

• 论 著 •

量子点荧光标志结肠癌细胞及其在组织芯片中的应用价值^{*}何凤屏¹, 徐 新¹, 吴青松¹, 李定云¹, 马占忠¹, 郭艳乐¹, 唐 盛², 尹卫东², 龚海涛², 刘 艺², 林恒先²

(1. 汕头大学医学院附属粤北人民医院, 广东汕头 512026; 2. 广东省深圳市迈科龙生物技术有限公司 518057)

摘 要:目的 探讨新的分子荧光标志量子点(QDs)在结肠癌组织芯片上进行不同蛋白的检测及评价其临床作用。方法 在结肠癌组织芯片上,利用 QDs 标志的链霉亲和素复合物(QDs-SA)能与生物素化二抗 IgG 荧光结合特点进行免疫荧光组织化学检测 K-ras、MXRA5 蛋白表达,评价其在蛋白定位情况。**结果** 观察到 K-ras、MXRA5 蛋白在结直肠癌组织呈高表达,并定位于结肠癌细胞的细胞膜和胞核。**结论** QDs 具有很好的荧光作用,能与抗体紧密结合。采用链霉亲和素修饰的 QDs,能够准确地检测结肠癌组织芯片上不同蛋白的定位,可为结肠癌体内和体外临床诊断提供新方法。

关键词:量子点荧光标志; 结肠癌; K-ras 蛋白; MXRA5 蛋白**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2016.18.010**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2016)18-2531-03Application of quantum dots immune fluorescent labelling in colorectal cancer tissues^{*}HE Fengping¹, XU Xin¹, WU Qingsong¹, LI Dingyun¹, MA Zhanzhong¹, GUO Yanle¹,TANG Sheng², YIN Weidong², GONG Haitao², LIU Yi², LIN Hengxian²

(1. Affiliated Yuebei People's Hospital of the Shantou University, Yuebei, Guangdong 512026, China;

2. Shenzhen Microprofit Biological Technology co., LTD, Shengzhen, Guangdong 518057, China)

Abstract: **Objective** To investigate different antigens detected by a novel labelled reagent-quantum dots(QDs) in the colorectal cancer tissues microarray(TMA). **Methods** Depend on QDs streptavidin conjugate(QDs-SA) combined specially with biotinylation IgG, immune of luorescent histochemistry was utilized to examine expression of K-ras, matrix-remodeling associated 5(MXRA5) proteins in the colorectal cancer TMA, where the protein accurate location was observed. **Results** K-ras, matrix-remodeling associated 5(MXRA5) proteins were high expressed in colorectal cancer tissue and located accurately in the cell membrane and nucleus of colorectal cancer cells, respectively. **Conclusion** QDs exhibit excellent photostability, broad emission spectrum and long fluorescence lifetime. Modified with streptavidin could accurately detect different protein locations in the colorectal cancer TMA. This is a novel approach for studying targeted imaging of colorectal cancer in vivo and vitro clinical diagnosis.

Key words: quantum dots fluorescent labelled; K-ras; MXRA5; colorectal cancer

近年来,量子点由于其生物特性在体内和体外的生物成像中优异的光学性质,已受到人们的高度重视^[1-2]。但是,目前在传统的免疫荧光分析技术中,有机荧光标志是生物标志常用的探针,并在临床上得到广泛的应用。然而,有机荧光基团自身存在一些固有的缺陷,如荧光稳定性差、易光漂白、发射谱峰拖尾等,这些都使其应用受到限制。近年来,量子点在医学领域应用其荧光标志并取得令人满意的效果^[3-4]。本文将量子点的分子标志技术在结肠癌组织芯片上进行应用,以及检测 K-ras、MXRA5 的抗原结肠癌组织表达及分析,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 结肠癌组织芯片相关资料 2 块芯片为 12×8 点阵,每点直径 1.5 mm,4 μm 厚,购自美国 Pantomics 公司。组织芯片内包括 60 例结肠癌,7 例结肠炎和 5 例健康人的结肠组织,每例组织均有 2 点。所有组织均来自临床外科切除标本,经 10% 中性缓冲甲醛固定 24 h。其中男性 34 例,女性 26 例;腺癌 55 例,黏液癌 5 例。炎性病变 7 例,正常结肠组织 5 例。

