

# 靶向 EGFR 可见光量子点用于三阴乳腺癌显像的实验研究

汪文霞 刘振 盖永康 蒋亚群 苑陆杰 兰晓莉

华中科技大学同济医学院附属协和医院核医学科、湖北省分子影像重点实验室, 武汉 430022

通信作者: 兰晓莉, Email: hzslxl@163.com

**【摘要】目的** 探索可见光量子点(QDs)作为载体靶向表皮生长因子受体(EGFR)用于三阴乳腺癌体外和在体靶向显像的可行性。**方法** 水溶性 QDs 与西妥昔单克隆抗体(Cetuximab)反应合成探针 QD-Cetuximab, 检测其形态、粒径、稳定性和发光特性。培养人乳腺癌细胞 MDA-MB-468(EGFR+) 和 MDA-MB-453(EGFR-), 与 QD-Cetuximab 和 QDs 温育进行细胞毒性实验、细胞显像和荧光定量分析。制备 MDA-MB-468 荷瘤裸鼠 8 只, 经尾静脉注射 100 μl QD-Cetuximab 和 QDs, 观察不同时间点的显像结果和探针分布。采用两独立样本 *t* 检验分析数据。**结果** 电镜下 QD-Cetuximab 粒径为 (40.34±2.44) nm, 动态光散射(DLS)结果示其水合粒径为 (57.85±4.69) nm, 且结构稳定。QD-Cetuximab 浓度≤50 nmol/L 时, 细胞相对存活率>90%; 而当浓度增至 100 nmol/L, 细胞相对存活率降至 (72.52±4.91)%。MDA-MB-468 经 QD-Cetuximab 温育后发出的红色荧光比 MDA-MB-468 用 QDs 温育和 MDA-MB-453 用 QD-Cetuximab、QDs 温育的均强, 标准化后的荧光强度定量分析显示 QD-Cetuximab 组荧光强度是 QDs 组的 5.1 倍 (863.36/169.97)。流式细胞分析示 MDA-MB-468 摄取 QD-Cetuximab 和 QDs 均随其浓度增加而增加, 但前者明显高于后者 (*t* 值: 12.25~38.11, 均  $P<0.05$ ), 25, 50, 100 和 200 nmol/L 浓度下 QD-Cetuximab 组的平均荧光强度与 QDs 组的比值分别为 5.4, 6.9, 7.4 和 6.2。QD-Cetuximab 和 QDs 探针在体内都主要聚集在肝, 在肝发出荧光的背景下肿瘤发出的荧光不明显, 但离体瘤组织可见荧光, QD-Cetuximab 组和 QDs 组的离体瘤组织荧光强度分别为  $(2.46\pm0.60)\times10^4$  和  $(1.29\pm0.05)\times10^4$  (*t*=3.392,  $P=0.015$ )。**结论** 偶联 Cetuximab 的 QDs 增加了对表达 EGFR 的三阴乳腺癌细胞的靶向能力; QD-Cetuximab 在三阴乳腺癌裸鼠离体成像效果尚可, 但需进一步修饰, 减少肝摄取。

**【关键词】** 乳腺肿瘤; 受体, 表皮生长因子; 量子点; 抗体, 单克隆; 肿瘤细胞, 培养的; 小鼠, 裸

**基金项目:** 国家自然科学基金重点项目 (81630049)

DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20190930-00214

## Visible light emitted quantum dots targeting EGFR in triple-negative breast cancer

Wang Wenxia, Liu Zhen, Gai Yongkang, Jiang Yaqun, Yuan Lujie, Lan Xiaoli

Department of Nuclear Medicine, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology; Hubei Key Laboratory of Molecular Imaging, Wuhan 430022, China

Corresponding author: Lan Xiaoli, Email: hzslxl@163.com

**[Abstract]** **Objective** To explore the feasibility and conditions of *in vitro* and *in vivo* imaging of triple-negative breast cancer using visible light emitted quantum dots (QDs) as the carrier to target epidermal growth factor receptor (EGFR). **Methods** The water-soluble QDs reacted with Cetuximab to synthesize the probe QD-Cetuximab. The morphology, particle size, stability and luminescence properties of the probe were examined. Human breast cancer cells MDA-MB-468 (EGFR+) and MDA-MB-453 (EGFR-) were cultured. Cytotoxicity assays, *in vitro* imaging and fluorescence intensity quantification were performed after cells incubation with QD-Cetuximab and QDs. Eight MDA-MB-468 tumor-bearing mice models were constructed, 100 μl QD-Cetuximab and QDs were injected through the tail vein. *In vivo* imaging and probe distribution were obtained at different time points. Independent-sample *t* test was used to analyze the data.

**Results** QD-Cetuximab had a particle size of (40.34±2.44) nm detected by transmission electron microscope (TEM), a hydrated particle size of (57.85±4.69) nm detected by dynamic light scattering (DLS), and a stable structure. When the concentration of QD-Cetuximab was ≤50 nmol/L, the relative survival rate of cells was more than 90%, and when the concentration exceeded 100 nmol/L, the relative survival rate of cells was reduced to (72.52±4.91)% ( $P<0.05$ ). The red fluorescence of MDA-MB-468 incubated with

QD-Cetuximab was stronger than that of MDA-MB-468 incubated with QDs and MDA-MB-453 incubated with QD-Cetuximab or QDs. The confocal fluorescent intensity quantitative determination showed that the ratio of QD-Cetuximab group/QDs group was 5.1 (863.36/169.97). Flow cytometry showed that the uptake of QD-Cetuximab and QDs by MDA-MB-468 increased with incremental incubating concentration, and the former was more significantly (*t* values: 12.25–38.11, all *P*<0.05). When the incubating concentration was 25, 50, 100, and 200 nmol/L, the quantitative average fluorescent intensity ratio of QD-Cetuximab group/QDs group was 5.4, 6.9, 7.4 and 6.2, respectively. The QD-Cetuximab and QDs probes mainly accumulated in the liver *in vivo*. The fluorescence emitted by tumor was not obvious under the high fluorescence of liver as a background. However, the fluorescence was visible in the isolated tumor tissue, and the quantitative fluorescence intensity of experimental group and control group were  $(2.46\pm0.60)\times10^4$  and  $(1.29\pm0.05)\times10^4$ , respectively (*t*=3.392, *P*=0.015). **Conclusions** Cetuximab can increase the targeting ability of QDs and promote cell uptake. Although the isolated tumor imaging results are acceptable, further modification of QDs should be considered to reduce the liver uptake and improving *in vivo* fluorescence imaging efficiency.

