IR-780 光热治疗小鼠乳腺癌移植瘤的初步研究*

510010 广州 南方医科大学研究生学院
周群芳，段琬璐，黎国峰[1]，严 飞[1]，刘锐洪[2]，李叶阔[3]

【摘 要】 **目的** 研究 IR-780 光热治疗对小鼠乳腺癌移植瘤的治疗效果。**方法** 在 BALB/c 小鼠右侧腹部皮下接种 4T1 乳腺癌细胞建立荷瘤动物模型进行实验，将荷瘤小鼠随机分为对照组（瘤内注射 0.1 ml 生理盐水）、激光组（激光照射 2.2 W/cm^2，4 min）、IR-780 组（瘤内注射 80 μg IR-780 溶液）和 IR-780+激光组（瘤内注射 80 μg IR-780 溶液，激光照射 2.2 W/cm^2，4 min）。游标卡尺测量并计算肿瘤体积，采用 Vevo 2100 超高分辨率小动物超声成像仪对 4 组小鼠给药后 0、12 及 60 h 的肿瘤组织进行成像并采图，采用免疫组化 TUNEL 法分析各组治疗 60 h 后肿瘤组织的凋亡指数。**结果** IR-780+激光组治疗 60 h 后的肿瘤体积较其余 3 组均减小（$P<0.05$）；与治疗前相比，IR-780+激光组治疗 12、60 h 后的肿瘤组织超声回声灰阶值均降低（$P<0.05$），且均低于其余 3 组（$P<0.05$）；与其余 3 组比较，IR-780+激光组的肿瘤凋亡指数升高（$P<0.05$）；对照组、激光组和 IR-780 组肿瘤体积、超声回声及凋亡指数的差异均无统计学意义（$P>0.05$）。**结论** IR-780 光热治疗对小鼠乳腺癌肿瘤具有明显杀伤作用，表现为肿瘤体积明显减小，肿瘤回声明显减低及大量肿瘤细胞凋亡。

【关键词】 乳腺癌； 光热治疗； 超声成像； 凋亡
中图分类号：R73-36 **文献标识码**：A **文章编号**：1009-0460(2015)04-0303-04

Effect of IR-780 photothermal therapy on breast cancer in xenograft mice

ZHOU Qunfang, DUAN Wanlu, LI Guofeng, YAN Fei, LIU Ruihong, LI Yekuo. Graduate Academy, China Southern Medical University, Guangzhou 510010, *China*
Corresponding author: LI Yekuo, E-mail: yekuoli@163.com

【**Abstract**】 **Objective** To explore the effect of IR-780 combined with laser on breast cancer xenograft in mice. **Methods** 4T1 breast cancer cells were inoculated in the right subcutaneous abdomen of BALB/c mice to establish tumor models. Experimental mice were randomly divided into four groups (five mice for each group): Control group (mice injected with 0.1 ml saline), Laser group (mice irradiated with laser of 2.2 W/cm^2 for 4 min), IR-780 group (mice injected with 80 μg IR-780) and IR-780+Laser group (mice injected with 80 μg IR-780 following irradiation with laser of 2.2 W/cm^2 for 4 min). The tumor volume was measured and recorded. The ultrasonic echo of tumor tissue in each group was evaluated with Vevo 2100 high frequency system at 0, 12 and 6 h after treatment, respectively. The apoptotic index of tumor tissue in each group was detected with TUNEL at 60 h after treatment. **Results** Compared with other three groups, the tumor volume of IR-780+Laser group was significantly decreased at 60 h after treatment ($P<0.05$). There were lower gray scale values of ultrasonic echo in IR-780+Laser group at 12 and 60 h versus 0 h after treatment ($P<0.05$). The gray scale values of ultrasonic echo in IR-780+Laser group were also lower than other three groups ($P<0.05$). There were higher apoptotic index of IR-780+Laser group versus other three groups ($P<0.05$). No significant difference was observed on the tumor volume, gray scale value of ultrasonic echo and apoptotic index among Control group, Laser group and IR-780 group ($P>0.05$). **Conclusion** The obvious suppressive effect was observed in photothermal therapy with IR-780 on breast cancer tumor, evidenced by change of ultrasonic echo of tumor tissue in high frequency and increased apoptosis.

