

## ·实验研究 Experimental research·

## 近红外二区成像中通过靶向磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 早期诊断肝癌转移实验研究

李 佳, 李 勇, 占美晓, 忻勇杰, 赵 炜, 陆骊工

**【摘要】 目的** 探讨靶向肝癌磷脂酰肌醇蛋白聚糖(GPC)-3 的纳米探针  $\text{Ag}_2\text{S}@BSA\text{-}TJ12P1$  在近红外二区(NIR-II)成像早期诊断肝癌转移灶中的优势。**方法** 制备硫化银纳米探针  $\text{Ag}_2\text{S}@BSA\text{-}TJ12P1$ 。通过体外细胞实验验证 GPC-3 表达,检测各肝癌细胞系转移能力。采用激光共聚焦成像验证硫化银纳米探针选择性摄取至肝癌细胞系情况。采用肝癌高转移细胞系建立裸鼠肝癌原位转移模型,通过 NIR-II 在体成像观察微小转移灶。**结果**  $\text{Ag}_2\text{S}@BSA\text{-}TJ12P1$  被激发后,可在 1 080 nm 处发出 NIR-II 荧光。细胞实验显示,肝癌 GPC-3 在肝癌细胞系中均有高表达, $\text{Ag}_2\text{S}@BSA\text{-}TJ12P1$  可被 HepG2、MHCC97-H、HCC-LM3 细胞特异性摄取。NIR-II 成像系统对裸鼠微小转移灶作出早期诊断。**结论**  $\text{Ag}_2\text{S}@BSA\text{-}TJ12P1$  可通过在体靶向肝癌 GPC-3 对肝癌微小转移灶成像,对肝癌微小转移灶早期诊断具有一定意义。

**【关键词】** 肝癌; 纳米探针; 近红外二区成像; 磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3

中图分类号:R735.7 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2020)-06-0591-05

**Early diagnosis of liver cancer metastases by targeting glypican-3 in the second near-infrared region: an experimental study** LI Jia, LI Yong, ZHAN Meixiao, XIN Yongjie, ZHAO Wei, LU Ligong. Department of Interventional Therapy, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Cancer Center of Guangdong Provincial Institute of Cardiovascular Diseases, Guangzhou, Guangdong Province 510080, China

Corresponding author: LU Ligong, E-mail: luligong1969@126.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the advantages of the second near-infrared region(NIR-II) nanoprobe( $\text{Ag}_2\text{S}@BSA\text{-}TJ12P1$ ) targeting liver cancer(Glypican-3, GPC-3) in the early diagnosis of liver cancer metastases by near-infrared second-region imaging. **Methods** Silver sulfide nanoprobe( $\text{Ag}_2\text{S}@BSA\text{-}TJ12P1$ ) was prepared. The expression of GPC-3 was verified by in vitro cell experiments, and the transferability of each cell line was tested. The selective uptake of silver sulfide nanoprobe into HCC cell lines was verified by laser confocal imaging. In situ metastasis of hepatocellular carcinoma in nude mice was established by using high metastatic cell lines of hepatocellular carcinoma. The micro-metastatic lesions were observed by NIR-II imaging. **Results** After  $\text{Ag}_2\text{S}@BSA\text{-}TJ12P1$  was excited, it could emit near-infrared fluorescence at 1 080 nm. Cell experiments showed that GPC-3 was highly expressed in liver cancer cell lines, and  $\text{Ag}_2\text{S}@BSA\text{-}TJ12P1$  could be specifically absorbed by HepG2, MHCC97-H and HCC-LM3. Early diagnosis of micro-metastatic nodules in nude mice could be made by NIR-II imaging system. **Conclusion** The  $\text{Ag}_2\text{S}@BSA\text{-}TJ12P1$  based on GPC-3 targeting liver cancer can visualize the micro-metastases of liver cancer by targeting the GPC-3 of liver cancer *in vivo*, which has certain potential for the early diagnosis of the micro-metastases of liver cancer. (J Intervent Radiol, 2020, 29: 591-595)

**【Key words】** liver cancer; nanoprobe; second near-infrared region imaging; glypican-3

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2020.06.014

基金项目: 科技部国家重点研发计划项目(2017YFA0205203)

