

FTS 与 NIRF 共轭化合物用于小鼠肿瘤模型的成像和治疗

王浩, 杨子龙, 张彩勤, 吴朋朋, 赵勇, 赵宁宁, 师长宏*

(第四军医大学实验动物中心, 西安 710032)

【摘要】 目的 研究法尼基硫代水杨酸 (farnesylthiosalicylic Acid, FTS) 与七甲川菁 (heptamethine carbocyanine) 近红外 (near infrared, NIR) 荧光染料共轭化合物的肿瘤靶向性及其在活体成像中的应用, 明确该化合物对肿瘤生长的抑制作用。方法 将人乳腺癌细胞 MCF-7、胶质瘤细胞 U251 和前列腺癌细胞 PC3 培养至对数生长期后, 分别加入不同浓度的 FTS 和 FTS-IR783, 观察两种化合物对肿瘤细胞的生长抑制作用; 培养的三种肿瘤细胞中加入 FTS-IR783 (20 $\mu\text{mol/L}$), 荧光显微镜下观察荧光染料在肿瘤细胞中的聚集; 将三种肿瘤细胞 (每只 1×10^6 个) 皮下移植裸鼠, 两周后荷瘤鼠腹腔注射 FTS-IR783 (每只 10 nmol/L), 活体成像分别测定肿瘤部位近红外荧光信号和肿瘤体积的相关性。结果 与 FTS 相比较, FTS-IR783 可显著抑制 MCF-7、U251 和 PC3 的生长; 三种肿瘤细胞可特异性识别 FTS-IR783, 呈现近红外荧光聚集; 皮下荷瘤模型注射 FTS-IR783 后, 活体成像显示肿瘤部位荧光强度与生物发光强度相关性分别达到 0.987, 0.998 和 0.971。结论 FTS 与近红外荧光染料 IR-783 共轭结合后可特异性识别肿瘤细胞, 用于肿瘤模型的活体成像, 同时该化合物具有的肿瘤靶向性可显著抑制肿瘤细胞的生长, 有望成为新型的靶向药物。

【关键词】 法尼基硫代水杨酸; 近红外荧光; 肿瘤模型成像; 治疗

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2017) 04-0345-05

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2017.04.001

Application of FTS and NIRF conjugated compounds in imaging and therapy of mouse tumor models

WANG Hao, YANG Zi-long, ZHANG Cai-qin, WU Peng-peng, ZHAO Yong, ZHAO Ning-ning, SHI Chang-hong*

(Lab Animal Center of the Fourth Military Medical University, Shaanxi Xi' an 710032, China)

【Abstract】 Objective To study the tumor targeting ability and application of farnesylthiosalicylic Acid (FTS) and heptamethine carbocyanine fluorescent dye-mediated near-infrared imaging in living animals, and confirm the inhibitory effect of this compound on growth of tumor cells. **Methods** Human breast cancer cell line MCF-7, glioma cell line U251 and prostate cancer cell line PC3 were cultured to logarithmic growth phase, and different concentrations of FTS and FTS-IR783 were added, respectively. We observed the inhibitory effect of those two compounds on the growth of tumor cells. Under fluorescence microscopy, specific accumulation of FTS-IR783 in these tumor cells was observed. The tumor cells (1×10^6) were transplanted subcutaneously into nude mice. These mice were subjected to intraperitoneal injection of FTS-IR783 (10 nmol/mouse) two weeks later. In the *in vivo* imaging, near infrared fluorescence signal and tumor volume were measured and their correlation was analyzed. **Results** Compared with FTS, FTS-IR783 significantly inhibited the growth of MCF-7, U251 and PC3 cells *in vitro*. FTS-IR783 was specifically uptaken by these three kinds of tumor cells, showing strong near infrared fluorescence in cell agglomerates. After subcutaneous injection of FTS-IR783, the correlation between fluorescence intensity and tumor volume was 0.987, 0.998 and 0.971, respectively. **Conclusions** The compound of FTS

