

·基础研究·

本文引用:张国栋,王海琴,吕洁,陈健,金邵华,胡军,张德保.近红外量子点表皮生长因子单克隆抗体荧光探针对抗黄地鼠颊黏膜癌变过程的动态可视化荧光成像研究[J].湖南中医药大学学报,2017,37(9):947-951.

近红外量子点表皮生长因子单克隆抗体荧光探针对金黄色地鼠颊黏膜癌变过程的动态可视化荧光成像研究

张国栋¹,王海琴²,吕洁¹,陈健¹,金邵华¹,胡军¹,张德保¹

(1.南华大学第一附属医院口腔科,湖南衡阳 421001;2.衡阳市中心医院药剂科,湖南衡阳 421001)

[摘要] 目的 利用近红外量子点表皮生长因子单克隆抗体荧光探针对抗由9,10-二甲基1,2-苯并蒽(9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene, DMBA)诱导建立的金黄色地鼠颊黏膜癌变过程进行动态可视化荧光成像研究。方法 (1)用0.5%DMBA丙酮液诱导建立金黄色地鼠颊黏膜癌变各期模型;(2)将水溶性近红外荧光量子点(QD800)表面功能性的修饰藕连表皮生长因子受体单克隆抗体(EGFR mAb)后,形成具有靶向功能性的QD800-EGFR mAb荧光探针;(3)将QD800-EGFR mAb经金黄色地鼠各期癌变模型尾静脉注射入血液循环系统以靶向适配原理显示其颊黏膜动态癌变过程荧光图像。结果 (1)QD800-EGFR mAb能够通过血液循环系统与金黄色地鼠颊黏膜癌变细胞上的EGFR特异性的靶向适配并荧光显影;(2)QD800-EGFR mAb显示的荧光图像随着金黄色地鼠颊黏膜癌变程度的加深而增强,且能准确地显示癌灶的形状及浸润深度。结论 QD800-EGFR mAb通过与口腔癌不同癌变阶段癌细胞表面的EGFR靶向性适配结合来显示个体化荧光图像,可能对以后临床研究口腔癌的发生发展及转移规律发挥巨大的影响。

[关键词] 9,10-二甲基1,2-苯并蒽;金黄色地鼠;近红外量子点;表皮生长因子;单克隆抗体;靶向适配;口腔癌

[中图分类号]R781.5 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.09.007

Visual Fluorescence Imaging of Golden Hamster Buccal Mucosa Cancerization Process Dynamic by Near Infrared Quantum Dot Epidermal Growth Factor Monoclonal Antibody Fluorescent Probe

ZHANG Guodong¹, WANG Haiqin², LV Jie¹, CHEN Jian¹, JIN Shaohua¹, HU Jun¹, ZHANG Debao¹

(1. Department of Stomatology, the First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China;

2. Department of Pharmacy, Hengyang Central Hospital, Hengyang, Hunan 421001, China.)

[Abstract] **Objective** The dynamic visualization of fluorescence imaging of hamster buccal mucosa carcinogenesis process of induced by 9,10-bis (1,2 benzo anthracene (9,10-dimethyl-1, 2-benzanthracene DMBA) were studied by using near infrared quantum dot epidermal growth factor monoclonal antibody fluorescent probe. **Methods** (1) The buccal mucosa carcinogenesis hamster models were induced with 0.5% DMBA acetone solution. (2) After forming the water soluble near-infrared fluorescent quantum dots (QD800) surface functional modification of the epidermal growth factor receptor monoclonal antibody (EGFR mAb), the targeted functional QD800-EGFR mAb fluorescent probe was formed. (3) The buccal mucosa dynamic carcinogenesis fluorescence images were formed through injection of QD800-EGFR mAb into the golden hamster carcinogenesis model tail vein. **Results** (1) QD800-EGFR mAb in blood circulatory system could combine with the EGFR specific target in golden hamster buccal mucosa cancer cells, and the fluorescence imaging lens was visual. (1) The fluorescence images showed by QD800-EGFR mAb were more clear with the deepening of the golden hamster buccal mucosa cancerization degree, and QD800-EGFR mAb fluorescent probe could accurately display the shape of the tumor and the depth of invasion. **Conclusion**

[收稿日期]2016-12-21

[作者简介]张国栋,男,硕士,主治医师,主要从事口腔颌面部肿瘤的预防与治疗,E-mail:457485360@qq.com。

The individual fluorescence images are displayed by QD800-EGFR mAb combined with EGFR target in cancer cell surface at different stages of canceration, which may play an effect on the clinical further research of oral cancer occurrence development and transfer rules.

