

文章编号: 0258-7025(2010)11-2735-08

# 两种近红外荧光探针的合成及肿瘤靶向研究

邓大伟 刘 飞 曹 洁 陈新洋 顾月清\*

(中国药科大学生命科学与技术学院, 江苏 南京 210009)

**摘要** 合成了两种近红外有机荧光探针,即叶酸-PEG-ICG-Der-01 和 LDL-ICG-Der-02,它们分别以肿瘤表面高度表达的叶酸受体以及低密度脂蛋白(LDL)受体为靶点。探针复合物中的叶酸和低密度脂蛋白部分为探针分子提供靶向“导向”,通过化学共价键分别与有机近红外染料 ICG-Der-01 和 ICG-Der-02 偶联,近红外染料则为探针分子的荧光信号输出端。利用紫外分光光度计、近红外荧光光谱仪及近红外荧光成像系统分析这两种荧光探针的光学性质,以及它们在叶酸受体及 LDL 受体过度表达的肿瘤鼠体内的成像过程。结果显示,所合成的叶酸-PEG-ICG-Der-01 和 LDL-ICG-Der-02 探针的荧光强度及光稳定性都高于对应的染料单体。而体内成像结果则表明两种探针都保持了叶酸和 LDL 的生物活性,能有效地靶向到相关肿瘤部位,成像清晰,并且能最终代谢排出体外。比较这两种探针,叶酸-PEG-ICG-Der-01 对肿瘤细胞的靶向性要优于 LDL-ICG-Der-02,并能用于肿瘤早期诊断。

**关键词** 医用光学;近红外荧光成像;光学分子探针;肿瘤靶向;叶酸;低密度脂蛋白

中图分类号 R318; R979.1

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL20103711.2735

## Synthesis and Tumor Targeting Research of Two Near-Infrared Fluorescence Probes

Deng Dawei Liu Fei Cao Jie Chen Xinyang Gu Yueqing\*

(School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University,

Nanjing, Jiangsu 210009, China)

**Abstract** Two near infrared fluorescence probes (i. e., folate-PEG-ICG-Der-01 and LDL-ICG-Der-02) are synthesized. Here, over-expressed folate receptors and low density lipoprotein (LDL) receptors in some specific tumors are chosen as target. The residues of folic acid and LDL, as the targeted ligand, are covalently conjugated to organic near-infrared fluorescence dye ICG-Der-01 and ICG-Der-02 respectively, where near-infrared dyes are the output of fluorescence signal. The optical properties of the two probes are characterized by ultraviolet spectrophotometer and near-infrared fluorescence spectroscopy system. The imaging process of folate-PEG-ICG-Der-01 and LDL-ICG-Der-02 probes in tumors which over expressed folate receptors and LDL receptors is further detected by near-infrared fluorescence imaging system. The results show that as-prepared folate-PEG-ICG-Der-01 and LDL-ICG-Der-02 probes present higher fluorescence intensity and better photo stability than those corresponding near-infrared fluorescence dyes. And the results of in vivo near-infrared fluorescence imaging confirm that these two probes are highly bioactive, can efficiently target tumor sites, and finally be eliminated. Compared with LDL-ICG-Der-02, the targeting capability of folate-PEG-ICG-Der-01 probe is more effective, and has great potential in non-invasive real time early tumor diagnosis.

**Key words** medical optics; near-infrared fluorescence imaging; optical molecular probe; tumor targeting; folic acid; low density lipoprotein

收稿日期: 2010-06-17; 收到修改稿日期: 2010-07-27

基金项目: 国家自然科学基金(30800257, 30700779 和 30970776)资助课题。

作者简介: 邓大伟(1979—),男,博士,讲师,主要从事纳米材料合成和近红外医学成像等方面的研究。

E-mail: david597300@163.com

\* 通信联系人。E-mail: cpuyueqing@163.com

# 1 引 言

随着成像相关技术的迅猛发展,医学影像学已成为生命科学和医学应用交叉的关键技术科学。当前,医学影像技术呈现多极化发展的趋势,主要包括:计算机 X 射线断层摄影术(X-CT),正电子发射断层摄影术(PET),单光子发射计算机断层摄影术(SPECT),磁共振成像(MRI),超声成像术(US)等<sup>[1~4]</sup>。尽管这些技术有着许多优点,但是也有很多不可忽视的不足,如空间时间分辨率不高、设备比较昂贵、操作复杂等。因此,如何进行无创伤的诊断并让它在一定程度上替代常规解剖成像仍旧是研究热点之一<sup>[5,6]</sup>。激光分子影像技术可在细胞和分子层面探索生命最小基本单元的功能,研究疾病发生发展的分子机理,亦可为疾病的早期诊断及治疗提供有效的无创、在位和实时的检测和监控<sup>[7,8]</sup>,如近年来发展起来的近红外荧光成像技术。目前,该技术已广泛应用于细胞凋亡成像、肿瘤受体成像、心血管疾病成像、近红外荧光免疫分析,微量生物活性物质检测等生物医学工程领域<sup>[9~11]</sup>,以其安全、无损、实时、在位监测等优势受到了诸多科研工作者的青睐。近红外光系指位于近红外光区(700~900 nm)的电磁波,由于在此区间内生物活体组织中的血红蛋白、水及脂质等对光波吸收很少,近红外光在生物组织中穿透深度大,可以在深层组织产生光信号,而对组织本身几乎无影响。