[基金项目] 军队实验动物专项 (编号: SYDW2016-006 号); 国家自然科学基金 (批准编号: 31501112)。

[作者简介] 王浩 (1996 -), 生物技术专业学员。Email: 18729559358@163.com

[通讯作者] 师长宏 (1973 -), 教授, 研究方向: 人类疾病动物模型及肿瘤研究。Email: changhong@fmmu.edu.cn

conjugated with near infrared fluorescent dye IR-783 can specifically recognize tumor cells, in both in vitro and in vivo imaging. At the same time, the compound can significantly inhibit the growth of tumor cells, and may be expected to become a new potential targeted drug.

[Key words] Farnesylthiosalicylic Acid; Near infrared fluorescence; Tumor model imaging; Treatment

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

法尼基硫代水杨酸 (farnesylthiosalicylic acid, FTS) 是 Ras 和 mTOR 的抑制剂, 可以引起膜结合和胞内 Ras 的显著下降, 是一种有效的抗肿瘤药物^[1]; 同时 FTS 可以选择性靶向肿瘤细胞内信号分子, 影响不同类型肿瘤细胞的生长。目前该化合物正作为一种化疗药物用于胰腺癌和肺腺癌的临床试验。但 FTS 用于临床肿瘤治疗的最大问题是水溶性较差, 低的生物相容性, 造成了不良的药代动力学特征^[2], 提高 FTS 治疗潜能的有效方法是通过靶向运载系统提升 FTS 在肿瘤部位的生物药效^[3]。

我们前期发现肿瘤细胞可以通过缺氧和活化的 HIF1 α /OATPs 分子特异性识别一类近红外 (near infrared, NIR) 荧光染料—七甲川菁 (heptamethine carbocyanine), 从而使该类染料具有了荧光成像和肿瘤靶向的双重功能^[4]。据此, 本研究期望将该类荧光染料 IR-783 与 FTS 共轭结合, 测试其用于肿瘤的活体成像诊断和治疗的效果, 为提升 FTS 的靶向治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 BALB/c 裸鼠 15 只, 雄性, 6~7 周龄, 购自北京维通利华生物技术有限公司【SCXK (京) 2016-0006】, 饲养于第四军医大学实验动物中心【SYXK-9 (陕) 2014-001】。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。

1.1.2 试剂和细胞

化合物 FTS (70 mmol/L) 购自 Salirasib 公司 (货号 HY-14754), FTS-IR783 (43.8 mmol/L) 由美国弗吉尼亚大学的 Pan Dongfeng 教授提供, 结构如图 1。人乳腺癌细胞 MCF-7、胶质瘤细胞 U251 和前列腺癌细胞 PC3 均由第四军医大学实验动物中心保存; MTT 检测试剂盒购于上海七海复泰生物科技有限公司 (货号 C008-3); RPMI-1640 和 DMEM 细胞培养液均由 Thermo 公司提供。

1.1.3 仪器设备

Caliper IVIS Lumina II 小动物光学成像系统;

Olympus IX73 荧光显微镜。

1.2 方法

1.2.1 MTT 检测

收集对数期的 MCF-7、U251 和 PC3 细胞, 用相应的含 10% 新生牛血清的培养液配成单个细胞悬液, 调整细胞浓度, 按照 5×10^3 细胞/孔的浓度加入 96 孔板, 每孔体积 200 μ L, 5% CO₂ 37 $^{\circ}$ C 培养至细胞单层铺满 80% 的孔底。将抗肿瘤药物 FTS 和 FTS-IR783 分别用含 5% 新生牛血清细胞培养液稀释为 150、100、75 和 50 μ mol/L 4 个浓度梯度, 分别在铺满 80% 的 MCF-7、U251 和 PC3 细胞的 96 孔培养板中弃除原培养液, 分别加入不同浓度梯度的药物, 每孔 100 μ L, 每种细胞的每个浓度分别设 4 个复孔, 同时设定药物溶剂空白对照, 5% CO₂ 37 $^{\circ}$ C 继续培养 72 h。按照细胞增殖与毒性检测试剂盒的使用说明每孔加入 10 μ L 的 Cell Counting Kit 溶液, 同时设置调零孔 (培养基、Cell Counting Kit 溶液)。5% CO₂ 37 $^{\circ}$ C 继续培养 3 h 后, 用酶标仪测定每孔 A₄₅₀ nm 处的吸光值。