【**Key Words**】 Breast cancer; Photothermal therapy; Ultrasound imaging; Apoptosis

乳腺癌是妇女最常见的恶性肿瘤，近年来其发病率呈上升趋势，严重威胁着生命健康[1-2]。手术治疗及放化疗给患者带来极大的痛苦，且以上方法有一定的局限性。患者难以耐受长期放化疗，而手

* 基金项目：全军医学科研“十二五”计划资助项目（CWS12J076）
1 518055 中国科学院深圳先进技术研究院医工所
2 510010 广州军区广州总医院超声影像科
3 通讯作者，E-mail：yekuoli@163.com

术治疗创伤风险大且仅适用乳腺癌早期。因此,探寻一种非侵入性且患者可耐受的新治疗方法是临床和科学研究的热点。

光热治疗是将光能转化为热能,加热肿瘤病灶部位使温度达到临界治疗温度并维持一段时间,以杀死癌细胞,从而达到治疗肿瘤的目的[3]。光热治疗具有创伤小、副作用少以及高选择性等优点,因而逐渐得到临床医学的肯定。IR-780 具有强荧光、良好稳定性及嗜肿瘤性,已被认为是很好的肿瘤活体成像荧光探针[4]。IR-780 在近红外光有很强的吸收,故可用于光热治疗。本研究通过在 BALB/c 小鼠右侧腹部皮下接种 4T1 乳腺癌细胞建立荷瘤动物模型,分析光热治疗后肿瘤组织成像及凋亡情况,探究 IR-780 光热治疗乳腺癌的效果。

1 材料与方法

1.1 试剂、动物及仪器 SPF 级雌性纯系 BALB/c 小鼠由广东省动物中心提供,4T1 乳腺癌细胞购自美国 ATCC 细胞库,IR-780、二甲基亚砜(DMSO)均购自美国 SIGMA 公司,TUNEL 检测试剂购自美国 Roche 公司,Trypsin-EDTA 购自美国 Gibco 公司,DMEM 高糖(含丙酮酸钠)购自美国 Hyclone 公司,胎牛血清购自以色列 Biological Industries 公司。激光器由中科院深圳先进技术研究院医工所提供,Vevo2100 超高分辨率小动物超声成像仪为加拿大 VisualSonics 公司产品,倒置荧光显微镜 DMI3000R、石蜡切片机 RM2235 为德国莱卡产品。

1.2 肿瘤模型制备 采用含 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 DMED 高糖培养基中培养 4T1 细胞,然后在 5% CO_2、37 ℃的培养箱中传 3~4 代,其次在对数期用胰酶消化细胞,离心 3 次洗去胎牛血清,最后制备成浓度 1×10^7 个/ml 无血清培养基的细胞悬浊液。每只小鼠于右侧腹部接种细胞数量为 1×10^6 个。

1.3 分组及肿瘤体积检测 称取一定量的 IR-780 溶于 DMSO 中,浓度为 32 mg/ml,再用无血清培养基稀释,终浓度为 800 μg/ml,备实验使用。小鼠右侧腹部肿瘤接种 9 天后,用游标卡尺测得其肿瘤平均直径约为 10 mm×10 mm。待小鼠肿瘤体积长至 500 mm^3 时,将荷瘤小鼠随机分为 4 组($n=5$):(1)对照组(Control):瘤内注射 0.1 ml 生理盐水;(2)激光组(Laser):瘤内注射 0.1 ml 生理盐水后行激光照射(808 nm, 2.2 W/cm^2, 4 min);(3)IR-780 组(IR-780):仅注射 0.1 ml 即 80 μg IR-780 溶液于肿瘤内,不行激光照射;(4)IR-780+激光组(IR-780+Laser):瘤内注射 80 μg IR-780 溶液后行激光照射(808 nm, 2.2 W/cm^2, 4 min)。将各组小鼠麻醉后,将肿瘤区域放置于激光内照射。在激光照射小鼠肿瘤时,同时用电子测温计测量激光照射时肿瘤区域的温度。激光照射 60 h 后,用游标卡尺再次测量 4 组小鼠的肿瘤体积。根据公式计算肿瘤体积,肿瘤体积=1/2×长径×短径^2。60 h 后处死小鼠,取出肿瘤组织。

1.4 超声成像检测 在给 4 组实验鼠注射药物,且未给予激光照射前(0 h),用 Vevo 2100 超高分辨率小动物超声成像仪的线阵探头(频率 40 MHz)对 4 组小鼠进行肿瘤超声成像。操作步骤如下:(1)将麻醉的小鼠左侧卧位固定在加热板上,用脱毛膏脱去右侧腹部肿瘤区域的皮毛,涂上超声耦合剂;(2)将探头固定于小鼠肿瘤区域并与肿瘤长轴垂直,收集图像并记录为 0 h(增益 40 db,深度 9 mm,宽度 8.08 mm);(3)激光治疗 12 h 及 60 h 后,再次采用 Vevo 2100 超高分辨率小动物超声成像仪对 4 组小鼠相同的肿瘤位置进行超声成像。通过仪器自带系统软件分析肿瘤的灰阶值。