目前,近红外荧光成像发展的方向主要包括新的生物相容性好的近红外荧光染料的制备,以及新的特异性靶向探针的合成,并将其应用于各种不同疾病的实验性研究中<sup>[12~14]</sup>。在各种研究中,近红外荧光探针已被大量地开发出来,种类繁多,主要包括有机荧光染料、无机和生物纳米粒子等<sup>[15,16]</sup>。由于大多数荧光染料体内半衰期较短,对肿瘤组织没有特异性的选择。因此,将这些染料与一些大分子结合,以增加其生物相容性,延长半衰期,并可能使其具有靶向性。

大部分恶性肿瘤,如卵巢癌、肾癌、子宫癌、睾丸癌、脑瘤、结肠癌、肺癌等表面含有某些过量表达的受体,如叶酸受体(FR)和低密度脂蛋白受体(LDLR)等。叶酸(FA)作为叶酸受体的配体,可被吸收入细胞内,对叶酸受体的亲和性达到了离解常数  $K_d$  约为  $10^{-10}$  mol/L<sup>[17]</sup>。低密度脂蛋白(LDL)则是 LDLR 特异性配体,可转运大量胆固醇以供细胞膜合成<sup>[18,19]</sup>,具有良好的生物相容性,可彻底生物降解,无免疫原性,并具有不易被体内网状内皮系

统(RES)识别而快速清除等优点,常被设计用作药物的载体。为此,本文用化学共价偶联法设计合成了两种近红外有机复合物荧光探针<sup>[20,21]</sup>,即叶酸-PEG-ICG-Der-01 和 LDL-ICG-Der-02,并用于肿瘤的体内靶向成像,这两种探针分别以肿瘤表面高度表达的叶酸受体以及 LDLR 作为靶点。

# 2 实 验

## 2.1 试剂及仪器

叶酸(美国 Alfa-Aesar 公司),低密度脂蛋白(实验室制备),N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC,上海阿拉丁试剂公司),N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,上海阿拉丁试剂公司),1-乙基-(3-二甲基氨基丙基),碳二亚胺盐酸盐(EDC,上海阿拉丁试剂公司),双氨基聚乙二醇(PEG-bis-amine,分子量 4000,实验室制备),有机近红外染料(ICG-Der-01 和 ICG-Der-02,实验室制备)。其他试剂均为国产分析纯。

葡聚糖凝胶 G-25 和葡聚糖凝胶 LH-20(美国 Sigma-Aldrich 公司);再生纤维素透析袋(MWCO 3500,美国 SPECTRUM 公司);纤维素透析袋[MWCO=10000,生工生物工程(上海)有限公司];JH 754PC 紫外可见分光光度计(上海菁华科技公司);DYY-8C 型电泳仪(北京市六一仪器厂);Malvern Zetasizer 3000 HS 激光粒度仪(英国马尔文仪器有限公司);PHS-25 型数显 pH 计(上海雷磁仪器厂)。

## 2.2 近红外荧光光谱分析系统和成像系统

### 2.2.1 近红外荧光光谱分析系统

近红外荧光光谱分析系统主要由激光光源,传输光纤,S2000 型光纤光谱仪,A/D 数字模拟转换器和计算机软件系统组成,装置如图 1(a)所示。其光源为单色性好的 NL-FC-2.0-763 型半导体激光器( $\lambda=765.9$  nm),近红外荧光染料受到激光激发产生荧光,荧光信号通过光纤传输后被 S2000 光纤光谱仪收集测试,经 A/D 数字模拟转换器将光学信号转换为数字模拟信号后显示在计算机上。在进行样品的荧光数据测定时,激发光纤与信号接收光纤成垂直  $90^\circ$  以减少散射光的干扰,且光纤通过自制支架固定后,可上下左右随意调节以便达到最佳荧光检测位置。

### 2.2.2 近红外成像系统

近红外成像系统主要由激光光源,CCD 照相机,长波通滤光片( $\geq 800$  nm)及计算机软件系统组成,装置如图 1(b)所示。其光源为发射波长  $\lambda =$

765.9 nm 的 NL-FC-2.0-763 型半导体激光器,可激发小型动物体内近红外荧光探针产生荧光,荧光信号穿透活体组织后由高度灵敏的 CCD 照相机捕获。在 CCD 照相机的正下方有一个 800 nm 长波通型滤光片,该滤光片可截留小于 800 nm 的光信号,故可

将激发光及其他非荧光信号截留,因而 CCD 相机所捕获的信号即为荧光探针所产生的荧光信号,其信号经软件处理,即可成为直观可视的荧光图像显示于计算机上。为了降低背景光线干扰,整个实验过程均需在暗室中完成。

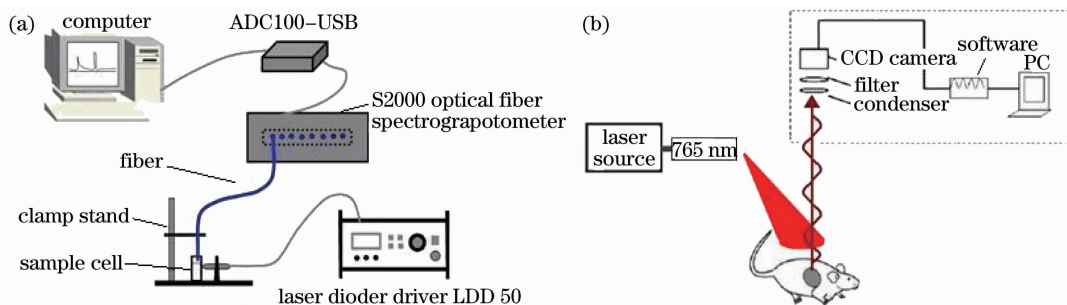


图 1 (a)近红外荧光光谱测量的装置示意图,(b)近红外成像系统的装置示意图

Fig. 1 (a) Diagram of a near-infrared fluorescence spectroscopy system, (b) diagram of a near-infrared imaging system

