

氧化石墨烯介导的光热免疫疗法 治疗转移性小鼠乳腺肿瘤*

李 勇^{1,2)} 周非凡^{2)**} 陈 伟²⁾⁽¹⁾ 天津医科大学肿瘤医院, 介入肿瘤治疗科, 天津市肿瘤防治重点实验室, 天津 300060;⁽²⁾ Biophotonics Research Laboratory, Center for Interdisciplinary Biomedical Education and Research, College of Mathematics and Science, University of Central Oklahoma, Edmond, Oklahoma 73034, USA)

摘要 本研究分别从细胞层面和在体层面, 研究纳米氧化石墨烯(nano graphene oxide, NGO)联合 805 nm 近红外激光对于肿瘤的杀伤和免疫刺激作用。细胞实验证实 NGO 具有良好的光热转换效应, 联合激光治疗, 能够有效杀伤肿瘤细胞。此外, NGO 能够刺激巨噬细胞产生 IL-6 及 TNF α , 并增强激光杀伤的肿瘤细胞对巨噬细胞的免疫刺激效应。在体实验中, 在小鼠背部不同位置使用同一瘤株种植两个瘤块, 模拟局部原发肿瘤和转移瘤。实验结果表明, NGO 联合激光治疗可以有效消融局部肿瘤, 并且, 未治疗的远隔部位肿瘤生长速度也显著降低。说明 NGO 联合激光治疗的方式在局部杀伤原位肿瘤的同时, 可能诱发了机体的抗肿瘤免疫反应, 从而达到了抑制远隔肿瘤生长的效果。

关键词 纳米氧化石墨烯, 光热治疗, 肿瘤, 免疫

学科分类号 R73-36, O439

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0329

恶性肿瘤死亡率极高, 且近年来发病率呈现出逐渐增高的总体趋势, 已经成为现代社会人类健康的重大威胁^[1]。出现转移的恶性肿瘤患者失去外科手术机会, 传统的放疗或化疗手段常不能达到有效的治疗目的, 且伴随较为严重的副反应^[2]。因此, 寻找和探索更加安全、有效且副作用低的治疗方案, 具有十分重要的临床价值。

利用激光作为热源, 对恶性肿瘤进行热杀伤治疗的方法, 是一种新型的肿瘤治疗手段, 受到国内外越来越多的关注。激光热疗常使用组织穿透性较好的近红外波段, 但光热效果仍不理想。因此, 有研究者针对激光热疗的这一局限性, 提出联合使用光吸收材料, 增强激光的光热转换效率, 提高肿瘤局部热损伤, 从而达到更好的肿瘤杀伤效果^[3-4]。

氧化石墨烯(graphene oxide, GO)具有特殊的理化及生物学特性, 已在生物医学领域得到广泛应用^[5]。氧化石墨烯携带氧化功能基团, 令其在水溶液中具有更好的分散性, 此外, 氧化石墨烯的细胞毒性极低, 生产成本不高。以上这些特点, 使得氧化石墨烯被认为是理想的高生物相容性材料, 而应

用于相关领域的研究中^[6-7]。研究发现, 氧化石墨烯还具有较高的光热转换能力, 特别是在近红外光波长区域, 对光产生较强的吸收和热转换效应, 产生的过高热能够直接杀伤肿瘤细胞^[8]。最新研究报告, 氧化石墨烯能够有效刺激免疫细胞活化, 诱发机体的免疫反应, 并且聚乙烯醇化的氧化石墨烯能够显著增强这种免疫刺激效应^[9]。

恶性肿瘤的产生与发展过程, 与机体免疫功能的变化有着密不可分的联系。而热治疗的效果不仅仅局限于高温对肿瘤组织的局部杀伤或与放化疗等传统治疗的协同效果^[10-12], 热治疗本身还可能刺激机体免疫系统, 联合使用免疫佐剂, 还可以诱发特异性的抗肿瘤免疫反应, 有效抑制远端转移瘤^[13-15]。

本研究使用氧化石墨烯联合 805 nm 近红外激

* 美国国家卫生研究院(RS20132225-106, 国家研究资源中心的 INBRE 项目)和俄克拉荷马州科学技术促进中心(HR16-085)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 14059745198, E-mail: fzhou2@uco.edu

收稿日期: 2017-08-05, 接受日期: 2017-10-30

光治疗, 观察其在肿瘤治疗中的作用.

1 材料与方法

1.1 氧化石墨烯的制备

1 g 石墨烯(XFNANO, China)加入 23 ml 98% 的 H_2SO_4 混合 8 h. 保持温度 $< 20^\circ\text{C}$, 缓慢加入 KMnO_4 (3 g). 混合后在 $35^\circ\text{C} \sim 40^\circ\text{C}$ 下搅拌 30 min, 在 $65^\circ\text{C} \sim 80^\circ\text{C}$ 下搅拌 45 min. 然后加入 46 ml 水, 100°C 加热混合物 30 min. 加入 140 ml 蒸馏水和 10 ml 30% H_2O_2 溶液中止反应. 依次使用 5% 的 HCl 水溶液和蒸馏水反复地离心和过滤清洗混合物.