作者单位: 510080 广州 广东省人民医院(广东省医学科学院)、广东省心血管病研究所肿瘤中心介入治疗科

通信作者: 陆骊工 E-mail: luligong1969@126.com

肝癌是全球第 5 大常见恶性肿瘤,外科肝切除术是首选治疗方法,然而目前术后复发率高<sup>[1]</sup>。肝肿瘤周边伴有微转移灶,肉眼难以识别,为手术彻底切除病灶带来一定困难<sup>[2]</sup>。近年实时光学手术导航技术发展为此带来新机遇,近红外二区(second near-infrared region, NIR-II)成像较传统近 NIR-I 成像穿透度更深、分辨率更高、自发荧光更少,故可极大提高术中成像灵敏度<sup>[3-4]</sup>。以肝癌高表达的磷脂酰肌醇蛋白聚糖(glypican, GPC)-3 为靶点,通过特异性靶向多肽<sup>[5]</sup>与荧光探针相偶联,可大大提高荧光探针主动靶向肝癌的能力。本研究通过构建靶向肝癌 GPC-3 特异性 NIR-II 荧光探针、肝癌裸鼠转移模型<sup>[6]</sup>并在体观测 NIR-II 荧光区,探讨 NIR-II 成像对肝癌微小转移灶早期诊断的优势。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验器材

硝酸银(AgNO<sub>3</sub>)、牛血清白蛋白(BSA)、氢氧化钠(NaOH)、硫化钠(Na<sub>2</sub>S)(北京伊诺凯科技公司), GPC-3 抗体(ab129381,英国 Abcam 公司),人 LO-2、HepG2、MHCC97-H、HCC-LM3 细胞系(北京中源合聚生物科技公司),多肽 TJ12P1(杭州中肽生化公司), NIRvana 640ST 型 NIR-II 成像系统、IVIS Lumina II 型小动物光学成像系统(中国科学院分子影像重点实验室)。

### 1.2 实验方法

纳米探针制备:BSA 用超纯水配制浓度为 0.5% 白蛋白溶液,浓度为 0.1 mmol/L 硝酸银水溶液缓缓滴入 10 mL 白蛋白溶液,避光反应 1 h;反应溶液中逐滴加入 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液,调节溶液 pH 至 12;逐滴加入 0.4 mmol/L 硫化钠水溶液,控制 Ag<sup>+</sup>:S<sup>2-</sup>离子摩尔比为 1:1,控制温度 40 ℃,避光反应过夜;所得溶液置于截留分子量为 100 kD 半透膜透析袋中进行透析,冷冻干燥得到固体粉末;粉末重新溶解于磷酸缓冲液(PBS),通过 1-乙基-(3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)-N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)交联法偶联多肽片段 TJ12P1,得到纳米探针 Ag<sub>2</sub>S@BSA-TJ12P1。

基本表征检测:采用 JEM-1200EX 型透射电子显微镜(TEM)获得纳米探针形貌结构电镜图,岛津 UV-3600 型紫外可见分光光度计检测紫外可见光吸收曲线,日立 F-7000 型荧光分光光度计检测荧光发射光谱。

穿透深度验证:配制 0.1 mol/L Ag<sub>2</sub>S@BSA-

TJ12P1 和等量 IRDye800-CW 溶液作为对照,制备不同厚度冰冻鸡胸肉切片覆盖样本并进行成像;采集 780~900 nm 波段 NIR-I 信号和 1 100~1 300 nm 波段 NIR-II 信号并采集数据,Light-field 软件读取信号值。

免疫印迹和免疫荧光验证:取对数期生长 LO2、HepG2、MHCC97-H、HCC-LM3 细胞于共聚焦培养皿中贴壁生长,与 Cy-5 染料标记的 Ag<sub>2</sub>S@BSA-TJ12P1 共孵育 12 h;4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)对细胞核进行染色,激光共聚焦显微镜观察样本荧光,Imaris 图像分析软件计算平均光密度(OD,平均 OD=积分 OD/区域全面积),取平均值。

另取上述细胞样品加入放射免疫沉淀测定(RIPA)裂解液,进行重悬,于冰上裂解 30 min 行蛋白提取,依照电泳上样量需要用水和 5 倍体积上样缓冲液(loading buffer)调整蛋白浓度,100℃煮沸变性,12%分离胶和 5%浓缩胶行凝胶电泳,每孔上样 40 μg,控制浓缩胶恒压 80 V,20 min;分离胶恒压 120 V,电泳至溴酚蓝到达凝胶底部;300 mA 恒流转膜 2 h;5%脱脂奶粉封闭 1 h,依次与一抗(1:1 000)与二抗(1:5 000)孵育,洗膜后暗室曝光、显影并定影;以肌动蛋白(actin)为内参,Quantity One v4.6.2 软件读取并记录 GPC-3 相对表达水平。

