

技术与方法

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.02.014

近红外量子点单克隆抗体荧光探针对 U14 头颈部移植鳞癌的原位可视化成像研究

赵 成, 杨 凯, 唐 洪, 杨 佳, 赵宁波, 赵春蓉
(重庆医科大学附属第一医院口腔颌面外科, 重庆 400016)

【摘要】目的: 观察近红外荧光量子点(Near-infrared fluorescent quantum dots, NIRF-QDs)表皮生长因子受体单克隆抗体(Epidermal growth factor receptor monoclonal antibody, EGFR mAb)荧光探针对 U14 头颈部移植鳞癌的原位可视化成像情况。方法: 将 EGFR mAb 偶联发射波长为 800 nm 的近红外荧光量子点(Quantum dot, QD800)制备近红外量子点表皮生长因子受体单克隆抗体荧光靶向探针(QD800-EGFR mAb), 将高表达表皮生长因子受体的 U14 鳞癌细胞和 QD800-EGFR mAb 共培养, 观察 QD800-EGFR mAb 与 U14 细胞表达的 EGFR 结合情况; 建立 U14 头颈部移植鳞癌裸鼠模型, 通过尾静脉注射 QD800-EGFR mAb, 观察对 U14 头颈鳞癌活体原位可视化动态成像情况。结果: 体外实验证明: QD800-EGFR mAb 能与 U14 细胞表达的 EGFR 特异性结合; 体内活体成像显示: QD800-EGFR mAb 静脉注射后能对 U14 头颈部移植鳞癌进行清楚的原位可视化荧光成像, 荧光成像一直持续到 24 h, 在 1~6 h 时间段内肿瘤成像最完整和信噪比最高。结论: 基于以 EGFR 为靶点的 NIRF-QDs 技术对头颈部鳞癌的发生发展、原位可视化成像和个体化治疗具有独特的优势和前景。

【关键词】头颈; 鳞状细胞; 癌; 表皮生长因子受体; 近红外量子点; 活体成像

【中国图书分类法分类号】R739.8

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-09-30

In situ visual imaging of U14 head and neck squamous cell carcinoma xenograft tumors by near-infrared quantum dots-monoclonal antibody fluorescent probes

ZHAO Cheng, YANG Kai, TANG Hong, YANG Jia, ZHAO Ningbo, ZHAO Chunrong

(Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To study the in situ visual imaging of near-infrared quantum dots (NIRF-QDs) epidermal growth factor receptor monoclonal antibody (EGFR mAb) fluorescent probes on the U14 head and neck squamous cell carcinoma xenograft tumors. **Methods:** Epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies were coupled to near-infrared fluorescent quantum dots (QD800) to prepare near-infrared fluorescent quantum dots-EGFR mAb probes (QD800-EGFR mAb). The squamous cell carcinoma U14 with high expression of EGFR and QD800-EGFR mAb were cocultured to observe the combination in vitro; serial visual in vivo imaging of U14 head and neck squamous cell carcinoma xenograft tumors was done after intravenous injection of QD800-EGFR mAb. **Results:** Experiments in vitro showed that QD800-EGFR mAb could bind specifically to U14 cells. In vivo imaging showed that clear visual in situ fluorescence imaging of head and neck squamous cell carcinoma could be achieved after intravenous injection of QD800-EGFR mAb, and the fluorescence imaging lasted up to 24 h during which the most complete and highest signal to noise ratio of tumor in vivo imaging was in 1~6 h. **Conclusion:** EGFR target based near near-infrared quantum dots technique has unique advantages and prospects for the occurrence and development study, visual in situ imaging and individual treatment of head and neck squamous cell carcinoma.

【Key words】head and neck; squamous cell; carcinomas; epidermal growth factor receptor; near-infrared quantum dots; in vivo imaging

非侵入对活体内癌细胞可视化成像观察在研究癌症发生发展和个体化治疗中具有重要的作用, 一直是抗癌领域研究的难点和热点。近年来发展起来的量子点 (Quantum dots, QDs) 在该领域显示出了巨大的前景^[1]。

作者简介: 赵 成 (1983-), 男, 硕士,

研究方向: 口腔颌面-头颈肿瘤临床及相关基础研究。

通信作者: 杨 凯, 男, 教授, Email: cqfyyk@yahoo.com.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 30872925, 81172205)。

