

## • 实验研究 Experimental research •

## 叶酸偶联金纳米棒在兔 VX-2 肝癌的摄取状况研究

许 军, 贺克武, 高 斌, 杨会军, 沈 蕾, 肖卫华

**【摘要】 目的** 建立兔肝癌模型, 观察实验动物对叶酸(FA)偶联二氧化硅包覆的金纳米棒(GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA)的摄取状况, 检测 GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA 对肝癌细胞的靶向性。**方法** CT 引导下穿刺接种法建立兔 VX-2 肝癌模型 27 只, 行 CT、超声检查观察肿瘤生长情况。2 周后将实验动物随机分成空白对照组(注入生理盐水)、门静脉注射 GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA 组和瘤内注射 GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA 组, 术后 24、48、72 h 每组各处死实验兔 3 只, 取其肿瘤组织和各主要脏器并作冷冻切片, 应用激光共聚焦显微镜观察实验动物对 GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA 的摄取情况。**结果** 成功构建兔 VX-2 肝癌模型, CT、超声检查显示肿瘤血供较丰富。共聚焦显微镜观察到实验动物摄入 GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA 24 h 内即可特异性地与肿瘤细胞结合进入肿瘤细胞, 并聚集在肿瘤细胞胞质内。**结论** GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA 可在实验动物体内高度靶向性作用于肝癌细胞, 在肿瘤靶向定位热疗和 <sup>125</sup>I 粒子介入治疗方面具有重要的应用前景。

**【关键词】** VX-2 肝癌模型; 叶酸偶联金纳米棒; 叶酸受体; 靶向性

中图分类号: R735.7 文献标志码: A 文章编号: 1008-794X(2015)-04-0328-05

**The intake of folate-conjugated silica-coated gold nanorods in rabbits with VX-2 liver cancer: an experimental study** XU Jun, HE Ke-wu, GAO Bin, YANG Hui-jun, SHEN Lei, XIAO Wei-hua. Medical Imaging Center, the Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui Province 230061, China

Corresponding author: GAO Bin, E-mail: gaobin\_3136@163.com

**【Abstract】 Objective** To establish the rabbit model with hepatic VX-2 tumor and to investigate the intake of folate-conjugated silica-coated gold nanorods (GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA) in experimental rabbits. **Methods** Under CT-guidance, animal model with VX-2 liver cancer was established in 27 rabbits by using puncture inoculation method. CT scanning and sonography were employed to observe the tumor growth. After two weeks, the rabbits were randomly and equally divided into blank control group ( $n=9$ , injection of saline), portal vein injection group ( $n=9$ , injection of GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA) and intra-tumoral injection group ( $n=9$ , injection of GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA). Every three rabbits from each group were sacrificed each time at 24 h, 48 h and 72 h after the treatment. The tumor tissue and the major organs were collected and sent for pathological examination. The cellular uptake of GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA was studied by confocal laser scanning microscopy. **Results** The rabbit model of VX-2 liver cancer was successfully established. CT and sonography examination indicated that the tumor was rich in blood supply. Confocal laser scanning microscopy revealed that GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA could specifically bind with tumor cells within 24 hours after injection, then the GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA entered into the tumor cells and gathered in the tumor cytoplasm. **Conclusion** GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA has highly targeted effect on the liver cancer cells in experimental animals, which has very important application prospect in targeting hyperthermia therapy and in <sup>125</sup>I seed implantation therapy. (J Intervent Radiol, 2015, 24: 328-332)

**【Key words】** VX-2 hepatic tumor model; folate-conjugated gold nanorod; folate receptor; target

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2015.04.013

基金项目: 国家自然科学基金(81071240)

作者单位: 230061 安徽医科大学第三附属医院影像中心(许 军、贺克武、高 斌、杨会军、沈 蕾); 中国科技大学生命科学院(肖卫华)