1.2 试剂 鼠抗人 K-ras、MXRA5 单克隆抗体(即用型)和生物素化抗鼠 IgG 均购自上海一研生物科技有限公司。分子荧

光标志量子点(QDs)标志的链霉亲和素复合物(QDs-SA)检测试剂盒购自武汉珈源量子点技术开发有限责任公司。

1.3 QDs-SA 检测 K-ras、MXRA5 的蛋白表达 根据试剂盒说明书进行操作。4 μm 厚结肠癌组织芯片脱蜡、水化、微波抗原修复、TBS 洗涤,封闭缓冲液 37 ℃ 湿盒孵育 30 min;滴加 K-ras、MXRA5 抗体,37 ℃ 孵育 2 h, TBS-T 漂洗 3 min/次×3 次,封闭缓冲液 37 ℃ 湿盒孵育 10 min;滴加生物素化抗鼠 IgG,37 ℃ 湿盒孵育 30 min, TBS-T 漂洗 3 min/次×3 次,封闭缓冲液 37 ℃ 湿盒孵育 10 min;滴加用封闭缓冲液稀释的 QDs-SA(1:100)37 ℃ 湿盒孵育 60 min, TBS-T 漂洗 3 min/次×3 次,滴加甘油封片。上荧光显微镜用不同波长激发 QDs,以细胞内出现绿色荧光颗粒为阳性, TBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照,整个试验过程均不需要避光。

2 结 果

2.1 QDs-SA 检测 K-ras 的蛋白表达 在荧光显微镜下(紫外光激发)均可以清楚地见到结肠组织中有 QDs 标志的部位发绿色荧光,显示 K-ras 蛋白存在部位,背景很干净,表明没有非特异性结合。在正常结肠组织中 K-ras 蛋白存在于黏膜细胞,

^{*} 基金项目:广东省重大科技专项基金资助项目(2013A022100011)。

作者简介:何凤屏,女,主任技师,主要从事肿瘤分子诊断的研究。

可见 QDs 标志的部位发绿色荧光;在结肠组织的癌细胞的胞膜内有 K-ras 蛋白阳性表达,可见 QDs 标志的部位发红色荧光;在结肠组织的腺瘤细胞的胞膜内有 K-ras 蛋白阳性表达,可见 QDs 标志的部位发紫红色荧光。

2.2 QDs-SA 检测 MXRA5 的蛋白表达 在荧光显微镜下(紫外光激发)均可以清楚地见到结肠组织中有 QDs 标志的部位发绿色荧光,显示 MXRA5 蛋白存在部位,背景很干净,表明没有非特异性结合。在荧光显微镜下可以清楚地看见在正常结肠组织中 MXRA5 蛋白存在于黏膜细胞,可见 QDs 标志的部位发绿色荧光;在结肠组织的癌细胞的胞膜内有 MXRA5 蛋白阳性表达,可见 QDs 标志的部位发红色荧光;在结肠组织的腺瘤细胞的胞膜内有 MXRA5 蛋白阳性表达,可见 QDs 标志的部位发紫红色荧光。

3 讨 论

量子点是一类直径小于 100 nm 的半导体纳米晶粒,是 1 种新型及很有潜力的荧光标志物。量子点标志探针广泛应用于肿瘤的体内外研究,尤其是肿瘤靶向成像、前哨淋巴结成像、肿瘤示踪、肿瘤细胞及亚细胞结构成像及肿瘤标志物检测等。量子点纳米标志荧光不仅能特异性靶向肿瘤部位,还能通过荧光强弱反映出其活跃程度,可应用于肿瘤的早期诊断和监测疗效^[1-4]。