QDs 是一种由 II~VI 族元素或 III~V 族元素组成的直径在 2~10 nm 范围内的纳米微晶体, 与目前传统的有机荧光染料和荧光蛋白相比, QDs 具有独特的光学特性^[1-3]; QDs 荧光强度高, 光化学稳定性好, 不易发生光漂白, 激发光谱宽且连续分布、发射光谱窄而对称, 通过改变 QDs 的尺寸和组成可获得从紫外到近红外范围内任意点的光谱。QDs 的这些光学特征是目前所有的荧光探针都不具备的。尤其是近年来发展起来发射光在 700~900 nm 范围内的近红外荧光量子点 (Near-

infrared fluorescent quantum dots, NIRF-QDs), 由于对组织具有强的穿透力, 特别适合于体内非侵入性可视化成像^[2-7]。

本研究将高表达表皮生长因子受体 (Epidermal growth factor receptor, EGFR) 的 U14 鳞癌细胞^[8,9]植入裸鼠颈-颈部, 建立裸鼠头颈部 U14 移植鳞癌模型, 用 EGFR 单克隆抗体 (Monoclonal antibody, mAb) 连接最大发射波长为 800 nm 的 NIRF-QDs, 制备近红外量子点单克隆抗体荧光探针 (QD800-EGFR mAb), 通过静脉注射 QD800-EGFR mAb 对 U14 头颈鳞癌进行活体原位可视化成像观察。本研究首次以 EGFR 为靶点, 用 NIRF-QDs 对头颈部鳞癌进行原位可视化成像研究, 为进一步探索用基于抗体靶向性的 NIRF-QDs 对头颈部鳞癌的可视化成像和个体化治疗提供依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料和仪器

SPF 级雄性 BALB/C-nu/nu 裸鼠, 鼠龄 6~8 周, 体重 20~25 g/只, 购自重庆医科大学实验动物中心。昆明小鼠鳞状细胞癌细胞株 U14 细胞 (中国医学科学院肿瘤研究所), QD800 抗体偶联试剂盒 (Invitrogen, Q22071MP, 美国), EGFR 单克隆抗体 (Abcam, ab52894, 英国), 西妥昔单抗 (Merck, IMC-C225, 德国), 冷冻离心机 (HERMLE, Z233MK-2, 德国), 紫外分光光度计 (Beckman, DU-600, 美国), 激光扫描共聚焦显微镜 (Leica, TCS-SP5, 德国), Maestro 活体成像系统 (CRi, Maestro EX, 美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 QD800-EGFR mAb 荧光探针的制备 QD800-EGFR mAb 荧光探针的制备根据 QD800 抗体偶联试剂盒提供的实验步骤进行, 分 4 步, 简述如下: (1) QDs 的活化和洗脱: 14 μ l 浓度为 10 mmol/L 的双功能 SMCC 溶液和 125 μ l 浓度为 4 μ mol/L 的 QD800 混合均匀, 在室温下活化反应 1 h, 用脱盐柱洗脱反应样本, 收集有色洗脱液 500 μ l。(2) mAb 的还原和分离: 6.1 μ l 浓度为 1 mol/L 的二硫苏糖醇加入到 300 μ l 浓度为 1 mg/ml 的 EGFR mAb 中, 混合均匀, 室温下还原反应 30 min。然后将 20 μ l 双蒸水稀释好的染料指示标记液加入到反应好的样本中。用脱盐柱分离反应样本, 从洗脱出的第 1 滴着色样本开始收集, 共收集 500 μ l。(3) 偶联和灭活: 把以上收集的两种洗脱液均匀混合, 室温下偶联反应 1 h; 取 3 μ l 即配的浓度为 10 mmol/L 的 2-巯基乙醇和偶联样本均匀混合, 室温下灭活反应 30 min。(4) 浓缩和纯化: 将以上偶联灭活后的液体加入超滤装置管中超速离心 15 min (7 000 r/min), 收集超滤离心膜内侧偶联溶液, 然后用 Pierce 柱行色谱分离, 得纯化的 QD800-EGFR mAb 探针。

根据产品说明书提供的消光系数和测量波长两个参数, 以及以此波长作为激发光在紫外分光光度计中测出相对应的吸光度以及比色杯的光程, 即可以计算出最后纯化的 QD800-EGFR mAb 荧光探针浓度。其计算公式为: $A = \varepsilon cl$ (A 吸光值, ε 消光系数, c 分子浓度, l 光程)。