**【Key words】** Breast neoplasms; Receptor, epidermal growth factor; Quantum dots; Antibodies, monoclonal; Tumor cells, cultured; Mice, nude

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81630049)

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20190930-00214

乳腺癌具有很高的异质性,其在女性的癌症死亡率中高居第 2 位<sup>[1]</sup>。三阴乳腺癌即雌激素受体 (estrogen receptor, ER)、孕激素受体 (progesterone receptor, PR)、原癌基因人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 三者均为阴性的乳腺癌,因缺乏治疗靶点而备受关注。研究发现表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 是具有重要研究价值的靶点<sup>[2]</sup>,其在三阴乳腺癌中的表达超过 50%,相对其他类型乳腺癌较高<sup>[3-4]</sup>。因此,EGFR 可作为三阴乳腺癌的生物标志物和治疗靶点。

量子点 (quantum dots, QDs) 为一种在生物医学研究中具有良好发展潜力的光学纳米材料,可通过改变尺寸发出不同波长的光 (从可见光到近红外光),具有激发光谱宽、发射光谱窄、抗光漂白性强等优点。因此,利用不同尺寸 QDs 在同一激发光下发出多色可见光的特性,可实现肉眼可见的同时多色显像,目前此方法较常用于组织细胞水平,而单色可见光 QDs 进行活体成像的研究较少<sup>[5-6]</sup>,同时在体多色显像更是鲜有报道,且仅限于非特异性淋巴系统研究的探索<sup>[7-8]</sup>,经血液循环的多靶和多色显像还有待进一步研究。本研究应用发出红光的 QD625,通过连接西妥昔单克隆抗体 (Cetuximab) 增加靶向 EGFR 能力,用于高表达 EGFR 的人三阴乳腺癌体外分析及在体显像,以探讨单色可见光 QDs 的体外和在体靶向显像的可行性,并进行了显像条件的探索,为可见光 QDs 在体显像提供基础和依据。

## 材料和方法

1. 主要材料。(1) 试剂和仪器。人乳腺癌细胞株 MDA-MB-468 (简称 468) 和 MDA-MB-453 (简称

453) (中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心);Cetuximab (Merck Drugs & Biotechnology, 德国);水溶性 QD625-COOH(武汉珈源量子点技术开发有限责任公司);PD10 脱盐层析柱 (美国 GE 公司);紫外分光光度计 (EpochTM, Bio Tek, 美国);多功能酶标仪 (EnSpireTM, PerkinElmer, 新加坡);透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM; TECNAI G2 F20, FEI, 美国);动态光散射 (dynamic light scattering, DLS; Malvern 0486, Malvern, 英国);流式细胞分析仪 (flow cytometer, FC; BD FACSCalibur, Becton Dickinson, 美国);激光共聚焦荧光显微镜 (Nikon C2, 日本);倒置荧光显微镜 (Olympus IX51, 日本);小动物活体成像系统 (*in-vivo* imaging system FX PRO, Bruker, 德国)。

(2) 实验动物。无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级 BALB/c nu/nu 雌性裸鼠 (华中科技大学同济医学院实验动物中心) 8 只, 鼠龄 4~8 周, 体质量  $(15\pm2)$  g。饲养条件恒温恒湿, 饲料、垫料、饮水均经过灭菌处理。动物实验经华中科技大学同济医学院实验动物使用管理委员会批准。

2. 方法。(1) QD625-Cetuximab 探针的制备和纯化。将 QD625-COOH (8 μmol/L) 和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 [1-(3-dimethyl-aminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC; >98%, 2 mg/ml]、N-羟基琥珀酰亚胺 (*N*-hydroxysuccinimide, NHS; >98%, 2 mg/ml) 以物质的量比 1:3 000:5 500 混合<sup>[9]</sup>, 室温下置于摇床上 30 min, 然后用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS; pH 值 9.18) 调 pH 值至 8~9。以 QD625-COOH : Cetuximab = 1:30 (*m/m*) 的比例加入抗体, 置于温控摇床上充分反应 4 h, 4 °C, 避光。反应产物经 PD10 柱纯化。纯化后产物

置于 4 ℃避光保存备用。根据产品提供的摩尔吸光系数  $\epsilon=3.55\times10^6$  和测量波长 450 nm 2 个参数,用紫外分光光度计测出样品在 450 nm 激发光下的吸光度,已知比色杯光程,计算出 QD-Cetuximab 的浓度。

(2) QD-Cetuximab 探针的性能检测。用多功能酶标仪分析探针 QD-Cetuximab 的激发和发射曲线,并与 QDs 进行对比。将 QD-Cetuximab 稀释至  $1\times10^{-9}$  mol/L, 将铜网覆在样品的液面上 60 s 后拿起, 用滤纸吸净多余液体后用磷钨酸染色 30 s, 静置晾干, 用 TEM 检测粒径。取 QD-Cetuximab 样品 1 ml, 用 DLS 测纳米粒的水合粒径和 Zeta 电位, 并监测其稳定性。

