

七甲川菁染料介导的近红外荧光成像和对肝癌的靶向药物递送

葛煦, 张彩勤, 赵勇, 白冰, 谭邓旭, 张贺, 师长宏*

(第四军医大学实验动物中心, 西安 710032)

【摘要】 目的 初步评估七甲川菁染料衍生物(IR-783)和化疗药物吉西他滨(gemcitabine)的缀合物(NIRG)对肝癌模型荧光成像及靶向治疗效果。**方法** 首先使用肝癌细胞系 Hep3B 验证肝癌细胞对 NIRG 的特异性吸收,并制备该细胞的裸鼠皮下移植瘤模型,观察 NIRG 在 CDX 模型中的近红外荧光成像效果;制备三例肝癌(C64003、C34566 和 B66873)裸鼠皮下 PDX 模型,研究 NIRG 在此模型中的肿瘤靶向荧光成像效果以及治疗效果,同时通过免疫组织化学法观察肝癌特异性抗原 AFP 在三例肝癌 PDX 模型的肿瘤组织中的表达,以及观察与 NIRF 染料特异性吸收相关的抗原 HIF1 α 和 OATP 的表达。**结果** 通过肝癌细胞系 Hep3B 观察到 NIRG 在肿瘤细胞内结合的部位分别为线粒体和溶酶体,在肝癌 CDX 皮下模型中发现 NIRG 特异性聚集肿瘤部位,随着肿瘤的生长 NIRF 信号增强,并与生物发光信号具有良好的相关性($R^2 = 0.99716$);免疫组织化学检测显示在三例肝癌 PDX 模型中的 AFP、HIF1 α 和 OATP 均高表达;NIRG 在三例肝癌 PDX 模型中荧光成像结果表明具有很好的肿瘤靶向性,同时能够抑制肿瘤的生长,显示了良好的治疗效果。**结论** 化合物 NIRG 兼具荧光成像和肿瘤靶向转运化疗药物的能力,可作为人类肝肿瘤的新型影像探针和靶向制剂。

【关键词】 七甲川菁染料;荧光成像;肝癌;靶向药物

【中图分类号】 Q95 - 33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 06-0746-06

Doi:10. 3969/j. issn. 1005 - 4847. 2018. 06. 012

Heptamethine carbocyanine dye-mediated near-infrared fluorescence imaging and targeted drug delivery to liver cancer

GE Xu, ZHANG Caiqin, ZHAO Yong, BAI Bing, TAN Dengxu, ZHANG He, SHI Changhong*

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

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

【Abstract】 Objective The goal here was to conduct a preliminary evaluation of the efficacy of a conjugate (NIRG) of heptamethine carbocyanine dye (IR-783) and the chemotherapeutic drug gemcitabine for tumor fluorescent imaging and targeted therapy. **Methods** First, the liver cancer cell line Hep3B was used to verify the specific absorption of NIRG, and nude mice as models of tumors from a subcutaneous xenograft of Hep3B cells were prepared to observe the effect of the NIRG fluorescence imaging in this CDX model. Three subcutaneous PDX models of liver cancer cases (C64003, C34566 and B66873) were prepared to study the effect of NIRG tumor-targeted fluorescence imaging and targeted therapy. Simultaneously, the expression of the hepatoma-specific antigen AFP was observed by immunohistochemistry in tumor tissues of these models. In addition, the expression of the antigens HIF1 α and OATP associated with the specific uptake of NIRF dye was observed. **Results** The results showed that the binding sites of NIRG in liver cancer cell line Hep3B cells were mitochondria and lysosomes. NIRG-specific tumor sites were found in the

【基金项目】军队实验动物专项(SYDW2016-006)。

Funded by Military Experimental Animal Special Project(SYDW2016-006).

【作者简介】葛煦(1973—),博士,副教授,研究方向:肿瘤动物模型。Email: gexu@fmmu.edu.cn

【通信作者】师长宏(1973—),博士,教授,研究方向:人类疾病动物模型。Email: changhong@fmmu.edu.cn

subcutaneous CDX model of liver cancer, and the NIRF signal was enhanced with the growth of the tumor. NIRF signal and the luminescence signal had a good correlation ($R^2 = 0.99716$). The IHC results showed that AFP was highly expressed in the three PDX models, and HIF1 α and OATP were also highly expressed. The fluorescence imaging results showed that NIRG had good tumor targeting and could inhibit tumor growth, showing a good therapeutic effect. **Conclusions** The conjugate NIRG has characteristics suitable for both fluorescence imaging and tumor targeting to deliver chemotherapeutic drugs. It is potentially an effective novel imaging and targeting agent for treatment of human liver cancer.