1.2 纳米氧化石墨烯(nano graphene oxide, NGO)的制备和表征检测

10 ml (1 g/L) 的氧化石墨烯溶液中加入 1.2 g NaOH . 溶解 3 h 后, 加入盐酸, 直到 pH 值下降到 1. 用水冲洗 3 次, 浓度控制为 1 g/L. 溶液中加入氨基化六支链乙二醇(6PEG- NH_2), 浓度为 2 g/L, 超声粉碎 5 min. 加入 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC, Sigma-Aldrich, USA) 1 mmol, 超声粉碎 1 h. 之后使用 2 倍的磷酸盐缓冲液, 以 12 000 r/min 的速度将氧化石墨烯溶液离心分离, 去除聚合体和多层的石墨烯. 离心分离和清洗 8 次后, 在 100 kDa MWCO 离心过滤器(微孔)中过滤, 获得本研究所使用的经氨基化六支链乙二醇处理的 NGO. 使用紫外可见近红外分光光度计检测 NGO 在 600~1 100 nm 的吸收光谱, 测量峰宽为 5 nm, 测量速度为 200 nm/min. 使用原子力显微镜及动态光散射仪检测纳米石墨烯的形态和尺寸特征.

1.3 NGO 溶液的光热性能检测

在 300 μl 的 EP 管中分别加入 100 μl 浓度为 40 mg/L 的 NGO 溶液, 使用 805 nm 激光器, 在 $0.5 \sim 2.5 \text{ W/cm}^2$ 不同功率下照射 5 min, 使用红外热成像仪记录温度(间隔 30 s). 在 300 μl 的 EP 管中分别加入 100 μl 不同浓度 NGO 溶液(0~80 mg/L), 在 805 nm 激光器功率为 2 W/cm^2 条件下进行照射 5 min, 并使用红外热成像仪记录温度(间隔 30 s).

1.4 细胞培养

小鼠乳腺癌细胞 4T1(ATCC, USA)以含 10% 胎牛血清(ATCC, USA)的 RPMI1640 培养基(GIBCO, USA), 在 37°C 含 5% CO_2 的培养箱内培养. 小鼠巨噬细胞 RAW264.7(ATCC, USA)以含 10% 胎牛血清(ATCC, USA)的 DMEM 培养基

(GIBCO, USA), 在 37°C 含 5% CO_2 的培养箱内培养.

1.5 细胞杀伤实验

在 4T1 细胞中分别加入不同浓度的 NGO 溶液, 在不同剂量近红外激光下照射 5 min, 24 h 后检测肿瘤细胞的存活率. 细胞活性检测: 每孔加入 10 μl 的 MTS(Promega, USA)继续培养 2 h 后, 用酶标仪检测 490 nm 处各孔的吸光度(A)值. 以实验平行的单纯培养液的空白孔调零, 记录 A 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:

$$\text{存活率} = (\text{实验组 A 值} - \text{本底 A 值}) / (\text{空白组 A 值} - \text{本底 A 值}) \times 100\%$$

细胞死亡检测: 处理后的细胞进行 FITC-AnnexinV/7AAD(Millipore, Germany)双染, 之后通过流式细胞技术, 分析肿瘤细胞的杀伤效果.

1.6 酶联免疫吸附检测(ELISA)分析

在巨噬细胞 RAW264.7(2×10^5)中分别加入不同浓度的 NGO, 24 h 后使用 ELISA 法检测细胞上清液中 IL-6 及 $\text{TNF}\alpha$ (R&D, USA)的浓度. 4T1(2×10^5)细胞分为三组进行不同处理: 空白对照组、805 nm 激光(2 W/cm^2 , 5 min)组、805 nm 激光(2 W/cm^2 , 5 min)联合 40 mg/L NGO 组. 将处理过的肿瘤细胞分别与巨噬细胞(2×10^5)共培养, 24 h 后用 ELISA 法检测细胞上清液中 IL-6 及 $\text{TNF}\alpha$ 的浓度.

1.7 肿瘤治疗

使用雌性 Balb/C 小鼠, 清洁级, 鼠龄 6~8 周. 于小鼠背部两侧同时种植小鼠 4T1 乳腺癌细胞, 肿瘤体积长至约 100 mm^3 时治疗左侧肿瘤. 激光治疗组使用 805 nm 近红外激光(2 W/cm^2 , 5 min), 激光+NGO 组局部注射 NGO (1 mg/kg), 6 h 后照射 805 nm 激光(2 W/cm^2 , 5 min), 利用红外热成像仪记录治疗过程中肿瘤表面温度. 治疗后观察左右两侧肿瘤体积变化. 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.

2 结 果

2.1 NGO 物理学特性分析

石墨烯是以 sp^2 混成轨域呈蜂巢晶格(honeycomb crystal lattice)排列构成的单原子层的二维晶体纳米材料. 分光光度计检测结果表明, NGO 在 600~1 100 nm 之间形成了吸收曲线, 证明在这个波长区间内 NGO 存在着光吸收能力(图 1).