### 2.3 有机近红外染料 ICG-Der-01 和 ICG-Der-02

自美国食品药品监督管理局(FDA)批准有机近红外染料吡啶青绿(ICG)用于人体成像实验后,ICG 类有机近红外荧光染料得到了极大的关注。世界上一些研究小组对 ICG 进行修饰,制备了 ICG 衍生物。华盛顿大学 Y. Ye 等<sup>[22]</sup>合成了一种名叫 Cypate 的有机染料。在参照 Cypate 合成的基础上,本组成功合成了两种新的有机近红外染料 ICG-

Der-01 和 ICG-Der-02, 它们的结构如图 2 所示。ICG-Der-01[图 2(a)]是一种脂溶性染料,不易溶于水,易溶于甲醇、乙醇、乙腈、二甲基亚砜(DMSO)和二甲基甲酰胺(DMF)等极性溶剂,在 pH7.2 的磷酸盐缓冲液(PBS)中吸收和发射波长分别为 783 nm 和 805 nm;ICG-Der-02[图 2(b)]是一种水溶性染料,在 pH7.2 的 PBS 中的吸收和发射波长分别为 780 nm 和 800 nm。

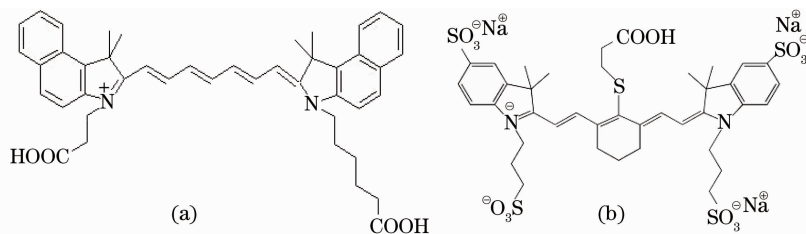


图 2 近红外荧光染料结构图。(a) ICG-Der-01,(b) ICG-Der-02

Fig. 2 Structure of near-infrared fluorescence dyes. (a) ICG-Der-01, (b) ICG-Der-02

### 2.4 叶酸-PEG-ICG-Der-01 探针的制备

称取 22 mg 叶酸溶于 2.5 mL 无水 DMSO 中,加入 1.5 倍量的 DCC 和 NHS,室温避光搅拌反应过夜。反应结束,将上述溶液滴加入含有 1.2 倍量的双氨基聚乙二醇和 0.1 mL 三乙胺的 5 mL 无水 DMSO 中,室温避光搅拌过夜。反应液用 pH7.2 的 PBS 溶液透析 3 d 并浓缩,去除未反应的叶酸和 DMSO,然后通过葡聚糖凝胶 G-25 柱分离出叶酸-PEG 的结合产物。

另取 1 mg 近红外有机染料 ICG-Der-01 溶于 1 mL 无水 DMSO 中,加入 DCC 和 NHS,其摩尔比为 1:1.5:1.5,避光反应 4 h。将反应液滴加到含有叶酸-PEG 的 pH 9.0 碳酸盐缓冲液中,避光反应过

夜。反应结束后,反应液于去离子水中透析 3 d 并浓缩干燥。通过葡聚糖 LH-20 柱,氯仿和甲醇的体积比为 1:1 洗脱,分离获得叶酸-PEG 偶联有机近红外染料 ICG-Der-01 的探针。

### 2.5 LDL-ICG-Der-02 探针的制备

按摩尔比 1:1.5:1.5 分别称取近红外荧光染料 ICG-Der-02,催化剂 EDC,NHS,溶于无水 DMSO,涡旋混匀后室温避光搅拌反应 4 h,得到 ICG-Der-02 的活化液。将上述制备的活化液离心后吸取上清液,边振摇边缓慢滴加到一定量的 LDL 提取液中,混匀后,4 ℃避光反应 12 h,得到 LDL-ICG-Der-02 探针的粗品。离心,吸取上清液,于 PBS 中充分透析 3 d,所得样品溶液以 0.22 μm 微孔滤膜过滤

密闭避光 4 °C 保存备用。

## 2.6 肿瘤和动物实验

### 2.6.1 肿瘤移植瘤动物模型的建立

将免疫缺陷裸鼠 (nu/nu CD-1 male and female) 于无特定病原体 (SPF) 级动物房饲养 1 周。于体积分数为 5% 的 CO<sub>2</sub>, 37 °C 培养箱, 用体积分数为 10% 的小牛血清的 RPMI 1640 培养液大量培养 Bel-7402, HepG<sub>2</sub> 和 HeLa 细胞。取大约 2 × 10<sup>6</sup> Bel-7402, HepG<sub>2</sub> 和 HeLa 细胞分别接种于裸鼠体内, 当瘤块直径长到 6 mm 时, 用于成像实验。

### 2.6.2 叶酸-PEG-ICG-Der-01 探针对正常裸鼠以及荷肿瘤裸鼠模型的在位监测

将叶酸-PEG-ICG-Der-01 探针溶于浓度为 10 nmol/mL 的生理盐水, 分别取 0.2 mL 溶液注射入正常雄性裸鼠 ( $n=4$ ), 荷肝癌 Bel-7402 的裸鼠以及接种了 HepG<sub>2</sub> 和 HeLa 的肿瘤裸鼠体内 ( $n=4$ ), 将这些裸鼠固定后置于近红外成像系统下进行成像监测。