【Keywords】 heptamethine carbocyanine dye; fluorescence imaging; liver cancer; targeted drug

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

近红外 (near-infrared, NIR) 荧光染料具有高消光系数和较大的斯托克斯位移^[1], 而正常组织在 NIR 光谱中几乎没有自发荧光, 这样可以使用 NIR 染料使信号与背景的比值最大化, 从而通过影像学模式有效检测肿瘤发生的部位^[2], 具有特异性强、时间分辨率高、干扰小等优点, 已成功应用于临床肿瘤的术中导航, 尤其术中肿瘤切缘、残留灶和转移灶的识别。吖啶菁绿 (indocyanine green, ICG) 是唯一被美国 FDA 批准用于临床的 NIRF 染料^[3], 但其缺乏肿瘤特异性, 稳定性差, 在正常肝中也会显示高的吸收, 易造成假阳性信号^[4]。目前, NIR 荧光成像在肿瘤的实验研究和临床应用方面显示出巨大的潜力, 许多 NIR 化合物, 如 Cy5.5 和 IR800-CW, 在用特异性抗原或实验肽标记后已成功用于肿瘤模型的诊断^[5]。

七甲川菁 (heptamethine carbocyanine, HC) 近红外荧光染料能够被肿瘤细胞吸收并特异性聚集于肿瘤部位, 不需标记任何靶标便可直接用于前列腺癌 (prostate cancer, PCA) 移植模型的活体成像, 具有成像和靶分子的双重功能^[6-7]。我们前期合成并筛选了一系列七甲川菁 NIR 染料, 包括 MHI-148 和 IR-783^[8]。研究发现肿瘤细胞对该类染料的吸收主要通过缺氧和活化的 HIF1 α /OATPs 信号实现, 从而使该类染料具有了肿瘤靶向性^[6]。依据该特征本研究计划将 IR-783 与化疗药物吉西他滨缀合形成偶联化合物 (near-infrared-gemcitabine, NIRG)^[7], 连续注射临床肝癌标本异种移植 (patient-derived xenograft, PDX) 小鼠模型, 利用其识别肿瘤的特性转运化疗药物, 通过活体成像实时监测化合物治疗效果, 实现肿瘤的靶向治疗。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

20 只 6~7 周龄的雄性 BALB/c 裸鼠购自北京

维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2014-0001】, 饲养在第四军医大学屏障设施内【SYXK(陕)2014-001】。所有动物实验均获得第四军医大学实验动物福利伦理委员会的批准 (No. 17018)。

1.1.2 细胞系和试剂

人肝癌细胞系 Hep3B2.1-7 (Hep3B) 购自美国 ATCC 细胞库, 通过慢病毒转染 Luc-Puro 构建稳定表达 Luc 的细胞系 (Hep3B-Luc), 由本实验室保存^[7]。细胞培养在 10% 胎牛血清的 MEM 培养液中, 含 1% 青霉素/链霉素 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)。肝癌手术标本来自西京医院肝胆脾胰外科 (实验室编号分别为 C64003, C34566 和 B66873), 相关临床实验均获得西京医院伦理委员会的批准 (批准编号: 2015432)。MitoTracker (货号 ab112144) 和 LysoTracker (货号 ab112136) 以及 CEA (货号 ab4451)、AFP (货号 ab46799) 和 OATP (货号 ab15441) 抗体购自 Abcam 公司, HIF1 α (货号 610958) 抗体购自 BD 公司。七甲川菁近红外荧光染料 IR-783 与化疗药物吉西他滨缀合形成的偶联化合物 NIRG (化学结构式见参考文献 7) 由美国 Cedars-Sinai Medical Center (Los Angeles, CA) 的 Leland Chung 教授提供^[7]。

