

量子点偶联 RGD 用于喉癌血管的靶向活体成像

朱小妹¹ 王晓梅² 冯刚² 陈强^{1,2} 林桂森² 赵郡婷¹ 许改霞¹ 牛憨笨¹

(¹深圳大学光电工程学院教育部/广东省光电子器件与系统重点实验室, 广东 深圳 518060)

(²深圳大学医学院深圳市生物医学工程重点实验室, 广东 深圳 518060)

摘要 研究了偶联环状精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-D-苯丙氨酸-赖氨酸[c(RGDfK)]肽段的 CdSe/ZnS 量子点(QD-RGD)对喉癌血管靶向成像。利用羧基与氨基反应将 c(RGDfK) 肽段与 QD 偶联;采用荧光分光光度计对 QD-RGD 在 RPMI1640 培养基和小鼠血清溶液中的光谱稳定性进行了检测;利用荧光显微镜检测 QD-RGD 对 Hep-2 细胞和 MCF-7 细胞上整合素 $\alpha_v\beta_3$ 的靶向性;最后将 QD-RGD 尾静脉注射到小鼠体内,检测了其皮脊翼视窗中喉癌血管的靶向性。结果表明 QD-RGD 的发射光谱在 RPMI1640 培养基 4 h 内没有明显变化,在小鼠血清中 24 h 内发射光谱的荧光强度仅下降了 20%;对细胞荧光成像表明 QD-RGD 能特异性与细胞表面的整合素 $\alpha_v\beta_3$ 结合;血管成像表明 QD-RGD 在注射 2 h 后聚集在喉癌局部血管,24 h 后 QD-RGD 从血管中移除。该研究表明 QD-RGD 能用于活体喉癌肿瘤血管靶向成像,这为喉癌的靶向诊断和靶向治疗研究提供了参考。

关键词 医用光学;量子点;环状精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-D-苯丙氨酸-赖氨酸肽段;整合素 $\alpha_v\beta_3$;皮脊翼视窗;肿瘤血管

中图分类号 Q632 文献标识码 A doi: 10.3788/CJL201441.0504002

Quantum Dot Conjugated RGD for Targeted *in Vivo* Imaging of Laryngocarcinoma Vessel

Zhu Xiaomei¹ Wang Xiaomei² Feng Gang² Chen Qiang^{1,2} Lin Guimiao²
Zhao Junting¹ Xu Gaixia¹ Niu Hanben¹

¹Key Laboratory of The Ministry of Education / Guangdong Optoelectronic Devices and System, College of Optoelectronic Engineering Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China

²Key Laboratory of Biomedical Engineering of Shenzhen, College of Medicine, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China

Abstract The targeted imaging of quantum dot (QD) conjugated cyclo (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys) peptides [c(RGDfK), QD-RGD] for laryngeal cancer blood vessel *in vivo* is studied. QD is conjugated with c(RGDfK) peptides by the reaction of carboxyl and amino groups. The spectra stabilities of QD-RGD in RPMI1640 and mouse serum are measured by fluorescence spectrophotometer. The targeting of QD-RGD to $\alpha_v\beta_3$ on Hep-2 and MCF-7 cells is studied by fluorescent microscope. Finally, the targeting of QD-RGD to laryngeal cancer vascular in dorsal skin fold window chamber by tail intravenous injection is investigated. The result shows that the spectra stability of QD-RGD in RPMI1640 does not obviously change in 4 hours. The fluorescence intensity of QD-RGD in mouse serum in 24 hours only decreases by 20%. The result of cells fluorescence imaging shows that QD-RGD can specifically bind to integrin $\alpha_v\beta_3$ on cells. The result of vascular imaging shows QD-RGD gathers in cancer blood vessel after injecting for 2 hours, and QD-RGD is removed from cancer blood vessel after 24 hours. The study demonstrates that QD-RGD can be used to targeted image cancer blood vessel *in vivo*, which offers a reference for studying targeting diagnosis and targeting therapy of laryngocarcinoma *in vivo*.