### 2.6.3 LDL-ICG-Der-02 探针对正常小鼠以及荷肿瘤裸鼠模型的在位监测

分别取 0.2 mL LDL-ICG-Der-02 探针溶液经尾静脉注入昆明小鼠体内 ( $n=4$ ), 荷 Bel-7402 移植瘤裸鼠以及 HepG<sub>2</sub>/HeLa 移植瘤裸鼠体内 ( $n=4$ ), 并将之置于近红外荧光成像系统下, 按不同时间点实时在位监测 LDL-ICG-Der-02 在荷瘤鼠体内的动态过程。

## 3 结果与讨论

### 3.1 叶酸, LDL 近红外荧光探针的合成

#### 3.1.1 叶酸-PEG-ICG-Der-01 的制备

叶酸-PEG-ICG-Der-01 探针的结构如图 3 所示, 合成主要分为两步, 分别为叶酸-PEG 的合成和叶酸-PEG-ICG-Der-01 的合成, 针对各种原料的官能团, 这两步合成方法最大的共同点是采用的羧基和氨基成酰胺反应。在制备叶酸-PEG 复合物时, 先用 NHS/DCC 将叶酸的  $\gamma$ -羧基活化, 然后再以酰胺键与 PEG 的氨基结合。由于叶酸含有  $\alpha$  和  $\gamma$  两个羧基, 它们都可能被催化剂活化。但是,  $\alpha$ -羧基是受体识别的位点之一, 故  $\alpha$ -羧基不能受到影响, 而只能利用  $\gamma$ -羧基活化后与氨基反应。为此, 控制催化剂的比例, 既能最大化地提高叶酸的  $\gamma$ -羧基活化效率, 又要降低  $\alpha$ -羧基的活化。在反应过程中, 使用叶酸:DCC:NHS 的摩尔比为 1:1.5:1.5 较为理想, 产生的  $\alpha$ -羧基产物较少。由于有机荧光染料具备的可利用的官能团为羧基, 不能直接与叶酸相连, 因此在合成中, 选用双氨基 PEG 作为桥梁。这是因为 PEG 水溶性好, 生物相容性好, 可延长探针在体内的循环时间, 进而增强叶酸复合物探针对肿瘤细胞的靶向性。

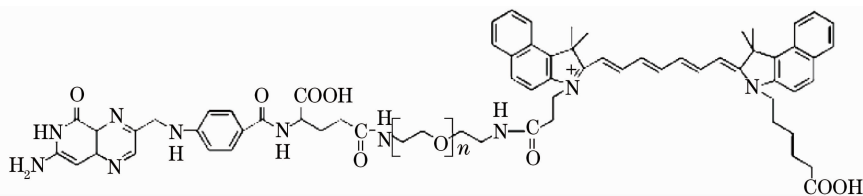


图 3 叶酸-PEG-ICG-Der-01 近红外荧光探针的结构图

Fig. 3 Structure of folate-PEG-ICG-Der-01 probe

#### 3.1.2 LDL-ICG-Der-02 的制备

近红外荧光染料 ICG-Der-02 为一种水溶性七甲川花菁染料, 其结构中有一羧基官能团, 很适合用作生物荧光标记。通过经典的 EDC/NHS 催化体系可以有效地将其活化, 与 LDL 分子中 apoB-100 上 Lys 残基共价偶联, 从而制备成具有 LDLR 特异性的水溶性近红外荧光探针 LDL-ICG-Der-02, 图 4 为该探针的结构示意图。这种共价标记的方式可能会影响 LDL 与 LDLR 的识别, 因此在实验过程中, 严格控制了 ICG-Der-02 染料的用量, 使 LDL 的 Lys 修饰率很低 (远小于 20%)。但由于荧光检测具有低检测限和高灵敏度等优点, 所以共价标记有少量有机荧光染料的探针仍能适用于体内诊断研究。

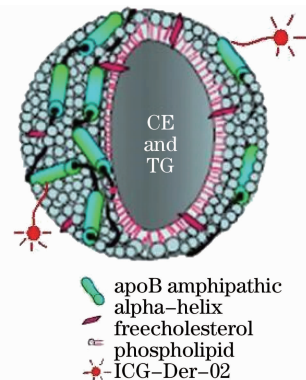


图 4 LDL-ICG-Der-02 近红外荧光探针的结构示意图

Fig. 4 Schematic diagram of LDL-ICG-Der-02 probe

### 3.2 叶酸, LDL 近红外荧光探针的光谱分析

#### 3.2.1 叶酸-PEG-ICG-Der-01 探针的光谱测定

分别取一定量的有机近红外染料 ICG-Der-01 和分离纯化后的叶酸-PEG-ICG-Der-01 探针(含有相同摩尔量的 ICG-Der-01)溶于 pH7.2 的 PBS 中,紫外和荧光光谱如图 5 所示。由图 5(a)可见,ICG-Der-01 的紫外吸收峰在 783 nm,而叶酸-PEG-ICG-Der-01 探针在 280, 363 和 783 nm 均有吸收,说明叶酸, PEG 与 ICG-Der-01 共价结合为叶酸-PEG-ICG-Der-01 复合物。图 5(b)为 ICG-Der-01 和叶酸-PEG-ICG-Der-01 的荧光光谱,激发光的波长为 765.9 nm, ICG-Der-01 的荧光峰为 805 nm, 叶酸-PEG-ICG-Der-01 探针的荧光峰为 819 nm, 与染料单体相比荧光峰位红移了 14 nm 左右。并且在相同的浓度下,叶酸-PEG-ICG-Der-01 探针的荧光强度要高于 ICG-Der-01。这一结果说明,染料 ICG-