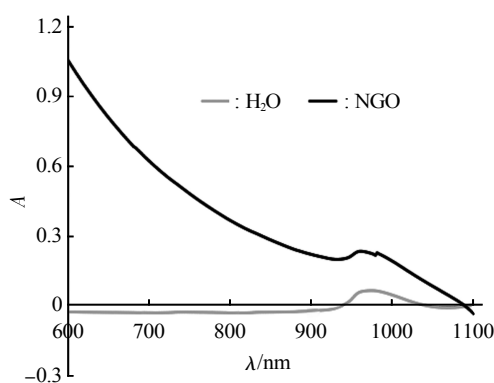


Fig. 1 Absorption spectra of NGO

为了进一步了解 NGO 的形态特征及尺寸, 我们使用原子力显微镜及动态光散射仪对 NGO 进行检测. 原子力显微镜结果显示, NGO 呈现片状, 分散结构, 如图 2a. 动态光散射结果显示 NGO 的直径范围在 40~60 nm 出现最大峰值, 并且在 200~400 nm 出现另一个较低的峰值, 如图 2b.

2.2 NGO 光热转换效应分析

为了进一步证实 NGO 的光热转换性能, 我们检测了 NGO 溶液在激光照射下的温度变化. 如图 3a 所示, 相对于水溶液, NGO 溶液的温度在同样光剂量照射下显著升高, 说明 NGO 具有较好的

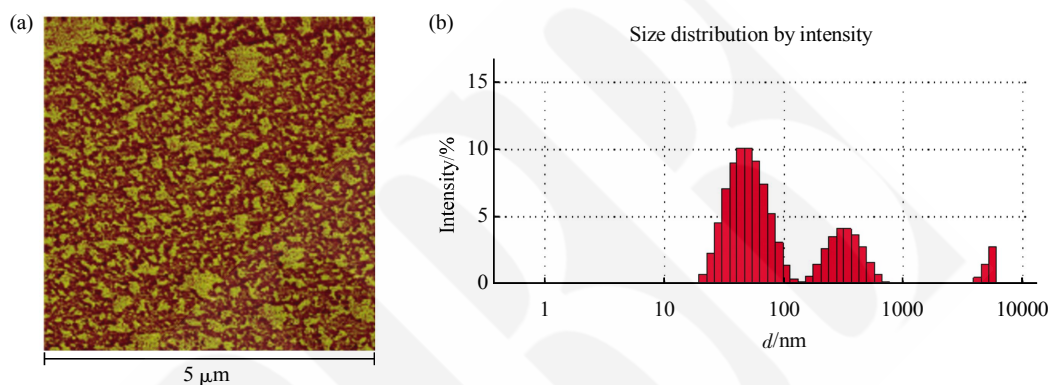


Fig. 2 The morphological characteristics of NGO

(a) The images of NGO detected by atomic force microscope. (b) The size distribution of NGO detected by dynamic light scattering.