(3) Western blot 分析 468 和 453 EGFR 的表达。将 468 和 453 接种于 6 孔板内(每孔约  $1\times10^6$  个细胞), 待长至 80% 用细胞裂解液(radio immunoprecipitation assay, RIPA) 裂解细胞, 收集, 冰浴 30 min 后, 离心 5~10 min(4 ℃, 11 000 r/min), 收集上清, 测定蛋白质浓度。将蛋白质样品与蛋白质上样缓冲液混合, 沸水浴 6 min。配制质量分数 10% 的分离胶和质量分数 5% 的浓缩胶, 添加电泳缓冲液, 将 468 和 453 的蛋白质样品加入电泳孔道中, 进行恒压电泳。剪取聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜用甲醇活化, 用 300 mA 电流转膜 90 min。转好的膜用质量分数 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后, 加入 EGFR 单克隆抗体(一抗)于 4 ℃下温育 12 h, 然后温育二抗 1 h。最后显影曝光, 用 AlphaEaseFC 软件分析灰度值。

(4) 细胞毒性实验。选取对数生长期的 468 接种于 96 孔板中(每孔约  $1\times10^4$  个细胞), 贴壁 24 h 后, 用含不同浓度(0、6.25、12.5、25、50、100 和 200 nmol/L) QD-Cetuximab 和 QDs 的培养基温育 24 h, 每孔 100 μl。然后将细胞增殖-毒性检测液(cell counting Kit-8, CCK-8) 溶液:无血清培养基以 1:9 的比例稀释, 每孔加 100 μl CCK-8 稀释液, 37 ℃下温育 2 h。用酶标仪测量每个孔在 450 nm 处的吸光度。将 0 nmol/L 组的细胞存活率作为 100%, 计算其他浓度下的细胞相对存活率。

(5) QD-Cetuximab 探针细胞显像。选取对数生长期的 468 接种于 6 个共聚焦皿里(每个皿约  $1\times10^5$  个细胞), 贴壁 24 h 后, 分为 2 组, 每组 3 个皿, 实验组加入  $1\times10^{-7}$  mol/L 的 QD-Cetuximab 100 μl, 对照组加入  $1\times10^{-7}$  mol/L 的 QDs 100 μl, 37 ℃下温育 2 h 后, 用质量分数 4% 多聚甲醛固定 15 min, 用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole,

DAPI) 复染 5 min, 染色全程避光。最后在共聚焦荧光显微镜下观察 2 组细胞荧光标记的情况, 激发光为 488 nm。

(6) QD-Cetuximab 探针摄取与浓度的关系。选取对数生长期的 468 和 453 分别接种于 96 孔板里(每个孔约  $1\times10^4$  个细胞), 贴壁 24 h 后, 分别用含不同浓度(10、20、40、60 和 80 nmol/L) QD-Cetuximab 和 QDs 的培养基温育 2 h, 每孔 100 μl。然后用质量分数 4% 多聚甲醛固定 15 min, DAPI 复染 5 min, 染色全程避光。最后用倒置荧光显微镜观察 2 种细胞用不同浓度的 2 种探针温育后的荧光标记情况。

(7) 流式细胞分析。将 468 接种于 6 孔板内(每孔约  $1\times10^6$  个细胞), 贴壁 24 h 后, 用含不同浓度(25、50、100 和 200 nmol/L) QD-Cetuximab 和 QDs 的培养基温育 2 h, 每孔 1 ml。然后用胰酶消化, 移至 1.5 ml 离心管中, 4 ℃, 1 000 r/min 离心 5 min, 再用 200 μl PBS 重悬, 移至流式管, 全程尽量避光。200 μl PBS 作为空白对照组。流式细胞分析仪获得的数据经软件 FlowJo 进行分析。通过每管的荧光强度来定量细胞对探针的摄取。

(8) QD-Cetuximab 探针在体和离体显像。取对数生长期的 468 制备细胞悬液, 于 BALB/c nu/nu 裸鼠右前臂皮下接种  $2\times10^6/100 \mu\text{l}$  的细胞, 肿瘤生长 1 个月后进行在体实验。将荷瘤裸鼠简单随机分为实验组和对照组, 每组各 4 只, 实验组经尾静脉注射 100 μl 的 QD-Cetuximab, 对照组经尾静脉注射 100 μl 的 QDs, 均含 150 pmol 的 QD625。注射完毕将小鼠立即放入暗室, 于 2、3、6、9、24 h 进行动物活体成像, 激发光和发射光分别为 400 和 600 nm。显像完成后解剖动物, 取出重要脏器和肿瘤组织, 再用同样的方法进行离体显像, 并用 Bruker MI SE 软件进行荧光定量分析。再将肿瘤组织浸入质量分数 4% 多聚甲醛中, 用石蜡包埋制切片, 进行 HE 染色和 EGFR 的免疫组织化学染色。

3. 统计学处理。采用 IBM SPSS 21.0 进行数据分析, 符合正态分布的定量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示, 2 组均数间的比较采用两独立样本 t 检验,  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

- QD-Cetuximab 探针的特性。用 EDC 和 NHS 活化 QD625 表面的羧基, 通过羧基和氨基的反应合成 QD-Cetuximab。PD10 纯化后, 电镜结果显示干燥纳米粒 QDs 直径为  $(31.93\pm2.04)$  nm, QD-Cetuximab 直径为

( $40.34\pm2.44$ ) nm。DLS 结果显示 QDs 的水合粒径为 ( $38.50\pm4.41$ ) nm, QD-Cetuximab 的水合粒径为 ( $57.85\pm4.69$ ) nm, QDs Zeta 电势为 ( $-16.5\pm1.44$ ) mV, QD-Cetuximab Zeta 电势为 ( $-8.3\pm0.85$ ) mV。粒径的增大和电势的改变均表明 Cetuximab 已与 QDs 表面连接。72 h 监测 QD-Cetuximab 的水合粒径波动在 5 nm 之内, 表明 QD625 和 Cetuximab 结合稳定。多功能酶标仪测得 QD-Cetuximab 的激发曲线和发射曲线与 QDs 的基本重合, 两者的大激发波长均在 380 nm, 最大发射波长均为 625 nm, 表明 QDs 连接 Cetuximab 不影响其光学特性。