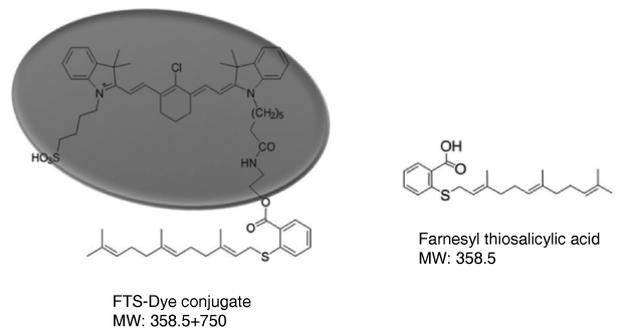


图 1 FTS-IR783 的化学结构

Fig. 1 The chemical structure of FTS-IR783

1.2.2 FTS-IR783 对肿瘤细胞的生长抑制效果

收集对数期的 MCF-7、U251 和 PC3 肿瘤细胞, 调整细胞浓度, 按照 1×10^4 细胞/孔, 加入 6 孔底板中培养 24 h。将抗肿瘤药物 FTS 和 FTS-IR783 分别用含 5% 胎小牛血清细胞培养液稀释为 75 μ mol/L 和 50 μ mol/L, 弃掉原培养液, 在铺满 80% 6 孔平底的 MCF-7、U251 和 PC3 细胞培养板中分别加入不同浓度梯度的药物, 每孔 2 mL, 同时设定药物溶剂空

白对照。5% CO₂ 37℃ 继续培养,每 12 h 在倒置显微镜下观察一次,待明显的细胞病变产生后终止培养并拍照。

1.2.3 FTS-IR783 与肿瘤细胞的结合

将三种肿瘤细胞 PC-3、MCF-7 和 U251 培养于 35 mm 激光共聚焦培养皿中,待细胞单层生长后加入 NIRF 染料 FTS-IR783,作用浓度为 20 μmol/L,每皿加入 100 μL,37℃ 孵育 30 min,用 PBS 洗去多余的染料,4% 多聚甲醛固定,DAPI 染核。同样方法处理,用配备有近红外滤光片的 Olympus IX73 荧光显微镜观察(激发/发射:750-800/820-860 nm)。

1.2.4 FTS-IR783 在肿瘤移植模型活体成像中的应用

将三种传代细胞系 PC-3、MCF-7 和 U251 分别接种于三组裸鼠的右后肢皮下,剂量为每只 1 × 10⁶ 个,每种细胞每组移植 5 只,共移植 15 只。7 d 后裸鼠腹腔注射 FTS-IR783,剂量为每只 10 nmol (100 μmol, 100 μL),24 h 后,用 Caliper IVIS Lumina II 小动物光学成像系统测定肿瘤部位 NIRF 强度 ROI (regions of interest);同时测量肿瘤大小,按下列公

式计算瘤体积 $V = 1/2 \times L(\text{长}) \times W(\text{宽})^2$,计算肿瘤体积^[5]。每 5 d 测量一次,测量至第 40 天。绘制荧光强度与肿瘤体积的相关性曲线。