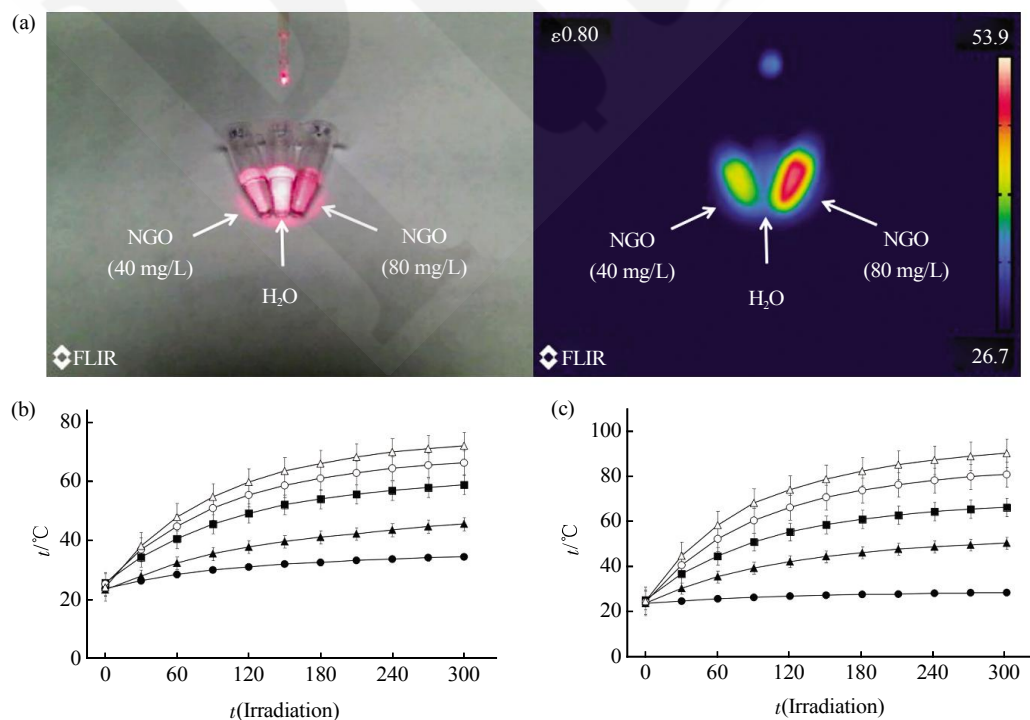


Fig. 3 The photothermal conversion effect of NGO under laser irradiation

(a) A representative thermographic image of NGO solution (40 mg/L, 80 mg/L) and H₂O under laser irradiation (2 W/cm²). (b) Temperature increase of NGO solution (40 mg/L) under laser irradiation with different doses. ●—● : 0.5 W/cm²; ▲—▲ : 1 W/cm²; ■—■ : 1.5 W/cm²; ○—○ : 2 W/cm²; △—△ : 2.5 W/cm². (c) Temperature increase of NGO solution at different concentrations under laser irradiation (2 W/cm²). ●—● : 0 mg/L; ▲—▲ : 20 mg/L; ■—■ : 40 mg/L; ○—○ : 60 mg/L; △—△ : 80 mg/L.

光热转换能力. 进一步分析 NGO 溶液的光热转换效果, 发现同样浓度 NGO 在不同光剂量照射下温度增长程度不同(图 3b), 且同样光剂量照射下, 不同 NGO 浓度也引起不同的温度增长(图 3c). 说明 NGO 的光热转换效果依赖于 NGO 浓度和光剂量.

2.3 光热杀伤效应的细胞学实验

使用不同功率的激光联合 NGO(40 mg/L)处理 4T1 细胞. 结果显示, 伴随着激光功率的升高, 激光联合 NGO 治疗对肿瘤细胞的杀伤效果逐渐增强, 在 2 W/cm^2 的功率下, 达到较大的杀伤效果. 而单纯使用激光治疗, 对肿瘤细胞的杀伤效果均不明显(图 4). 说明单纯的 805 nm 激光照射, 对于肿瘤细胞活性的影响十分有限, 联合 NGO, 能够有效地增强光热转换, 达到细胞杀伤的效果.

在以上实验结果的基础上, 对 4T1 细胞使用功率 2 W/cm^2 的 805 nm 激光照射联合 20 mg/L 及 40 mg/L 两种浓度的 NGO 治疗, 通过流式细胞技术, 分析肿瘤细胞的杀伤效果. 结果显示, 相对于对照组及单纯激光治疗组, 激光联合 NGO 的治疗方式, 能够有效杀伤细胞. 相对于 20 mg/L 浓度的

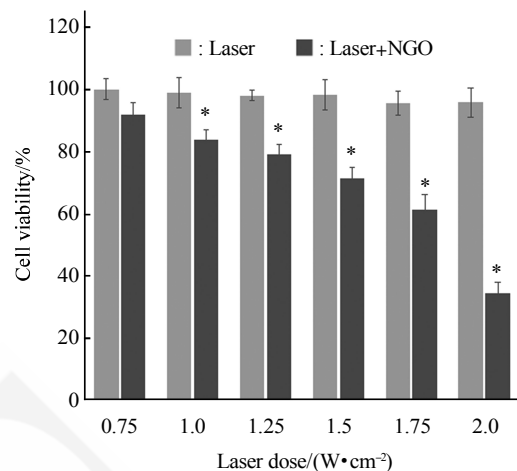


Fig. 4 The cytotoxic effects of NGO combined with laser

The cytotoxicity of NGO(40 mg/L) under laser irradiation with different doses(* $P < 0.05$).

NGO, 40 mg/L 浓度的 NGO 能够获得更好的肿瘤细胞杀伤效果(图 5).

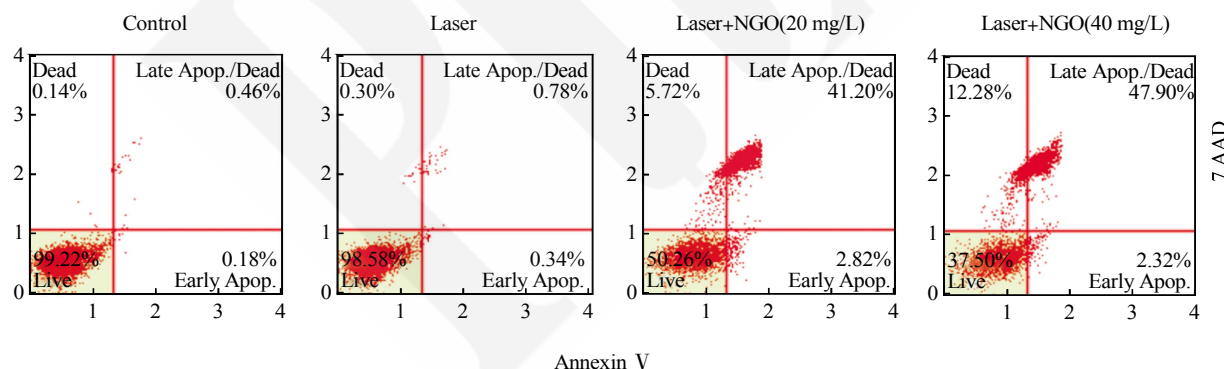


Fig. 5 Cell death analysis under laser irradiation combined with NGO

2.4 NGO 及联合治疗的免疫刺激效应

细胞实验结果显示, 在巨噬细胞溶液中加入不同浓度的 NGO 后, 伴随 NGO 浓度的增高, 免疫相关细胞因子肿瘤坏死因子 α (TNF α) 和白介素 6 (IL-6) 的浓度逐渐升高(图 6a). 结果说明 NGO 具有浓度依赖性的免疫刺激作用.