1.5 凋亡检测 采用 TUNEL 试剂检测 4 组肿瘤组织中细胞凋亡情况。取出的肿瘤组织经福尔马林固定后制备成石蜡切片,切片厚度为 8 mm。制备好的石蜡切片依次经脱蜡、水化、透明及抗原修复后,样本加入 50 μl/个 TUNEL 反应液,阴性对照加入 50 μl/个的标记液,常温避光潮湿环境下反应 60 min。荧光显微镜下观察,激发波长 450~500 nm,发射波长 515~565 nm。根据公式计算凋亡指数,凋亡指数=视野中阳性细胞数/视野中细胞总数×100%。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 13.0 版软件分析。数据均以“均数±标准差”的形式表示,多组比较用单因素方差分析,组间比较用 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组的光热治疗效果 Laser 组在激光照射时温度升高不明显,在照射 1 min 时温度基本稳定在 37.4 ℃,仅升高 4.3 ℃;而 IR-780+Laser 组在激光照射 10 s 时温度由 33.1 ℃升至 45.2 ℃,30 s 达 56.2 ℃,明显超过了肿瘤的耐受温度。IR-780+Laser 组激光照射后立即可见肿瘤部位烧焦并结痂,

12 h 后可见肿瘤体积开始缩小，60 h 肿瘤明显变小，而 Laser 组却无上述变化。IR-780+Laser 组的治疗 60 h 后的肿瘤体积均小于 Control 组、Laser 组和 IR-780 组（$P<0.05$），且 Control 组、Laser 组和 IR-780 组间肿瘤体积的差异均无统计学意义（$P>0.05$）。见图 1～图 3。

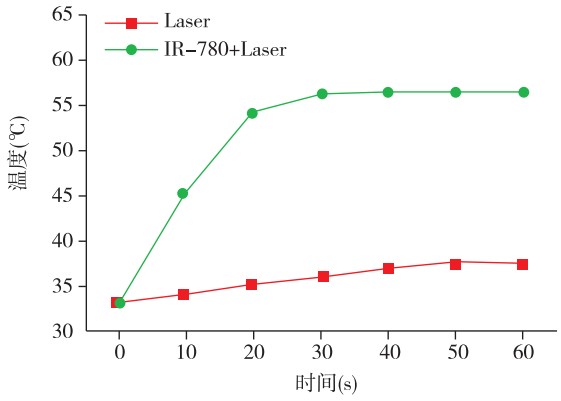
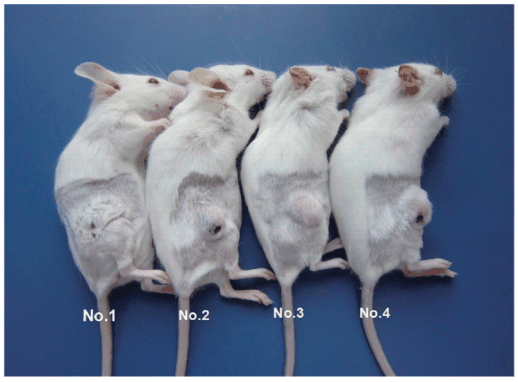


图 1　IR-780 光热治疗 1 min 荷瘤小鼠肿瘤区域的温度时间曲线



No.1：IR-780+Laser；No.2：IR-780；No.3：Laser；No.4：Control

图 2　各组治疗 60 h 后的大体情况

2.2　各组治疗前后肿瘤组织的回声改变　IR-780+Laser 组在 12 h 时超声图表现肿瘤回声稍有体积变小，然而组织回声改变不明显，60 h 后肿瘤明显变小，回声也明显减低。Control 组、Laser 组及 IR-780 组肿瘤体积在治疗 12 h 及 60 h 后，小鼠肿瘤组织体积稍增大而肿瘤组织回声均无明显变化。4 组肿瘤组织在 0、12、60 h 肿瘤组织灰阶值的量化分析显示：IR-780+Laser 组在治疗 12 h 后，其灰阶值减低（$P<0.05$），而激光照射 60 h 后，相较于未照射前其灰阶值明显降低（$P<0.05$）。其余 3 组间灰阶值的差异均无统计学意义（$P>0.05$）。见图 4、图 5。

