

文章编号: 0258-7025(2009)10-2676-04

# 单壁碳纳米管增强近红外区激光热疗效果

周非凡 邢达 宋盛 欧忠敏 陈伟

(华南师范大学激光生命科学研究所暨激光生命科学教育部重点实验室, 广东 广州 510631)

**摘要** 分别从细胞层面和在体层面研究单壁碳纳米管(SWNT)对近红外区 980 nm 激光热疗的增强效应。细胞层面研究:对照组无处理,单壁碳纳米管组孵育单壁碳纳米管 2 h,激光组照射 980 nm 激光,激光+单壁碳纳米管组孵育单壁碳纳米管 2 h 后照射 980 nm 激光,各处理组细胞继续培养 12 h,CCK8 检测细胞死亡率。在体层面研究:对照组无处理,单壁碳纳米管组在肿瘤部位注射单壁碳纳米管,激光组照射 980 nm 激光,激光+单壁碳纳米管组在肿瘤部位注射单壁碳纳米管 6 h 后照射 980 nm 激光。比较 4 组的杀伤效果、肿瘤增长、生存情况等。结果表明,相对于激光治疗组,激光+单壁碳纳米管组具有显著的杀伤效果,有效抑制肿瘤增长,明显提高治愈率。说明单壁碳纳米管能够显著地增强 980 nm 激光热疗效果。

**关键词** 医用光学; 激光热疗; 980 nm 激光; 单壁碳纳米管; 小鼠乳腺癌; Balb/c 小鼠

中图分类号 Q631 文献标识码 A doi: 10.3788/CJL20093610.2676

## Single-Walled Carbon Nanotubes Enhance Near-Infrared Region Photothermal Therapy

Zhou Feifan Xing Da Song Sheng Ou Zhongmin Chen Wei

(Key Laboratory of Laser Life Science & Institute of Laser Life Science, Ministry of Education, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong 510631, China)

**Abstract** The enhance effects of single-walled carbon nanotubes (SWNT) during photothermal therapy in 980 nm region in vitro and in vivo are studied. For in vitro study, the control group was not treated, the SWNT group was incubated with SWNT for 2 h, the laser group was irradiated with 980 nm laser, the laser+SWNT group were incubated with SWNT for 2 h and then irradiated with 980 nm laser. Cell cytotoxicity was assessed with CCK8 at 12 h after treatment. For in vivo study, the control group was not treated, the SWNT group was injected with SWNT, the laser group was irradiated with 980 nm laser, the laser+SWNT group were injected with SWNT and irradiated with 980 nm laser 6 h after injection. The destroy effects, tumor growth, survival rate between four groups were compard. The results show that compared to laser group, the laser+SWNT group could destruct the tumors significantly inhibit tumor growth effectively, and improve survival rate of mice. It indicates that SWNT could significantly enhance the photothermal therapy in 980 nm region.

**Key words** medical optics; photothermal therapy; 980 nm laser; single-walled carbon nanotubes; murine mammary tumor; Balb/c mice

### 1 引 言

以激光进行高温治疗的激光热疗法,已成为肿瘤热疗的一种新的有效手段<sup>[1,2]</sup>。用于热疗的激光

主要使用可见光及近红外激光,但由于该波段激光对组织的穿透有限,因此,激光热疗法具有一定的局限性。研究报道,利用光吸收染料能够选择性地增

收稿日期: 2008-10-09; 收到修改稿日期: 2009-01-01

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30627003,30870676,30870658,30800261)和广东省自然科学基金(7117865)资助课题。

作者简介: 周非凡(1982—),女,博士研究生,主要从事激光医学方面的研究. E-mail: zhouff@senu.edu.cn

导师简介: 邢达(1957—),男,教授,博士生导师,主要从事光学与生命科学交叉学科及生物医学光学等方面的研究。

E-mail: xingda@senu.edu.cn(通信联系人)