通信作者: 高 斌 E-mail: gaobin\_3136@163.com

肝癌是最常见的致命恶性肿瘤之一,其诊断和治疗一直是临床难题<sup>[1]</sup>。除少数癌肿可以通过外科手术切除外,目前常用的肝癌治疗手段多集中于化疗和选择性内放疗。然而由于肝癌组织内的独特微环境,抗癌药物在肿瘤组织内分布浓度很低,对肝癌患者 5 年生存率的提升不到 1%<sup>[2]</sup>。金纳米棒(GNRs)具有独特的光学性质和优势、较低的细胞毒性、良好的生物相容性,在光热治疗、细胞成像和基因传递等生物医学领域展现出广泛的应用前景<sup>[3-4]</sup>。研究表明叶酸(FA)受体在恶性肿瘤细胞膜表面的表达显著高于正常细胞<sup>[5]</sup>,因此将 FA 作为靶向配体与 FA 受体特异性表达的癌细胞结合,为 FA 靶向肿瘤治疗研究奠定了基础。

本实验在建立兔 VX-2 肝癌模型的基础上,通过不同途径将前期研究中制备的 FA 偶联二氧化硅包覆的金纳米棒(GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA)注射进入实验动物体内,采用双光子激光共聚焦显微镜观察动物模型对 GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA 的摄取情况。现将实验结果总结如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料和仪器

荷瘤种兔 1 只(由苏州大学附属第一医院惠赠)、新西兰大耳白兔 27 只(均为雄性,体重 2.5~3.0 kg,由安徽医科大学实验动物中心提供)、GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA(本实验室自制)、FA-2104 型电子天平(上海良平仪器仪表有限公司)、Leica 双光子激光共聚焦显微镜(德国 Carl Zeiss 公司)、光学显微镜(日本 Olympus 公司)、16 层螺旋 CT(美国通用电气公司)以及手术相关器械。

### 1.2 CT 引导下穿刺接种法建立兔 VX-2 肝癌模型

无菌条件下用戊巴比妥钠(30 mg/kg)静脉全身麻醉荷瘤兔后手术剥离其后腿肌肉内肿块,将取出的生长活跃的肿瘤组织剪碎为 1~2 mm<sup>3</sup> 的小块。全身麻醉待接种肿瘤的新西兰白兔后,常规肋下 CT 扫描其肝脏,明确肝位置并确定待接种部位,用带尖头穿刺针芯的穿刺针沿设定的穿刺角度、方向穿入预定肝位置,眼科镊夹 1 块瘤块放入针鞘内,平头穿刺针芯将瘤块推入肝内,重复 1~2 次。直视下来回在针鞘内推动平头穿刺针芯,证实瘤块接种于肝脏。术后连续 3 d 肌肉注射青霉素 40 万单位+庆大霉素 4 万单位。

### 1.3 CT、超声检查

新西兰白兔禁食 24 h,戊巴比妥钠(30 mg/kg)

静脉全身麻醉后,将其仰卧位固定于 CT 床上,左右尽量对称。CT 扫描参数:120 kV,50 mA,FOV 25 cm,层厚 2 mm。增强扫描对比剂选用碘普罗胺注射液(碘浓度 300 mg/ml,剂量 1 ml/kg),用高压注射器经耳缘注射(流率 1 ml/s)。彩色超声诊断仪设置为 TESTIS(浅表高频)条件,采用 15 L、8 W 浅表器官探头,变频率 8~13 MHz。

### 1.4 实验动物分组及不同处理

随机将实验白兔分成 A、B、C 3 组,每组 9 只。A 组为空白对照组:植入肿瘤后 2 周,从耳缘静脉注射生理盐水 5 ml;B 组为门静脉注射 GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA 组:超声引导下辨别并确定兔门静脉主干位置,向门静脉内注射 GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA 200  $\mu$ l;C 组为瘤内注射 GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA 组:超声引导下向肿瘤组织内注射 GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA 200  $\mu$ l。术后 24 h、48 h、72 h 采用空气栓塞法处死实验兔,每组各处死 3 只,取其肿瘤组织和各主要脏器(心脏、肝脏、脾脏、肾脏、肺脏)作后续检测。