2 结果

2.1 FTS-IR783 对肿瘤细胞生长的抑制作用

按照公式分别计算 FTS 和 FTS-IR783 对不同肿瘤细胞的生长抑制作用,每组药物的细胞抑制率按照下列公式计算:细胞抑制率(%) = (药物溶剂空白 A_{450 nm} - 样品 A_{450 nm}) / (药物溶剂空白 A_{450 nm} - 调零 A_{450 nm}) × 100%。结果见图 2:与 FTS 组相比较,50 μmol/L FTS-IR783 可显著抑制 MCF-6 细胞的生长,抑制率达 90% 以上;75 μmol/L FTS-IR783 可显著抑制 PC-3 的生长,抑制率达 60%;75 μmol/L FTS-IR783 抑制 U251 生长的效率可达 80%,显著高于相同浓度(75 μmol/L)的 FTS。图 3 显示相同浓度(50 μmol/L)的 FTS 和 FTS-IR783 作用于三种肿瘤细胞后显微镜下形态变化,FTS-IR783 比较 FTS 可使更多肿瘤细胞皱缩、变圆,最终导致细胞死亡,具有更显著的抑制肿瘤生长作用。

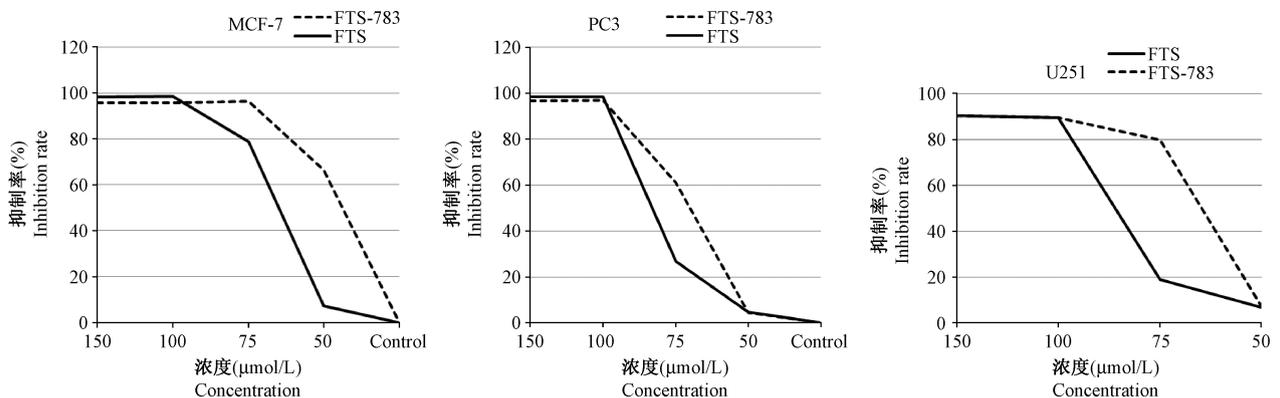


图 2 不同浓度的 FTS 和 FTS-IR783 分别对三种肿瘤细胞的生长抑制率

Fig. 2 Inhibition rates of the growth of 3 kinds of tumor cells caused by different concentrations of FTS-IR783 and FTS

2.2 肿瘤细胞对 FTS-IR783 特异性识别

培养的肿瘤细胞 PC-3、MCF-7 和 U251 加入 NIRF 染料 FTS-IR783 共孵育,在荧光显微镜下观察到近红外荧光染料(红色荧光)可被所有的肿瘤细胞特异性吸收,主要结合部位是肿瘤细胞的胞质和细胞膜,结果见图 4。DAPI 染细胞核为蓝色,NIRF 为红色的近红外荧光。