当我们将不同治疗方式处理过的肿瘤细胞分别与巨噬细胞共培养, 激光联合 NGO 组细胞因子释

放的水平显著高于空白对照组及单纯激光治疗组(激光功率 2 W/cm^2 , NGO 浓度 40 mg/L). 结果说明, 在细胞水平, 激光联合 NGO 的治疗方式, 可以有效地刺激巨噬细胞活化(图 6b).

2.5 原位及远隔部位肿瘤杀伤的在体实验

在肿瘤在体实验中, 与单纯激光治疗组相比, 激光联合 NGO 治疗能够显著增加肿瘤部位温度(图 7).

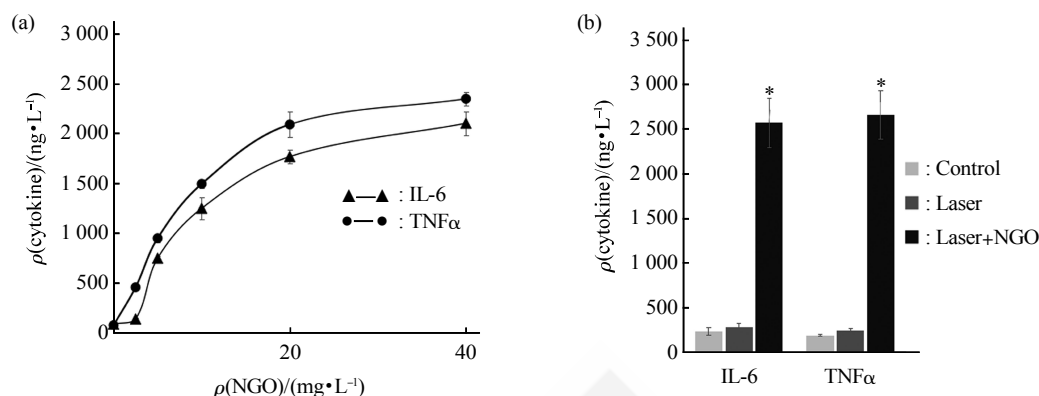


Fig. 6 Cytokines secretion by macrophages stimulated by indicated treatments

(a) Cytokines secretion by macrophages stimulated by NGO at different concentrations. (b) Cytokines secretion by macrophages stimulated by treated tumor cells (* $P < 0.05$) (Laser power: 2 W/cm², NGO concentration: 40 mg/L).

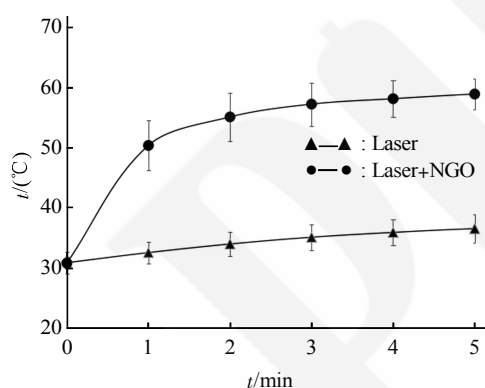


Fig. 7 Temperature increase on the surface of tumor under laser irradiation with or without NGO (Laser: 2 W/cm²×5 min, NGO: 1 mg/kg) (* $P < 0.05$)

如图 8a 所示, 在小鼠背部两侧同时种植肿瘤, 仅治疗左侧肿瘤, 之后观测治疗部位肿瘤生长及右侧未治疗部位肿瘤生长情况. 参考既往相关研究结果, 动物实验治疗使用 NGO 的剂量为 1 mg/kg^[16-17]. 背部左侧肿瘤生长曲线显示, 与空白对照组比较, 激光治疗组轻度抑制了肿瘤的生长, 然而激光联合 NGO 治疗组显著抑制了肿瘤的生长. 从肿瘤生长曲线分析, 3 d 后, 激光联合 NGO 治疗组肿瘤开始缩小, 而对照组及激光治疗组肿瘤体积继续增长. 15 d 时, 激光联合 NGO 治疗组肿瘤基本消除, 而对照组及激光治疗组肿瘤体积达 600 mm³ 以上(图 8b). 结果表明, 激光联合 NGO 能够产生显

著的光热效果, 有效杀伤肿瘤.