强肿瘤部位的热损伤,提高肿瘤治疗效果<sup>[3,4]</sup>。最新研究表明,一种新颖的纳米材料——碳纳米管<sup>[5]</sup>,在近红外区域对激光能量具有强烈吸收效应<sup>[6]</sup>,并将光能量迅速转化为热能,产生的热效应导致了细胞的立刻崩溃<sup>[6,7]</sup>。由于生物组织在近红外区的光吸收很弱<sup>[8,9]</sup>,因此这种新颖的纳米材料因其独特的近红外光吸收性和光稳定性,能有效地代替光吸收染料在激光热疗中的应用。本实验中采用的单壁碳纳米管(SWNT)通过 CoMoCAT 法合成<sup>[10]</sup>,具有结构均一(直径 0.81 nm)、在近红外 980 nm 处有特征吸收峰等特点<sup>[11]</sup>。

虽然大多数研究仍是关于碳纳米管运载功能及作为生物传感材料的应用<sup>[12~15]</sup>,仅仅探讨碳纳米管的光热效应及在细胞层面的影响<sup>[6,7~16]</sup>。但目前的研究结果已表明,碳纳米管能将光能转化为热能,杀伤细胞<sup>[6,7]</sup>,且具有安全剂量<sup>[17,18]</sup>,对机体无损伤。因此,碳纳米管在光热治疗中将展现出良好的应用前景。

## 2 材料与方法

小鼠乳腺癌瘤株从第四军医大学实验中心引进。单壁碳纳米管由美国俄克拉荷马大学生化材料所馈赠。雌性 Balb/c 小鼠 36 只,清洁级,鼠龄 6~8 周,广州中山医科大学动物中心提供。半导体激光器,波长 980 nm,石英光纤传输,上海恩耐订制。

将 0.3 mg 单壁碳纳米管加入到磷脂化聚乙二醇(PL-PEG)溶液中(质量浓度为 3.5 mg/700  $\mu$ L)超声 6 h,使单壁碳纳米管溶解。将单壁碳纳米管悬浮液离心 1 h(10000 g),取上清液,并用 100 kDa 过滤器(Millipore)多次过滤去除过量的 PL-PEG,得最终澄清的 SWNT-PEG 溶液。在紫外/可见分光光度计下(UV/IS spectrometer (Lambda 35, Perkin-Elmer, UK))测量碳管溶液在 400~1100 nm 处的吸光度,测量峰宽为 5 nm,测量速度为 200 nm/min。

用 1640 加质量分数为 10% 新生牛血清和抗生素,体外培养 EMT6 肿瘤细胞。96 孔板培养细胞( $1 \times 10^3$ /孔),分 4 组实验。空白对照组无任何处理,单壁碳纳米管组和激光+单壁碳纳米管组同时孵育单壁碳纳米管(质量浓度为 1.75  $\mu$ g/mL 和 3.5  $\mu$ g/mL)2 h,激光组和激光+单壁碳纳米管组照射 980 nm 激光 2 min ( $0.5 \text{ W/cm}^2$  和  $1 \text{ W/cm}^2$ ),12 h 后 CCK8 检测细胞死亡率。每孔加入 10  $\mu$ L 的 CCK8 继续培养 2 h 后,用酶标仪检测 450 nm 处各孔的光密度(OD)值。以实验平行的单纯培养液的

空白孔调零,记录 OD 值,每个实验重复 3 次,取其平均值,细胞的存活率可以表示为:

$$\text{存活率} = \frac{\text{实验组 OD 值} - \text{本底 OD 值}}{\text{空白组 OD 值} - \text{本底 OD 值}} \times 100\%$$

Balb/c 小鼠 36 只随机分为 4 组,小鼠右腿部接种小鼠乳腺癌 EMT6 细胞( $2 \times 10^6$ /只),肿瘤体积约 300  $\text{mm}^3$  时进行治疗。对照组无处理,单壁碳纳米管治疗组在肿瘤部位注射单壁碳纳米管(质量比为 1 mg/kg),激光治疗组照射 980 nm 激光( $1 \text{ W/cm}^2$ , 5 min),激光+单壁碳纳米管治疗组在肿瘤部位注射单壁碳纳米管(质量比为 1 mg/kg),6 h 后照射 980 nm 激光( $1 \text{ W/cm}^2$ , 5 min)。

每天观察各组小鼠瘤体的生长情况。每 2~3 d 测量计算一次瘤体体积,观察至对照组体积全部超过 1500  $\text{mm}^3$ 。测量方法为用游标卡尺按直角测量肿瘤的长轴和短轴,最后计算肿瘤体积  $V = ab^2/2$ , $a$  为长轴, $b$  为短轴。准确记录每只小鼠死亡时间和治愈时间。