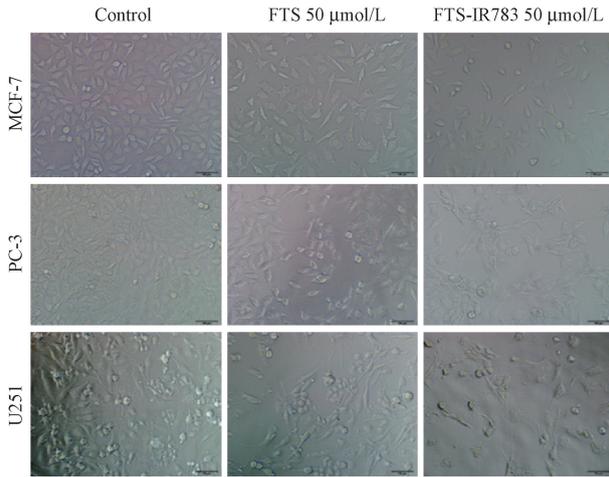
2.3 FTS-IR783 可用于肿瘤移植模型的近红外荧光活体成像

将三种传代肿瘤细胞 MCF-7、U251 和 PC-3 分别皮下接种裸鼠后,连续进行 NIRF 活体成像,肿瘤

部位近红外荧光强度,同时测定不同时间点肿瘤体积。结果见图 5,随着接种时间的增加,皮下肿瘤体积变大,NIRF 强度均逐渐增加,且与肿瘤体积具有较好的相关性,拟合曲线中 r 值分别达到 0.987、0.998 和 0.971。

3 讨论

近红外荧光(near infrared fluorescence, NIRF)成像技术可及时、准确发现肿瘤,连续、无创观察肿瘤的变化,具有检测时间快(最快 1 s),不需注射底物等优点,已成为肿瘤诊断和治疗研究领域的热



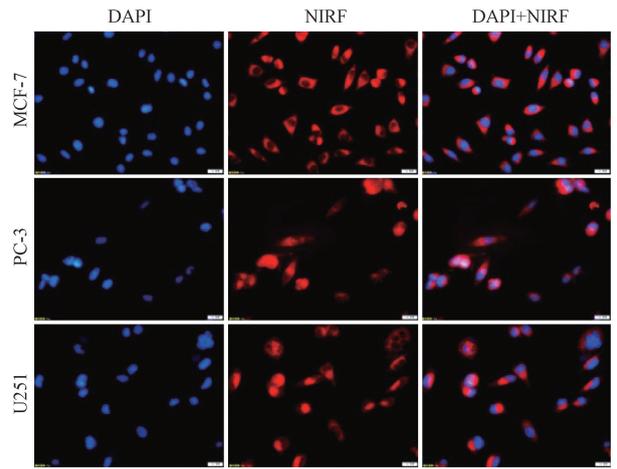
注:Control 为 5% RPMI1640 的无药物作用阴性对照,细胞形态完整,轮廓清晰,未见死亡细胞;FTS (50 $\mu\text{mol/L}$) 为含 50 $\mu\text{mol/L}$ FTS 的 5% RPMI1640 作用组,三种细胞均约有 40% 左右出现皱缩变圆的现象;FTS-IR783 (50 $\mu\text{mol/L}$) 为含 50 $\mu\text{mol/L}$ FTS-IR783 的 5% RPMI1640 作用组,三种细胞约有 80% 左右出现皱缩变圆脱落。

图 3 FTS 和 FTS-IR783 对不同肿瘤细胞的生长抑制作用
 Note. Control: The (5% RPMI1640) drug-free group, showing intact cell structure and clear cell outline, and there were no dead cells. FTS (50 $\mu\text{mol/L}$): The cells were cultured with 5% RPMI1640 containing 50 $\mu\text{mol/L}$ FTS. About 40% of all the three kinds of cells became wrinkled and rounded. FTS-IR783 (50 $\mu\text{mol/L}$): The cells were treated with 5% RPMI1640 containing 50 $\mu\text{mol/L}$ FTS-IR783. About 80% of the three kinds of cells were wrinkled, rounded and detached off.