背部右侧肿瘤生长曲线显示, 与空白对照组及单激光治疗组比较, 激光联合 NGO 治疗组显著地抑制了肿瘤的生长. 从肿瘤生长曲线分析, 15 d 时, 激光联合 NGO 治疗组肿瘤体积维持于 300 mm³ 左右, 而对照组及激光治疗组肿瘤体积达 500 mm³ 左右(图 8c). 激光联合 NGO 的治疗并未直接作用于小鼠背部右侧肿瘤, 然而背部右侧肿瘤的生长受到明显抑制. 结果表明, 激光联合 NGO 的光热治疗, 可能激发机体的免疫反应, 从而使远隔部位的同种肿瘤生长受到抑制.

3 讨 论

转移性恶性肿瘤在临床上具有难治性高和致死率高的特点^[18-19]. 手术治疗方式常常不适用于伴有远隔部位转移的晚期肿瘤患者. 放疗和化疗等传统治疗方式, 又由于副反应高, 患者不耐受等原因, 在临床使用中受到很多限制^[20-21]. 因此, 寻找新的、低毒、高效、并能对转移性肿瘤同时产生治疗效果的新治疗策略, 对于晚期肿瘤的治疗具有重要的意义.

NGO 具有良好的光热转换效应, 联合激光治疗, 能够有效产生过热效果, 从而达到肿瘤杀伤的目的^[22]. 光热杀伤细胞实验结果表明, 在 NGO 联合激光治疗策略中, 对于激光功率和 NGO 浓度都存在着剂量依赖效应: 伴随着激光功率和 NGO 浓度的增高, 肿瘤细胞的杀伤效应也得到显著提高.

并且我们在细胞实验中观察到, NGO 溶液可

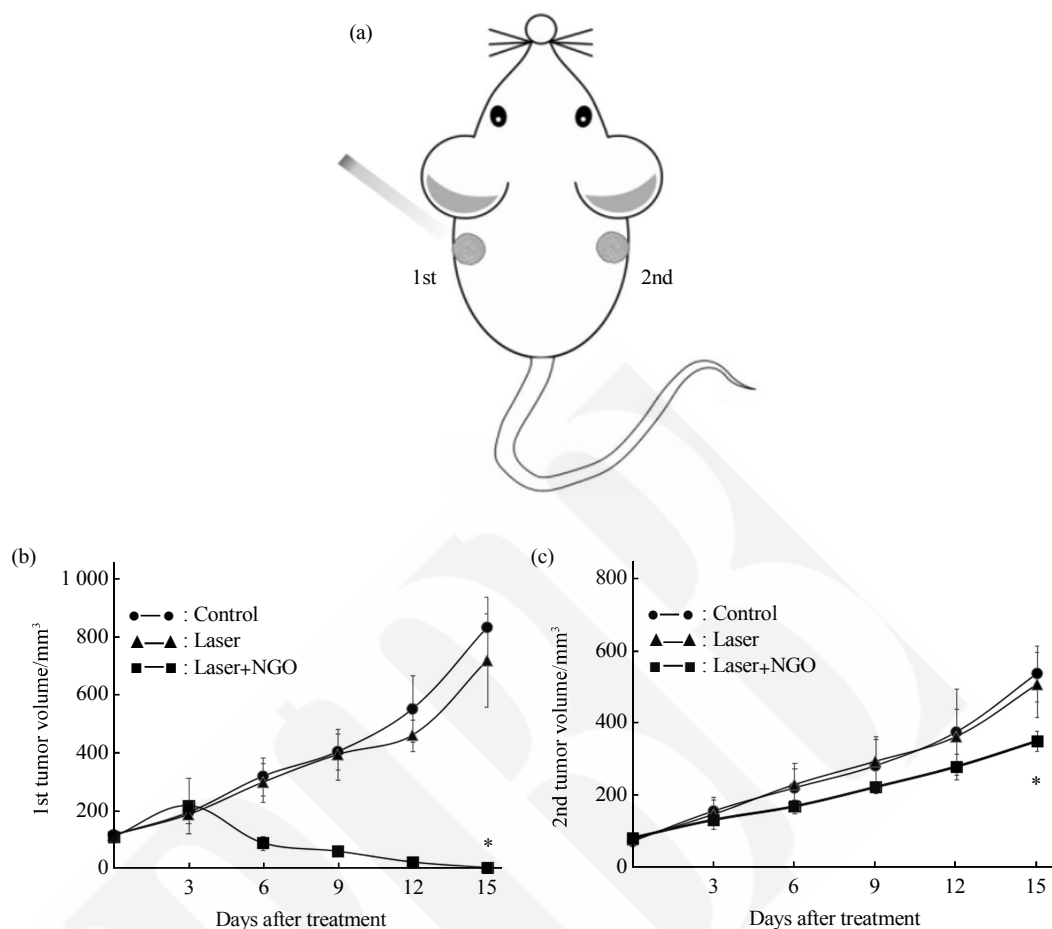


Fig. 8 Volume of tumors under different treatments

(a) Diagram of the tumor-bearing animal model. (b) Volume of the 1st tumor treated under indicated treatments (* $P < 0.05$) (Laser: 2 W/cm² × 5 min, NGO: 1 mg/kg). (c) Volume of the untreated 2nd tumor after the treatment on the 1st tumor (* $P < 0.05$).