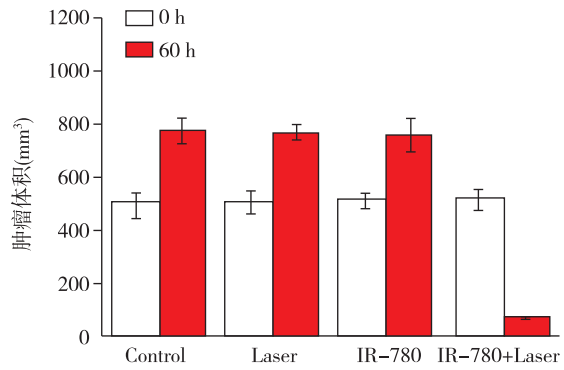
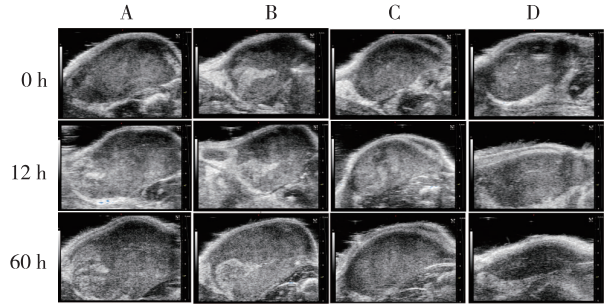


图 3　各组治疗 60 h 后的肿瘤体积比较



A：Control 组；B：Laser 组；C：IR-780 组；D：IR-780+Laser 组

图 4　各组治疗前后肿瘤组织的超声成像图

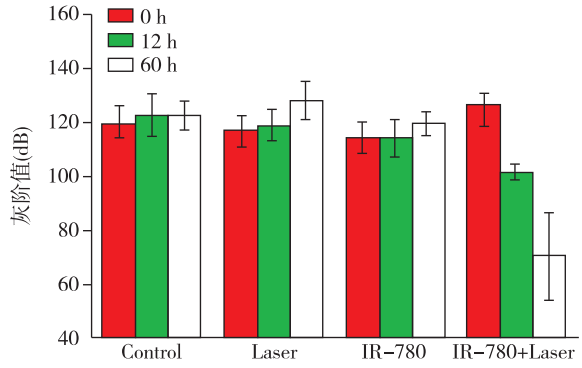


图 5　各组治疗前后肿瘤组织的超声灰阶值量化

2.3　各组肿瘤组织的凋亡情况　TUNEL 染色图片在荧光显微镜下用蓝光激发成绿光。根据凋亡检测试剂盒说明，在荧光显微镜下绿色荧光点为抗体标记的凋亡细胞。IR-780+Laser 组的凋亡指数均高于 Control 组、Laser 组和 IR-780 组，差异有统计学意义（$P<0.05$）；Control 组、Laser 组和 IR-780 组凋亡指数的差异均无统计学意义（$P>0.05$）。见图 6。

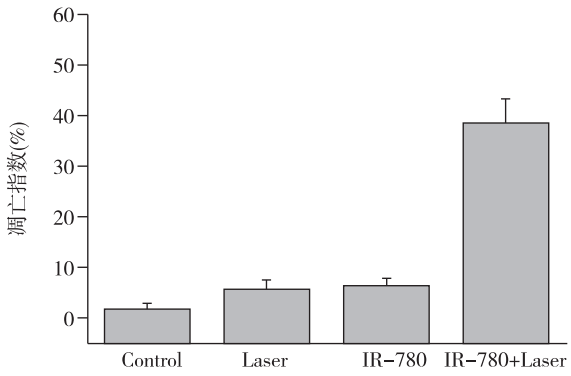


图 6 各组治疗 60 h 后的肿瘤组织凋亡指数

3 讨 论

在癌症治疗中,手术切除、化疗、放疗及生物治疗已在肿瘤治疗方面取得了卓越成就,但是毒副作用、多药耐药等问题仍难以克服[5-6]。热疗是利用物理加热的方式,加热病灶部位使温度达到临界治疗温度并维持一段时间来杀死癌细胞,从而达到治疗肿瘤的目的。光热治疗是利用吸光物质将光能转变成热能,当温度上升到一定值时使肿瘤组织产生不可逆性损伤,可以达到局部治疗肿瘤的目的,从而减少患者的痛苦[7]。光热疗法能否成功的关键,在于癌细胞上产生强的光照吸收以及高的光热转换效率[8]。由于光热治疗是非侵入治疗,患者的禁忌证少且可再次治疗,所以得到临床研究的亲睐。因此,热疗在临床应用中逐渐发展成为一种备受关注的替代疗法[9]。