Fig. 3 Inhibitory effect of FTS and FTS-IR783 on growth of different tumor cells

点^[9]。已证实,该类型的荧光染料组织渗透性好,自发荧光低,标记肿瘤细胞后能够通过成像设备从深层组织中检测到肿瘤,临床应用前景巨大^[10]。我们合成的一类七甲川菁 NIR 染料,如 IR-783 和 MHI-148,不需标记探针,可直接用于肿瘤活体成像,具有成像和靶分子的双重特性。利用其靶向性我们将 IR-783 与吉西他滨 (gemcitabine) 共轭结合成为 IR-783-Gem (NIRG),该化合物作为药物载体能通过血脑屏障和血肿屏障,将药物转运至脑肿瘤部位,显著抑制颅内胶质瘤的生长^[11]。基于此,本研究尝试将七甲川菁 NIR 染料作为化疗药物靶向运载系统,与 FTS 共轭结合,提高 FTS 的治疗效果,测试其用于肿瘤成像和治疗的效果,改善 FTS 原有的药代动力学特性。

尽管 FTS 表现出低毒性和良好的抗癌性能,但差的药代动力学阻碍了其临床应用。有人尝试通过 PEG 修饰提高 FTS 的生物相容性,从而改善它的水

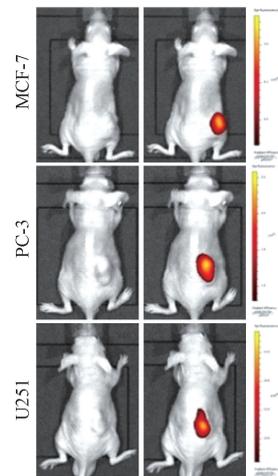


注:DAPI 为着染的细胞核;NIRF 为 FTS-IR783 作用于细胞后在胞质和胞膜处激发的近红外荧光;DAPI + NIRF 为细胞核与胞质的荧光重合。

图 4 肿瘤细胞对 FTS-IR783 的特异性吸收

Note. DAPI: Cell nuclei were stained with DAPI; NIRF: All the three kinds of cells were stained with FTS-IR783 and showed near-infrared fluorescence. DAPI + NIRF is the overlay of the two fluorescence images.

Fig. 4 The specific uptake of FTS-IR783 by tumor cells



注:左列图为三种肿瘤细胞接种在裸鼠皮下制备的肿瘤模型。右列图为相同模型裸鼠注射 FTS-IR783 后通过小动物活体成像仪采集的近红外荧光图,在每个肿瘤部位均有很好的荧光显影。

图 5 肿瘤移植模型 NIRF 成像结果

Note. The left photographs are the tumor-bearing nude mice photographed under bright light; The right pictures are overlays of the same mice photographed under bright light and near-infrared irradiation, depicting the FTS-IR783-fluorescence images of the tumors.

Fig. 5 Photographs showing NIRF images of the transplanted tumor models

溶性和治疗效果^[2]。近期有研究将 FTS 联合姜黄素靶向肿瘤细胞,可以克服 FTS 原有的药理学障

碍^[3]。FTS 是 Ras 抑制剂,对于不同类型肿瘤显示出理想的抗癌特性。其抗癌的主要机制是通过诱导 Ras 蛋白从锚固区移动,促进其快速降解,从而阻断 RAS 蛋白相关信号,最终破坏细胞膜的完整性能^[6,7]。也有报道称,FTS 通过抑制 MAP 激酶途径,阻止各种肿瘤细胞的生长,包括胰腺癌,黑色素瘤和结肠癌等^[8]。但对于乳腺癌、胶质瘤和前列腺癌未见报道。因此,本研究分别选择上述三种肿瘤的传代细胞和裸鼠皮下移植模型进行实验研究,观察 FTS 在此三类肿瘤中的抑瘤效果。