Key words medical optics; quantum dot; cyclo (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys) peptides; integrin $\alpha_v\beta_3$; skin fold window chamber; cancer blood vessel

OCIS codes 170.6280; 170.1530; 110.0180

收稿日期: 2013-09-01; 收到修改稿日期: 2013-10-01

基金项目: 国家 973 计划 (2012CB85802)、国家自然科学基金 (61235012, 61335001)、广东省科技创新项目 (2012KJJCX0094)

作者简介: 朱小妹 (1988-), 女, 硕士研究生, 主要从事生物光子学方面的研究。E-mail: zhuxiaomei_1988@163.com

导师简介: 许改霞 (1977-), 女, 博士, 副研究员, 主要从事生物光子学与纳米医学方面的研究。

E-mail: xugaixia@szu.edu.cn (通信联系人)

1 引 言

量子点(QD)是一种能光致发光的纳米晶体,尺寸限制在纳米量级。量子点的尺寸限制导致量子点的能量增大,能带变成类似于原子的分裂能级。当量子点受到一束高能量光的激发,量子点内的电子向高能级发生跃迁,电子从高能级返回低能级时发出荧光,并且量子点的尺寸越小,被束缚的量子点能量越大,发出的荧光波长越短^[1]。此外量子点还具有发光强度高和光稳定性高等特点,因此在能源^[2]、激光器^[3]及单光子光源^[4]方面具有重要的应用。近年来,在量子点表面修饰生物分子的荧光探针被广泛应用于生命科学领域研究,包括细胞成像^[5]、单分子追踪^[6]、DNA 检测^[7]、活体淋巴结成像^[8]、活体肿瘤成像^[9]及体内的药物追踪成像^[10]。但是如何提高对病理组织及生物器官的靶向成像质量仍然是量子点探针所面临的挑战。

据研究报道,整合素家族中的 $\alpha_v\beta_3$ 是重要的细胞粘附分子,是由 α_v 链和 β_3 链两个亚基组成的二聚体糖蛋白。在多数实体肿瘤细胞类型及肿瘤血管中高表达,而在正常组织和静态的内皮细胞中表达较低,并且整合素 $\alpha_v\beta_3$ 与肿瘤细胞浸润及转移有关,是肿瘤靶向成像及治疗的一个重要靶点^[11-13]。人工合成的含精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)肽段能与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 特异性结合,在肿瘤诊断和肿瘤治疗中具有重要的临床研究价值^[14]。喉癌是来源于喉粘膜上皮组织的恶性肿瘤,它的发病率占全身恶性肿瘤的 5.7%~7.6%,在耳鼻喉科领域中仅次于鼻咽癌和鼻腔、鼻窦癌,居第三位,好发年龄为 50~70 岁。由于喉癌发病人群及发病位置的特殊性,对喉癌的诊断和治疗效果一直不理想^[15],靶向诊断和靶向治疗有望突破喉癌诊断和治疗的瓶颈。

本文将 CdTe/ZnS 量子点与 c(RGDfK)肽段偶联(QD-RGD),检测了 QD-RGD 发射光谱在 RPMI1640 和小鼠血清两种不同溶液中随时间的变化;然后将 QD-RGD 与人喉癌细胞 Hep-2 和人乳腺癌细胞 MCF-7 共培养,检测了 QD-RGD 对细胞上 $\alpha_v\beta_3$ 特异靶向性;最后在皮脊翼视窗中构建 Hep-2 细胞株的肿瘤血管模型,通过注射 QD-RGD 溶液在荧光显微镜下观察 QD-RGD 对肿瘤血管的靶向性。结果表明量子点在 RPMI1640 培养基和小鼠的血清中的光谱稳定性较高,荧光成像结果表明 QD-RGD 能特异地靶向细胞上的整合素 $\alpha_v\beta_3$ 和肿瘤血管成像,这为肿瘤血管的靶向研究及治疗提供了参考信息。