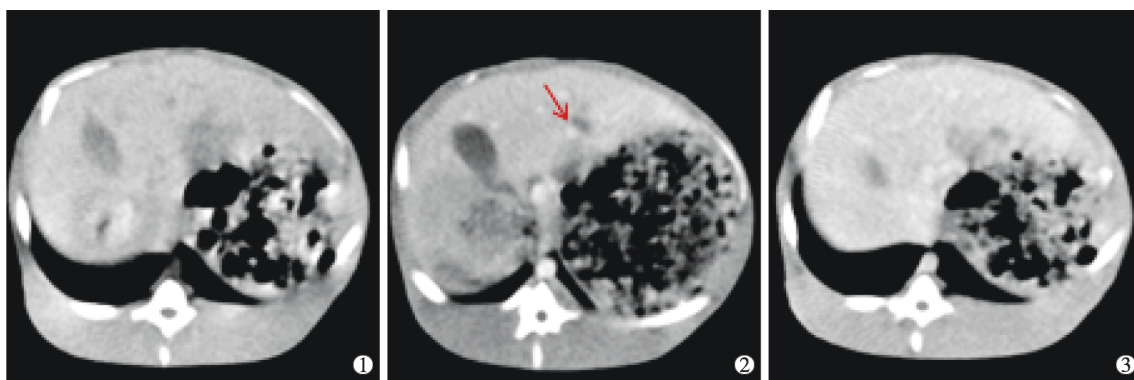
### 1.5 激光共聚焦显微镜观察实验动物对 GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA 摄取情况

取实验兔 24 h、48 h、72 h 的肿瘤组织,瘤周 1.5 cm 组织,正常肝脏、肾脏、脾脏和肺脏组织切块(<1 cm<sup>3</sup>),4℃下固定过夜后,用 0.01 mol/L PBS 缓冲液洗 3 次。在 20%蔗糖中 4℃浸泡 1 h 以上,待组织块下沉后进行冷冻切片。组织块固定后放入样品台的冷冻包埋剂(OCT)中,调整样品位置,打开钢瓶开关使压缩 CO<sub>2</sub> 气体喷出,迅速冷冻组织样品。冷冻后的样品转移至冷冻切片机(样品温度平衡至 -20℃)中,将组织切成约 10  $\mu$ m 切片,粘贴于用多聚赖氨酸处理过的盖玻片(20 mm × 40 mm,0.13~0.17  $\mu$ m 厚)上,用双光子激光共聚焦显微镜观察标本内细胞对 GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA 的摄取情况。

## 2 结果

### 2.1 影像学及病理学检查建模结果

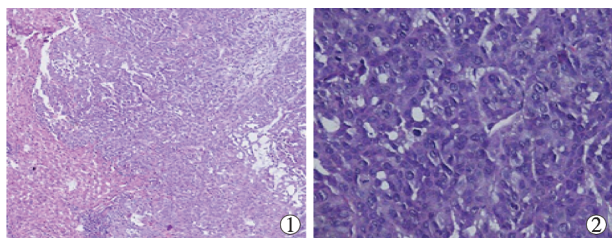
CT 表现:兔 VX-2 肝癌模型构建 1 周左右瘤灶较小,2 周时直径约 1.5 cm,平扫呈低密度,少数呈等密度,坏死为明显低密度。增强双期扫描显示,动脉期肿瘤强化明显,呈高密度;门脉期肿瘤呈稍低密度,肿瘤边缘及正常的肝实质增强使肿瘤显示更清楚(图 1)。超声表现:超声声像图上肿瘤表现为低回声,边界清楚,有明显声晕,内部回声欠均匀;血流信号检测可见瘤体内点状、短条状血管分支,肿块周边见环形包绕的丰富血管。肿瘤病理组织学改