本实验结果显示 FTS-IR783 化合物兼具肿瘤诊断成像和治疗的三重功能,体内体外实验均证实 FTS-IR783 可抑制 MCF-7、U251 和 PC3 的生长,其抑瘤效果显著优于 FTS(见图 2)。培养的三种肿瘤细胞与 FTS-IR783 共孵育后,可特异性吸收荧光染料,细胞核周围呈现近红外荧光聚集。以上结果表明 IR783 与 FTS 共轭结合后,显著提高了 FTS 的肿瘤靶向性和抑制肿瘤细胞增殖的作用。皮下荷瘤模型注射 FTS-IR783 后,活体成像显示肿瘤部位荧光强度与生物发光强度呈现良好的相关性。研究发现,荧光波长越接近 900 nm 穿透能力越强,因此,FTS-IR783 吸收及发射光谱均处于 800 nm,应是观测生理指标的最佳选择,提示该化合物可用于监控肿瘤的生长变化,可应用于肿瘤动物模型的活体成像。同时,利用 IR-783 具有的肿瘤靶向性将 FTS 与 IR-783 共轭结合后可特异性识别肿瘤细胞,显著抑制肿瘤细胞的生长,有效地改善了 FTS 的药代动力学特性,为提升 FTS 的治疗效果提供新的思路,可望成为新型的靶向药物。

综上所述,FTS-IR783 共轭结合后,能够有效地提升其在肿瘤模型中的靶向性,且显著提高了抑制肿瘤生长的作用,目前的研究结果显示该化合物作为具有很好的临床应用前景,有望开发成为有效的化疗药物。据此,本实验室将制备多种肿瘤模型进一步探索研究新合成药物 FTS-IR783 的肿瘤靶向性诊断和治疗效果,以期为该药物的应用推广提供更完善、更丰富的实验数据。

参 考 文 献

- [1] Laheru D, Shah P, Rajeshkumar NV, et al. Integrated preclinical and clinical development of S-trans, trans-farnesylthiosalicylic acid (FTS, Salirasib) in pancreatic cancer [J]. Invest New Drugs, 2012, 30(6): 2391–2399.
- [2] Zhang X, Lu J, Huang Y, et al. PEG-Farnesylthiosalicylate conjugate as a nanomicellar carrier for delivery of paclitaxel [J]. Bioconjugate Chem, 2013, 24(3): 464–472.
- [3] Chen Y, Zhang X, Lu J, et al. Targeted delivery of curcumin to tumors via PEG-derivatized FTS-based micellar system [J]. AAPS J, 2014, 16(3): 600–608.
- [4] Shi C, Wu JB, Chu GC, et al. Heptamethine carbocyanine dye-mediated near-infrared imaging of canine and human cancers through the HIF-1 alpha/OATPs signaling axis [J]. Oncotarget, 2014, 5(20): 10114–10126.
- [5] 赵宁宁, 张彩勤, 赵勇, 等. 近红外荧光染料在胃癌人源性肿瘤组织异种移植模型研究中的应用 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(6): 643–647.
- [6] Santen RJ, Song RX, Zhang Z, et al. Long-term estradiol deprivation in breast cancer cells up-regulates growth factor signaling and enhances estrogen sensitivity [J]. Endocr Relat Cancer, 2005, 12(Suppl 1): S61–73.
- [7] Haklai R, Weisz MG, Elad G, et al. Dislodgment and accelerated degradation of Ras [J]. Biochemistry, 1998, 37(5): 1306–1314.
- [8] Halaschek –Wiener J, Wacheck V, Schlagbauer-Wadl H, et al. A novel Ras antagonist regulates both oncogenic Ras and the tumor suppressor p53 in colon cancer cells [J]. Mol Med, 2000, 6(8): 693–704.
- [9] 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): 50901–50910.
- [10] 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.
- [11] Wu JB, Shi C, Chu GC, et al. Near-infrared fluorescence heptamethine carbocyanine dyes mediate imaging and targeted drug delivery for human brain tumor [J]. Biomaterials, 2015, 67: 1–10.

[收稿日期] 2017-04-19