以有效地刺激巨噬细胞产生 IL-6 及 TNF α 。巨噬细胞参与先天性和适应性免疫反应，如作为吞噬细胞，抗原呈递细胞和延迟型超敏反应的效应细胞^[23]。本研究所使用的 RAW264.7 是一种永生化的巨噬细胞，由于表征稳定，被广泛应用于体外的巨噬细胞研究^[24-25]。IL-6 及 TNF α 是免疫细胞控制和影响癌细胞增殖能力的重要细胞因子，因此被作为研究抗肿瘤免疫反应的常用指标^[26-27]。相比于对照组及单纯使用激光组，NGO 联合激光治疗方法可以有效地促进巨噬细胞产生 IL-6 及 TNF α 。这些细胞因子是巨噬细胞抗肿瘤型分化的特征性因子，因此提示 NGO 联合激光治疗方法可以有效地刺激抗肿瘤免疫反应的产生^[28-30]。

在体实验表明，相对于单纯使用激光治疗，NGO 联合激光的治疗方式能够形成更理想的光热

反应，产生更高的热效应，有效地损伤肿瘤组织。另外，在 NGO 联合激光治疗组中，虽然远隔部位的肿瘤从未接受过任何局部治疗，但其生长速度却显著低于对照组及单纯激光治疗组。结合细胞学实验结果，我们可以推论：NGO 联合激光治疗的方式在局部杀伤原位肿瘤的同时，可能诱发了机体的抗肿瘤免疫反应，从而达到了抑制远隔部位肿瘤生长速度的效果。但这一过程是否真正合并了具有治疗意义的抗肿瘤免疫反应，以及产生了哪一类别的免疫反应，还需要进一步的研究加以证实。

参 考 文 献

- [1] Torre L A, Bray F, Siegel R L, *et al.* Global cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin, 2015, **65**(2): 87-108
- [2] Fidler I J, Kripke M L. The challenge of targeting metastasis.