[**Keywords**] 9,10-dimethylen-1,2-benzanthracene; golden hamster; near-infrared quantum dot; epidermal growth factor; monoclonal antibody; targeting adaptation; oral cancer

口腔癌发病率占全身恶性肿瘤的第六位,其中90%是上皮来源的鳞状细胞癌。目前倡导口腔癌的治疗以手术、放疗、化疗、生物治疗为主的综合序列表疗法,但其5年生存率仍维持在50%左右^[1]。影响口腔癌的预后因素不仅与肿瘤病理类型、生长位置、侵袭深度、颈淋巴结转移状态等瘤体自身因素有关外,亦与肿瘤的早期诊断、手术方式、术后评估等人为外在因素有关。目前由于人类伦理道德的限制,对于口腔癌在人类的发生机制、转移途径、侵袭深度、个体化治疗及安全手术切缘等问题尚存很大疑惑。

本研究首先采用0.5% DMBA 丙酮液诱导建立处于不同时期、不同阶段的金黄地鼠颊黏膜癌变模型,其次将水溶性近红外荧光量子点(near-infrared quantum dots, QDs)表面藕连单克隆抗体(mAb)表皮生长因子受体(EGFR),形成具有靶向功能性的QD800-EGFR mAb 荧光探针;最后将QD800-EGFR mAb 经尾静脉注射入癌变模型血液循环系统内以抗原抗体靶向适配原理首次绘制出口腔癌癌变过程的动态可视化荧光图像,为临床进一步动态研究口腔癌发生发展及转移机制打下基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料和仪器

1.1.1 实验动物 叙利亚金黄地鼠40只,清洁级,雌雄各半,鼠龄4~6周,体质量25~30 g,购于卫生部成都生物制品研究所,实验动物生产许可证号:SCXK(川)2016003。

1.1.2 主要试剂 DMBA(Sigma公司,美国);Qtracker™800 Cell Labeling Kit(Invitrogen公司,美国);EGFR单克隆抗体(Abcam公司,英国)。

1.1.3 主要仪器 荧光分光光度计(RF-540,Shimadzu公司,美国);冷冻低速离心机(Z233MK-2,HERMLE公司,德国);激光共聚焦显微镜(TCS-SP5,Leica公司,德国);In-Vivo FX Imaging System (Kodak公司,美国);倒置相差荧光显微镜(NIKON公司,TE2004-U,日本)。

1.2 造模方法及检测

1.2.1 金黄地鼠颊黏膜癌变动态模型的建立^[2] 将40只金黄地鼠随机分成实验组(A)、对照组(B)两组,每组20只。将A、B组金黄地鼠分别固定于自制鼠架上,拉开颊囊,用1号油画笔在A组金黄地鼠双侧颊囊涂0.5% DMBA 丙酮液,B组涂擦丙酮液,每周一、三、五涂擦,共计12周,所有动物涂擦后禁食、禁饮2 h。在实验开始前及开始后每周日各挑选A、B组实验动物各1只,取实验颊囊组织行HE切片病检确认癌变各阶段。