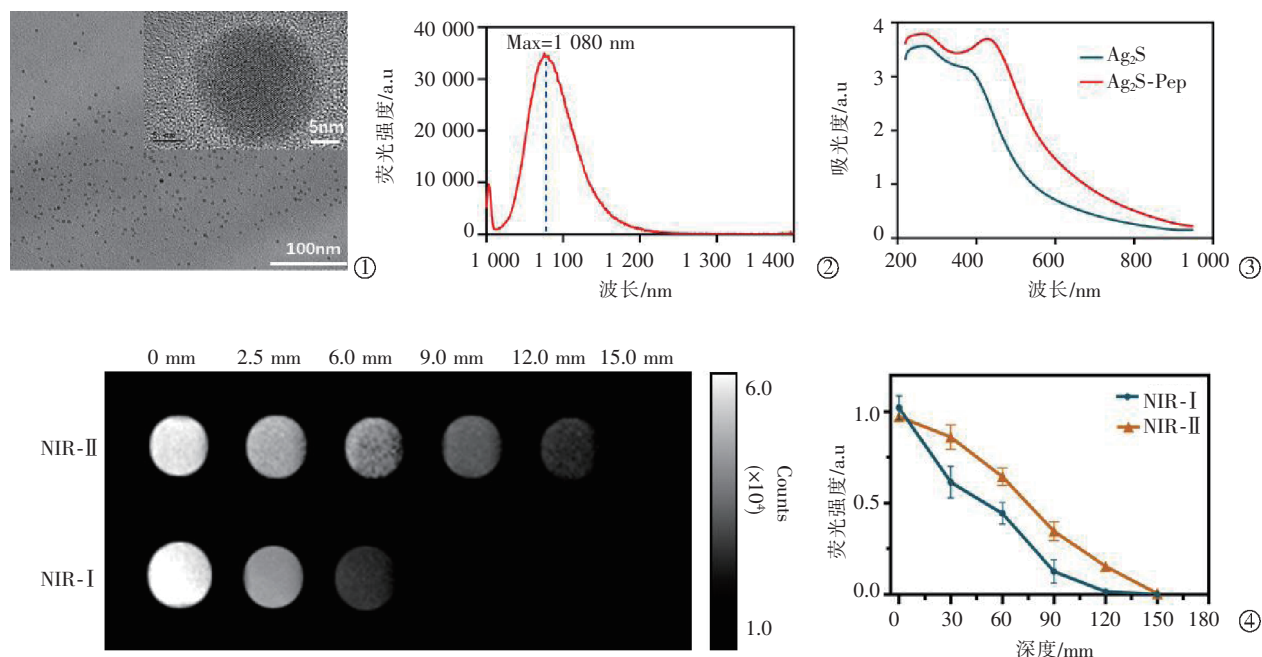
### 1.3 活体 NIR-II 成像与病理学验证

收集对数生长期 HCC-LM3 细胞,胰酶消化后用 PBS 重悬,调整浓度为 5×10<sup>6</sup> 个/mL,选取 6 周龄雄性 Balb/c 小鼠并尾静脉注射细胞悬液制备转移模型,观察小鼠体重及精神状态变化。2 周后通过尾静脉注射 200 μg/mL Ag<sub>2</sub>S@BSA-TJ12P1 纳米探针,分别在注射后 1、2、6、12、24、48 h 于 NIR-II 成像系统中成像。