由于癌细胞对热的耐受程度低于正常细胞,当局部温度达到 42 ℃以上时,癌细胞会因蛋白质变性、DNA 合成和修复的削弱、细胞内含氧量或 pH 值降低等因素的影响而导致死亡[10]。IR-780 是脂溶性分子,最大吸收波长在 780 nm,波谱在近红外区域,所以可被用来光热治疗[11]。同时,IR-780 对光有很强的表面等离子共振吸收效应,即有很强的光热转换效率,可以在激光照射时迅速加热,因此在肿瘤的光热治疗中具有明显的优越性[4]。

本研究通过在 Balb/c 小鼠右侧腹部皮下接种 4T1 乳腺癌细胞建立荷瘤动物模型,探讨了 IR-780 光热治疗乳腺癌的效果。超声可以通过回声改变或血流灌注改变实时监测治疗效果,高频超声具有很高的分辨率。本研究中 IR-780+Laser 组治疗 12 h 及 60 h 后,超声见肿瘤回声明显减低,肿瘤体积变小,而其他 3 组治疗前后的回声改变不明显。荧光显微镜下可见 IR-780+Laser 组有明显增多的肿瘤细胞凋亡。Laser 组、IR-780 组仅有少量凋亡细胞,Control 组几乎无凋亡。由超声影像和 TUNEL 实验结果再次证明了 IR-780 光热治疗小鼠乳腺癌的效果明显。IR-780 光热治疗在短时间内即可见肿瘤体积明显变小,肿瘤回声明显减低以及大量凋亡,与 IR-780 光热治疗产生的高温作用有关。在本研究中还发现 IR-780 联合激光照射后,肿瘤血管内充满血栓。

参考文献

[1] Halsted CP, Benson JR, Jatoi I. A historical account of breast cancer surgery: beware of local recurrence but be not radical[J]. Future Oncol, 2014, 10(9): 1649-1657.

[2] 宋玲琴, 何建军, 张新伟, 等. 培美曲塞联合洛铂治疗蒽环类和紫杉类化疗失败的晚期乳腺癌的临床观察[J].临床肿瘤学杂志, 2012, 17(3): 237-239.

[3] Jang B, Park JY, Tung CH, et al. Gold nanorod-photosensitizer complex for near-infrared fluorescence imaging and photodynamic/photothermal therapy in vivo[J]. ACS Nano, 2011, 5(2): 1086-1094.

[4] Wang Y, Liu T, Zhang E, et al. Preferential accumulation of the near infrared heptamethine dye IR-780 in the mitochondria of drug-resistant lung cancer cells[J]. Biomaterials, 2014, 35(13): 4116-4124.

[5] Yu J, Javier D, Yaseen MA, et al. Self-assembly synthesis, tumor cell targeting, and photothermal capabilities of antibody-coated indocyanine green nanocapsules[J]. J Am Chem Soc, 2010, 132(6):1929-1938.

[6] Sun TM, Du JZ, Yao YD, et al. Simultaneous delivery of siRNA and paclitaxel via a "two-in-one" micelleplex promotes synergistic tumor suppression[J]. ACS Nano, 2011, 5(2): 1483-1494.

[7] Zheng M, Yue C, Ma Y, et al. Single-step assembly of DOX/ICG loaded lipid--polymer nanoparticles for highly effective chemo-photothermal combination therapy[J]. ACS Nano, 2013, 7(3): 2056-2067.

[8] Ahmad MZ, Akhter S, Rahman Z, et al. Nanometric gold in cancer nanotechnology: current status and future prospect[J]. Pharm Pharmacol, 2013, 65(5): 634-651.

[9] Zheng C, Zheng M, Gong P, et al. Indocyanine green-loaded biodegradable tumor targeting nanoprobes for in vitro and in vivo imaging[J]. Biomaterials, 2012, 33(22): 5603-5609.

[10] Tang Y, McGoron AJ. Combined effects of laser-ICG photothermotherapy and doxorubicin chemotherapy on ovarian cancer cells[J]. J Photochem Photobiol B, 2009, 97(3): 138-144.

[11] Yue C, Liu P, Zheng M, et al. IR-780 dye loaded tumor targeting theranostic nanoparticles for NIR imaging and photothermal therapy[J]. Biomaterials, 2013, 34(28): 6853-6861.

收稿日期:2014-11-21; 修回日期:2015-01-26