1.2 方法

1.2.1 肝癌细胞对 NIRG 的特异性吸收

为了测定 NIRG 在肿瘤细胞内的结合部位, 人肝癌细胞系 Hep3B 在 24 孔板培养 24 h 后分别加入 MitoTracker (200 nmol/L) 或 LysoTracker (75 nmol/L) 37℃ 作用 30 min 后, PBS 洗涤, 加入 NIRG 溶液 (20 μ mol/L) 继续作用 30 min, PBS 洗涤后, 在荧光显微镜下观察 NIRG 在线粒体和溶酶体中的结合 (Olympus IX71, Olympus, Melville, NY, Jap, 配备 ICG 滤光片, 发射/激发: 750-800/820-860 nm)。

1.2.2 肝癌裸鼠皮下移植瘤的 NIRF 成像

实验中裸鼠麻醉采用腹腔注射氯胺酮 (100

mg/mL) 和甲苯噻嗪 (20 mg/mL) 混合溶液, 手术和成像实验中采用异氟烷吸入麻醉。

将不同浓度的 Hep3B-Luc 细胞 (1×10^6 , 3×10^6 , 和 9×10^6) 分别接种裸鼠右后肢皮下。两周后, 上述裸鼠腹腔注射 NIRG $1 \mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{kg})$ 溶液 100 μL , 24 h 后采用配备有 ICG 滤光片的 (发射/激发: 750 – 800/820 – 860 nm) 小动物活体成像系统 (Lumina II Small Animal Optical Imaging System) 检测肿瘤部位 NIRF 强度。同时按照 1.5 mg/mouse 剂量腹腔注射荧光素酶底物 (Gold Biotechnology, Olivette, MO, USA), 同样检测肿瘤部位生物发光强度 (bioluminescence intensity, BLI), 分析 NIRF 强度与 BLI 信号的相关性。

1.2.3 IR-783 介导的化疗药物对肝癌 PDX 模型的治疗

来自临床的肝癌手术标本被切成 3 mm³ 大小, 无菌浸泡处理后, 套管针移植入裸鼠背部皮下 (每组 5 只)。1 月后, 肿瘤开始生长, 计数为 F0 代, 取其组织块用 4% 多聚甲醛固定后, 切片, 进行 HE 染色。肿瘤一抗 AFP 37℃ 孵育 2 h, 加入二抗 (羊抗鼠) 室温孵育 20 min, DAB 显色后, 苏木精复染脱水透明封片晾干, 光学显微镜下观察。同时免疫组织化学测定 HIF1 α 和 OATP 的表达。PDX 模型肿瘤组织连续传代。取其 F3 代瘤组织移植裸鼠皮下, 待肿瘤长至 100 mm³ 后, 分成两组 (每组 5 只) 分别腹腔注射 NIRG (10 mg/kg) 和生理盐水, 每周 2 次, 连续治疗 4 周, 测定肿瘤大小, 绘制肿瘤生长曲线。

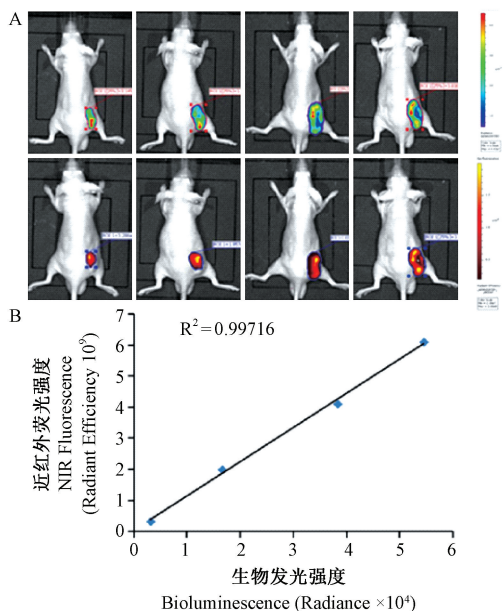
2 结果

2.1 肝癌皮下移植瘤对 NIRG 的特异性吸收

利用人肝癌细胞系 Hep3B-Luc 成功建立裸鼠皮下移植模型, 分别注射 NIRG 染料和荧光素底物后, 活体成像同时测定肿瘤部位 NIRF 信号和生物发光 (BIL) 信号。结果发现 NIRG 特异性富集于肿瘤部位, 随着肿瘤的生长, NIRF 信号和 BIL 信号均增强 (图 1A), 且二者具有良好的相关性 ($R^2 = 0.99716$, 图 1B)。

