, 等. 滇西亚种树鼯微卫星分子标记的筛选 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25 (6): 36 - 41.
- [8] 李婧潇, 王新兴, 王文广, 等. 中缅树鼯微卫星分子标记的筛选 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 19 (4): 312 - 315.
- [9] Botstein D, White RL, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. Am J Hum Genet, 1980, 32 (3): 314 - 331.
- [10] Chen SY, Xu L, Lu LB, et al. Genetic diversity and matrilineal structure in Chinese tree shrews inhabiting Kunming, China [J]. Zoolog Res, 2011, 32 (1): 17 - 23.
- [11] 黎家敏, 李海燕, 李婧潇, 等. 应用 RAPD 标记技术对树鼯遗传多样性的分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20 (2): 34 - 40.
- [12] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study [J]. Mol Ecol, 2005, 14 (8): 2611 - 2620.
- [13] Perez - Alvarez MJ, Olavarria C, Moraga R, et al. Microsatellite markers reveal strong genetic structure in the endemic Chilean dolphin [J]. PLoS One, 2015, 10 (4): e0123956.
- [14] Gupta AK, Chauhan M, Bhardwaj A, et al. Microsatellite markers based genetic diversity and bottleneck studies in Zanskar pony [J]. Gene, 2012, 499 (2): 357 - 361.
- [7] 张彩勤, 张海, 赵勇, 等. 近红外荧光染料 IR-783 介导的肿瘤成像 [J]. 中国实验动物学报. 2014, 22 (2): 17 - 19.
- [8] Shao C, Liao CP, Hu P, et al. Detection of live circulating tumor cells by a class of near-infrared heptamethine carbocyanine dyes in patients with localized and metastatic prostate cancer [J]. PLoS One. 2014, 9 (2): e88967.
- [9] 张彩勤, 赵勇, 张海, 等. 近红外荧光染料 MHI - 148 应用于肿瘤活体成像的初步研究 [J]. 科学技术与工程. 2014, 28: 179 - 182
- [10] 郑玲, 卢光明. 近红外荧光染料在肿瘤特异性成像中的研究 [J]. 临床放射学杂志. 2012, 31 (6): 897 - 899
- [11] Close DM, Xu T, Saylor GS, et al. In vivo bioluminescent imaging (BLI): noninvasive visualization and interrogation of biological processes in living animals [J]. Sensors (Basel). 2011, 11 (1): 180 - 206.
- [12] Popovic M, Zaja R, Smital T. Organic anion transporting polypeptides (OATP) in zebrafish (*Danio rerio*): Phylogenetic analysis and tissue distribution [J]. Comp Biochem Physiol Part A, Mol Integr Physiol. 2010, 155 (3): 327 - 335.
- [13] Martinez-Becerra P, Briz O, Romero MR, et al. Further characterization of the electrogenicity and pH sensitivity of the human organic anion-transporting polypeptides OATP1B1 and OATP1B3 [J]. Mol Pharmacol. 2011, 79 (3): 596 - 607.
- [14] Acharya MR, Karp JE, et al. Factors affecting the pharmacokinetic profile of MS-275, a novel histone deacetylase inhibitor, in patients with cancer [J]. Invest New Drugs. 2006, 24 (5): 367 - 375.
- [15] Shi C, Wu JB, Pan D. Review on near-infrared heptamethine cyanine dyes as theranostic agents for tumor imaging, targeting, and photodynamic therapy [J]. J Biomed Opt. 2016, 21 (5): 50901.

[收稿日期] 2016 - 06 - 06

[收稿日期] 2016 - 05 - 10

(上接第 571 页)