2. EGFR 在 468 和 453 的表达。Western blot 结果显示 468 的蛋白质条带在  $180\times10^3$  处可见一浓黑条带, 而 453 的相应位置未见明显灰度条带, 表明 468 表达 EGFR 明显强于 453。

3. 细胞毒性。468 经与一定浓度梯度的 QD-Cetuximab 和 QDs 温育 24 h 后, 可发现当 QD-Cetuximab 和 QDs 浓度  $\leq 50$  nmol/L, 细胞相对存活率平均值均大于 90%, 与空白对照组 (0 nmol/L) 相比差异均不明显 ( $t$  值:  $0.421\sim2.769$  和  $0.211\sim2.486$ , 均  $P>0.05$ )。当浓度增至 100 nmol/L 时, 实验组和对照组细胞相对存活率分别降至 ( $72.52\pm4.91$ )% 和 ( $73.02\pm3.92$ )% ( $n=5$ )。组间比较发现, 每个浓度下 QD-Cetuximab 和 QDs 组细胞相对存活率差异无统计学意义 ( $t$  值:  $0.054\sim1.636$ , 均  $P>0.05$ ), 表明 QDs 连接 Cetuximab 后对其细胞毒性没有明显影响 (表 1)。

4. QD-Cetuximab 探针体外显像和细胞摄取。普通荧光显微镜下肉眼可见 468 用较高浓度 QD-Cetuximab 温育后发出的红色荧光强于 468 用同等浓度 QDs 温育, 也强于 453 用同等浓度 QD-Cetuximab 或 QDs 温育。且随浓度升高, 468 和 453 对 QD-Cetuximab 和 QDs 的摄取均增加, 其中以 468 对探针 QD-Cetuximab 的摄取增加最明显, 表明在忽略非特异性摄取的情况下, Cetuximab 的特异性靶向可增加 EGFR 高表达细胞对探针的摄取。探针浓度越高, 细胞摄

取越多, 可检测的荧光强度越强(图 1)。共聚焦荧光显微镜下可见, QD-Cetuximab 温育后 468 所发出的红色荧光比 QDs 温育更强(图 2), 应用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析实验组和对照组的累积吸光度值分别为 ( $863.36\pm37.21$ ) 和 ( $169.97\pm20.37$ ) ( $n=3, t=23.12, P<0.05$ ), QD-Cetuximab 的吸光度值是 QDs 组的 5.1 倍。

流式细胞分析结果显示, 以空白对照组为不发荧光, 在不同温育浓度下, QD-Cetuximab 组发出荧光的细胞占所有细胞的百分比(后面均用阳性率表示)均高于 QDs 组。浓度为 25 nmol/L 时, QD-Cetuximab 的阳性率为 65.4%, 而 QDs 组仅为 0.63%; 浓度为 50 nmol/L 时, QD-Cetuximab 的阳性率高达 90.5%, 而 QDs 组仅为 1.09%。随浓度继续升高, 细胞对 QDs 的摄取也逐渐增加, 从 100 nmol/L 到 200 nmol/L, QDs 组的阳性率从 9.29% 升至 43.3%, 而 QD-Cetuximab 的摄取接近饱和, 阳性率为 98.5%~99.0%。对各组细胞发出的荧光强度进行定量分析可见, 在 25、50、100、200 nmol/L 浓度下 QD-Cetuximab 组与 QDs 组的荧光强度分别为  $128.0\pm11.7$  与  $23.8\pm8.9$  ( $t=12.25$ )、 $221.3\pm15.1$  与  $32.1\pm6.4$  ( $t=19.92$ )、 $420.3\pm14.5$  与  $57.1\pm7.9$  ( $t=38.11$ )、 $606.8\pm22.7$  与  $98.1\pm7.5$  ( $t=36.84$ ) ( $n=3$ , 均  $P<0.05$ ), 2 组比值分别为 5.4、6.9、7.4 和 6.2。

5. QD-Cetuximab 探针在体、离体显像和分布。实验组和对照组在体显像发现, 2 组探针均明显聚集于肝, 而肿瘤均未见明显显影。对脏器和肿瘤组织进行离体显像, 发现 QDs 组可见少许荧光残存于肺, QD-Cetuximab 组可见少量存在于肺和小肠, 心、脾、肾、肿瘤均未见明显荧光分布(图 3A)。取实验组和对照组的肿瘤组织单独进行离体显像, 可见实验组肿瘤组织发出的荧光稍强于对照组, 表明 QD-Cetuximab 存在一定的靶向性(图 3B)。用 Bruker MI SE 软件分析 QD-Cetuximab 组和 QDs 组的离体瘤组织荧光强度分别为  $(2.46\pm0.60)\times10^4$  和  $(1.29\pm0.05)\times10^4$  ( $n=4; t=3.392, P=0.015$ ), 差异有统计

表 1 不同浓度 QD-Cetuximab 和 QDs 温育 468 后细胞相对成活率比较(%;  $\bar{x}\pm s$ )

组别	浓度 (nmol/L)					
	6.25	12.5	25	50	100	200
QD-Cetuximab	$96.42\pm10.14$	$90.86\pm6.56$	$91.64\pm9.38$	$90.68\pm2.68$	$72.52\pm4.91$	$66.31\pm5.02$
QDs	$98.48\pm9.58$	$97.35\pm5.01$	$92.00\pm5.68$	$90.28\pm3.22$	$73.02\pm3.92$	$72.15\pm1.69$
$t$ 值	0.320	1.363	0.054	0.151	0.125	1.636
$P$ 值	$>0.05$	$>0.05$	$>0.05$	$>0.05$	$>0.05$	$>0.05$