实验数据采用 Origin6.0 进行统计,以均数士标准差( $\bar{X} \pm S$ )表示。

## 3 结果

### 3.1 单壁碳纳米管溶液的吸收光谱

图 1 为单壁碳纳米管溶液在可见及近红外区的吸收光谱,表明 CoMoCAT 法制备的单壁碳纳米管在 980 nm 处存在特征吸收峰。

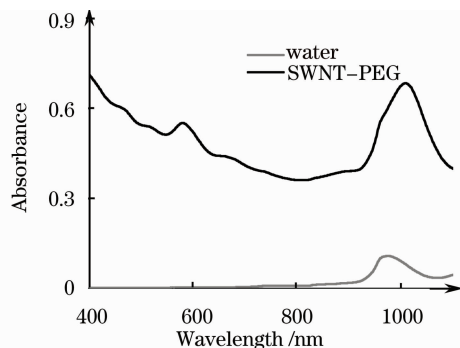


图 1 CoMoCAT 单壁碳纳米管溶液的吸收光谱

Fig. 1 Absorption spectra of CoMoCAT single-walled carbon nanotubes solution

### 3.2 细胞层面杀伤效应

细胞层面杀伤效应实验显示:单光照激光剂量达  $60 \text{ J/cm}^2$  时,细胞存活率无明显变化,同样光剂量照射孵育单壁碳纳米管的细胞时(质量浓度为 1.75  $\mu$ g/mL),细胞存活率有所下降,当单壁碳纳米管孵育质量浓度达 3.5  $\mu$ g/mL 时,细胞存活率下降

至 68%。单光照剂量达  $120 \text{ J/cm}^2$  时,细胞存活率为 63%,同样光剂量照射孵育单壁碳纳米管的细胞时(质量浓度为  $1.75 \mu\text{g/mL}$  和  $3.5 \mu\text{g/mL}$ ),细胞存活率分别下降至 45% 和 15%(如图 2 所示)。结果表明,单壁碳纳米管明显增强 980 nm 激光的杀伤效应,并且此杀伤效应具有光剂量和单壁碳纳米管剂量依赖性。

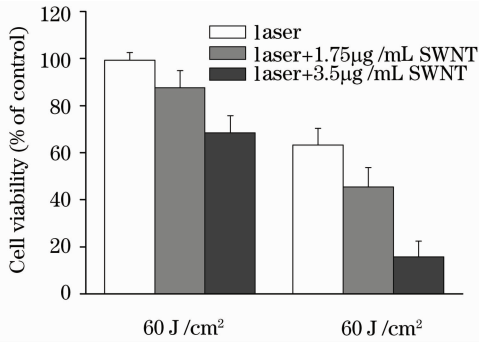


图 2 不同刺激组处理对细胞存活率的影响

Fig. 2 Viability of tumor cells under different treatment

### 3.3 肿瘤生长曲线

在体实验肿瘤生长曲线显示,与空白对照组比较,单激光治疗组明显抑制了肿瘤的生长,然而激光+单壁碳纳米管治疗组显著地抑制了肿瘤的生长,并且单壁碳纳米管治疗组对肿瘤生长无影响。从肿瘤生长曲线分析,当治疗后 10 d 时,激光治疗组和激光+单壁碳纳米管治疗组具有相同的肿瘤生长抑

表 1 治疗后的瘤体脱落数及存活数

Table 1 Tumor free and survival number of mice after treatment

Group	Number	Tumor free and survival number at different days after treatment			
		5	10	20	30
Control	8	0/8	0/8	0/7	0/5
SWNT	8	0/8	0/8	0/8	0/5
Laser	10	0/10	0/10	1/9	1/9
Laser-SWNT	10	0/10	0/10	4/10	8/10

### 3.5 激光治疗组和激光+单壁碳纳米管治疗组治疗效果

图 4 为激光治疗和激光+单壁碳纳米管治疗后 30 d 时小鼠肿瘤图片,激光治疗后,瘤体表面结痂,但随后复发;激光+单壁碳纳米管治疗后,肿瘤处结痂,随后慢慢消除,直至瘤体脱落。