2.2 肝癌细胞与 NIRG 染料的特异性结合

荧光显微镜下发现 NIRG 信号聚集于肝癌细胞 Hep3B (图 2)。为了进一步明确 NIRF 染料在细胞器内的结合部位, 我们将 Hep3B 细胞和 NIRG 分别与 MitoTracker、LysoTracker 特异性探针共孵育。结果如图 2, NIRG 近红外荧光信号共定位于 Hep3B 细



注: 裸鼠皮下注射肝癌 Hep3B-Luc 细胞后建立的移植模型分别注射酶底物和 NIRG 后进行 NIRF/BLI 成像 (1A)。计算 NIRF 强度与 BLI 信号强度的相关性 ($n=5$) (1B)。

图 1 定量分析 NIRG 在肝癌模型中介导的荧光信号
Note. Hep3B-Luc cells were subcutaneously injected into nude mice. The implanted models were injected with the enzyme substrate and NIRG, and subjected to NIRF/BLI imaging (1A). The correlation between NIRF intensity and BLI signal was calculated ($n=5$) (1B).

Figure 1 Quantitative analysis of fluorescent signals mediated by NIRG in liver cancer models

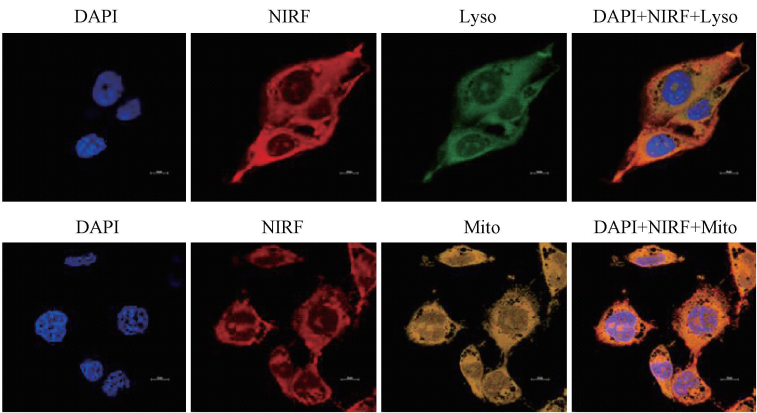
胞黄色的 MitoTracker 探针或绿色的 LysoTracker 探针部位, 提示 NIRF 染料在肿瘤细胞内结合的部位分别为线粒体和溶酶体。

2.3 肝癌 PDX 模型的建立及 NIRF 活体成像

三例肝癌手术标本移植裸鼠皮下后, 平均大约 3 个月后才形成肉眼可见的肿瘤, 待肿瘤长至 500 mm³ 后, 连续体内传代 3 次后, 肿瘤生长的潜伏期稳定至 20 d。取原发瘤和转移瘤 HE 染色发现, 二者在组织形态方面保持了较好的一致性 (图 3)。免疫组织化学检测显示肝癌特异性抗原 AFP 高表达, 与 NIRF 染料特异性吸收相关的抗原 HIF1 α 和 OATP 均高表达 (图 4)。

2.4 NIRG 介导的靶向药物对肝癌 PDX 模型的治疗效果

三例肝癌 PDX 模型成瘤后, 分组在 7、14、21 和 28 d 注射 NIRG 溶液, F3 代裸鼠皮下移植瘤, 腹腔注射 NIRG 溶液后, 24 h 进行 NIRF 活体成像均可以检测到肿瘤部位有特异性荧光, 确认了



注:NIRF 为化合物 NIRG 在肿瘤细胞内激发的荧光,绿色为溶酶体特异性探针,橙色为线粒体特异性探针,DAPI 为细胞核特性探针。

图 2 NIRG 特异性聚集于肝癌细胞的线粒体和溶酶体(×1200)

Note. NIRF is the fluorescence of compound NIRG excited in tumor cells. Green is the lysosome-specific probe. Orange is the mitochondrion-specific probe and DAPI is the nuclear probe.