Der-01 与水溶性的叶酸-PEG 结合后,使其在 pH7.2 的 PBS 中荧光强度大大提高,良好的荧光性质更有利于探针的体内运用。

另取 ICG-Der-01 和叶酸-PEG-ICG-Der-01 探针 PBS,用发射波长  $\lambda=765.9$  nm 的激光连续照射溶液 60 min(光源工作功率为 30 mW),并在不同照射时间测试荧光光谱,考察它们在激光连续照射下的光稳定性。结果如图 5(c)所示,在一定强度的激光连续照射下,相同摩尔量的叶酸-PEG-ICG-Der-01 探针和有机染料 ICG-Der-01 的荧光都有一定程度的降低,这也反应了有机荧光染料的光漂白现象。ICG-Der-01 的荧光基本上表现为连续的降低,而叶酸-PEG-ICG-Der-01 探针的荧光变化情况相对稳定,说明 ICG-Der-01 结合到叶酸-PEG 后,光稳定性也有一定程度的提高。

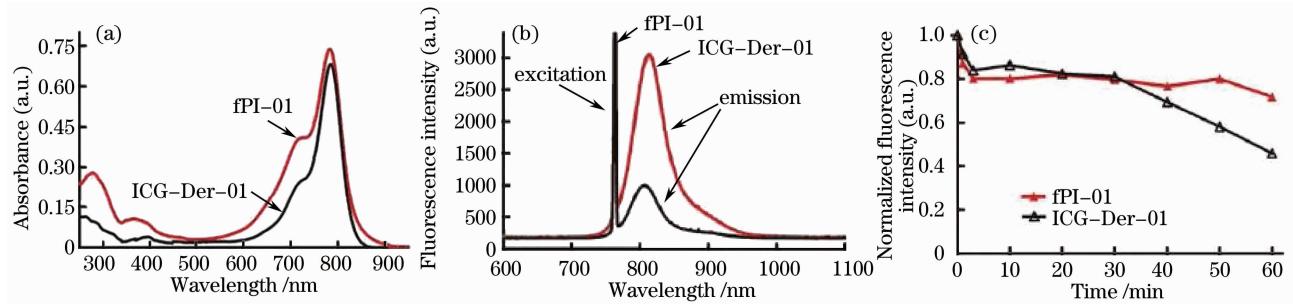


图 5 叶酸-PEG-ICG-Der-01(fPI-01)探针和 ICG-Der-01 的光谱特性。(a)紫外吸收光谱,(b)荧光光谱,(c)光稳定性比较  
Fig. 5 Fluorescence properties of folate-PEG-ICG-Der-01 (fPI-01) probe and ICG-Der-01. (a) absorbance spectrum, (b) fluorescence spectrum, (c) comparison of photo stability

#### 3.2.2 LDL-ICG-Der-02 探针的光谱测定

由图 6(a)可知,ICG-Der-02 单体的紫外吸收峰为 780 nm,LDL-ICG-Der-02 探针吸收峰为 280 nm 和 795 nm,分别代表了探针中 LDL 脂蛋白和近红外荧光染料 ICG-Der-02 的紫外吸收,说明 LDL 和 ICG-Der-02 共价结合为 LDL-ICG-Der-02 复合物。

但 LDL-ICG-Der-02 探针较 ICG-Der-02 单体相比,紫外吸收峰发生了 15 nm 的红移。由图 6(b)可知,ICG-Der-02 单体的最大荧光峰位于 800 nm,而 LDL-ICG-Der-02 探针的最大荧光峰位于 812 nm,其峰位较单体染料亦发生轻微红移,这可能与花菁染料在该溶液体系下发生 J-带聚集有关<sup>[23]</sup>。在

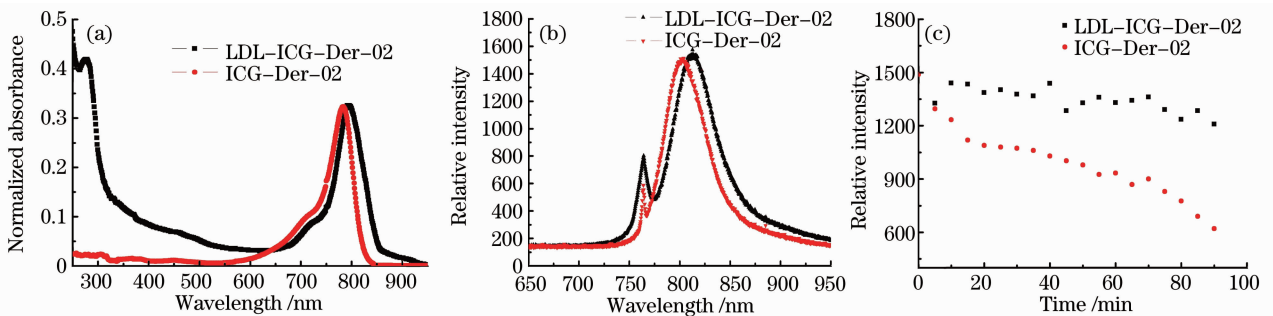


图 6 LDL-ICG-Der-02 探针和 ICG-Der-02 的光谱特性。(a)紫外吸收光谱,(b)荧光光谱,(c)光稳定性比较  
Fig. 6 Fluorescence properties of LDL-ICG-Der-02 probe and ICG-Der-02. (a) absorbance spectrum, (b) fluorescence spectrum, (c) comparison of photo stability