QDs 最显著的光学特性是激发光谱宽、发射光谱窄而对称、荧光寿命长、抗漂白能力强、stokes 位移大、摩尔消光系数大。相对于传统常用的有机荧光染料,QDs 作为生物荧光标志具有如下的优势:(1)多色性,由于 QDs 的激发光谱宽、发射光谱窄而强,一个光源能同时激发不同荧光的 QDs,所以可以选用不同粒径或组成的 QDs,实现多通路生物分子标志,且各种荧光标志之间相互干扰小。从本研究可以看出,紫外光、蓝光激发在荧光显微镜下均可以清楚地见到结肠组织中有 QDs 标志的部位发绿色的光。此外,QDs 的荧光发射光谱窄且对称,光谱之间不重合或很少重合,用其做标志物可显著提高分析方法的灵敏度和分辨率。QDs 的发射光是有机荧光染料的 20~100 倍,稳定性强 100~1 000 倍,可以经受反复多次激发,不像有机荧光染料的荧光容易淬灭^[5]。(2)QDs 的抗漂白能力强,稳定性好,摩尔消光系数大,显示出更高的荧光强度,可在活细胞内态、实时示踪分子转运、信号转导等。(3)背景干扰小,QDs 的 stokes 位移大、荧光寿命长,从而使所发射的荧光能从背景荧光中脱颖而出。(4)生物相容性好:经适当的生物修饰后,QDs 生物相容性好,适于活体或细胞研究。同时,QDs 与生物大分子的耦联方法和方式比较简单,例如化学键和静电力进行耦联等,而传统标志试剂,每种试剂均需要特定的耦联方法。本文采用链霉亲和素-生物素系统的非共价耦联的方式结合,将生物素化抗体与链霉亲和素标志 QDs 非共价耦联。其特点是操作简单易行,耦联反应的特异性强,耦联效率高,产物的稳定性好,可实现高灵敏度检测^[6-7]。

结直肠癌是常见的恶性肿瘤之一,在我国发病率呈逐年上升趋势。早期诊断和治疗是提高结直肠癌治愈率的关键。通过从分子水平对肿瘤标志物的高灵敏度检测,有助于对肿瘤的诊断、治疗及预后判断^[6-8]。K-ras 和 MXRA5 是在结直肠癌细胞表面表达的 1 种肿瘤相关抗原。有研究表明,K-ras 和 MXRA5 是在结直肠癌组织呈高水平的表达,在正常组织表达

很低或不表达,对其检测有助于对结直肠癌的早期诊断^[9-10]。本文将生物素化抗体与链霉亲和素标志 QDs 非共价耦联,成功制备可以特异性检测结直肠癌细胞表面表达的 QDs 标志 K-ras 和 QDs 标志 MXRA5 的荧光探针,可以观察到结肠癌细胞表面的荧光图像。同时,免疫荧光标志也显示,QDs 非共价耦联后,K-ras 和 MXRA5 抗体仍具有与细胞表达的抗原特异性结合的活性。结果表明,将 QDs 和单克隆抗体(K-ras、MXRA5)非共价耦联后制备的荧光探针,能够很好应用于结肠癌细胞特异的免疫荧光成像分析。