## 4 讨 论

激光+单壁碳纳米管治疗组的肿瘤生长抑制效果、小鼠瘤体脱落数及小鼠存活数均显著高于对照组,且明显高于激光治疗组。激光治疗组虽能抑制肿瘤生长,但激光穿透能力有限,不能有效地损伤深

制效果;10 d 后,激光+单壁碳纳米管治疗组肿瘤体积继续减小,而激光治疗组肿瘤体积开始增长;30 d 时,激光+单壁碳纳米管治疗组肿瘤基本消除,而激光治疗组肿瘤体积达  $600 \text{ mm}^3$ (如图 3 所示)。结果表明,单壁碳纳米管显著增强激光热疗效果,可以有效抑制肿瘤生长。

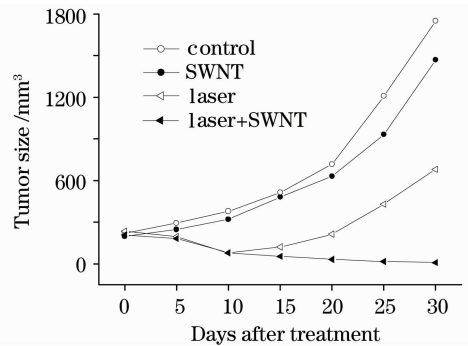


图 3 不同治疗组对小鼠肿瘤的生长抑制作用

Fig. 3 Tumor size after different treatment

### 3.4 小鼠存活及瘤体脱落数

表 1 中各治疗组小鼠瘤体脱落及存活数据显示:治疗后 30 d 时,对照组和单壁碳纳米管治疗组各存活 5 只,无瘤体脱落小鼠;激光治疗组存活 9 只,小鼠瘤体脱落 1 只;然而激光+单壁碳纳米管治疗组具有显著的治疗效果,小鼠全部存活,且在 20 d 时 4 只治疗小鼠瘤体脱落,30 d 时,瘤体脱落小鼠达 8 只。

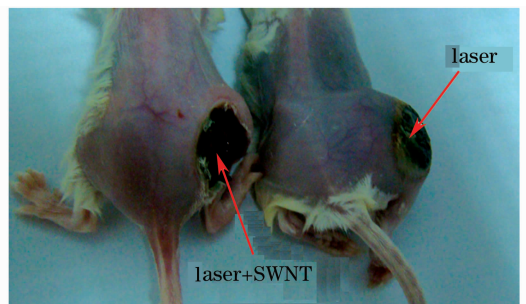


图 4 激光治疗和激光+单壁碳纳米管治疗后 30 天小鼠肿瘤图片

Fig. 4 Image of mice tumors at 30 days after laser and laser+SWNT treatment

层肿瘤组织,所以易复发。由图 1 可知,CoMoCAT 单壁碳纳米管在 980 nm 处存在较强的特异性吸收,注射在肿瘤内部的碳纳米管在激光照射时,能迅速地将光能转化为热能,增加肿瘤部位的治疗温度,增强热损伤效果。另一方面,存在深部位肿瘤组织内的单壁碳纳米管吸收光能转化为热能,使得肿瘤深部位组织也能得到有效治疗,从而使得整个瘤体逐渐消除、脱落。所以激光+单壁碳纳米管治疗组相对于激光治疗组,能更加有效地损伤肿瘤及深层肿瘤组织、抑制肿瘤生长。碳纳米管的应用显著地增强了激光热疗的效果。

## 5 结 论

Chen 等<sup>[3,4]</sup>采用吡啶氰绿(ICG)作为光吸收染料,以波长 808 nm 激光作为光源,也显示出一定的光热增强效果。N. W. S. Kam 等<sup>[6]</sup>报道 Hipco 法制备的单壁碳纳米管在 808 nm 激光照射下能将光能转化为热能,并且有效地杀伤细胞。但吡啶氰绿的光稳定性不强,Hipco 法制备的单壁碳纳米管结构不均一,无特征吸收峰<sup>[10]</sup>。本文选择 CoMoCAT 法制备的单壁碳纳米管,光稳定性好,结构均一,在 980 nm 处存在特征性吸收峰,且光波波长较长,增加了作用的深度。因此选用 CoMoCAT 碳纳米管为光吸收材料,以波长 980 nm 激光作为光源,治疗小鼠乳腺癌模型,观察各治疗组的治疗效果。结果显示,激光+单壁碳纳米管治疗组具有显著的抗肿瘤效果,可以明显抑制肿瘤生长。单壁碳纳米管作为一种新颖的光吸收纳米材料,具有光稳定性强、近红外特征吸收等显著优点,可以有效地应用于肿瘤光热治疗方面。