注: 温育时间为 24 h ( $n=5$ ); 468 为人乳腺癌细胞株 MDA-MB-468, Cetuximab 为西妥昔单克隆抗体, QDs 为量子点

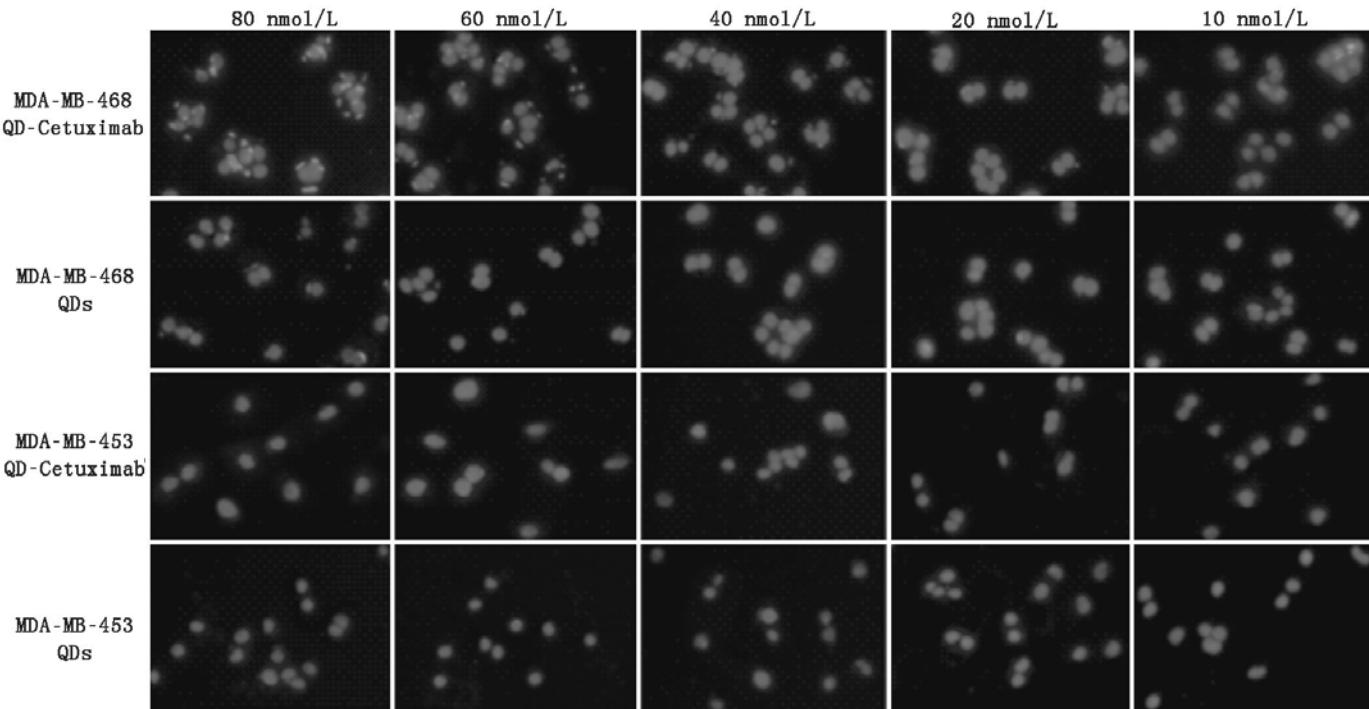


图 1 人乳腺癌细胞株 MDA-MB-468 和 MDA-MB-453 分别用不同浓度量子点(QDs)和 QD-西妥昔单克隆抗体(Cetuximab)温育 2 h 后的荧光显像图(×400)。红色荧光:QD625, 蓝色荧光:DAPI 为 4',6-二脒基-2-苯基吲哚

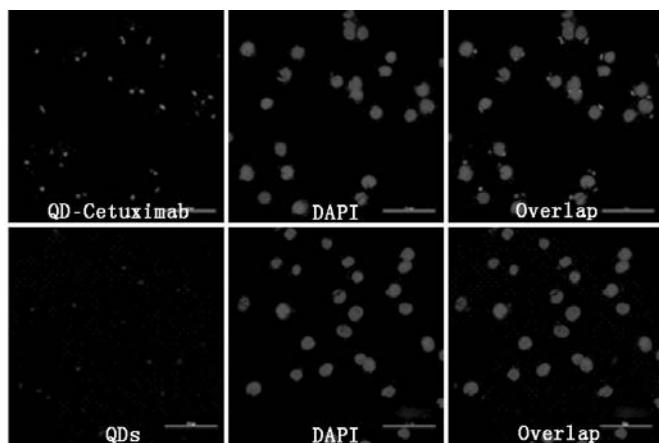


图 2 人乳腺癌细胞株 MDA-MB-468 分别用 QD-Cetuximab 和 QDs 温育 2 h 后的共聚焦显像图(×400)。红色荧光:QD625, 蓝色荧光:DAPI, Overlap 为重叠

学意义(图 3C)。取离体瘤组织进行 HE 染色和免疫组织化学染色,HE 染色可见排列紊乱的肿瘤组织细胞和新生血管(图 4A),免疫组织化学中的黄染区域表明 468 肿瘤组织高表达 EGFR(图 4B)。

## 讨 论

纳米技术已广泛应用于生物医学研究,尤其是在肿瘤的靶向定位和载药治疗等方面。QDs 作为一种可发荧光的纳米材料,因其优越的理化性质而备受关注。QDs 的激发光谱较为宽泛,一般用紫外或蓝光激发,而发射光谱较窄,相互之间的干扰较小,有利于多种 QDs 在同一激发光下同时进行多色显像。这项技术目前主要应用于细胞水平的研究<sup>[10-12]</sup>,在体显像偏向于用近红外荧光,因其组织