Jaiswal 等^[11]比较早使用结合亲和素的 QDs 标志肿瘤细胞。他们利用细胞摄取 QDs 和 QDs 结合抗体标志细胞表面蛋白来使活细胞成像,结果发现采用壳-核型 QDs 标志多种细胞,可在长达 12 d 过程中不影响细胞的生长和发育,开创了简单、易行的非基因工程方法来研究肿瘤细胞的生物学行为。目前,对肿瘤细胞及亚细胞结构成像,使用最多的方法仍以 QDs 标志抗体与肿瘤细胞表达的特异性抗原结合,如细胞结构、肿瘤标志物、特殊受体等^[12-13]。本文通过采用亲和素修饰 QDs,再把需要耦联的抗体生物素化,QDs 很容易与抗体结合,耦联物可用于荧光免疫分析,与传统的有机荧光标志试剂(即一抗或二抗)相比,在临床上的应用更广阔。Jaiswal 等^[11]也有类似的报道。Jaiswal 等^[11]将生物素化的膜糖蛋白(P-gp)特异性抗体作为一抗,与亲和素结合的 QDs 依次与细胞结合,实现了对 P-gp 转染的宫颈癌 HeLa 细胞的表面标志,为活细胞成像研究提供了 1 种新方法。国外学者采用生物素-链霉亲和素的方法将 OD560、QD608、QD630 标志的抗体检测乳腺癌细胞株上 Her2 的表达情况,将乳腺癌细胞 SK-BR-3 细胞与 Her2 抗体孵育,此后,以 QDs 标志 Her2 抗体共孵育后成功在细胞表面标志出该肿瘤标志物 Her2^[14-15]。本文实现了结肠癌组织芯片上进行 K-ras、MXRA5 抗原的检测,蛋白定位准确,背景很干净,因此认为优于免疫组织化学。此外,本方法结合分子生物学和细胞形态学原理,具有成本低、简便快速、信息量大的特点,适合在各级医院的应用。

综上所述,QDs 在肿瘤标志物检测中的应用都是以抗原抗体反应为基础,QDs 经过标志后与抗体紧密结合应用于临床,已显示出广阔的应用前景^[16-17]。无论是体内肿瘤靶向成像,还是体外细胞成像等研究,QDs 荧光标志都是 1 个很好的工具。随着 QDs 制备和标志技术的不断提高,QDs 对肿瘤诊断率和疗效方面的贡献就更大。通过 QDs 标志体系建立 1 个高特异性、高敏感性的肿瘤检测平台,是 QDs 在肿瘤学中应用的 1 个重要方向。

参考文献

- [1] Wang S, Li W, Yuan D, et al. Quantitative detection of the tumor-associated antigen large external antigen in colorectal cancer tissues and cells using quantum dot probe[J]. Int J Nanomedicine, 2016, 11: 235-247.
- [2] Carbary-Ganz JL, Welge WA, Barton JK, et al. In vivo molecular imaging of colorectal cancer using quantum dots targeted to vascular endothelial growth factor receptor 2 and optical coherence tomography/laser-induced fluorescence dual-modality imaging[J]. J Biomed Opt, 2015,