1.2.2 QD800-EGFR mAb 荧光探针体外标记 U14 活细胞 取生长良好的 U14 细胞, 以 5×10^4 个的细胞浓度接种到 9 个 35 mm 玻璃底培养皿 (Φ 15 mm) 中, 每个 1 ml, 培养 24 h

后, 弃去培养基, PBS 清洗 3 次, 实验分 3 组, 每组 3 个培养皿。对照组 I 加入 100 μ l 浓度为 100 nmol/L 的 QD800。对照组 II 先加入浓度为 1 μ g/ml 的 EGFR 单克隆抗体 (西妥昔单抗) 200 μ l 封闭 EGFR, 2 h 后用 PBS 清洗 3 次, 然后加入 100 nmol/L 的 QD800-EGFR mAb 探针 100 μ l。以上各组在 37℃ 下孵育 30 min, 用 PBS 冲洗细胞 3 次后用激光共聚焦显微镜观察 QD800 荧光在 U14 瘤细胞内的分布情况。

1.2.3 裸鼠头颈部 U14 移植瘤模型建立 取对数生长期的 U14 细胞, 0.5% 胰蛋白酶消化, 4℃ 800 r/min 离心 4 min, 然后将细胞悬于 PBS 中, 将含有 2×10^6 个 U14 细胞的 PBS 悬液 0.2 ml 注射于裸鼠颈-颈交界部皮下, 共 10 只, 建立头颈部鳞癌模型, 每日观察肿瘤生长情况, 待其最长径达到 0.8~1.2 cm 时开始实验。

1.2.4 肿瘤活体可视化成像观察 模型裸鼠分为实验组和对照组, 每组 5 只, 用 2% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 行腹腔注射麻醉后, 实验组通过尾静脉注射 100 μ l (含 50 pmol 当量的 QD800) QD800-EGFR mAb。对照组通过尾静脉注射 250 μ l 浓度为 1 μ g/ml 的西妥昔单抗, 24 h 后再注射与实验组相同当量的 QD800-EGFR mAb。所有动物于注射 QD800-EGFR mAb 后 15 min、1、3、6、9、24 h 的 6 个不同时间点用 Maestro 活体成像系统行活体可视化成像检测, 激发光/发射光为 630 nm/800 nm, 曝光时间为 50 ms, 采集时间为 10 s, 像素 1024 $\times$ 1024。图像采集完毕, 用 Maestro 2.10.0 软件进行图像处理 and 数据分析, 分别显示自发荧光和目标荧光信号并测量其荧光值, 将每种信号添加伪色彩, 本研究自发荧光设置为绿色, 目标荧光信号设置为红色, 最后将两种色彩相叠加。

1.2.5 QD800-EGFR mAb 荧光探针在肿瘤内分布检测 实验组和对照组分别在 6 h 成像后断颈处死裸鼠 2 只, 24 h 成像完毕后断颈处死裸鼠 3 只, 处死裸鼠后立即解剖取出肿瘤, 然后用冰冻切片包埋剂包埋并速冻, 在 -20℃ 下连续切割为 7 μ m 厚的组织切片, 每 2 张连续的冰冻切片中, 一张行常规 HE 染色, 另一张冰冻组织切片在激光共聚焦显微镜下观察 QD800 在肿瘤中的分布情况。

2 结果

2.1 QD800-EGFR mAb 荧光探针的制备

收集纯化的 QD800-EGFR mAb 荧光探针样本, 通过产品说明书提供的在 550 nm 下的消光系数 $\varepsilon_{550} = 1.7 \times 10^6$ /mol/(L $\cdot$ cm), 以及在 550 nm 下测得的吸光度 A 为 3.442, $l = 1$ cm, 计算得到最终纯化的 QD800-EGFR mAb 探针浓度约 2.025 μ mol/L。

2.2 QD800-EGFR mAb 荧光探针体外标记 U14 活细胞

在激光共聚焦显微镜下成像 (图 1): 实验组 U14 细胞膜上可见明显的红色荧光, 表明 QD800-EGFR mAb 已结合到细胞膜表面; 对照组 I 和 II 的 U14 细胞均未观察到 QD800 的红色荧光, 以上结果表明: QD800 不能与 U14 细胞结合, QD800-EGFR mAb 能与 U14 细胞结合, 但不能被西妥昔单抗封闭 EGFR 后的 U14 细胞结合, 这证明了 mAb 与 QD800 连接后, EGFR mAb 的免疫活性没有改变, QD800-EGFR mAb 仍能通过特异性免疫识别 U14 细胞表达的