- Cancer Metastasis Rev, 2015, **34**(4): 635–641
- [3] Chen W R, Adams R L, Bartels K E, *et al.* Chromophore-enhanced *in vivo* tumor cell destruction using an 808-nm diode laser. *Cancer Lett*, 1995, **94**(2): 125–131
- [4] Chen W R, Adams R L, Higgins A K, *et al.* Photothermal effects on murine mammary tumors using indocyanine green and an 808-nm diode laser: an *in vivo* efficacy study. *Cancer Lett*, 1996, **98**(2): 169–173
- [5] Geim A K, Novoselov K S. The rise of graphene. *Nat Mater*, 2007, **6**(3): 183–191
- [6] Bitounis D, Ali-Boucetta H, Hong B H, *et al.* Prospects and challenges of graphene in biomedical applications. *Adv Mater*, 2013, **25**(16): 2258–2268
- [7] Zhou X, Liang F. Application of graphene/graphene oxide in biomedicine and biotechnology. *Curr Med Chem*, 2014, **21** (7): 855–869
- [8] Yang K, Zhang S, Zhang G, *et al.* Graphene in mice: ultrahigh *in vivo* tumor uptake and efficient photothermal therapy. *Nano Lett*, 2010, **10**(9): 3318–3323
- [9] Luo N, Weber J K, Wang S, *et al.* PEGylated graphene oxide elicits strong immunological responses despite surface passivation. *Nat Commun*, 2017, **24**(8): 14537–14547
- [10] Takemoto M, Kuroda M, Urano M, *et al.* The effect of various chemotherapeutic agents given with mild hyperthermia on different types of tumours. *Int J Hyperthermia*, 2003, **19**(2): 193–203
- [11] Wen Q L, He L J, Ren P R, *et al.* Comparing radiotherapy with or without intracavitary hyperthermia in the treatment of primary nasopharyngeal carcinoma: a retrospective analysis. *Tumori*, 2014, **100**(1): 49–54
- [12] Hainfeld J F, Lin L, Slatkin D N, *et al.* Gold nanoparticle hyperthermia reduces radiotherapy dose. *Nanomedicine*, 2014, **10**(8): 1609–1617
- [13] Zhou F, Li X, Naylor M F, *et al.* InCVAX—a novel strategy for treatment of late-stage, metastatic cancers through photoimmunotherapy induced tumor-specific immunity. *Cancer Lett*, 2015, **359**(2): 169–177
- [14] Chen W R, Liu H, Ritchey J W, *et al.* Effect of different components of laser immunotherapy in treatment of metastatic tumors in rats. *Cancer Res*, 2002, **62**(15): 4295–4299
- [15] Yeung H Y, Lo P C, Ng D K, *et al.* Anti-tumor immunity of BAM-SiPc-mediated vascular photodynamic therapy in a BALB/c mouse model. *Cell Mol Immunol*, 2017, **14**(2): 223–234
- [16] Kalluru P, Vankayala R, Chiang C S, *et al.* Nano-graphene oxide-mediated *In vivo* fluorescence imaging and bimodal photodynamic and photothermal destruction of tumors. *Biomaterials*, 2016, **95**(16): 1–10
- [17] Yang K, Gong H, Shi X, *et al.* *In vivo* biodistribution and toxicology of functionalized nano-graphene oxide in mice after oral and intraperitoneal administration. *Biomaterials*, 2013, **34** (11): 2787–2795
- [18] Chambers A F, Werb Z. Invasion and metastasis—recent advances and future challenges. *J Mol Med (Berl)*, 2015, **93** (4): 361–368
- [19] Scully O J, Bay B H, Yip G, *et al.* Breast cancer metastasis. *Cancer Genomics Proteomics*, 2012, **9**(5): 311–320
- [20] Pedersen B, Koktved D P, Nielsen L L. Living with side effects from cancer treatment—a challenge to target information. *Scand J Caring Sci*, 2013, **27**(3): 715–723
- [21] Skiba-Tatarska M, Kusa-Podkańska M, Surtel A, *et al.* The side-effects of head and neck tumors radiotherapy. *Pol Merkuri Lekarski*, 2016, **41**(241): 47–49
- [22] Sahu A, Choi W I, Lee J H, *et al.* Graphene oxide mediated delivery of methylene blue for combined photodynamic and photothermal therapy. *Biomaterials*, 2013, **34**(26): 6239–6248
- [23] De Santis M, Locati M, Selmi C. The elegance of a macrophage. *Cell Mol Immunol*, 2017[Epub ahead of print](DOI: 10.1038/cmi.2017.64)
- [24] Cheng X L, Ding F, Li H, *et al.* Activation of AMPA receptor promotes TNF- α release via the ROS-cSrc-NF κ B signaling cascade in RAW264.7 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, **461**(2): 275–280
- [25] Lu C L, Zhu W, Wang D M, *et al.* Inhibitory effects of chemical compounds isolated from the rhizome of *Smilax glabra* on nitric oxide and tumor necrosis factor- α production in lipopolysaccharide-induced RAW264.7 cell. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 602425
- [26] Tripsianis G, Papadopoulou E, Anagnostopoulos K, *et al.* Coexpression of IL-6 and TNF- α : prognostic significance on breast cancer outcome. *Neoplasma*, 2014, **61**(2): 205–212
- [27] De Simone V, Franzè E, Ronchetti G, *et al.* Th17-type cytokines, IL-6 and TNF- α synergistically activate STAT3 and NF- κ B to promote colorectal cancer cell growth. *Oncogene*, 2015, **34** (27): 3493–3503
- [28] Feito M J, Vila M, Matesanz M C, *et al.* *In vitro* evaluation of graphene oxide nanosheets on immune function. *J Colloid Interface Sci*, 2014, **432**(15): 221–228
- [29] Chen X M, Song E W. The role of tumor microenvironment in cancer immunotherapy. *Prog Biochem Biophys*, 2017, **44** (8): 641–648
- [30] Chen Y F, Hong J, Shen J J, *et al.* Progress on clinical immunotherapy of malignant tumor. *Prog Biochem Biophys*, 2017, **44**(8): 709–716

Photothermal-immunotherapy for Metastatic Breast Tumor in Mice Using Graphene Oxide*

LI Yong^{1,2)}, ZHOU Fei-Fan^{2)**}, CHEN Wei R.²⁾

⁽¹⁾ Interventional Therapy Department, Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy,
Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060, China;

²⁾ Biophotonics Research Laboratory, Center for Interdisciplinary Biomedical Education and Research,
College of Mathematics and Science, University of Central Oklahoma, Edmond, Oklahoma 73034, USA)

Abstract The tumor killing and immune stimulation effects of photothermal therapy using nano graphene oxide (NGO) were studied *in vitro* and *in vivo*. For *in vitro* study, NGO showed a good photothermal conversion effect, increasing temperature under laser irradiation to destroy tumor cells. In addition, NGO could effectively stimulate the production of IL-6 and TNF α by macrophages and enhance the immune response of macrophages to laser-treated tumor cells. For *in vivo* study, two tumors were inoculated on both sides of the back of mice, serving as the local primary tumor and surrogate distal metastatic tumor. The results showed that the treatment of NGO combined with laser could effectively ablate the treated primary tumor, and inhibit the growth of untreated distal tumor. It suggested that the treatment of NGO combined with laser therapy could stimulate the anti-tumor immune response of the body to attack distal metastases.

Key words nano graphene oxide, photothermal therapy, tumor, immune

DOI: 10.16476/j.pibb.2017.0329

*This work was supported by grants from the US National Institutes of Health (RS20132225-106 from the INBRE Program of the National Center for Research Resources) and the Oklahoma Center for Advancement of Science and Technology (HR16-085).

**Corresponding author.

Tel: 86-14059745198, E-mail: fzhou2@uco.edu

Received: August 5, 2017 Accepted: October 30, 2017