## 2 结果

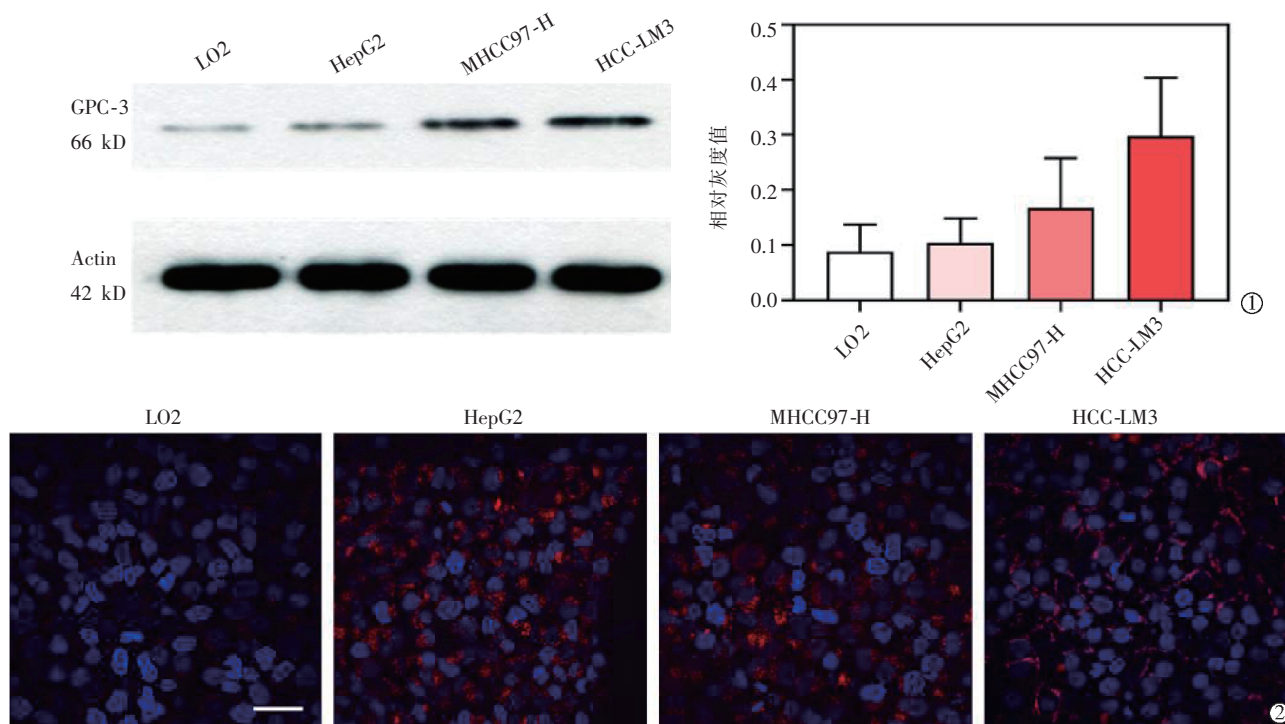
TEM 显示 Ag<sub>2</sub>S@BSA-TJ12P1 纳米探针表征为量子点,粒径约为 10 nm(图 1①);经多肽修饰后,吸收光谱可见 400 nm 左右处有一特征性吸收峰,证明多肽与 Ag<sub>2</sub>S 成功偶联(图 1②);NIR-II 荧光光谱可见最大发射峰位于波长 1 080 nm 处,处于 NIR-II 谱段(图 1③);IRDye-800CW 作为 NIR-I 对照,采用不同厚度冻鸡胸肉遮盖样品并测试荧光穿透深度显示,NIR-II 荧光较 NIR-I 荧光具有更强的穿透深度(6 mm 对 9 mm)(图 1④)。

免疫印迹检测结果显示,HepG2、MHCC97-H、HCC-LM3 细胞 GPC-3 表达均显著高于 LO2 细胞



①Ag<sub>2</sub>S@BSA-TJ12P1 表征;②激发荧光光谱;③修饰多肽前后紫外-可见光吸收波谱;④ NIR-II 荧光和 NIR-I 荧光穿透深度实验和定量分析

图 1 Ag<sub>2</sub>S@BSA-TJ12P1 纳米探针表征



①LO2、HepG2、MHCC97-H 与 HCC-LM3 细胞 GPC-3 表达;②LO2、HepG2、MHCC97-H、HCC-LM3 对 Ag<sub>2</sub>S@BSA-TJ12P1 摄取的荧光