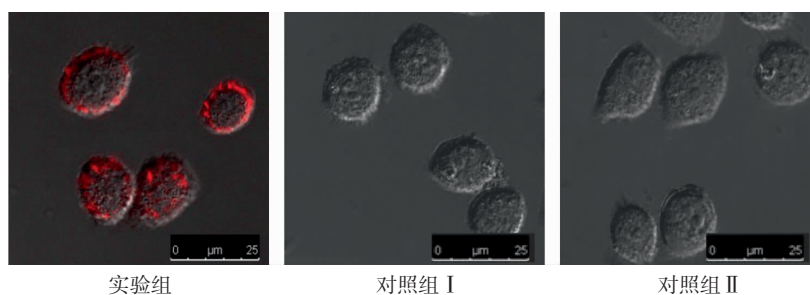


图 1 QD800-EGFR mAb 探针标记 U14 细胞 30 min 后成像照片 (LSCM, 标尺: 25 μ m)

Fig.1 In-vitro labeling of U14 cells with QD800-EGFR mAb probe. Detection of the fluorescence was conducted after 30 minutes of labeling (LSCM, scale: 25 μ m)

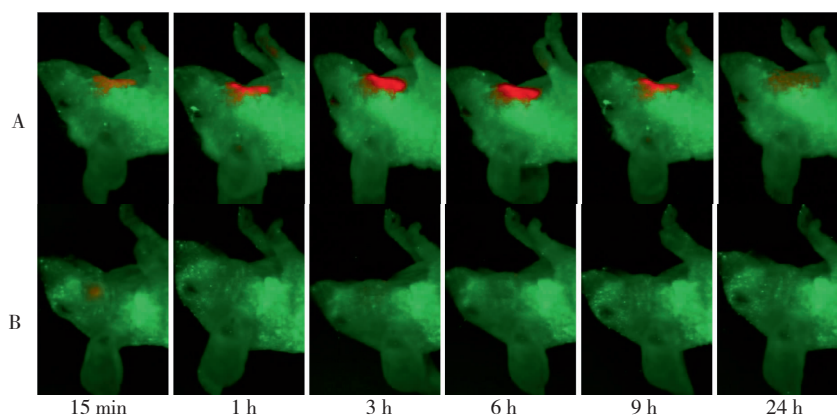


图 2 各时间点肿瘤活体可视化成像图 (Maestro 活体成像系统)

Fig.2 Visible imaging of U14 cells in the head and neck squamous cell carcinoma xenograft tumors by QD800-EGFR mAb probe at different times (Maestro in vivo imaging system)

EGFR, 从而使 QD800 结合到细胞表面。

2.3 裸鼠头颈部 U14 移植瘤模型建立

裸鼠颈-颈交界处皮下接种 U14 细胞 1 周后即可见明显的肿瘤生长, 2 周时肿瘤最大直径达到 0.8~1.2 cm 时开始实验, 10 只裸鼠全部成瘤。

2.4 肿瘤活体可视化成像

实验组在尾静脉注射 QD800-EGFR mAb 后 15 min 肿瘤部位出现明显的荧光信号, 1~6 h 肿瘤的荧光信号最完整, 与肿瘤大小对应, 在 9 h 时观察到肿瘤的荧光成像明显变小, 24 h 时只有很小的荧光成像 (图 2A)。对照组由于在注入 QD800-EGFR mAb 前 U14 表达的 EGFR 被西妥昔单抗克隆抗体封闭, 在 15 min 时肿瘤部位可检测到微弱荧光信号, 估计是 U14 瘤细胞对 QD800-EGFR mAb 的非特异性吞噬所致, 但从 1~24 h 未检测到明显区别于背景荧光的荧光信号 (图 2B)。荧光信噪比 (肿瘤荧光强度与背景自发荧光强度之比) 测定显示: 实验组从 1~6 h 信噪比较高, 在 9 h 时明显降低, 24 h 时接近基线水平, 对照组从 15 min 以后信噪比一直处于基线水平 (图 3)。

2.5 QD800-EGFR mAb 荧光探针在肿瘤内分布检测

实验组和对照组分别在 6 h 和 24 h 成像完毕后取出瘤体的 HE 染色切片在光镜下观察均可见大量癌细胞, 肿瘤生长良好 (图 4)。在激光共聚焦显微镜下: 对照组在成像完毕后 6 h 和 24 h 的瘤体切片中均未见有明显 QD800 荧光, 而实验组在成像完毕后 6 h 和 24 h 的瘤体切片中分别见有大量的 QD800 荧光分布和少量的 QD800 荧光分布 (图 5)。