LDL-ICG-Der-02 探针及 ICG-Der-02 单体染料的光稳定性考察实验[图 6(c)], 激发光源发射波长为 765.9 nm, 功率为 30 mW]发现, LDL-ICG-Der-02 探针的荧光稳定性同样要优于 ICG-Der-02 单体染料, 这说明 LDL 对 ICG-Der-02 单体染料有一定的增稳作用。

### 3.3 叶酸, LDL 近红外荧光探针对于肿瘤的靶向成像

#### 3.3.1 叶酸-PEG-ICG-Der-01 探针在正常裸鼠体内的代谢情况及对荷瘤鼠的成像诊断

为了考察叶酸-PEG-ICG-Der-01 探针对于荷瘤鼠的成像诊断, 首先考察其在正常裸鼠体内代谢成像情况, 结果如图 7(a)所示(在近红外成像实验中, 激发光源的发射波长为 765.9 nm, 功率为 35 mW, CCD 相机曝光时间均为 1 s)。将探针静脉注射进入裸鼠体内后, 荧光信号首先在肝脏部位浓聚, 随后膀胱开始出现荧光信号, 裸鼠的尿液中也观察到荧光信号。在监测中, 发现叶酸-PEG-ICG-Der-01 探针在体内存在的时间较长, 尤其是能长时间在肝脏中观测到荧光信号。但裸鼠能够正常生活, 并未发现严重副作用及相应的死亡现象, 也说明叶酸-PEG-ICG-Der-01 探针对于裸鼠并无明显毒性。

由图 7(b)可知, 将叶酸-PEG-ICG-Der-01 探针通过尾静脉注射进入荷肝癌 Bel-7402 裸鼠后, 荧光信号在裸鼠全身短暂分布后浓聚到肝脏。随着时间

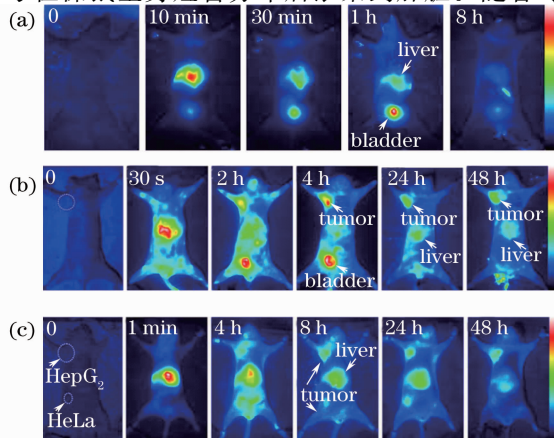


图 7 叶酸-PEG-ICG-Der-01 探针在正常裸鼠体内代谢情况(a), 在荷 Bel-7402 裸鼠(b)以及荷 HepG<sub>2</sub> 和 HeLa 肿瘤裸鼠(c)的成像诊断

Fig. 7 Intracorporal process of folate-PEG-ICG-Der-01 probe in normal nude mouse (a), NIR fluorescence images of nude mouse bearing Bel-7402 (b), HepG<sub>2</sub> and HeLa (c) tumor after administration of folate-PEG-ICG-Der-01 probe

的增长,膀胱开始出现荧光信号,说明一部分探针开始通过尿液排泄。在静脉注射探针后 2 h,肿瘤部位开始观察到明显的荧光信号。从 2 h 开始到监测的 48 h 内,都能清晰地观察到肿瘤部位的荧光信号,并且组织对比度逐渐增强。

另外,将人肝癌 HepG<sub>2</sub> 细胞接种于裸鼠的右侧前肢腋部皮下,人宫颈癌 HeLa 细胞同时接种于裸鼠右侧下腹部,构建复合荷瘤鼠模型。由图 7(c)可知,将叶酸-PEG-ICG-Der-01 探针注射进复合荷瘤鼠裸鼠后,4 h 时可以很清晰地观察到肿瘤组织,定位准确,成像清晰,一直到 48 h 时仍然能够在肿瘤部位观察到明显的荧光信号。这说明合成的叶酸-PEG-ICG-Der-01 探针对于肿瘤的亲和力良好,并且能较长时间存在于肿瘤组织中。这些成像实验都显示,叶酸-PEG-ICG-Der-01 可作为荧光探针对于肿瘤组织进行成像,并且成像清晰,定位准确,分辨率较高。同时,这一研究结果也为肿瘤治疗药物的设计提供了一种新思路,即叶酸靶向前药,它们在肿瘤组织中较长时间的累积和存在,应该能对肿瘤细胞长时间的杀伤和抑制。

#### 3.3.2 LDL-ICG-Der-02 探针在正常小鼠体内的代谢情况及对荷瘤鼠的成像诊断

除了合成叶酸-PEG-ICG-Der-01 探针,还合成了 LDL-ICG-Der-02 探针。因此,在本研究中,进一步考察了 LDL-ICG-Der-02 探针在正常小鼠体内的代谢情况以及对荷瘤鼠体内肿瘤的靶向成像,结果示于图 8(近红外成像实验的具体参数同图 7)。如图 8(a)所示,LDL-ICG-Der-02 探针经静脉注入至小鼠体内,开始慢慢浓集于肝部位,并逐渐在膀胱部位有明显荧光信号(5 min~12 h)。至 36 h 时,仅肝脏部位剩余有微弱的信号。这说明 LDL-ICG-Der-02 探针在体内不停地循环代谢,并主要通过膀胱代谢排出体外。