2 材料和方法

2.1 主要仪器

正置荧光显微镜(日本 Olympus 公司, BX51);倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司, IX71);超净工作台(蚌埠净化设备厂, JDJ-203);数显式恒温烘箱(上海浦东荣丰科学仪器有限公司, DHG-9246);高压蒸汽灭菌锅型(上海博讯实业有限公司医疗设备厂, YXQ-LS-50SII);CO₂ 细胞培养箱(美国 CellStar 公司, QWJ700SVBA);荧光分光光度计(Hitachi 日立, F-4600)。

2.2 主要试剂

CdSe/ZnS 量子点溶液(发射峰波长为 655 nm)购自英徕捷基(上海)贸易有限公司;1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC·HCL)购自北京百灵威有限公司;N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;胰酶和 Hoechst33258 购自 sigma 奥德里奇(上海)贸易有限公司;胎牛血清(FBS)、青霉素、链霉素、RMPI1640 培养基和 DMEM 培养基均购自深圳库源生物科技有限公司;其余试剂均为分析纯。

2.3 实验方法

2.3.1 QD-RGD 偶联

用磷酸盐缓冲液(PBS)分别制备浓度为 1 mg/mL 的 EDC 和 NHS 溶液;取 25 μ L 的 QD 溶液(8 μ mol/L)放入装有 100 μ L PBS 的 1.5 mL 棕色 EP 管中,再加入 10 μ L EDC 和 10 μ L NHS 溶液磁力搅拌 20 min;之后在此棕色管中加入 12.1 μ L 的 RGD 溶液(1 mg/mL),并且加入 PBS 溶液使棕色管中溶液体积为 200 μ L,用磁力搅拌器搅拌 2 h,之后用透析袋进行透析纯化,去除未偶联的 c(RGDfK)分子。

2.3.2 QD-RGD 不同溶液中的稳定性

分别取 4 μ L 的 QD-RGD 溶液加入到 996 μ L 的 RMPI1640 培养液和小鼠血清中使得 QD-RGD 的终浓度均为 4 nmol/L,用荧光分光光度计分别检测两种溶液中的 QD-RGD 在不同时间点(0、0.5、1、2、4、6、8、24 h)的发射光谱。

2.3.3 Hep-2 细胞 $\alpha_v\beta_3$ 靶向性检测

人喉癌 Hep-2 细胞株(购于南京凯基生物有限公司)的培养基是含有 10% 小牛血清(FBS)的 RMPI1640 培养基,阴性对照组人乳腺癌 MCF-7 细胞株(暨南大学生命科学院馈赠)的培养基是含有 10% 小牛血清的 DMEM 完全培养基,细胞放于 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养;待细胞贴壁生长到 80% 时,用 PBS 将细胞洗两遍,加入 0.25% 的胰

酶消化 5 min, 然后以 1000 r/min 转速离心 5 min; 重悬细胞后用血球计数板进行计数, 将细胞以 6×10^3 个/孔接种于含有盖玻片的 24 孔板中过夜; 第二天吸去旧培养基, 用 PBS 洗两遍, 分别加入 1 nmol/L 的 QD-RGD 和 QD 溶液(用无血清的 RPMI1640 培养液配置), Hep-2 细胞分为一个实验组和两个对照组, 实验组直接加入 1 nmol/L 的 QD-RGD 进行标记, 一个对照组直接加入 1 nmol/L 的 QD 溶液进行标记, 另一个对照组先加入 $5 \mu\text{mol}$ c(RGDfK) 封闭 30 min, 之后加入 1 nmol/L QD-RGD 溶液进行标记; 阴性对照组 MCF-7 细胞中只加入 1 nmol/L QD-RGD 溶液进行标记; 细胞添加 QD 或 QD-RGD 后放于培养箱中培养 1 h, 之后用 PBS 洗两遍, 每遍 5 min, 加入 4% 多聚甲醛溶液固定 10 min; 再用 PBS 洗两遍, 加入配制好的 Hoechst 33258 染色 10 min, 用 PBS 洗两遍; 封片后用荧光显微镜进行观察。