穿透力相对较强。另外,QDs 比有机染料的抗光漂白能力强,可满足长时间显像的需要。

本研究所采用的 QD625 为(CdSe)ZnS 壳核结构。QDs 和 Cetuximab 的反应是随机的,因为抗体作为蛋白质分子,其表面有许多个氨基,即多个结合位点,当 QDs 与抗体的活性区域结合后,可能会影响抗体识别抗原,导致探针失去靶向性。QDs 和 Cetuximab 定向结合的方法还有很多,例如将 Cetuximab 的 Fc 段醛基化,QDs 表面巯基化,通过巯基与醛基的共价结合将抗体 Fc 段连接到 QDs 表面等<sup>[9]</sup>。本实验综合考虑特异性、发光强度和试剂消耗等因素后选择了羧基-氨基共价偶联的方法。QDs 和 Cetuximab 反应形成的酰胺键稳定,通过监测探针的水合粒径,发现波动不明显,表明短期内酰胺键不会发生断裂,保证了探针在体内的稳定性。QD-Cetuximab 和 QDs 的激发曲线和发射曲线基本一致,两者均在 380 nm 处出现吸收峰,在 625 nm 处出现发射峰,表明 QDs 表面修饰生物分子不影响其光学特性。

由于 QDs 的核心结构是由 Cd、Se 等重金属组成,探针的毒性危害一直是其临床转化应用的阻碍,故 QDs 的细胞毒性以及在体毒性一直为研究重点。有研究认为重金属核所致的细胞毒性可能与 QDs 本身的理化性质<sup>[13]</sup>、胞外浓度(给药浓度)和胞内浓度(细胞摄取)<sup>[14]</sup>、细胞种类<sup>[15]</sup>、表面化学修饰[聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)、COOH、NH<sub>2</sub>]<sup>[16-17]</sup>、诱导氧化应激<sup>[18]</sup>等因素有关。但也有研究认为短

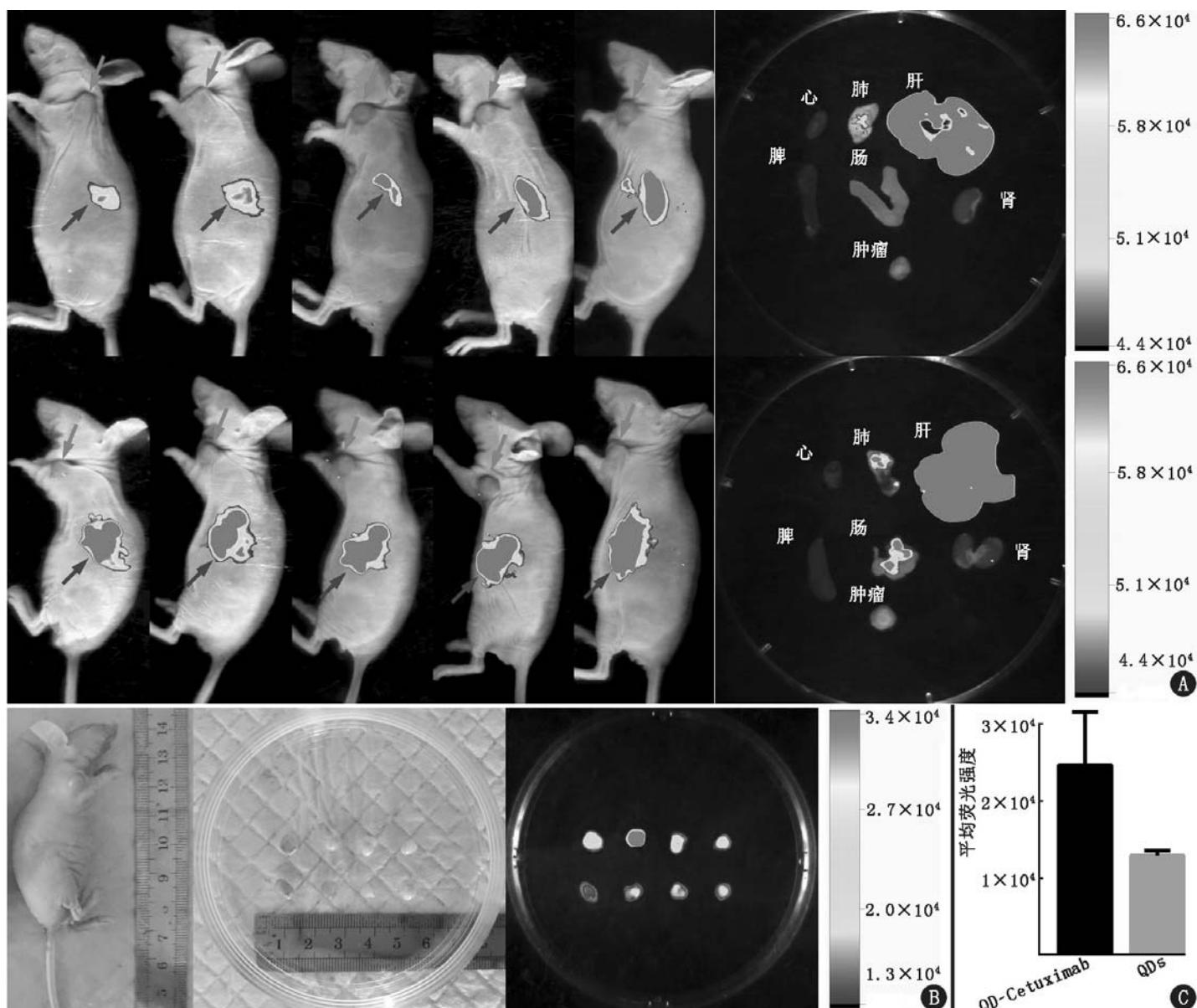


图 3 不同组小鼠显像及荧光强度定量分析结果。A. 经尾静脉注射量子点(QDs)(上)和 QD-西妥昔单克隆抗体(Cetuximab)(下)后 2、3、6、9、24 h(从左到右)在体及离体组织显像(红色箭头示肿瘤,蓝色箭头示肝);B. 肿瘤大小约 0.6~0.7 cm(长径)时,24 h 后实验组(上,QD-Cetuximab 组)和对照组(下,QD 组)的离体肿瘤组织单独显像( $n=4$ );C. 图 B 中 2 组肿瘤组织平均荧光强度定量分析