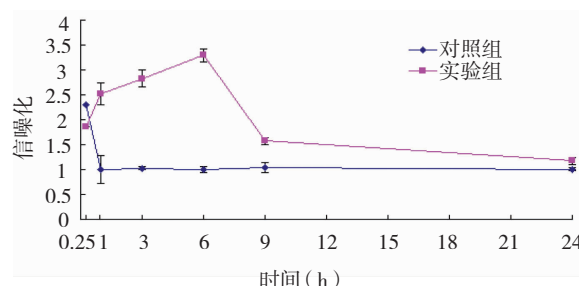


图 3 肿瘤荧光信噪比随时间变化情况

Fig.3 Signal-to-noise ratio in the U14 head and neck squamous cell carcinoma xenograft tumors after different times of probe injection in the experimental group and control group

3 讨论

由于 QDs 较之传统的有机荧光染料探针和荧光蛋白具有优良的光学特性, 使之成为一种极具发展潜力的体内非侵入医学成像的工具^[1-7]。研究也证明, 表面生物功能化的 QDs 标记活细胞后在实验检测所需浓度范围内对细胞没有毒性, 不影响活细胞的生长和分化、增殖和凋亡, 也不影响细胞在体内侵袭和转移能力^[5-7, 10]。这些优势预示着 QDs 非常适用于荧光成像, 将成为肿瘤早期诊断的有力工具。

在本研究中, 采用最大发射波长为 800 nm 的近红外荧光量子点, 这种 QDs 不仅具有一般可见光量子点的优良光学

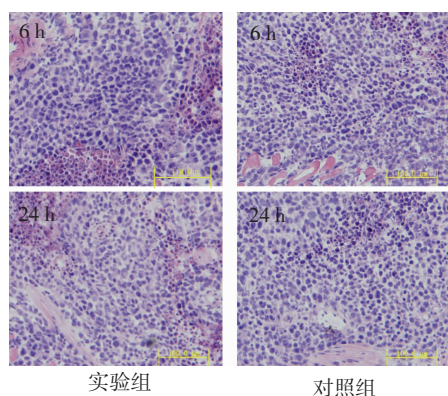


图 4 实验组和对照组在静脉注射 QD800-EGFR mAb 后 6 h 和 24 h 瘤体组织病理切片照片 (HE, 200 ×)

Fig.4 H&E staining of tumor section from the experimental group and control group of U14 squamous cell carcinoma 6 and 24 hours after probe injection (HE, 200 ×)

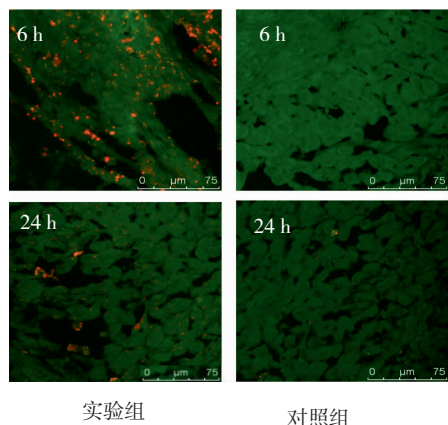


图 5 实验组和对照组在静脉注射 QD800-EGFR mAb 后 6 h 和 24 h 瘤体组织切片激光共聚焦成像照片 (标尺: 75 μm)

Fig.5 Laser scanning confocal microscope analysis of tumor section from the experimental group and control group control group II of U14 squamous cell carcinoma 6 and 24 hours after probe injection (scale: 75 μm)

性质,而且对组织具有更强的穿透能力。本研究激发光波长采用 630 nm,这既在 QDs 激发光谱之内,也极大减小了自身组织生色基团的影响^[11,12],增强活体成像的信噪比。

可视成像技术可以展示活体动物中荧光基团的荧光发射状况,结合日益完善的各种荧光探针,使其正在成为医学基础研究和临床疾病应用之间联系的重要枢纽。本研究将发射波长为 800 nm 的 NIRF-QDs 偶联 EGFR mAb 制备成 QD800-EGFR mAb 荧光探针,通过体内外实验均证明:QD800-EGFR mAb 对高表达 EGFR 的 U14 细胞具有良好靶向,能获得清晰的体内外成像,能更直观、更清晰地展现体内肿瘤的形态。由于目前研究证明头颈部鳞癌细胞 EGFR 阳性表达率高达 90%^[13],因此本研究为以 EGFR 为靶点,用 NIRF-QDs 对头颈部鳞癌进行原位可视化成像研究,为进一步探索用基于抗体靶向性的 NIRF-QDs 对头颈部鳞癌的可视化成像和个体化治疗提供依据。