2.3.4 皮脊翼视窗制作

为了研究 QD-RGD 活体靶向喉癌血管成像, 在小鼠的背部制作了皮脊视窗模型, 视窗构建如文献描述^[16], 简单步骤为选取 20~25 g 的 BALB/c-nu 小鼠(购自于广东动物中心), 腹腔注射 150 μL 的 1% 戊巴比妥钠, 麻醉后放于加热垫上, 用碘伏对制作视窗的部位进行消毒处理后, 将一片视窗用针线缝合固定于小鼠背部一侧, 装上上边的一颗螺丝固定另一片视窗; 然后去掉另一侧直径约为 12 mm 左右的皮肤, 注射 5 μL 的 Hep-2 细胞($2 \times 10^5 \mu\text{L}^{-1}$), 将直径为 14 mm 的盖玻片覆盖去除了皮肤的部位; 最后将视窗下边缝合在小鼠的背部。制作完视窗的小鼠单独放于鼠笼中饲养, 给予小鼠无菌的食物和水。

2.3.5 QD-RGD 靶向血管检测

一周后, 待视窗中肿瘤面积大于等于 6 mm²

时, 用戊巴比妥钠麻醉小鼠后, 利用显微镜对小鼠的肿瘤血管拍照; 然后尾静脉注射 100 pmol 的 QD-RGD 溶液, 用波长 490 nm 的激发光对小鼠血管中的 QD-RGD 靶向进行荧光成像。

3 结果和讨论

3.1 QD-RGD 在不同溶液中的稳定性

QD 的发射峰波长为 652 nm, QD 与 c(RGDfK) 偶联后的发射光谱与 QD 的光谱没有差别, 说明 c(RGDfK) 对 QD 的发光特性没有影响。接下来研究了 QD-RGD 溶液在两种不同生物溶液中的发射光谱随时间的变化, 如图 1 所示。图 1(a) 是 QD-RGD 的发射峰波长位置在两种不同溶液中随时间的变化, 图 1(b) 是 QD-RGD 在两种不同溶液中的荧光强度随时间的变化。由图可见, QD-RGD 的在两种溶液中的发射峰的位置随时间没有明显变化, 24 h 后 QD-RGD 的荧光峰值位置在小鼠血清中仅有 1 nm 左右的位移, 而在 RPMI1640 培养基中峰值的位置没有变化。QD-RGD 的荧光强度在两种溶液中随时间变化的差异较大, 在 RPMI1640 培养液中, QD-RGD 的荧光强度 1 h 后增大了 9.21%, 这种变化趋势与 CdTe 量子点在 RPMI1640 培养基中的发射光谱的变化一致^[17]。分析原因可能由于 RPMI1640 培养基中含有的氨基酸分子或者其他的分子能与 QD-RGD 表面结合, 增加量子点结构的稳定性, 减少量子点的聚集, 从而使 QD-RGD 的荧光强度增强。并且 QD-RGD 的荧光强度在 RPMI1640 培养基中 4 h 时没有明显变化, 但在 24 h 后其荧光强度下降了 96.4%, 因此在短时期内研究 QD-RGD 对细胞上 $\alpha_v\beta_3$ 靶向时可以使用 RPMI1640 作为 QD-RGD 的配制液。在小鼠血清中, QD-RGD 的荧光强度缓慢下降, 24 h 之后荧光强度下降了 20%,

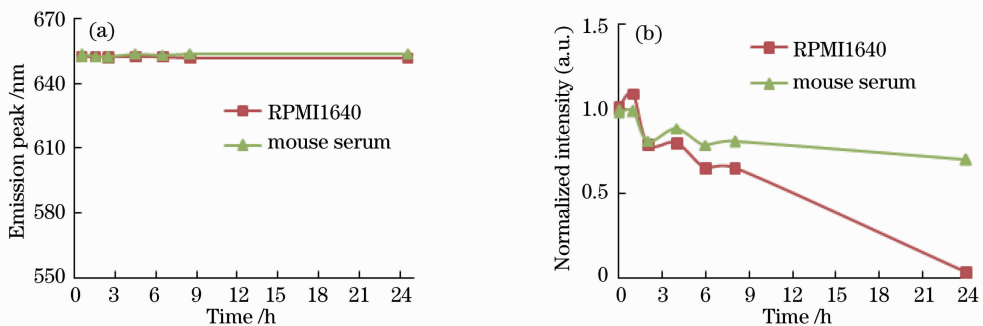


图 1 QD-RGD 在两种不同溶液中发射光谱随时间的变化。(a) 发射光谱峰值的变化; (b) 发射光谱的荧光强度的变化

Fig. 1 Emission spectra of QD-RGD in different solutions changes with time. (a) Variations of emission peak; (b) variations of fluorescence intensity