1.2.2 近红外量子点EGFR单克隆抗体荧光探针(QD800-EGFR mAb)的制备和纯化 根据Qtracker™800 Cell Labeling Kit提供的实验步骤进行,简述如下:(1)QD800的活化和洗脱:取37℃下预热15 min的双功能SMCC溶液14 μL,10 mmol/L放入1.5 mL EP管中,加入混匀4 μmol/L的QD800 125 μL并在20℃下反应1 h,NAP-5柱洗脱反应液,收集有色洗脱液500 μL。(2)EGFR还原和分离:在20℃下将1 mol/L DDT 6.1 μL与1 mg/mL EGFR单抗PBS液300 μL混匀反应30 min,然后加入20 μL双蒸水稀释好的CF750标记液。取500 μL NAP-5柱洗脱反应液。(3)偶联和灭活:20℃下将(1)(2)洗脱液混匀反应1 h,加入10 mmol/L 硫代乙二醇3 μL灭活30 min。(4)浓缩和纯化:将各盛有0.5 mL藕联灭活液的2个超滤离心管以7 000 r/min离心15 min,用Pierce柱对离心膜内侧溶液进行色谱分离即为纯化的QD800-EGFR mAb探针。

1.2.3 金黄地鼠颊黏膜不同癌变阶段的荧光可视化成像及信号强度比较 通过HE切片确认金黄地鼠正常颊黏膜、中度不典型增生、癌前病变、鳞癌等一系列癌变阶段模型,2%戊巴比妥(40 mg/kg)行模型腹腔注射麻醉,将100 μL的QD800-EGFR mAb经尾静脉依次注射入各个癌变阶段模型内及相应对照组金黄地鼠体内,30 min时在In-Vivo FX Imaging System(像素设置为1 024×1 024,曝光时间为50 ms,激发光/发射光为630/800 nm)下进行

活体可视化荧光成像检测, 所获图像采用配套的 Carestream MI 软件进行分析。本实验将 QD800-EGFR mAb 探针荧光设置为红色, 自发荧光为绿色, 最后将其叠加分析。

1.2.4 QD800-EGFR mAb 荧光探针在癌变模型细胞中的分布 将实验组中鳞癌模型成像完毕后立刻断颈处死, 解剖取其颊囊癌灶组织, 尽量剔除正常黏膜、脂肪等组织, 将癌灶组织迅速低温冷冻包埋, 并在-20℃下连续切割为 8 μm 厚的组织切片。在激光共聚焦显微镜下观察量子点探针在癌灶组织中的分布情况, 并与对照组比较。

1.3 统计学分析

实验数据均采用软件 SPSS 13.0 进行有效分析, 结果以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示, *t* 检验比较两均数, 3 个均数以上的比较采用方差分析, 按 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 金黄地鼠颊黏膜不同癌变阶段模型的建立

常规 HE 染色病理检查显示, 实验组: 为正常黏膜(0 天); 出现中度不典型增生(2 周); 出现癌前病变(6 周); 有鳞癌(12 周)。对照组: 均为正常黏膜。详见图 1-7。

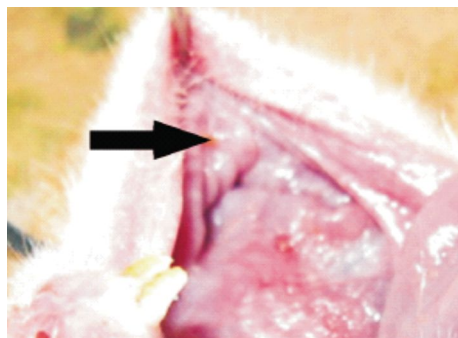


图 1 肉眼观察 2 周时金黄地鼠颊黏膜中度不典型增生

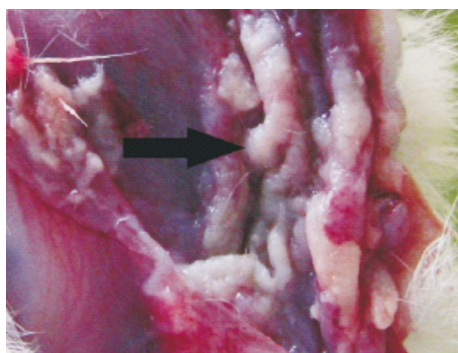


图 2 肉眼观察 6 周时金黄地鼠颊黏膜癌前病变

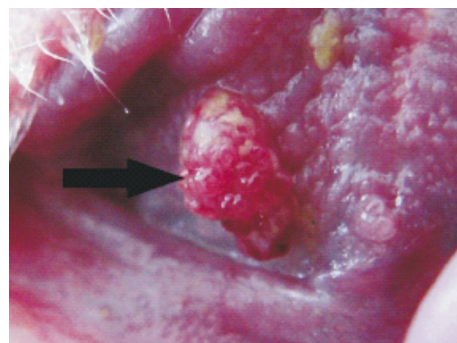


图 3 肉眼观察 12 周时金黄地鼠颊囊黏膜鳞状细胞癌

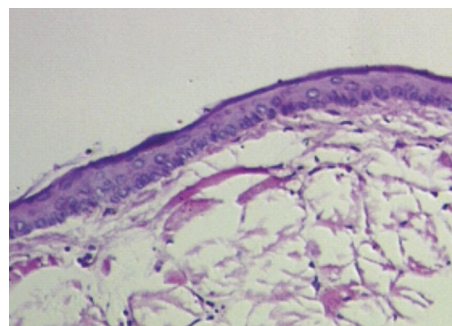


图 4 正常金黄地鼠颊囊黏膜光镜图(HE×200)

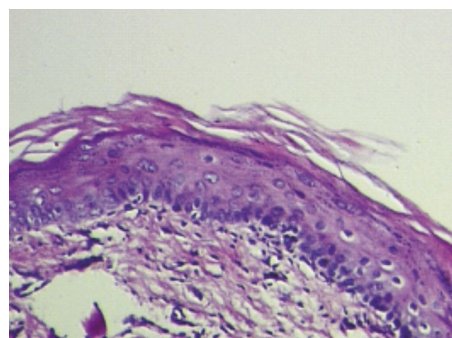


图 5 2 周时金黄地鼠颊囊黏膜中度不典型增生光镜图(HE×200)

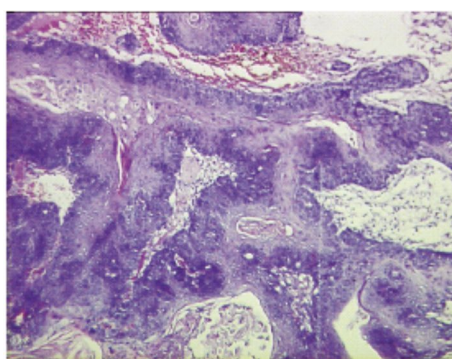


图 6 6 周时金黄地鼠颊囊黏膜癌前病变光镜图(HE×200)

2.2 金黄地鼠颊黏膜不同癌变阶段的活体可视化荧光成像及信号强度比较

分别将 100 μL QD800-EGFR mAb 荧光探针经金黄地鼠尾静脉注入正常、中度不典型增生、癌前

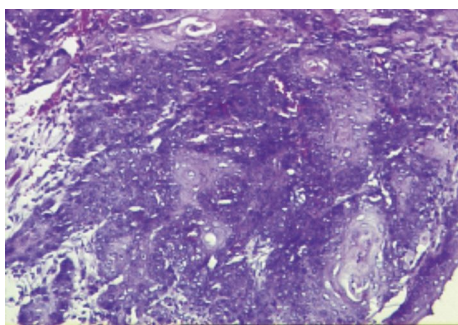
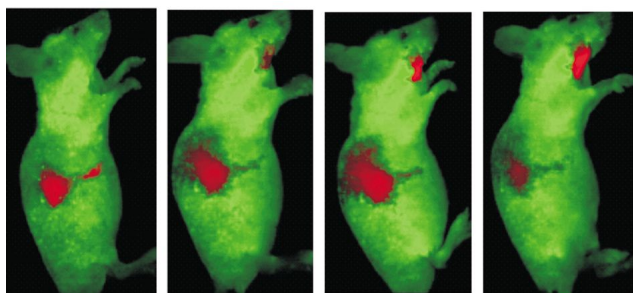
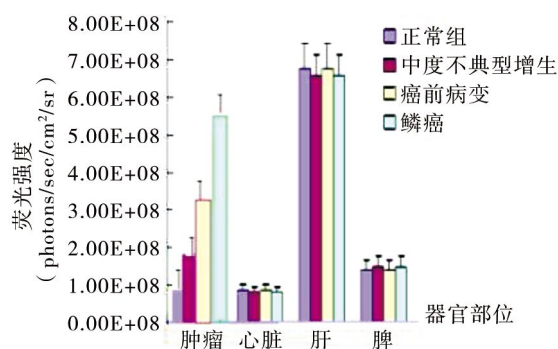


图7 12周金黄色地鼠颊黏膜鳞状细胞癌光镜图 (HE×200)

病变、鳞癌等癌变模型内,每组模型5只,30 min时采集到的荧光信号清晰连续完整,且与肉眼下肿瘤的大小、形状及浸润深度对应吻合。对照组始终未出现明显的荧光信号。将各组荧光信号强度值进行比较分析,发现 QD800-EGFR mAb 荧光探针在实验组颊黏膜中的分布明显大于对照组($P<0.05$);癌前病变组及鳞癌组明显大于中度不典型增生组($P<0.05$);鳞癌组明显大于癌前病变组($P<0.05$)。见图 8-9。



正常黏膜 中度不典型增生(2周) 癌前病变(6周) 鳞癌(12周)
图8 金黄色地鼠颊黏膜癌变不同阶段的荧光可视化活体成像



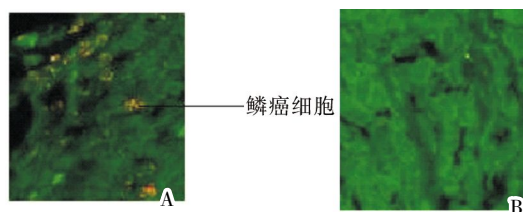
注: QD800-EGFR mAb 荧光探针依次在实验组颊黏膜、癌前病变组、中度不典型增生组、鳞癌组互相比较, * P 均 <0.05 。

图9 30 min 时所监测到的各组荧光信号强度值

2.3 QD800-EGFR mAb 荧光探针在癌变模型细胞中的分布

实验组鳞癌癌灶细胞中冰冻切片激光共聚焦显

微镜可见有明显的荧光探针残留,对照组未见明显荧光探针残留。见图 10。



注:实验组(A) 对照组(B)

图10 QD800-EGFR mAb 荧光探针在癌变模型细胞中的分布激光共聚焦显微图

3 讨论

目前研究证明,将近红外 QDS 表面与肿瘤细胞表面靶向性配体偶联后进行肿瘤细胞定位追踪诊断技术是目前监测肿瘤早期发生、发展及转移的最有效技术^[3-5]。同时发现近红外 QDS 表面功能化修饰后不仅没有改变其独特稳定的光学特性,还能极大降低其细胞生物毒性,增强其化学结构稳定性、生物机体相容性和靶向特异性,在体内外肿瘤细胞成像方面显示出了极大的发展前景^[6-10]。目前现有检测癌症敏感性较好的方法,如 CT 和 MRI 等,只有当癌细胞的数目达到数百万个才能检测出来^[11],而 Cao 等^[12]用 QD800 标记 BcaCD885 癌细胞后,可在裸鼠的口腔颊黏膜下、皮下、肌肉内检测到 1×10^4 个癌细胞,这证明用 QD800 成像较目前的 CT 和 MRI 对癌症检测的敏感性提高了 100 倍以上。据 Gao 等^[13]预测,随着具有更强组织穿透的近红外量子点的发展,近红外量子点标记的细胞把把敏感性提高到能检测到体内 10~100 个细胞,同时该方法更加简单易行,经济方便,而且还适合在手术中对安全切缘的正确判断及对残留癌细胞的直接可视化判断。

本研究首先采用 0.5% DMBA 丙酮液诱导建立起了一套完整的金黄色地鼠颊部“正常黏膜-中度不典型增生-癌前病变-鳞癌”癌变模型;然后将制备好的近红外量子点 EGFR 单克隆抗体荧光探针(QD800-EGFR mAb) 经过癌变模型尾静脉注入血液循环系统,根据 QD800-EGFR mAb 与癌细胞表面的 EGFR 主动靶向性适配结合,首次得出来了一套完整的活体生物体内癌变过程荧光图像。同时实验结果首次证实:(1)QDS 进入血液循环系统后易被作为异物识别而被体内单核吞噬系统细胞所吞噬,从而大量聚集于富含单核吞噬系统细胞的肝脾

等器官,这对躯体部位的肿瘤成像产生很大的干扰,但对缺乏单核吞噬系统细胞的口腔-头颈部的成像无干扰,因此口腔-头颈部是 QDS 的理想可视化成像部位;(2)口腔-头颈部恶性肿瘤大多为鳞癌,而90%以上的口腔-头颈部鳞癌细胞表面高表达 EGFR^[4],因此以 EGFR 为靶点用 QDS 进行活体可视化成像对头颈部鳞癌具有广泛适用性;(3)QDS 显影随着金黄地鼠颊黏膜癌变程度的加剧而扩大,并且形状与肉眼下癌变相吻合,故可用于肿瘤的个体化成像研究及治疗。综上所述,QD800-EGFR mAb 将在分子影像水平上对头颈-口腔肿瘤的发生发展及转移规律、侵袭深度、个体化治疗、术后监测等方面开启新的治疗模式。

参考文献:

- [1] Mehrotra R, Gupta A, Singh M, et al. Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions[J]. *Mol Cancer*, 2006, 5(11): 281-289.
- [2] Yang K, Zhang GD, Mei J, et al. Screening and analysis of pathogenic genes during DMBA-induced buccal mucosa carcinogenesis in golden hamsters [J]. *Oncology Reports*, 2010, 23 (6): 1619-1624.
- [3] Shi C, Zhu Y, Xie Z, et al. Visualizing human prostate cancer cells in mouse skeleton using bioconjugated near-infrared fluorescent quantum dots[J]. *Urology*, 2009, 74(2): 446-451.
- [4] Tada H, Higuchi H, Wanatabe TM, et al. In vivo real-time tracking of single quantum dots conjugated with monoclonal anti-HER2 antibody in tumors of mice[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(3): 1138-1144.
- [5] Yang K, Zhang FJ, Tang H, et al. In-vivo imaging of oral squamous cell carcinoma by EGFR monoclonal antibody conjugated near-infrared quantum dots in mice[J]. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6(5): 1739-1745.
- [6] Bentolila LA, Ebenstein Y, Weiss S. Quantum dots for in vivo small-animal imaging[J]. *J Nucl Med*, 2009, 50(4): 493-496.
- [7] Ciarlo M, Russo P, Cesario A, et al. Use of the semiconductor nanotechnologies "quantum dots" for in vivo cancer imaging [J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2009, 4(3): 207-215.
- [8] Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, et al. Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics[J]. *Science*, 2005, 307 (5709): 538-544.
- [9] Aswathy RG, Yoshida Y, Maekawa T, et al. Near-infrared quantum dots for deep tissue imaging[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397(4): 1417-1435.
- [10] Jiang W, Singhal A, Kim BYS, et al. Assessing near-infrared quantum dots for deep tissue, organ, and animal imaging applications[J]. *J Assoc Lab Autom*, 2008, 13(1): 6-12.
- [11] Vashisth SK, Tewari R, Bajpai RP, et al. Review of quantum dot technologies for cancer detection and treatment[J]. *J Nanotechnol*, 2006, 7(5): 99-104.
- [12] Cao YA, Yang K, Li ZG, et al. Near-infrared quantum-dot-based non-invasive in vivo imaging of squamous cell carcinoma U14[J]. *Nanotechnology*, 2010, 21(47): 475-479.
- [13] Gao X, Cui Y, Levenson RM, et al. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots[J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(8): 969-976.
- [14] Moon C, Chae YK, 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.

(本文编辑 杨 瑛)