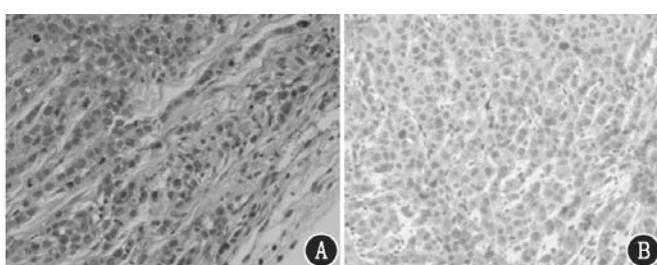


图 4 468 肿瘤组织 HE 和免疫组织化学结果。A. 468 瘤组织 HE 染色( $\times 200$ );B. 468 瘤组织表达表皮生长因子受体(EGFR)的免疫组织化学染色( $\times 200$ )

期内 QDs 对于活体不存在明显的急性毒害作用<sup>[19]</sup>。本实验发现当 QD-Cetuximab 和 QDs 的温育浓度小于 50 nmol/L 时,细胞相对存活率几乎维持在 90% 以上,表明其重金属核产生的细胞毒性不大,可能是纳米粒的 ZnS 外壳结构所致<sup>[20]</sup>,以及外面包裹的一层有机物避免了重金属的暴露。当 QD-Cetuximab

和 QDs 的温育浓度达到 100 nmol/L 以上时,细胞相对存活率骤降至 70% 左右,表明当探针达到一定浓度时,重金属核的毒性会由少聚多,从而影响细胞存活。

QDs 作为一种纳米结构,其本身会被细胞摄取,摄取的多少与 QDs 的粒径、所带电荷、给药浓度、表面化学修饰<sup>[21]</sup>以及细胞种类有关<sup>[22]</sup>;QDs 粒径越小,带负电荷越少<sup>[23]</sup>,浓度越高,细胞对 QDs 摄取越高;连接细胞膜分子表达增加的靶向抗体,也能促进细胞对 QDs 的摄取。本实验中当浓度从 20 nmol/L 递增到 80 nmol/L,468 摄取 QD-Cetuximab 均比 QDs 明显增多。不同温育浓度下,453 发出的荧光均弱于 468,且随浓度越大,差异越明显。共聚焦荧光显微镜下可见 QD-Cetuximab 组的 468 发出红色荧光,QDs 组可见星点荧光,标准化荧光强度分析表明实验组的平均荧光强度约为对照组的 5 倍。QDs

由于粒径小容易被细胞摄取,因此 QDs 孵育的 468 和 453 都能发出少许荧光,但 Cetuximab 能够增加 EGFR 高表达细胞对探针的摄取,表明增加了探针的靶向性。流式细胞分析结果也进一步证实了这一结果。

既往研究更多的是采用近红外纳米粒进行小动物活体成像<sup>[24-26]</sup>,因为近红外光的组织穿透力最强。可见光的穿透力虽然相对较弱,但其优势在于肉眼可辨,且具有不同颜色。QDs 的一个特性是,不同粒径在同一激发光下可发出不同波长的可见光,这使之成为同时多色显像研究的较好选择。为验证可见光 QDs 用于活体成像的可行性,本研究选择发出可见红光的 QD625 用于小鼠在体显像。结果发现 QD-Cetuximab 和 QDs 均主要聚集在肝,少许存在于肺和小肠,而肿瘤部位没有显像。当对离体瘤组织单独进行显像时,可见实验组的荧光强度强于对照组,荧光强度定量分析也佐证了该结果。因此,探针 QD-Cetuximab 和 QDs 进入体内后都会被肝摄取,而被肿瘤摄取的量非常少,但从实验组和对照组离体瘤组织的显像差异来看,Cetuximab 可使探针具有一定的靶向性。

QD-Cetuximab 和 QDs 作为外源性物质,容易在网状内皮组织内沉积(如肝)。有研究表明在纳米粒表面连接 PEG 可减少非特异性摄取,延长血液循环时间<sup>[27-28]</sup>。探针的注射剂量也需要斟酌,量少难以获得肿瘤对比显像,过多可能会产生毒性。有研究者每只鼠仅给予 100 pmol QDs<sup>[29]</sup>,有的推荐注射 200 pmol QDs/只<sup>[30]</sup>,有的因为是靶向颅内原位癌,注射剂量高达 5 nmol QDs/只<sup>[31]</sup>。为达到显像效果,QDs 预计注射剂量必定要多于近红外 QDs。

本研究在体肿瘤显像不理想,可能是探针 QD-Cetuximab 缺乏 PEG 修饰,注射剂量不恰当,肿瘤组织相对肝来说体积太小(用于显像的肿瘤实际大小约 0.6~0.7 cm)以及可见光组织穿透力较弱等。后续有关可见光用于活体成像的研究需要考虑的因素有纳米载体的选择,探针的粒径(过大容易被肝脾摄取),所带电荷(电荷越多越容易非特异性结合),探针的水溶性(水溶性较弱会导致血液循环时间过短),表面修饰(PEG 可减少网状内皮组织吞噬),探针注射剂量、给药方式以及肿瘤的部位、大小等。QD-Cetuximab 在三阴乳腺癌裸鼠离体成像尚可,但仍需进一步修饰,减少肝摄取,以提高在体荧光显像效果。