## 参 考 文 献

- 1 C. P. Nolsoe, S. Torp-Pedersen, F. Burcharth *et al.*. Interstitial hyperthermia of colorectal liver metastases with a US-guided Nd:YAG laser with a diffuser tip: a pilot clinical study [J]. *Radiology (Easton, Pa.)* 1993, **187**: 333~337
- 2 Zhu Guangming, Zhu Dan, Luo Qingming *et al.*. Study on the opticalthermal response and dynamic thermal damage of biotissue during laser thermotherapy [J]. *Chinese J. Biomedical Engineering*, 2004, **23**(2): 157~162

- 朱光明,朱 丹,骆清铭等. 激光热疗中生物组织的光热特性响应以及动态热损伤研究[J]. *中国生物医学工程学报*, 2004, **23**(2): 157~162
- 3 W. R. Chen, R. L. Adams, K. E. Bartels *et al.*. Photothermal effects on murine mammary tumors using indocyanine green and an 808-nm diode laser: an in vivo efficacy study [J]. *Cancer Lett.*, 1995, **94**: 125~131
- 4 W. R. Chen, R. L. Adams, A. K. Higgins *et al.*. Photothermal effects on murine mammary tumors using indocyanine green and an 808-nm diode laser: an in vivo efficacy study [J]. *Cancer Lett.*, 1996, **98**: 169~173
- 5 Cong Zheng. Carbon nanotube [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 1999, **36**(8): 6~11  
从 征. 碳纳米管[J]. *激光与光电子学进展*, 1999, **36**(8): 6~11
- 6 N. W. S. Kam, M. J. O'Connell, J. A. Wisdom *et al.*. Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, **102**: 11600~11605
- 7 陈 昆,李文新. 激光纳米治疗癌症研究发现新途径[J]. *中国激光*, 2005, **32**:1698
- 8 K. Köönig. Multiphoton microscopy in life sciences [J]. *J. Microsc. (Oxford)*, 2000, **200**: 83~104
- 9 R. Weissleder. A clearer vision for in vivo imaging [J]. *Nat. Biotechnol.*, 2001, **19**: 316~317
- 10 B. Kitiyanan, W. E. Alvarez, J. H. Harwell *et al.*. Controlled production of single-wall carbon nanotubes by catalytic decomposition of CO on bimetallic Co-Mo catalysts [J]. *Chem. Phys. Lett.*, 2000, **317**: 497~503
- 11 S. M. Bachilo, L. Balzano, J. E. Herrera *et al.*. Narrow (*n,m*)-distribution of single-walled carbon nanotubes grown using a solid supported catalyst [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**: 11186~11187
- 12 D. Pantarotto, J. P. Briand, M. Prato *et al.*. Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes [J]. *Chem. Commun.*, 2004, **1**: 16~17
- 13 N. W. S. Kam, T. C. Jessop, P. A. Wender *et al.*. Nanotube molecular transporters: internalization of carbon nanotube-protein conjugates into mammalian cells [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**: 8650~8651
- 14 R. J. Chen, S. Bangsaruntip, K. A. Drouvalakis *et al.*. Noncovalent functionalization of carbon nanotubes for highly specific electronic biosensors [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, **100**: 4984~4989
- 15 J. J. Gooding, R. Wibowo, J. Liu *et al.*. Protein electrochemistry using aligned carbon nanotube arrays [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**: 9006~9007
- 16 Cui Daxiang. Advance and prospects of nanoscale diagnosis and therapy technology for tumors [J]. *Chinese J. Cancer Biother*, 2008, **15** (5): 401~405  
崔大祥. 肿瘤纳米诊断和治疗技术的研究现状与发展前景 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, **15** (5): 401~405
- 17 诸 颖,李文新. 碳纳米管的细胞毒性 [J]. *中国科学 B*, 2008, **38**(8): 677~684
- 18 Z. Liu, C. Davis, W. Cai *et al.*. Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, **105**: 1410~1415