Figure 2 NIRG specifically clusters in mitochondria and lysosomes of liver cancer cells(×1200)

NIRG 染料在肝癌 PDX 模型中的肿瘤靶向性,活体成像结果见图 5。该化合物能够在肿瘤部位特异性聚集,诱导较强的近红外荧光。连续注射 NIRG 化合物后能够显著抑制肿瘤的生长(图 6),在三种肝癌 PDX 移植模型中均显示出治疗效果,说明该化合物兼具荧光成像和肿瘤靶向转运化疗药物的能力。

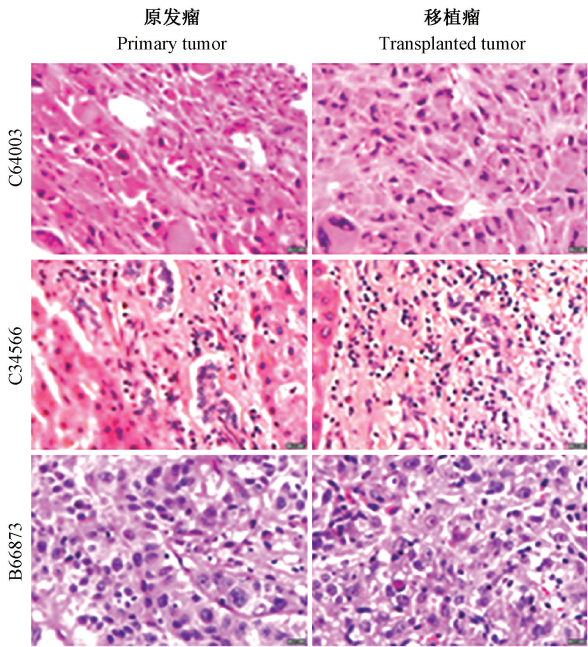


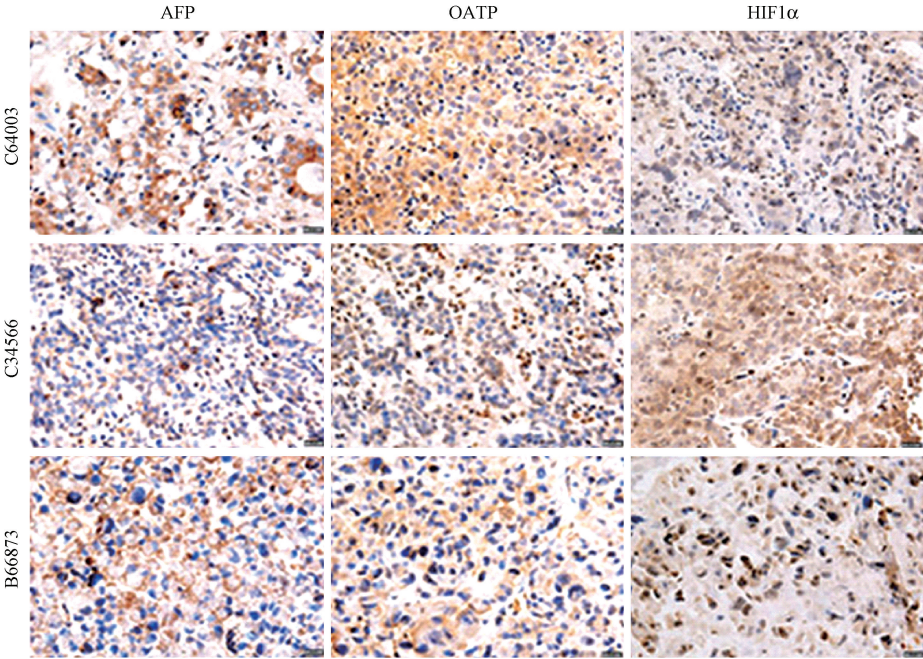
图 3 肝癌 PDX 模型瘤组织的病理形态(×400)

Figure 3 Histopathological analysis of PDX models of liver cancer(×400)