①CT 平扫示肝左内叶肿瘤,呈低密度结节状,类圆形,边缘较清楚;②③CT 增强扫描示动脉期肿瘤实体部分强化明显,其内可见一小强化结节(红箭头);静脉期肿瘤强化程度低于正常肝实质

图 1 CT 平扫和 CT 增强扫描图像

变:肉眼见肿瘤呈灰白色,质硬,切面呈鱼肉状;光镜下肿瘤细胞呈条索状或腺样排列,细胞体积较大,呈圆形、梭形或不规则形,核大、深染,异型明显并可见核分裂象(图 2)。



①低倍(10×)镜下,可见正常肝组织内多灶浸润性癌巢,与正常肝实质分界清楚;②高倍(40×)镜下,可见癌细胞核大,深染,核分裂多,并有少量坏死组织

图 2 HE 染色后光镜下图像

## 2.2 共聚焦显微镜观察肝癌模型对 GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA 摄取情况

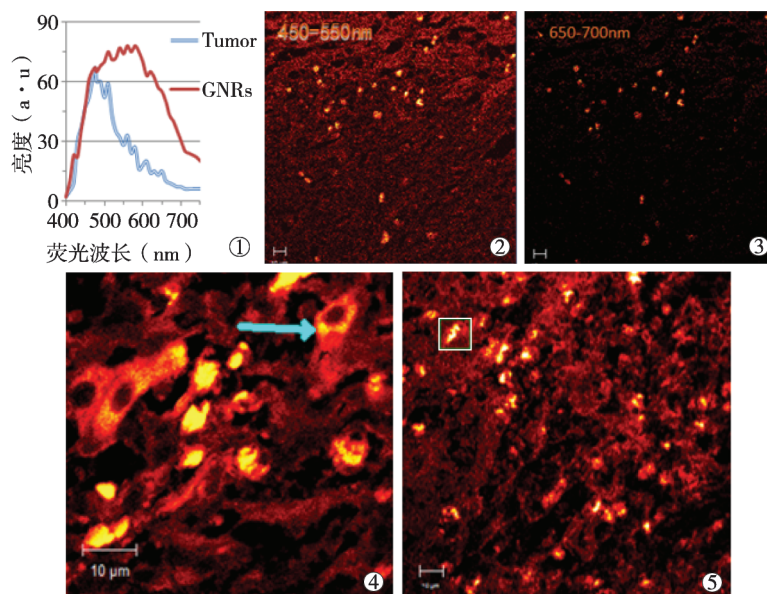
双光子激光共聚焦显微镜观察发现,肿瘤组织及其他脏器自体荧光发射范围为 400~600 nm, GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA 荧光范围较广(400~700 nm)。当检测荧光范围超过 600 nm 时,肿瘤组织和脏器的自体荧光迅速降低而 GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA 仍具有较强荧光,因此利用这一规律可以将 GNRs 从肿瘤组织和脏器中区分出来(图 3①、②、③)。细胞核在 400~700 nm 范围内几乎没有自体荧光发出。注射 GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA 24 h 后,肿瘤细胞胞质内可见大量 GNRs 积聚,而细胞核内未见 GNRs 荧光(图 3④);脾脏内也可见较多 GNRs 积聚(图 3⑤);GNRs 在瘤周 1.5 cm 肝组织和正常肝组织内可见少量积聚,瘤内注射组较门静脉注射组肝组织内积聚偏少,主要积聚在肝板之间的肝血窦内,而肝细胞内未见积聚;GNRs 在肾脏组织内未见积聚。注射 GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA 48 h 后,肿瘤细胞胞质内 GNRs 积聚增多,并发

现少量 GNRs 向细胞核内化;脾脏内 GNRs 积聚较 24 h 时未见明显变化;瘤周 1.5 cm 肝组织和正常肝组织内 GNRs 积聚较 24 h 时明显减少;肾脏集合管内可见少量 GNRs 积聚,瘤内注射组较门静脉注射组无明显差异,而肾实质细胞内未见积聚。注射 GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA 72 h 后,肿瘤细胞胞质内 GNRs 积聚进一步增多,GNRs 向细胞核内化较 48 h 时变化不明显;脾脏内 GNRs 积聚较 48 h 明显减少;瘤周 1.5 cm 肝组织和正常肝组织内 GNRs 积聚较 48 h 时进一步减少,瘤内注射组肝组织内只见极少量 GNRs 荧光;肾脏集合管内可见较多 GNRs 积聚,瘤内注射组 GNRs 积聚少于门静脉注射组(图 4)。实验动物肺脏及心脏组织内未见 GNRs 荧光,对照组肿瘤组织及各器官内均未见 GNRs 荧光(图 5)。

## 3 讨论

GNRs 是一种呈胶囊状的颗粒,在可见光区和近红外区有一个横向等离子共振吸收峰(TSPR)和一个纵向等离子共振吸收峰(LSPR)<sup>[6]</sup>。GNRs 可以强烈吸收近红外激光并转化为热能释放到局部环境,这种光热效应在实体肿瘤治疗中展现出巨大的应用价值<sup>[7]</sup>。然而传统 GNRs 合成过程中要使用大量具有较强生物毒性的表面活性剂十六烷基三甲基溴化铵(CTAB),使之在生物医学领域的应用受到了限制<sup>[8]</sup>。我们在前期研究中以二氧化硅(SiO<sub>2</sub>)作为壳材制备椭圆形 SiO<sub>2</sub> 包覆的 GNRs(GNRs@SiO<sub>2</sub>),同时将 FA 通过氨基偶联到 GNRs@SiO<sub>2</sub>,以降低 GNRs 的生物毒性,并在体外实验中得到证实<sup>[9-10]</sup>。本研究中给予正常动物摄入很高剂量(13 mg/kg)的 GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA 后,并未发现明显的中毒迹象,动物肝肾功能也未见明显变化(观察结果尚未发表)。有研究发现,将 GNRs 摄入剂量提高到 2 700 mg/kg





①肿瘤组织自发荧光和 GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA 荧光发射光谱(标尺=10 μm);②770 nm 近红外激光激发下检测 450~550 nm 范围内共聚焦图像,GNRs (亮点)和肿瘤组织自发荧光都可以清楚观察到;③相同区域检测范围为 650~700 nm 时,只有 GNRs 可以观察到;④GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA 进入肿瘤细胞内,并在肿瘤细胞胞质内积聚(蓝色箭头),肿瘤细胞核内没有发现 GNRs;⑤脾脏内 GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA 图像显示脾脏内巨噬细胞吞噬 GNRs (绿色方框内)

图 3 GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA 在不同组织的共聚焦图像

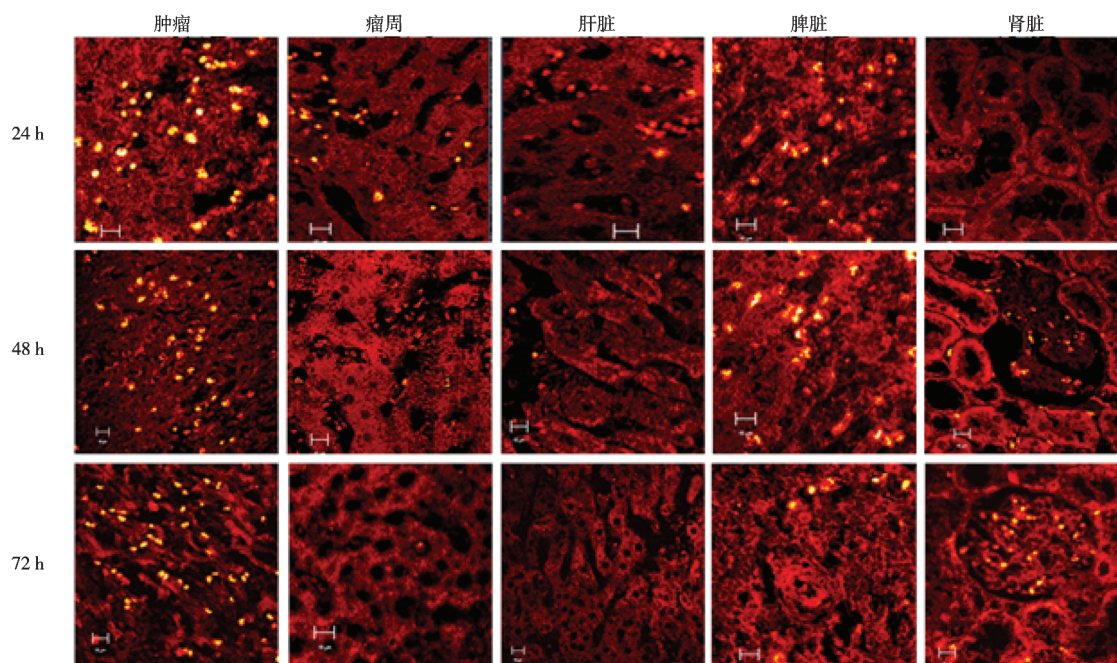


图 4 摄入 GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA 后不同时间段(24 h、48 h、72 h),瘤内注射组动物体内肿瘤组织及各主要器官对 GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA 的摄取状况(标尺=10 μm)

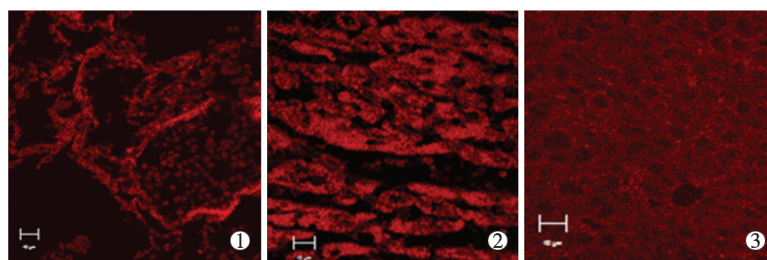


图 5 实验动物肺脏①、心脏组织②及对照组肿瘤组织③内均未见 GNRs 荧光



时,实验动物也没有出现明显的毒性反应<sup>[11]</sup>。

FA 受体是细胞膜表面糖基化的糖蛋白,在多种上皮组织来源的肿瘤组织中高表达,可与 5-甲基四氢 FA 及游离 FA 特异结合,并且通过受体介导的胞吞机制将 FA 及其衍生物高效、特异地载入肿瘤细胞<sup>[12]</sup>。肝癌属于腺上皮来源,肝癌细胞表面具有丰富的 FA 受体<sup>[13]</sup>。本研究通过双光子激光共聚焦显微镜观察肝癌模型对 GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA 的摄取情况,进一步从细胞水平证明 GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA 对肿瘤细胞的高度靶向性。有研究<sup>[14]</sup>证明,GNRs 在近红外光激光激发下发出的双光子荧光信号亮度,是相同条件下罗丹明染色荧光亮度的 58 倍。Tong 等<sup>[15]</sup>将 FA 偶联的 GNRs 与 FA 受体过量表达的 KB 细胞和 NIH-3T3 细胞分别进行孵育,通过双光子荧光信号可以很清晰地观察到细胞吞噬纳米颗粒过程中处于吞噬不同阶段的 GNRs 所在位置。本研究结果显示,GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA 可以特异性地与肿瘤细胞结合后进入肿瘤细胞,并聚集在细胞质内。此外,在肝血窦和脾脏的巨噬细胞内也观察到部分 GNRs,表明 GNRs 在体内的循环、代谢与网状内皮系统有关,这与国外的相关研究报道<sup>[16]</sup>一致。本研究还发现,注射 GNRs 24 h 后,GNRs 开始由肾脏排出体外,瘤内注射组 GNRs 清除较门静脉组缓慢,GNRs 在体内循环时间更长,肿瘤细胞内 GNRs 聚集更多。

总之,本研究制备的 FA 偶联的 GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA 可以在实验动物体内特异性识别肝癌。GNRs@SiO<sub>2</sub>-FA 可作为荧光试剂或药物载体,广泛应用于肿瘤的诊断或治疗,尤其是能与 FA 高表达的癌细胞靶向结合,使其在肿瘤的靶向定位热疗和 <sup>125</sup>I 粒子介入治疗方面展现出巨大的应用价值。

#### [参 考 文 献]

- [1] Zhang QA, Tong JL, Chen HJ, et al. A novel magnetic nanoparticle hyperthermia combined with ACMF-Dependant drug release by DAMMs injection in VX-2 liver tumors[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2012, 12: 127-131.
- [2] Liang P, Dong B, Yu X, et al. Computer-aided dynamic simulation of microwave-induced thermal distribution in coagulation of liver cancer[J]. IEEE Trans Biomed Eng, 2001, 48: 821-829.
- [3] Yang DP, Cui DX. Advances and prospects of Gold nanorods[J]. Chem Asian J, 2008, 3: 2010-2022.
- [4] Mackey MA, Ali MR, Austin LA, et al. The most effective Gold nanorod size for plasmonic photothermal therapy: theory and in vitro experiments[J]. J Phys Chem B, 2014, 118: 1319-1326.
- [5] 田 慧, 张 奇, 项光亚. 叶酸受体介导的肿瘤靶向治疗研究进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2006, 22: 227-229.
- [6] Hormozi-Nezhad MR, Robatjazi H, Jalali-Heravi M. Thorough tuning of the aspect ratio of Gold nanorods using response surface methodology[J]. Anal Chim Acta, 2013, 779: 14-21.
- [7] Van De Broek B, Devoogdt N, D'Hollander A, et al. Specific cell targeting with nanobody conjugated branched Gold nanoparticles for photothermal therapy[J]. ACS Nano, 2011, 5: 4319-4328.
- [8] Ma ZL, Wang JF, Kong SK, et al. Optotransfection of mammalian cells based on a femtosecond laser and facilitated by Gold nanorods[J]. Nanotechnology, 2013, 24: 435102-435107.
- [9] 高 斌, 李爱华, 肖卫华, 等. 叶酸偶联金纳米棒靶向探针制备及体外肝癌细胞对其摄取状况的研究[J]. 中华放射学杂志, 2013, 47: 654-658.
- [10] 李爱华, 高 斌, 贺克武, 等. 椭圆形金纳米棒作为癌细胞靶向探针的研究[J]. 介入放射学杂志, 2013, 22: 312-316.
- [11] Hainfeld JF, Slatkin DN, Smilowitz HM. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice[J]. Phys Med Biol, 2004, 49: N309-N315.
- [12] Franzen S. A comparison of peptide and folate receptor targeting of cancer cells: from single agent to nanoparticle[J]. Expert Opin Drug Deliv, 2011, 8: 281-298.
- [13] D'angelica M, Ammori J, Gonen M, et al. Folate receptor- $\alpha$  expression in resectable hepatic colorectal cancer metastases: patterns and significance[J]. Mod Pathol, 2011, 24: 1221-1228.
- [14] Wang HF, Huff TB, Zweifel DA, et al. In vitro and in vivo two-photon luminescence imaging of single Gold nanorods [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 15752-15756.
- [15] Tong L, Zhao Y, Huff TB, et al. Gold nanorods mediate tumor cell death by compromising membrane integrity [J]. Adv Mater, 2007, 19: 3136-3141.
- [16] Tong L, Wei H, Zhang Y, et al. Visualizing systemic clearance and cellular level biodistribution of Gold nanorods by intrinsic two-photon luminescence[J]. Langmuir, 2009, 25: 12454-12459.

(收稿日期:2014-10-23)

(本文编辑:边 皓)