说明 QD-RGD 可以用于长时间活体成像研究。

可见, QD-RGD 在 RPMI1640 培养基 4 h 内的发射光谱较稳定, 并且它在小鼠血清中 24 h 内的荧光强度的变化是可以用来活体成像。QD-RGD 在这两种生物液体中的稳定性可能由于这些液体中存在的生物分子在一定时间内不会破坏量子点的结构, 从而量子点可用于生物活体一些疾病的成像和示踪。

3.2 QD-RGD 靶向细胞成像

Hep-2 细胞和 MCF-7 细胞经处理后用荧光显微镜成像如图 2 所示。Hep-2 细胞与 QD-RGD 共培养 1 h 后, 细胞核周围可看见明显的红色荧光, 说

明 QD-RGD 在细胞周围聚集; Hep-2 经 1 nmol/L 的 QD 溶液处理后, 在细胞周围没有发现量子点的红色荧光, 说明 1 nmol/L QD 与细胞培养 1 h 无法对细胞进行非特异性染色成像; 对于先用 c(RGDfK) 封闭后再用 QD-RGD 处理后的 Hep-2 细胞周围也没有发现红色荧光, 可能由于过量的 c(RGDfK) 将细胞上的 $\alpha_v\beta_3$ 位点几乎全部占据, QD-RGD 无法与细胞上的 $\alpha_v\beta_3$ 结合, 因此没有红色荧光。阴性对照组 MCF-7 细胞周围没有发现红色荧光, MCF-7 细胞被证明是低表达 $\alpha_v\beta_3$ ^[13], 因此 QD-RGD 不能聚集在细胞周围, 可见 QD-RGD 能特异性与细胞上的 $\alpha_v\beta_3$ 结合, 进而对细胞进行成像。

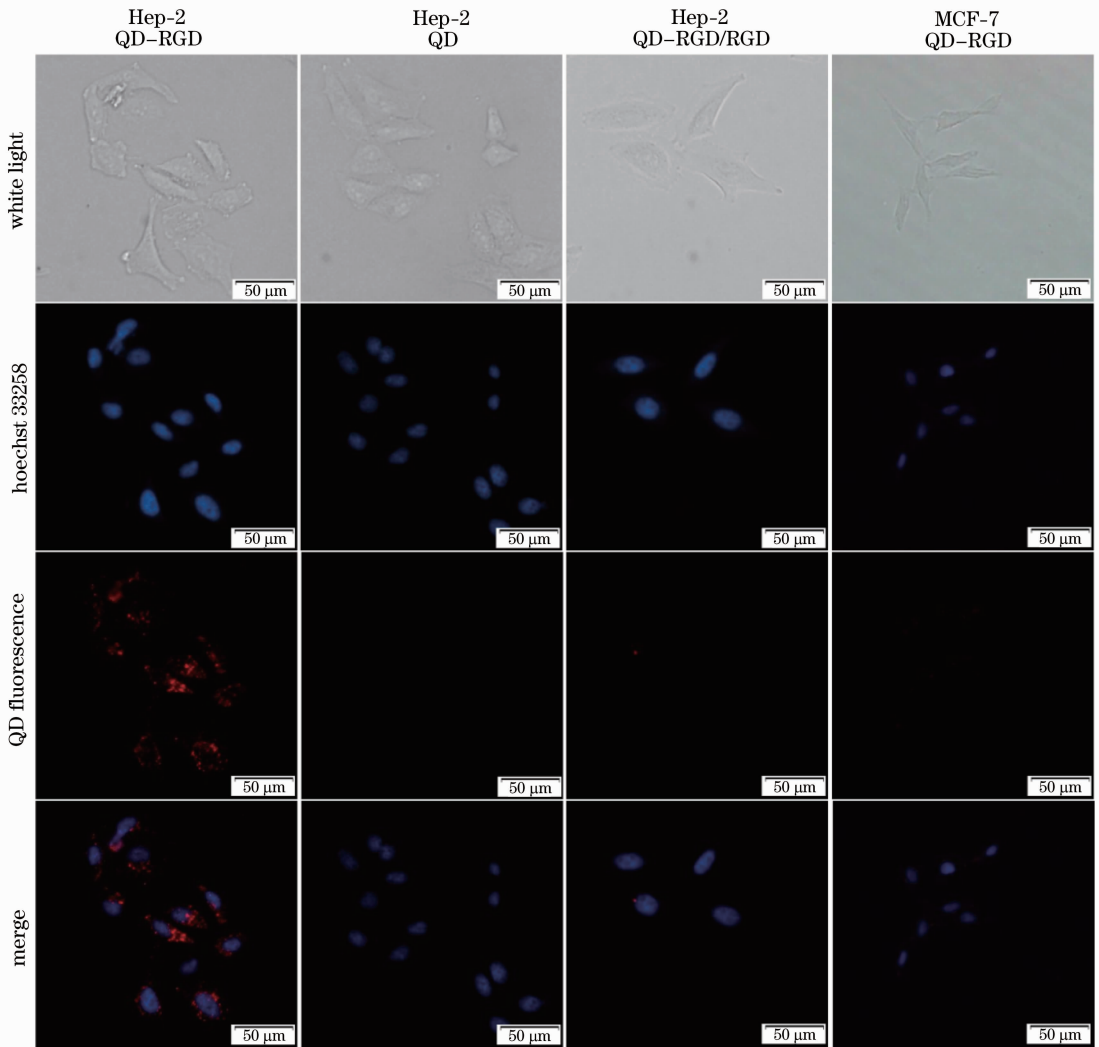


图 2 QD-RGD 对 Hep-2 细胞靶向性

Fig. 2 QD-RGD targeting to Hep-2 cells

3.3 QD-RGD 活体靶向肿瘤血管成像

小鼠背部构建的皮脊翼视窗模型如图 3(a) 所示, 在视窗中可以清晰看见血管。在视窗中间移植 Hep-2 细胞一周后, 利用显微镜白光成像喉癌肿瘤

血管如图 3(b) 所示, 在肿瘤周围有细小而丰富的肿瘤血管, 这些肿瘤血管对肿瘤的生长具有重要意义, 它们为肿瘤的生长提供营养和排走代谢产物。并且肿瘤血管内的内皮细胞快速生长, 处于激活状态, 肿

瘤血管内的整合素高表达^[18]。

尾静脉注射 QD-RGD 后,在荧光显微镜下对视窗中的血管进行成像,5 min 内量子点在血管中快速流动。如图 4 所示,注射 2 h 后,量子点在肿瘤血管处发现明显红色荧光,说明 QD-RGD 在肿瘤血管处聚集,而在正常血管中没有发现荧光;注射 24 h

后,对视窗中肿瘤血管成像发现,肿瘤血管中红色荧光消失,根据 QD-RGD 在小鼠血清中的稳定性判断,24 h 后 QD-RGD 的荧光强度仍为 70%左右,推测 QD-RGD 已经从血管中排出。活体血管成像结果说明 QD-RGD 能活体靶向喉癌血管成像。

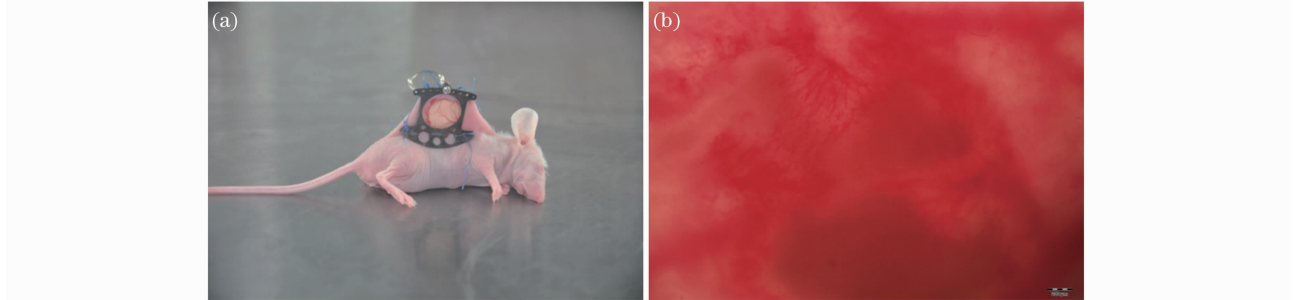


图 3 皮脊翼视窗中喉癌血管模型。(a)皮脊翼视窗模型;(b)白光下视窗中喉癌局部血管成像,标尺 200 μm

Fig. 3 Laryngeal cancer vascular model in dorsal skin fold window chamber. (a) Model of mouse dorsal skin fold window chamber; (b) image of partial laryngeal cancer vascular in dorsal skin fold window chamber, scale bar is 200 μm

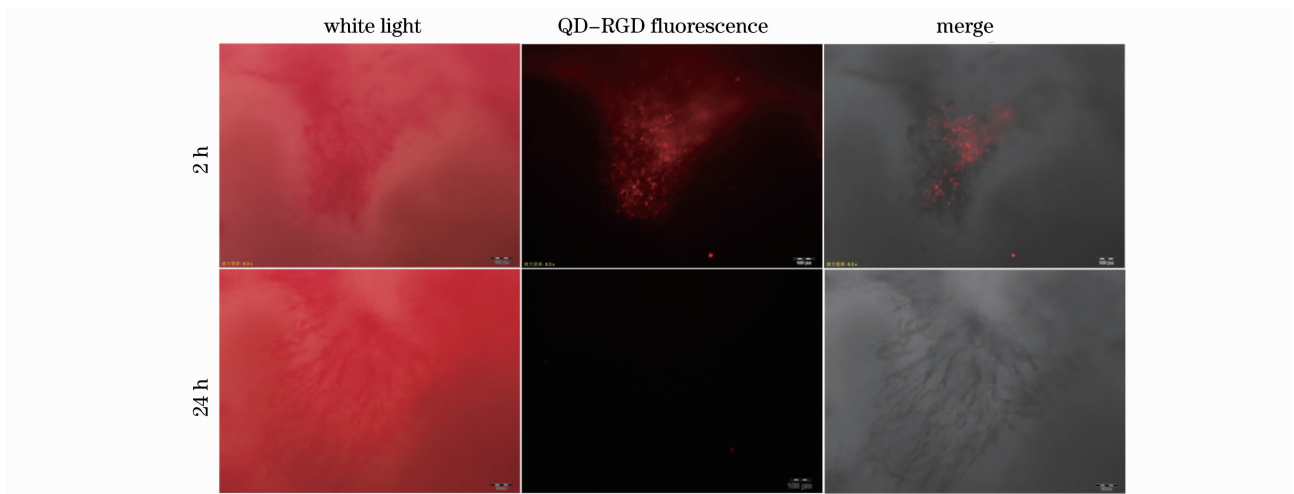


图 4 QD-RGD 活体靶向喉癌血管成像,标尺为 100 μm

Fig. 4 QD-RGD targeted imaging laryngocarcinoma vessel *in vivo*, scale bar is 100 μm

4 结 论

通过光谱检测结果得知小鼠血清和 RPMI1640 培养基对 QD-RGD 用于细胞靶向成像和活体肿瘤血管靶向成像没有明显影响; Hep-2 细胞成像结果表明 QD-RGD 探针能与细胞上高表达的 $\alpha_v\beta_3$ 受体特异性结合;进一步的喉癌血管成像说明 QD-RGD 能活体靶向肿瘤血管上的 $\alpha_v\beta_3$ 受体,进而对肿瘤血管成像,这对于早期肿瘤靶向诊断和肿瘤靶向治疗具有重要的意义。

参 考 文 献

1 A P Alivisatos. Semiconductor cluster, nanocrystals and quantum dots[J]. Science, 1996, 271(5251): 933-937.

- 2 Yu Pingrong, Zhu Kai, Norman Andrew G, *et al.*. Nanocrystalline TiO_2 solar cells sensitized with InAs quantum dots[J]. J Phys Chem B, 2006, 110(50): 25451-25454.
- 3 S G Li, Q Gong, C F Cao, *et al.*. Multi-spectral lasing characteristics of InAs/GaAs quantum dot laser[J]. Superlattice Microst, 2013, 59: 97-105.
- 4 T M Babinec, B J M Hausmann, M Khan, *et al.*. A diamond nanowire single-photon source[J]. Nature Technology, 2010, 5 (3): 195-199.
- 5 W C W Chan, S M Nie. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection [J]. Science, 1998, 281 (5385): 2016-2018.
- 6 S Courty, C Luccardini, Y Bellaiche, *et al.*. Tracking individual kinesin motors in living cells using single quantum-dot imaging [J]. Nano Lett, 2006, 6(7): 1491-1495.
- 7 Peng Hui, Zhang Lijuan, T H M Kjallman, *et al.*. DNA hybridization detection with blue luminescent quantum dots and dye-labeled single-stranded DNA[J]. J Am Chem Soc, 2007, 129

- (11): 3048–3049.
- 8 H Kobayashi, Y Hama, Y Koyama, *et al.*. Simultaneous multicolor imaging of five different lymphatic basins using quantum dots[J]. *Nano Lett*, 2007, 6(7): 1711–1716.
- 9 Y Cao, K Yang, Z Li, *et al.*. Near-infrared quantum-dot-based non-invasive in vivo imaging of squamous cell carcinoma U14[J]. *Nanotechnology*, 2010, 21(47): 475104.
- 10 W Xu, L Liu, N J Brown, *et al.*. Quantum dot-conjugated anti-GRP78 scFv inhibits cancer growth in mice[J]. *Molecules*, 2012, 17(1): 796–808.
- 11 Chen Xiaoyuan, Sievers Eric, Hou Yingping, *et al.*. Integrin $\alpha v \beta 3$ targeted imaging of lung cancer[J]. *Neoplasia*, 2005, 7(3): 271–279.
- 12 O Lieleg, M Lpe-Garca, C Semmrich, *et al.*. Specific integrin labeling in living cells using functionalized nanocrystals [J]. *Small*, 2007, 3(9): 1560–1565.
- 13 W Cai, S Dong-Woon, K Chen, *et al.*. Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects[J]. *Nano Lett*, 2006, 6(4): 669–676.
- 14 E Ruoslahti, M D Pierschbacher. New perspectives in cell adhesion; RGD and integrins[J]. *Science*, 1987, 238(4826): 491–497.
- 15 Wang Chao. Empirical Study on Anti-Tumor Peptide of Tumastatin Treating Laryngeal Squamous Cell Carcinoma[D]. Shenyang: China Medical University, 2007.
王 超. 肿瘤抑素抗肿瘤活性相关肽治疗喉鳞状细胞癌的实验研究[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2007.
- 16 G M Palmer, A N Fontanella, S Shan, *et al.*. In vivo optical molecular imaging and analysis in mice using dorsal window chamber models applied to hypoxia, vasculature and fluorescent reporters[J]. *Nat Protoc*, 2011, 6(9): 1355–1366.
- 17 Zhai Peng, Xu Gaixia, Zhu Xiaomei, *et al.*. Synthesis of targeting quantum dot and its applications in *in vivo* imaging research[J]. *Chinese J Lasers*, 2013, 40(1): 0104003.
翟 鹏, 许改霞, 朱小妹, 等. 靶向量子点的合成及其在活体成像研究中的应用[J]. *中国激光*, 2013, 40(1): 0104003.
- 18 C J Avraamides, B Garmy-Susini, J A Varner. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2008, 8(8): 604–617.

栏目编辑: 韩 峰