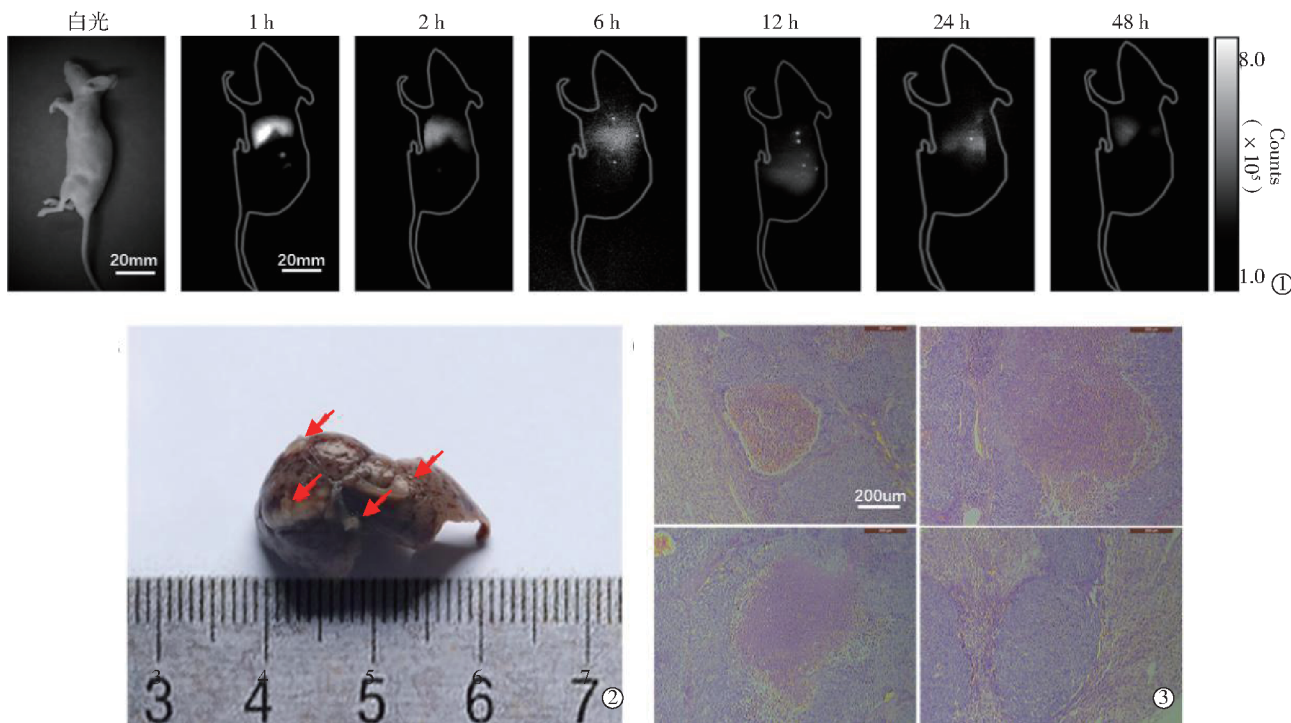
图 2 Ag<sub>2</sub>S@BSA-TJ12P1 可特异性靶向肝癌细胞

(图 2①)。Cy-5 染料标记纳米探针 Ag<sub>2</sub>S@BSA-TJ12P1 并与 4 种细胞共孵育后,激光共聚焦成像可见纳米探针被 HepG2、MHCC97-H、HCC-LM3 细胞特异性摄取,而 LO2 细胞几乎不摄取(图 2②)。

裸鼠注射纳米探针后 1、2、6、12、24、48 h 成像

显示,探针首先富集于肝脏区域,12 h 后探针信号对转移灶具有最佳信噪比,48 h 后信号基本消失(图 3①);离体肝脏可见数枚直径约 1 mm 微小转移灶,散在分布于肝表面(图 3②);苏木精-伊红(HE)染色组织病理切片可见病灶内大量异形细胞(图 3③)。





①Ag<sub>2</sub>S@BSA-TJ12P1 在裸鼠肝癌转移模型 NIR-II 成像结果;②转移性肝癌大体图像;③ 转移性肝癌 HE 染色病理显像

图 3 裸鼠转移模型 NIR-II 荧光成像

### 3 讨论

肝癌早期以手术治疗为主,中晚期治疗包括介入为主的综合治疗<sup>[17]</sup>。然而肝癌起病隐匿,早期症状不明显,诊断时多为中晚期。肝癌外科手术过程中,术者判断肝癌边界通常依赖术中触诊和肉眼观察,缺乏实时、客观、有效的辅助方法。活体荧光成像技术通过荧光靶向探针在肿瘤区域特异性富集,借助高灵敏度成像仪器,可在术中实时定位肿瘤,为术者彻底切除肿瘤提供实时反馈。NIR-II 荧光成像(900~1 700 nm)与 NIR-I 荧光成像(750~900 nm)相比穿透强度更深,生物自发荧光更少,大大提高了肿瘤区域信噪比,有望突破现有光学手术导航的瓶颈<sup>[8-9]</sup>。此外,荧光探针需与高特异性肿瘤抗体相耦合,以实现肿瘤长效、稳定标记,满足外科医师对术中导航的时间要求。近年研究表明,GPC-3 作为肝癌特异性标志物在肝癌发生发展过程中具有重要作用,高达 90% 患者肝癌表面存在 GPC-3 高表达,为肝癌精准靶向与诊疗提供了重要证据<sup>[10]</sup>。