QDs 作为备受关注的纳米材料,具有许多优质特

性,其能发出从可见到近红外各波长的荧光供体外和在体显像研究。虽然 QDs 核心是由重金属组成,存在毒性风险,但在一定浓度范围内(<100 nmol/L),QDs 的细胞毒性可忽略不计。QDs 凭借粒径小易被细胞内吞,表面修饰 Cetuximab 可增强探针对 EGFR 的靶向性,促进细胞摄取。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参 考 文 献

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108. DOI: 10.3322/caac.21262.
- [2] Ali AM, Ansari JAK, El-Aziz NMA, et al. Triple negative breast cancer: a tale of two decades [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2017, 17(4): 491-499. DOI: 10.2174/187152061666160725112335.
- [3] Levva S, Kotoula V, Kostopoulos I, et al. Prognostic evaluation of epidermal growth factor receptor (EGFR) genotype and phenotype parameters in triple-negative breast cancers [J]. Cancer Genomics Proteomics, 2017, 14(3): 181-195. DOI: 10.21873/cgp.20030.
- [4] Foidart P, Yip C, Radermacher J, et al. Expression of MT4-MMP, EGFR, and RB in triple-negative breast cancer strongly sensitizes tumors to erlotinib and palbociclib combination therapy [J]. Clin Cancer Res, 2019, 25(6): 1838-1850. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1880.
- [5] Zhao Y, Zhang Y, Qin G, et al. In vivo biodistribution and behavior of CdTe/ZnS quantum dots [J]. Int J Nanomedicine, 2017, 12: 1927-1939. DOI: 10.2147/IJN.S121075.
- [6] Han HS, Niemeyer E, Huang Y, et al. Quantum dot/antibody conjugates for in vivo cytometric imaging in mice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(5): 1350-1355. DOI: 10.1073/pnas.1421632111.
- [7] Kosaka N, Ogawa M, Sato N, et al. In vivo real-time, multicolor, quantum dot lymphatic imaging [J]. J Invest Dermatol, 2009, 129(12): 2818-2822. DOI: 10.1038/jid.2009.161.
- [8] Kosaka N, Mitsunaga M, Choyke PL, et al. In vivo real-time lymphatic draining using quantum-dot optical imaging in mice [J]. Contrast Media Mol Imaging, 2013, 8(1): 96-100. DOI: 10.1002/cmmi.1487.
- [9] Xing Y, Chaudry Q, Shen C, et al. Bioconjugated quantum dots for multiplexed and quantitative immunohistochemistry [J]. Nat Protoc, 2007, 2(5): 1152-1165. DOI: 10.1038/nprot.2007.107.
- [10] Clausen MP, Arnspong EC, Ballou B, et al. Simultaneous multi-species tracking in live cells with quantum dot conjugates [J]. PLoS One, 2014, 9(6): e97671. DOI: 10.1371/journal.pone.0097671.
- [11] Li S, Jiang J, Yan Y, et al. Red, green, and blue fluorescent folate-receptor-targeting carbon dots for cervical cancer cellular and tissue imaging [J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2018, 93: 1054-1063. DOI: 10.1016/j.msec.2018.08.058.
- [12] Liu C, Wang R, Wang B, et al. Orange, yellow and blue luminescent carbon dots controlled by surface state for multicolor cellular imaging, light emission and illumination [J]. Mikrochim Acta, 2018, 185(12): 539. DOI: 10.1007/s00604-018-3072-3.
- [13] Hu L, Zeng G, Chen G, et al. Bioaccumulation and toxicity of CdSe/ZnS quantum dots in phanerochaete chrysosporium [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2017, 159: 303-311. DOI: 10.

- 1016/j.colsurfb.2017.08.006.
- [14] Manshian BB, Abdelmonem AM, Kantner K, et al. Evaluation of quantum dot cytotoxicity: interpretation of nanoparticle concentrations versus intracellular nanoparticle numbers [J]. *Nanotoxicology*, 2016, 10(9): 1318-1328. DOI:10.1080/17435390.2016.1210691.
- [15] de Carvalho SM, Mansur A, Mansur HS, et al. *In vitro* and *in vivo* assessment of nanotoxicity of CdS quantum dot/aminopolysaccharide bionanoconjugates [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 71: 412-424. DOI:10.1016/j.msec.2016.10.023.
- [16] Ulusoy M, Jonczyk R, Walter JG, et al. Aqueous synthesis of PEGylated quantum dots with increased colloidal stability and reduced cytotoxicity [J]. *Bioconjug Chem*, 2016, 27(2): 414-426. DOI:10.1021/acs.bioconjchem.5b00491.
- [17] Clift MJ, Varet J, Hankin SM, et al. Quantum dot cytotoxicity *in vitro*: an investigation into the cytotoxic effects of a series of different surface chemistries and their core/shell materials [J]. *Nanotoxicology*, 2011, 5(4): 664-674. DOI:10.3109/17435390.2010.534196.
- [18] Luo YH, Wu SB, Wei YH, et al. Cadmium-based quantum dot induced autophagy formation for cell survival via oxidative stress [J]. *Chem Res Toxicol*, 2013, 26(5): 662-673. DOI:10.1021/tr300455k.
- [19] Chen LD, Liu J, Yu XF, et al. The biocompatibility of quantum dot probes used for the targeted imaging of hepatocellular carcinoma metastasis [J]. *Biomaterials*, 2008, 29(31): 4170-4176. DOI:10.1016/j.biomaterials.2008.07.025.
- [20] Mansur AA, Mansur HS, de Carvalho SM, et al. Surface biofunctionalized CdS and ZnS quantum dot nanoconjugates for nanomedicine and oncology: to be or not to be nanotoxic? [J]. *Int J Nanomedicine*, 2016, 11: 4669-4690. DOI:10.2147/IJN.S115208.
- [21] Ashraf S, Park J, