

[文章编号] 1000-1182(2011)02-0175-04

· 专栏论著 ·

量子点荧光探针在人舌鳞状细胞癌组织中的应用研究

赵建江 黄宇华 王治平 盘杰 陈军

(南方医科大学附属口腔医院·广东省口腔医院 口腔颌面外科, 广州 510280)

[摘要] 目的 通过免疫荧光技术,利用量子点荧光探针在人的舌鳞状细胞癌组织中检测特定蛋白,探讨量子点荧光探针在人舌鳞状细胞癌组织中的应用。方法 相同粒径的量子点通过间接免疫荧光技术分别对人舌鳞状细胞癌组织中的P53及Bcl-2蛋白进行特异荧光标记,荧光显微镜观察蛋白定位表达;不同粒径的量子点通过间接免疫荧光技术,在同一张舌鳞状细胞癌组织切片上分别标记P53蛋白与Bcl-2蛋白,并对其定位表达进行观察。结果 相同粒径的量子点荧光探针可分别与组织中的P53、Bcl-2蛋白结合,在紫外荧光激发下发出特异红色荧光,P53蛋白结合物主要分布于细胞核;Bcl-2蛋白结合物主要分布于细胞质;不同粒径的量子点荧光探针在同一张组织切片上可同时对P53蛋白与Bcl-2蛋白进行标记,在紫外荧光激发下2种蛋白结合物发出2种不同颜色的荧光形成鲜明对比,显示量子点荧光探针标记的蛋白定位准确,特异性高。结论 量子点荧光探针可应用于人舌鳞状细胞癌组织中的2种蛋白的特异免疫荧光标记。

[关键词] 量子点荧光探针; 舌鳞状细胞癌; 免疫荧光

[中图分类号] R 739.98 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2011.02.019

Application of quantum dots fluorescent probes in tissue of human tongue squamous cell carcinoma ZHAO Jian-jiang, HUANG Yu-hua, WANG Zhi-ping, PAN Jie, CHEN Jun. (Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, The Affiliated Stomatological Hospital of Southern Medical University; Guangdong Provincial Stomatological Hospital, Guangzhou 510280, China)

[Abstract] **Objective** To study if quantum dots fluorescent probes can be applied to detect P53 protein and Bcl-2 protein in tissue of human tongue squamous cell carcinoma. **Methods** By indirect immunofluorescence assay the same particle size quantum dots fluorescent probes were applied to detect P53 protein and Bcl-2 protein respectively. Different particle size quantum dots fluorescent probes were applied to detect P53 protein and Bcl-2 protein simultaneously in paraffin-embedded tissue section of human tongue squamous cell carcinoma under fluorescent microscope. **Results** P53 protein and Bcl-2 protein can be combined with quantum dots fluorescent probes and specific fluorescence can be observed with ultraviolet light excited. P53 protein was mainly distributed in the nucleus, and Bcl-2 protein major in the cytoplasm. P53 protein and Bcl-2 protein can be combined with different particle size quantum dots fluorescent probes respectively in the same paraffin-embedded tissue section of human tongue squamous cell carcinoma and two kinds of fluorescence can be observed. **Conclusion** Quantum dots fluorescent probes can be applied to detect two kinds of specific protein in paraffin-embedded tissue section of human tongue squamous cell carcinoma.

[Key words] quantum dots fluorescent probe; tongue squamous cell carcinoma; immunofluorescence

恶性肿瘤的发生与多种癌基因激活、抑癌基因失活和细胞凋亡的调节紊乱有着密切关系。目前认为,p53和bcl-2是细胞凋亡调控中最重要的基因。而常规的免疫组织化学、免疫荧光方法在检测这些

基因表达方面存在某些局限性,本研究应用量子点(quantum dots, QD)荧光探针的光学优越性对P53与Bcl-2进行检测,探讨量子点荧光探针应用于人舌鳞状细胞癌组织的临床价值。

1 材料和方法

1.1 材料来源

收集10例2009年8—10月因舌鳞状细胞癌来广东省口腔医院住院治疗患者的舌鳞状细胞癌标本,

[收稿日期] 2010-07-10; [修回日期] 2010-11-04

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30672340);广东省科技计划基金资助项目(2008B030301183)

[作者简介] 赵建江(1965—),男,河南人,主任医师,博士

[通讯作者] 赵建江, Tel: 020-84439500

制成石蜡包埋组织切片。所有患者均通过组织病理学确诊,术前未接受任何放、化疗,其中男性5例,女性5例;年龄39~64岁,平均50.5岁。

1.2 主要试剂和仪器

鼠抗人P53单克隆抗体、鼠抗人Bcl-2单克隆抗体、兔抗人Bcl-2多克隆亲和纯化抗体(Santa cruz公司,美国);量子点标记的链霉亲和素试剂盒(武汉珈源量子点技术开发有限责任公司);BSA、PBS、TBS(Gibco公司,美国),实验所用溶液都采用高压灭菌去离子水配制;DP72荧光显微镜(Olympus公司,日本)。

1.3 方法

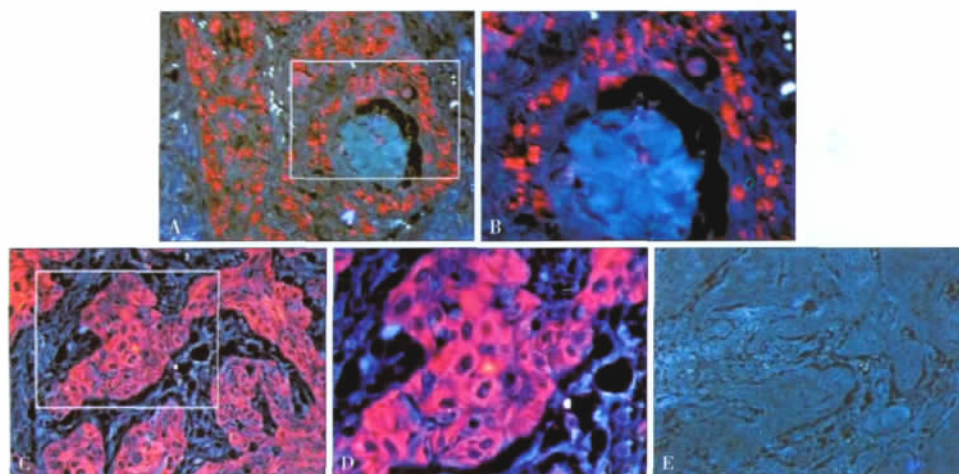
1.3.1 同一粒径量子点分别对人舌鳞状细胞癌石蜡包埋组织切片中P53和Bcl-2蛋白的标记 3~4 μm 厚人舌鳞状细胞癌石蜡包埋组织切片经脱蜡水化后在pH=6.0的枸橼酸缓冲盐溶液浸泡,微波修复抗原,自然冷却后,蒸馏水洗2次,TBS洗3次,加2%BSA 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭30 min,加一抗(鼠抗人P53单克隆抗体,或者鼠抗人Bcl-2单克隆抗体,稀释比均为1:100),在37 $^{\circ}\text{C}$ 中湿盒孵育2 h,TBST洗3次,每次5 min,2%BSA 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭10 min后加入二抗(生物素化羊抗鼠IgG,稀释比为1:500),37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒孵育30 min,TBST洗3次,每次5 min,2%BSA 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭20 min,加量子点标记的链霉亲和素,量子点发射波峰为605 nm(QD605),稀释比为1:100,37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒孵育30 min,TBST洗3次,每次5 min,TBS洗2次,缓冲甘油封片,紫外光激发下荧光显微镜观察。空白对

照用TBS液代替一抗,其余步骤与量子点标记法相同。

1.3.2 不同粒径量子点同时对人舌鳞状细胞癌石蜡包埋组织中P53和Bcl-2蛋白的标记 切片脱蜡水化,抗原修复同前,2%BSA封闭缓冲液37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒孵育30 min,滴加等量的1:50稀释的鼠抗人P53抗体及1:50稀释的兔抗人Bcl-2抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒孵育过夜,次日复温后TBST洗3次,每次5 min,2%BSA 37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒封闭10 min,滴加1:500稀释的生物素化羊抗鼠IgG,37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒孵育30 min,TBST洗3次,每次5 min,2%BSA 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭20 min,滴加1:100稀释的QD-SA,37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒孵育30 min,TBST洗3次,每次5 min,2%BSA 37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒封闭20 min,滴加1:100稀释的量子点标记的马抗兔IgG(量子点发射波峰为545 nm,QD545),37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒孵育30 min,TBST洗3次,每次5 min,TBS洗2次,缓冲甘油封片,紫外光激发下,荧光显微镜观察。

2 结果

用同一粒径量子点分别对人舌鳞状细胞癌石蜡包埋组织中的P53和Bcl-2蛋白进行标记时,可以看到量子点(QD605)标记的P53蛋白,蛋白主要定位于细胞核,在紫外光激发下发出红色荧光,见图1A,局部放大图见1B;量子点(QD605)标记的Bcl-2蛋白,蛋白主要定位于细胞质,在紫外光激发下发出红色荧光如图1C,局部放大图见1D;而空白对照则没有量子点激发出来的特异红色荧光,见图1E。



A: P53与QD605结合物紫外光下发出红色荧光 荧光显微镜 $\times 200$; B: P53与QD605结合的局部放大图,结合物发出红色荧光,定位于细胞核 荧光显微镜 $\times 400$; C: Bcl-2与QD605结合物紫外光下发出红色荧光 荧光显微镜 $\times 200$; D: Bcl-2与QD605结合的局部放大图,结合物发出红色荧光,定位于细胞质 荧光显微镜 $\times 400$; E: 空白对照,紫外光激发下未见特异荧光 荧光显微镜 $\times 100$ 。

图1 同一粒径量子点分别对人舌鳞状细胞癌组织中P53和Bcl-2蛋白的标记

Fig 1 Marked P53 and Bcl-2 protein respectively in tissue of human tongue squamous cell carcinoma with the same particle size of quantum dots probes

用不同粒径量子点同时对人舌鳞状细胞癌石蜡

包埋组织中的P53和Bcl-2蛋白标记时,可以看到量

量子点QD605标记的P53蛋白,蛋白主要定位于细胞核,在紫外光激发下发出红色荧光;而量子点QD545标记的Bcl-2蛋白,主要定位于细胞质,在紫外光激发下发出绿色荧光。大部分肿瘤细胞中绿色荧光包绕着红色荧光,对比鲜明,而部分肿瘤细胞只有绿色荧光或只有红色荧光,见图2。

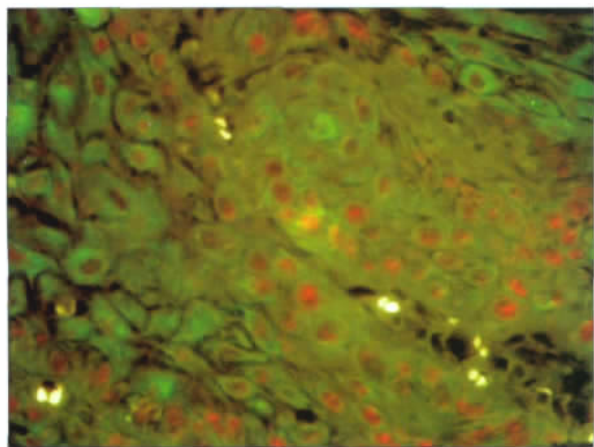


图2 不同粒径量子点同时对人舌鳞状细胞癌组织中P53和Bcl-2蛋白进行标记 荧光显微镜 ×400

Fig 2 Marked P53 and Bcl-2 protein simultaneously in tissue of human tongue squamous cell carcinoma with different particle size of quantum dots probes fluorescent microscope ×400

3 讨论

目前,广泛用于生物成像和临床诊断的有机荧光染料主要有异硫氰酸荧光素、罗丹明等,但都存在一些缺点,如激发光谱窄,发射光谱宽且携有红光尾段,导致发射光光谱重叠;不同颜色的染料还需配置多个激发光源,同时检测几个荧光探针标记的生物分子很困难;且有机染料发光不稳定,容易出现荧光漂白等^[1]。特别对于需要激光扫描共聚焦显微镜观察时,激光的亮度极高导致了普通有机染料的荧光漂白现象很普遍,为获得样本的三维成像或观察活样本时,由于所需的扫描和观察的时程较长,这样荧光信号就会因为漂白而减弱,图像显示不佳。因此,有机荧光在临床上的应用受到限制。

而量子点由于具有独特的量子尺寸效应和表面效应,与现有的有机荧光染料相比具有很大优势:1)颜色多样,通过调节量子点自身尺寸大小即可改变其发射光波长而改变其颜色,从而产生一个色彩斑斓、颜色分明的标记探针家族,这是传统的有机染料无法比拟的;2)激发光谱宽且连续分布,使得单一光源同时激发所有量子点、选择合适的激发光波长来最小化细胞组织样本自发荧光成为可能;3)发射光谱窄而对称、单色性好,空间位阻小,允许不同探针间隙小而光谱重叠更少,适于同时检测多

个标记指标;4)量子点荧光强度高而稳定,抗光漂白能力强,在激光扫描共聚焦显微镜高强度下连续扫描1 h,未见有明显荧光衰减^[2]。量子点表现出的荧光强度和持续时间是普通有机荧光染料的10~20倍,因而可在低信号强度情况下进行连续的光谱学检测^[3-5]。

本实验采用荧光抗体技术(fluorescence antibody, FA),先用相同粒径的量子点分别标记P53、Bcl-2蛋白,显示2种蛋白在舌癌组织中均表达,并了解其定位后再在同一张组织切片中利用不同粒径的量子点同时标记P53、Bcl-2蛋白,在同一紫外荧光激发下即显示P53与Bcl-2蛋白在肿瘤细胞中的不同表达位置。而有些肿瘤细胞只表达P53,显示绿色荧光,有些肿瘤细胞则只表达Bcl-2,显示红色荧光,而大部分舌癌肿瘤细胞由于同时表达P53蛋白及Bcl-2蛋白,因而呈现绿色荧光包绕红色荧光。这表明P53与Bcl-2蛋白在舌癌组织中的表达具有独特性,同时两种蛋白都在癌组织中高表达,则可能预示患者对放疗敏感性较低,预后较差^[6-8]。如果对舌癌病程变化做连续观察,从其不同着色的荧光变化中就可以了解P53、Bcl-2的相互作用及变化,这对了解肿瘤的发病机制、发生发展的机制及预后分析都有很大的帮助。而用单一荧光或免疫组织化学进行蛋白标记时不可能获得这些蛋白相互作用的信息。因此,量子点荧光探针受到国内外学者在肿瘤标志物、蛋白质组学研究方面的极大重视,如利用量子点荧光探针在肺癌组织芯片上同时检测细胞角蛋白和增殖细胞核抗原的蛋白表达,在乳腺癌组织中同时检测人表皮生长因子受体-2(human epidermal growth factor receptor-2, HEGR-2)、雌激素受体(estrogen receptor, ER)抗原的表达等,通过了解肿瘤蛋白的相互作用以期对肿瘤进行生物学行为分析,临床分期及预后分析等^[9-11]。

尽管量子点荧光探针具有许多优点而在生物医学领域备受关注,但也存在一些缺点。如量子点比传统荧光染料要大,且经过修饰后有时会更大,产生的空间位阻更明显,会在一定程度上限制其在分子生物学的应用;量子点的表面修饰和交联方式的不同可影响量子点的物理和化学状态,使量子点产量降低;修饰后水溶性量子点与功能基团(如抗体、生物素等)的偶联数量关系很难判定等^[12-15]。尽管如此,其在生物医学上的研究利用还是充满前景的。目前利用量子点荧光强度的变化对其检测的组织蛋白进行精确定量,利用量子点的优良光学特性而制作特定探针应用于活体成像研究等,将是下一步量子点荧光探针的研究方向,而这将为基因组学、蛋

蛋白质组学、药物筛选、生物大分子相互作用、肿瘤生物学行为分析等研究提供更加有效的技术支持。

【参考文献】

- [1] Hall M, Kazakova I, Yao YM. High sensitivity immunoassays using particulate fluorescent labels[J]. *Anal Biochem*, 1999, 272(2): 165-170.
- [2] 盘杰, 赵建江, 王治平, 等. 量子点荧光技术标记口腔鳞癌细胞中bcl-2的研究[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2009, 30(5): 634-638.
PAN Jie, ZHAO Jian-jiang, WANG Zhi-ping, et al. Quantum dot fluorescence marker in oral squamous cell carcinoma of bcl-2[J]. *J Sun Yat-Sen University: Medical Sciences Edition*, 2009, 30(5): 634-638.
- [3] Bruchez M Jr, Moronne M, Gin P, et al. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels[J]. *Science*, 1998, 281(5385): 1930-1931.
- [4] Pitsillides CM, Joe EK, Wei X, et al. Selective cells targeting with light-absorbing microparticles and nanoparticles[J]. *Biophys J*, 2003, 84(6): 4023-4032.
- [5] Alivisatos P. The use of nanocrystals in biological detection[J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(1): 47-52.
- [6] 方凤琴, 黄金颖, 刘文中等. 头颈鳞癌p53、Bcl-2及P-gp表达在治疗中的作用[J]. *实用肿瘤学杂志*, 2007, 21(6): 516-518.
FANG Feng-qin, HUANG Jin-ying, LIU Wen-zhong, et al. Effect expression of p53, Bcl-2 and P-gp protein in treatment head and neck squamous carcinoma[J]. *J Pract Oncol*, 2007, 21(6): 516-518.
- [7] Huang HY, Illei PB, Zhao Z, et al. Ewing sarcomas with p53 mutation or p16/p14ARF homozygous deletion: A highly lethal subset associated with poor chemoresponse[J]. *J Clin Oncol*, 2005,

23(3): 548-558.

- [8] Yamazaki Y, Chiba I, Hirai A, et al. Radioresistance in oral squamous cell carcinoma with p53 DNA contact mutation[J]. *Am J Clin Oncol*, 2003, 26(5): e124-e129.
- [9] 陈洪雷, 朱小波, 张玉霞, 等. 量子点免疫标记技术在肺癌组织芯片上的应用[J]. *武汉大学学报: 医学版*, 2008, 29(5): 607-609.
CHEN Hong-lei, ZHU Xiao-bo, ZHANG Yu-xia, et al. Application of quantum dots immune labelling technique in lung cancer tissue microarray[J]. *Medical J Wuhan University*, 2008, 29(5): 607-609.
- [10] Gbezani AA, Lee JA, Klostranec J, et al. High throughput quantification of protein expression of cancer antigens in tissue microarray using quantum dot nanocrystals[J]. *Nano Lett*, 2006, 6(12): 2881-2886.
- [11] Sweeney E, Ward TH, Gray N, et al. Quantitative multiplexed quantum dot immunohistochemistry[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 374(2): 181-186.
- [12] Pinaud F, Michalet X, Bentolila LA, et al. Advances in fluorescence imaging with quantum dot bio-probes[J]. *Biomaterials*, 2006, 27(9): 1679-1687.
- [13] Yu WW, Chang E, Drezek R, et al. Water-soluble quantum dots for biomedical applications[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 348(3): 781-786.
- [14] Kim SW, Kim S, Tracy JB, et al. Phosphine oxide polymer for water-soluble nanoparticles[J]. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(13): 4556-4557.
- [15] Warshaw DM, Kennedy GG, Work SS, et al. Differential labeling of myosin V heads with quantum dots allows direct visualization of hand-over-hand processivity[J]. *Biophys J*, 2005, 88(5): L30-L32.

(本文编辑 汤亚玲)

(上接第174页)

- surgical orthodontic therapy[J]. *Am J Orthod*, 1974, 66(4): 378-397.
- [4] 段银钟, 付建宏, 钱红, 等. 正畸正颌技术联合矫治成人严重双颌前突[J]. *中国美容医学*, 2002, 11(5): 470-472.
DUAN Yin-zhong, FU Jian-hong, QIAN Hong, et al. Treatment for adult skeletal bimaxillary by orthognathia with orthodontic and orthognathic surgery[J]. *Chinese J Aesthetic Medicine*, 2002, 11(5): 470-472.
- [5] 王兴, 张震康, 张熙恩. 正颌外科手术学[M]. 济南: 山东科技出版社, 1999: 138-141.
WANG Xing, ZHANG Zhen-kang, ZHANG Xi-en. Orthognathic surgery[M]. Jinan: Shandong Scientific and Technique Press, 1999: 138-141.
- [6] 段银钟, 王峰, 张云飞, 等. 固定咬合斜面导板打开咬合的临床效果[J]. *口腔正畸学*, 2003, 10(3): 117-118.
DUAN Yin-zhong, WANG Feng, ZHANG Yun-fei, et al. Clini-

cal effects of bite-opening by use of fixed inclined bite-plate[J]. *Chin J Orthodont*, 2003, 10(3): 117-118.

- [7] 段银钟, 孙应明, 刘彦普, 等. 正畸正颌联合治疗腭裂术后上颌骨严重发育不良症[J]. *实用口腔医学杂志*, 2002, 18(5): 408-411.
DUAN Yin-zhong, SUN Ying-ming, LIU Yan-pu, et al. Treatment of upper jaw postoperative dysostosis of maxilla in the patients with cleft palate by orthognathia[J]. *J Pract Stomatol*, 2002, 18(5): 408-411.
- [8] 段银钟, 霍娜, 陈磊, 等. 正畸治疗 类错颌下颌偏斜的疗效分析初探[J]. *中华口腔医学杂志*, 2008, 43(12): 462-466.
DUAN Yin-zhong, HUO Na, CHEN Lei, et al. Orthodontic treatment of Class patients with mandibular asymmetry[J]. *Chin J Stomatol*, 2008, 43(12): 462-466.

(本文编辑 李彩)