本研究所设计的 Ag<sub>2</sub>S@BSA 纳米探针在 NIR-II 区具有优越的光学性质,将荧光探针与 GPC-3 特异性靶向多肽 TJ12P1 通过 EDC-NHS 交联法相耦合获得靶向探针 Ag<sub>2</sub>S@BSA-TJ12P1,大大增强了荧光探针靶向性,并实现了肝癌原发灶与转移灶长效、稳定标记。裸鼠肝癌转移模型体外实验证实,本研

究设计的 Ag<sub>2</sub>S@BSA-TJ12P1 荧光探针与传统 NIR-I 荧光探针(IRdye800-CW)相比,NIR-II 成像具有更强的穿透深度,更少受到生物自发荧光干扰;在体实验证实,Ag<sub>2</sub>S@BSA-TJ12P1 荧光探针 NIR-II 成像可成功观测到最小为 1 mm 肝癌转移灶,并经病理证实。

综上所述,本研究结果在肝癌转移灶精准诊断及荧光手术导航方面具有一定的转化前景。但本研究也有局限性,所应用的裸鼠肝癌转移模型模拟肝癌血行转移病理情况,可能较人类肝癌肝内转移位置及特性存有一定差异,需要结合更多疾病动物模型加以验证,以及进一步优化靶器官成像时间窗等加以探讨。

### [参考文献]

- [1] 原发性肝癌诊疗规范(2017年版)[J]. 中国实用外科杂志, 2017, 37:705-720.
- [2] 程红岩, 陈 栋, 徐爱民, 等. 肝癌术后复发原因的探讨[J]. 中华肿瘤杂志, 1999, 21:29-31.
- [3] Wang PY, Fan Y, Lu LF, et al. NIR - II nanoprobes in - vivo assembly to improve image-guided surgery for metastatic ovarian cancer[J]. Nat Commun, 2018, 9: 2898.
- [4] Zhu SJ, Yung BC, Chandra S, et al. Near-infrared - II (NIR - II) bioimaging via off - peak NIR - II fluorescence emission[J]. Theranostics, 2018, 8:4141-4151.

- [5] Zhu DL, Qin YS, Wang JJ, et al. Novel glypican - 3 - binding peptide for in vivo hepatocellular carcinoma fluorescent imaging [J]. Bioconjug Chem, 2016, 27:831-839.
- [6] 李 雁, 汤钊猷, 叶胜龙, 等. 不同转移潜能人肝癌单克隆细胞株的分离和建立[J]. 中华肝胆外科杂志, 2001, 7:681-685.
- [7] 马婧崧, 颜志平. 肝癌介入治疗进一步思考[J]. 介入放射学杂志, 2019, 28:507-510.
- [8] Hu ZH, Fang C, Li B, et al. First-in-human liver-tumour surgery guided by multispectral fluorescence imaging in the visible and near-infrared-I/II windows[J]. Nat Biomed Eng, 2020, 4:259-271
- [9] Cai MS, Zhang ZY, Shi XJ, et al. NIR - II/NIR - I fluorescence molecular tomography of heterogeneous mice based on gaussian weighted neighborhood fused lasso method [J]. IEEE Trans Med Imaging, 2020, 39:2213-2222
- [10] Li N, Wei LW, Liu XY, et al. A frizzled - like cysteine - rich domain in glypican - 3 mediates Wnt binding and regulates hepatocellular carcinoma tumor growth in mice [J]. Hepatology, 2019, 70:1231-1245.
- (收稿日期:2019-12-12)  
(本文编辑:边 佶)

欢迎投稿 欢迎订窗 欢迎刊登广告

《Journal of Interventional Medicine》

网址: [www.keaipublishing.com/JIM](http://www.keaipublishing.com/JIM)

邮箱: [j\\_intervent\\_med.@163.com](mailto:j_intervent_med.@163.com)