参 考 文 献

- [1] Byers R J, Hitchman E R. Quantum dots brighten biological imaging [J]. Prog Histochem Cytochem, 2011, 45 (4): 201-237.
- [2] Yang K, Cao Y A, Shi C M, et al. Quantum dot-based visual in vivo imaging for oral squamous cell carcinoma in mice [J]. Oral Oncol, 2010, 46 (12): 864-868.
- [3] 杨 凯, 曹雨庵, 李志刚, 等. 近红外荧光量子点对颊癌可视化活体成像研究 [J]. 中华口腔医学杂志, 2011, 46 (3): 134-138.
- Yang K, Cao Y A, Li Z G, et al. Visual imaging for buccal carcinoma with near-infrared fluorescent quantum dots in vivo [J]. Chin J Stomatol, 2011, 46 (3): 134-138.
- [4] Cao Y A, Yang K, Li Z G, et al. Near-infrared quantum-dot-based non-invasive in vivo imaging of squamous cell carcinoma Tca8113 [J]. Nanotechnology, 2010, 21 (47): 475104.
- [5] Yang K, Li Z G, Cao Y A, et al. Effect of peptide-conjugated near-infrared fluorescent quantum dots (NIRF-QDs) on the invasion and metastasis of human tongue squamous cell carcinoma cell line Tca8113 in vitro [J]. Int J Mol Sci, 2009, 10 (10): 4418-4427.
- [6] Li Z G, Kai Y, Cao Y A, et al. In vivo study of the effects of peptide-conjugated near-infrared fluorescent quantum dots on the tumorigenic and lymphatic metastatic capacities of squamous cell carcinoma cell line Tca8113 and U14 [J]. Int J Mol Sci, 2010, 11 (4): 1413-1422.
- [7] Sun D P, Yang K, Zheng G, et al. Study on effect of peptide-conjugated near-infrared fluorescent quantum dots on the clone formation, proliferation, apoptosis, and tumorigenicity ability of human buccal squamous cell carcinoma cell line BcaCD885 [J]. International Journal of Nanomedicine, 2010, 5: 401-405.
- [8] 聂妹芳, 刘风英, 陶光实. 瘤体注射表皮生长因子受体抗体治疗小鼠宫颈鳞癌 [J]. 湖南医科大学学报, 2001, 26 (5): 421-424.
- Nie M F, Liu F Y, Tao G S. Treatment of cervical carcinoma in mice by injecting monoclonal antibody of epidermal growth factor receptor into solid tumor [J]. Bull Hunan Med Univ, 2001, 26 (5): 421-424.
- [9] DiSilvestro P A, Walker J L, Morrison A, et al. Gynecologic oncology group radiation therapy with concomitant paclitaxel and cisplatin chemotherapy in cervical carcinoma limited to the pelvis: a phase I/II study of the gynecologic oncology group [J]. Gynecologic Oncology, 2006, 103 (3): 1038-1042.
- [10] 杨 凯, 曹雨庵, 李志刚, 等. 肽段-量子点对鳞状细胞癌细胞成瘤及淋巴转移能力影响的动物实验 [J]. 中华口腔医学杂志, 2010, 45 (5): 299-302.
- Yang K, Cao Y A, Li Z G, et al. Effect of peptide-conjugated quantum dots on the tumorigenicity and lymph node metastasis of human tongue squamous cell carcinoma cell line Tca8113 and mouse uterine cervix carcinoma U14 in vivo [J]. Chin J Stomatol, 2010, 45 (5): 299-302.
- [11] Ravindran G A, Yasuhiko Y, Maekawa T, et al. Near-infrared quantum dots for deep tissue imaging [J]. Anal Bioanal Chem, 2010, 397 (4): 1417-1435.
- [12] Diagaradjane P, Orenstein-Cardona J M, Colón-Casasnovas N E, et al. Imaging epidermal growth factor receptor expression in vivo: pharmacokinetic and biodistribution characterization of a bioconjugated quantum dot nanoprobe [J]. Clin Cancer Res, 2008, 14 (3): 731-741.
- [13] Moon C, Chae Y K, Lee J. Targeting epidermal growth factor receptor in head and neck cancer: lessons learned from cetuximab [J]. Experimental Biology and Medicine, 2010, 235 (8): 907-920.

(责任编辑: 关蕴良)