3 讨论

吉西他滨是一种脱氧胞苷类似物,具有广泛的抗肿瘤活性,但其非特异性生物分布往往会引起严重的不良反应^[9]。常规化疗药物无肿瘤靶向性,无法将治疗剂特异性递送至肿瘤组织。配有荧光基团的分子前体药物已经成为监测药物输送和释过程的有用工具。它允许实时监测治疗效果和减少药物剂量,避免潜在副作用^[10]。已报道七甲川菁染料主要通过缺氧和活化的 HIF1 α /OATPs 信号识别肿瘤细胞,由于 HIF1 α 和 OATPs 在大部分肿瘤细胞中普遍高表达,因此该类染料具有了肿瘤靶向性,在乳腺癌、前列腺癌、肝癌、胃癌、胰腺癌等肿瘤中均有报道其肿瘤成像的靶向性^[5-8,10-12]。Shi 等^[13]尝试将抗肿瘤药物氮芥与近红外荧光染料 IR-780 碘化物结合,构建了新的靶向药物 IR-780NM,该化合物兼具有肿瘤靶向性和近红外荧光成像能力。将七甲川菁化合物 IR-783 与单胺氧化酶小分子抑制剂氯吉灵共轭结合后,形成了新的肿瘤靶向药物,该化合物能将化疗药物特异性转运至人前列腺癌裸鼠移植模型肿瘤部位,有效抑制肿瘤的生长^[14]。

常规化疗药物很难通过血脑屏障(BBB)和血肿屏障(BTB)^[15],七甲川菁染料作为药物载体,与化学治疗药物共价结合后,促进药物穿透血液肿瘤屏障(BTB),有效抑制脑肿瘤的发生和转移,延长荷瘤小鼠的存活时间^[7]。本研究中我们选择临床三

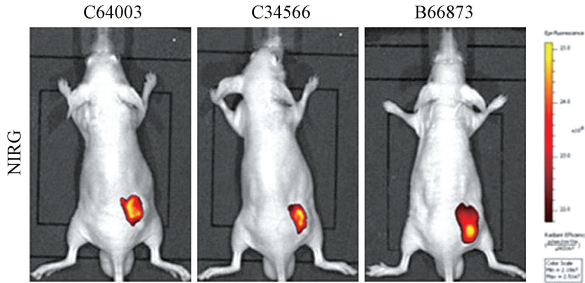


注:裸鼠移植瘤和病人原发瘤中 AFP 高表达;PDX 移植瘤中 HIF1 α 和 OATP 均高表达。

图 4 肝癌 PDX 模型瘤组织的免疫组织化学分析($\times 400$)

Note. AFP was highly expressed in both nude mouse-transplanted tumors and primary tumors; both HIF1 α and OATP were highly expressed in PDX tumors.

Figure 4 Immunohistochemical analysis of PDX models of liver cancer($\times 400$)



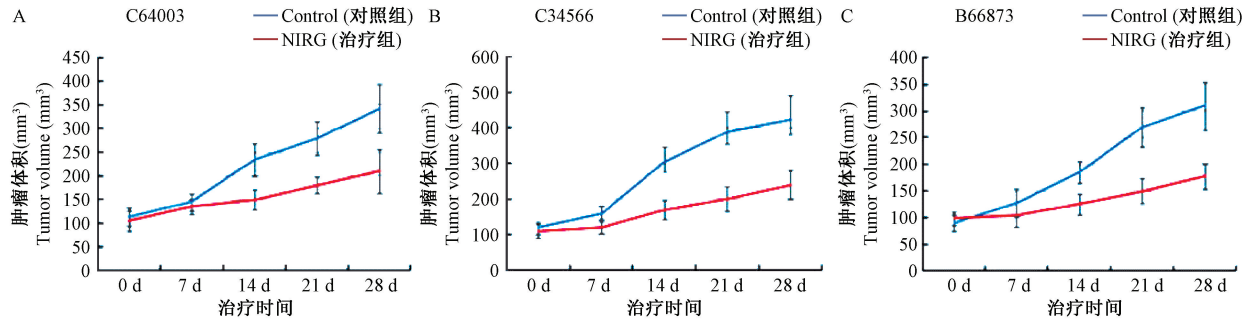
注:三个 PDX 移植瘤部位均检测到特异性近红外荧光。

图 5 肝癌 PDX 模型的 NIRF 活体成像

Note. Specific near-infrared fluorescence was detected in all three PDX xenografts.