图 8(b)为 LDL-ICG-Der-02 探针在荷 Bel-7402 移植瘤裸鼠体内动态过程的实时在位监测图。LDL-ICG-Der-02 探针经静脉注入到裸鼠体内后,5 min 时在肿瘤下侧的小瘤块及肝脏部位有较明显的荧光信号,并且信号同样可以持续较长时间(5 min~12 h)。36 h 后,LDL-ICG-Der-02 探针能基本从体内清除。在整个动物实验过程中,荧光信号主要集中在肿瘤的小瘤块部分,而在大瘤块部分并没有看到明显荧光信号,预示着 LDL-ICG-Der-02 探针可能会对新生肿瘤有更好的诊断效果。

图 8(c)为 LDL-ICG-Der-02 探针在荷 HepG<sub>2</sub>/

HeLa 移植瘤裸鼠体内的动态过程实时在位监测图。LDL-ICG-Der-02 探针经静脉注入到裸鼠体内, 5 min 时 LDL-ICG-Der-02 探针明显全身分布, 且在两个肿瘤部位有部分微弱信号, 随着时间的推移, 荧光信号主要集中在两个肿瘤部位, 肝脏及膀胱部位, 并且在两个肿瘤部位强的荧光信号一直可持续数小时 (5 min ~ 12 h)。随着时间的进一步推移, LDL-ICG-Der-02 探针在裸鼠体内将不断被清除, 36 h 时全身几乎无明显荧光信号, 同样说明 LDL-ICG-Der-02 探针可以完全代谢出体外。这些实验结果显示 LDL-ICG-Der-02 探针可以靶向到过表达 LDL 受体的肿瘤。

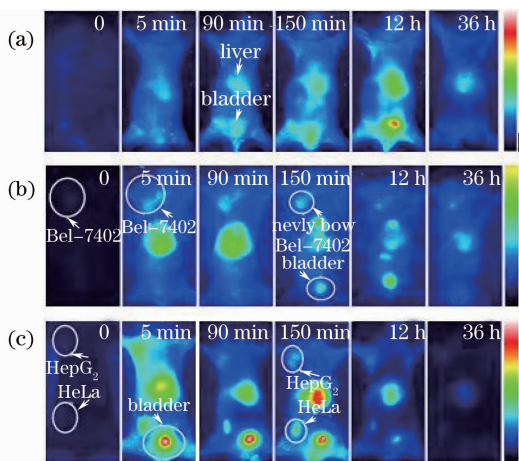


图 8 LDL-ICG-Der-02 探针在正常小鼠体内代谢情况 (a), 在荷 Bel-7402 裸鼠 (b) 以及荷 HepG<sub>2</sub> 和 HeLa 肿瘤裸鼠 (c) 的成像诊断

Fig. 8 Intracorporal process of LDL-ICG-Der-02 probe in normal nude mouse (a), NIR fluorescence images of nude mouse bearing Bel-7402 (b), HepG<sub>2</sub> and HeLa (c) tumor after administration of LDL-ICG-Der-02 probe

基于上述实验结果, 成功制备了两种光学性能优越且具有肿瘤靶向显像功能的近红外有机荧光探针, 即叶酸-PEG-ICG-Der-01 和 LDL-ICG-Der-02 探针复合物。叶酸和 LDL 是生物体的内源物质, 它们分别以肿瘤表面高度表达的叶酸受体以及 LDL 受体为靶点, 所以本研究中制备得到的这两种近红外荧光探针都有较好的生物相容性。比较这两种近红外荧光探针, 叶酸-PEG-ICG-Der-01 探针复合物对肿瘤组织的靶向显像能力要优于 LDL-ICG-Der-02 探针, 并能对早期肿瘤进行显像诊断。但与小分子叶酸相比, LDL 是纳米粒子, 尺寸大, 并有疏水性的内核。因此, LDL 不仅可以作为靶向配体, 而且还可同时作为药物载体进行使用。

## 4 结 论

成功制备了叶酸-PEG-ICG-Der-01 与 LDL-ICG-Der-02 两种近红外荧光靶向探针。光谱分析结果表明两种探针在 PBS 溶液中的荧光强度要高于近红外染料 ICG-Der-01 和 ICG-Der-02, 且光稳定性也得到显著提高, 这更加有利于探针的体内运用。对于叶酸以及 LDLR 过量表达的相关恶性肿瘤, 诸如 HeLa, HepG<sub>2</sub>, Bel-7402 移植瘤裸鼠等的体内实验结果表明, 叶酸-PEG-ICG-Der-01 与 LDL-ICG-Der-02 荧光探针都能有效地靶向到相关肿瘤部位, 定位准确, 成像清晰, 且最终能代谢出体外。这说明叶酸-PEG-ICG-Der-01 与 LDL-ICG-Der-02 是两种潜在的可用于肿瘤实时在位无损监测的靶向性近红外荧光探针, 且对于肿瘤的早期诊断也具有十分重要的意义。