- 20(9):096015.
- [3] Zeng WJ, Peng CW, Yuan JP, et al. Quantum dot-based multiplexed imaging in malignant ascites: a new model for malignant ascites classification[J]. Int J Nanomedicine, 2015, 10:1759-1768.
- [4] Carbary-Ganz JL, Barton JK, Utzinger U. Quantum dots targeted to vascular endothelial growth factor receptor 2 as a contrast agent for the detection of colorectal cancer [J]. J Biomed Opt, 2014, 19(8):086003.
- [5] 王蒯, 方谨. 单克隆抗体 ND-1-量子点荧光探针对大肠癌细胞的特异成像研究[J]. 中国组织化学细胞化学杂志, 2013, 22(3):249-253.
- [6] 王建浩, 李志杰, 邱琳, 等. 基于靶向多肽的量子点探针用于结肠癌肿[J]. 科学通报, 2013, 58(7):556-560.
- [7] Minarikova P, Benesova L, Halkova T, et al. Longitudinal molecular characterization of endoscopic specimens from colorectal lesions [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(20):4936-4945.
- [8] Steven A, Heiduk M, Recktenwald CV, et al. Colorectal carcinogenesis: connecting K-RAS-induced transformation and CREB activity in vitro and in vivo[J]. Mol Cancer Res, 2015, 13(8):1248-1262.
- [9] Wang GH, Yao L, Xu HW, et al. Identification of MXRA5 as a novel biomarker in colorectal cancer[J]. Oncol Lett, 2013, 5(2):544-548.
- [10] Yu T, Lu Q, Ou X, et al. Association of sedentary behavior with the expression levels of biomarkers in colorectal cancer: clinical analysis of 228 patients[J]. Tohoku J Exp Med, 2014, 232(3):167-176.
- [11] Jaiswal JK, Malloussi H, Mauro JM, et al. Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates[J]. Nat Biotechnol, 2003, 31(1):47-51.
- [12] Yang D, Chen Q, Wang W, et al. Direct and indirect immunolabelling of HeLa cells with quantum dot[J]. Luminescence, 2008, 23(3):169-174.
- [13] Wu XY, Liu HJ, Liu JQ, et al. Immuno-fluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dot[J]. Nature Biotechnol, 2003, 21(1):41-46.
- [14] Michalska M, Florczak A, Dams-Kozłowska H, et al. Peptide-functionalized ZCIS QDs as fluorescent nanoprobe for targeted HER2-positive breast cancer cells imaging[J]. Acta Biomater, 2016, 35:293-304.
- [15] Yang C, Liu H, Zhang Y, et al. Hydrophobic-sheath segregated macromolecular fluorophores: colloidal nanoparticles of polycaprolactone-grafted conjugated polymers with bright far-red/near-infrared emission for biological imaging[J]. Biomacromolecules, 2016, 17(5):1673-1683.
- [16] Singh G, Kumar M, Soni U, et al. Cancer cell targeting using folic acid/anti-HER2 antibody conjugated fluorescent CdSe/CdS/ZnS-MPA and CdTe-MSA quantum dots[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2015, 15(12):9382-9395.
- [17] Tasso M, Singh MK, Giovanelli E, et al. Oriented bioconjugation of unmodified antibodies to quantum dots capped with copolymeric ligands as versatile cellular imaging tools[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2015, 7(48):26904-26913.

(收稿日期:2016-04-19 修回日期:2016-06-25)

(上接第 2530 页)

的预防、发生有重要的指导意义。

参考文献

- [1] Daniels LB, Maisel AS. Natriuretic peptides[J]. J Am Coll Cardiol, 2007, 50(25):2357-2368.
- [2] Smith JG, Newton-Cheh C, Almgren P, et al. Assessment of conventional cardiovascular risk factors and multiple biomarkers for the prediction of incident heart failure and atrial fibrillation[J]. J Am Coll Cardiol, 2010, 56(21):1712-1719.
- [3] 曾朱君, 彭瑟. 冠心病患者超敏肌钙蛋白 T、脑钠肽及超敏 C-反应蛋白变化的意义[J]. 实验与检验医学, 2015, 33(1):63-66.
- [4] Volanakis JE. Human C-reactive protein: expression, structure, and function [J]. Mol Immunol, 2001, 38(2/3):189-197.
- [5] Wilson AM, Swan JD, Ding H, et al. Widespread vascular production of C-reactive protein(CRP) and a relationship between serum CRP, plaque CRP and intimal hypertrophy [J]. Atherosclerosis, 2007, 191(1):175-181.
- [6] Möckel M, Danne O, Müller R, et al. Development of an optimized multimarker strategy for early risk assessment of patients with acute coronary syndromes[J]. Clin Chim Acta, 2008, 393(2):103-109.
- [7] 周波, 刘利慧. 冠心病患者血清炎症因子水平测定及其临床意义[J]. 实用医药杂志, 2014, 31(2):121-122.
- [8] 蔡大炜. 脑钠肽、内皮素和超敏 C 反应蛋白检测在心力衰竭患者中的应用[J]. 中华全科医学, 2014, 12(1):70-71.
- [9] Popelová J, Kotaška K, Cerný S, et al. Range and distribution of NT-proBNP values in stable corrected congenital heart disease of various types[J]. Can J Cardiol, 2012, 28(4):471-476.
- [10] 邹志宝. 用超敏 C 反应蛋白与脑钠肽对冠心病患者进行冠状动脉病变程度预测的临床价值[J]. 当代医药论丛, 2014, 19(19):69-70.

(收稿日期:2016-03-08 修回日期:2016-05-15)