Figure 5 NIRF live imaging of PDX models of liver cancer

例肝癌手术标本,成功制备了 PDX 模型,通过组织病理学分析确认了移植瘤与原发瘤的相似性,所有移植瘤均保持了 AFP 的高表达。进一步检测发现 PDX 肿瘤标本中 HIF1 α 和 OATPs 的高表达,与七甲川菁染料识别肿瘤细胞的机制相吻合。因此,为了提高化疗药物的肿瘤靶向性,我们尝试将 IR-783 与吉西他滨(gemcitabine)共轭结合成为 IR-783-gemcitabine(NIRG)。该化合物在肝癌 PDX 裸鼠的移植模型中,能够通过近红外荧光成像显示肿瘤的发生,符合七甲川菁染料的肿瘤靶向性近红外荧光特征并且可以显著抑制肿瘤的生长,显示出良好的



注:NIRG 均显著抑制三种肝癌 PDX 移植瘤的生长($n=5$)。

图 6 NIRG 化合物对肝癌 PDX 模型的治疗效果

Note. NIRG significantly inhibits the growth of the three types of liver cancer PDX xenografts ($n=5$).

Figure 6 The therapeutic effect of NIRG on PDX models of liver cancer

肿瘤靶向特异性和成像特性。

总之,新型七甲川菁染料衍生物-药物缀合物 NIRC 是检测和治疗人类肝肿瘤的有效制剂。本研究结果为 NIR 染料的临床应用和未来发展都提供了重要的实验依据。这样的共轭结合物不仅具备了近红外荧光成像的特性,在未来的抗癌治疗中可能成为重要的备选药物。

参 考 文 献(References)

- [1] Tummers QR, Schepers A, Hamming JF, et al. Intraoperative guidance in parathyroid surgery using near-infrared fluorescence imaging and low-dose methylene blue [J]. *Surgery*, 2015; 158(5):1323–1330.
- [2] Frangioni JV. In vivo near-infrared fluorescence imaging [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2003; 7(5):626–634.
- [3] Pameijer CR, Leung A, Neves RI, et al. Indocyanine green and fluorescence lymphangiography for sentinel node identification in patients with melanoma [J]. *Am J Surg*, 2018; 216(3):558–561.
- [4] Libérale G, Vankerckhove S, Galdon MG, et al. Fluorescence imaging after intraoperative intravenous injection of indocyanine green for detection of lymph node metastases in colorectal cancer [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2015;41(9):1256–1260.
- [5] 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.
- [6] Wu JB, Shao C, Li X, et al. Near-infrared fluorescence imaging of cancer mediated by tumor hypoxia and HIF1 α /OATPs signaling axis [J]. *Biomaterials*, 2014; 35(28): 8175–8185.
- [7] 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.
- [8] Wu J, Pan D, Chung LW. Near-infrared fluorescence and

nuclear imaging and targeting of prostate cancer [J]. *Transl Androl Urol*, 2013; 2(3):254–264.

- [9] D' Alessandris QG, Montano N, Cenci T, et al. Targeted therapy with bevacizumab and erlotinib tailored to the molecular profile of patients with recurrent glioblastoma. Preliminary experience [J]. *Acta Neurochir (Wien)*, 2013; 155(1):33–40.
- [10] 师长宏. 基于近红外荧光制剂的多模态多功能分子影像技术在肿瘤模型中的应用[J]. *中国实验动物学报*. 2018; 26(2): 100–105.
- Shi CH. Application of multi-modality and multi-functional molecular imaging based on near-infrared fluorescence dye in tumor models [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2018; 26(2):100–105.
- [11] Zhang C, Zhao Y, Zhang H, et al. The application of heptamethine cyanine dye DZ–1 and indocyanine green for imaging and targeting in xenograft models of hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2017; 18(6): 1332.
- [12] Shi C, Wu JB, Chu GC, et al. Heptamethine carbocyanine dye-mediated near-infrared imaging of canine and human cancers through the HIF1 α /OATPs signaling axis [J]. *Oncotarget*, 2014; 5(20): 10114–10126.
- [13] Zhang E, Luo S, Tan X, et al. Mechanistic study of IR–780 dye as a potential tumor targeting and drug delivery agent [J]. *Biomaterials*, 2014; 35(2):771–778.
- [14] Wu JB, Lin TP, Gallagher JD, et al. Monoamine oxidase a inhibitor-near-infrared dye conjugate reduces prostate tumor growth [J]. *J Am Cheml Soc*, 2015; 137(6):2366–2374.
- [15] Agarwal S, Manchanda P, Vogelbaum MA, et al. Function of the blood-brain barrier and restriction of drug delivery to invasive glioma cells: Findings in an orthotopic rat xenograft model of glioma [J]. *Drug Metab Dispos*, 2013; 41(1):33–39.

[收稿日期] 2018–06–04