## 参 考 文 献

- 1 E. L. Kaijzel, C. W. Löwik. Whole-body optical imaging in animal models to assess cancer development and progression[J]. *Clin. Cancer. Res.*, 2007, **13**(12): 3490~3497
- 2 Zhang Guangshui, Chen Changqing, Qi Jian *et al.*. Raman spectroscopic study on EC9706 cells irradiated by X-ray with different dose[J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(2): 509~512  
张广水, 陈长青, 齐健等. EC9706 细胞经不同剂量 X 射线辐照后的拉曼光谱[J]. *中国激光*, 2009, **36**(2): 509~512
- 3 Chen Zhemin, Chen Jun, Yamashita Yutaka *et al.*. Experimental research on fiber Bragg grating based monitor for laser thrombolysis in vitro[J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(4): 1020~1024  
陈哲敏, 陈军, 山下丰等. 激光融血栓的光纤光栅监控实验研究[J]. *中国激光*, 2009, **36**(4): 1020~1024
- 4 Xu He, Gao Meihua. He-Ne laser irradiation to the thymus area enhances CD59 expression and activation of cell signaling in T cells of tumor-bearing mice [J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(10): 2603~2608  
徐鹤, 高美华. 氦氛激光照射胸腺区促进荷瘤小鼠 T 细胞的 CD59 表达与活化信号转导[J]. *中国激光*, 2009, **36**(10): 2603~2608
- 5 E. W. Stein, K. Maslov, L. V. Wang. Noninvasive, in vivo imaging of blood-oxygenation dynamics within the mouse brain using photoacoustic microscopy[J]. *J. Biomed. Opt.*, 2009, **14**(2): 020502
- 6 Li Zuanfang, Huang Zufang, Chen Rong *et al.*. Two-photon fluorescence imaging of thyroid tissue[J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(3): 765~768  
李钻芳, 黄祖芳, 陈荣等. 甲状腺组织的双光子荧光成像[J]. *中国激光*, 2009, **36**(3): 765~768
- 7 J. Rao, A. Dragulescu-Andrasi, H. Yao. Fluorescence imaging in vivo: recent advances[J]. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2007, **18**(1): 17~25
- 8 Zhou Feifan, Xing Da, Song Sheng *et al.*. Single-Walled carbon nanotubes enhance near-infrared region photothermal therap[J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(10): 2676~2679  
周非凡, 邢达, 宋盛等. 单壁碳纳米管增强近红外区激光热疗效果[J]. *中国激光*, 2009, **36**(10): 2676~2679
- 9 D. Maxwell, Q. Chang, X. Zhang *et al.*. An improved cell-penetrating, caspase-activatable, near-infrared fluorescent peptide

- for apoptosis imaging[J]. *Bioconjug. Chem.*, 2009, **20**(4): 702~709
- 10 J. Klohs, M. Gräfe, K. Graf *et al.*. In vivo imaging of the inflammatory receptor CD40 after cerebral ischemia using a fluorescent antibody[J]. *Stroke.*, 2008, **39**(10): 2845~2852
- 11 Y. Q. Gu, Z. Y. Qian, Y. L. Song. In Vivo Near Infrared Techniques for Protein Drug Development[M]. Encyclopaedia of Healthcare Information System, IGI Global, 2008
- 12 Qian Huimin, Chen Haiyan, Wang Min *et al.*. The near-infrared labeling conjugates and their application in biopharmaceutics[J]. *Pharm. Bio.*, 2006, **13**(4): 306~309  
钱慧敏, 陈海燕, 王 旻 等. 近红外标记技术在生物医药领域的应用[J]. *药物生物技术*, 2006, **13**(4): 306~309
- 13 J. Zhang, D. W. Deng, Y. Q. Gu. The targeting behavior of folate-nanohydrogel evaluated by near infrared imaging system in tumor-bearing mouse model[J]. *Pharma. Res.*, 2010, **27**(1): 46~55
- 14 J. Zhang, Y. Q. Gu. In vivo anti-tumor efficacy of docetaxel-loaded thermally responsive nanohydrogel[J]. *Nanotechnology*, 2009, **20**(32): 325102~325109
- 15 K. Licha, C. Olbrich. Optical imaging in drug discovery and diagnostic applications[J]. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 2005, **57**(8): 1087~1108
- 16 D. W. Deng, W. H. Zhang, X. Y. Chen *et al.*. Facile synthesis of high-quality, water-soluble, near-infrared-emitting PbS quantum dots[J]. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2009, **2009**(23): 3440~3446
- 17 Y. K. Kim, J. Y. Choi, M. K. Yoo *et al.*. Receptor-mediated gene delivery by folate-PEG-baculovirus in vitro [J]. *J. Biotechnol.*, 2007, **131**(3): 353~361
- 18 R. A. Firestone. Low-density lipoprotein as a vehicle for targeting antitumor compounds to cancer cells[J]. *Bioconjug. Chem.*, 1994, **5**(2): 105~113
- 19 G. Zheng, H. Li, M. Zhang *et al.*. Low-density lipoprotein reconstituted by pyropheophorbide cholesteryl oleate as target-specific photosensitizer[J]. *Bioconjug. Chem.*, 2002, **13**(3): 392~396
- 20 F. Liu, X. Y. Chen, D. W. Deng *et al.*. Folate-polyethylene glycol conjugated near-infrared fluorescence probe with high targeting affinity and sensitivity for in vivo early tumor diagnosis [J]. *Mol. Image. Bio.*, (2010) in press, DOI: 10.1007/s11307-010-0305-1
- 21 X. Y. Chen, D. W. Deng, Z. Y. Qian *et al.*. In vivo tumor imaging in mice with near-infrared-low density lipoprotein conjugates[C]. *SPIE*, 2009, **7519**: 75190P
- 22 Y. Ye, S. Bloch, J. Kao *et al.*. Multivalent carbocyanine molecular probes: synthesis and applications [J]. *Bioconjug. Chem.*, 2005, **16**(1): 51~61
- 23 W. J. Harrison. Liquid-crystalline J-aggregates formed by aqueous ionic cyanine dyes[J]. *J. Phys. Chem.*, 1996, **100**(6): 2310~2321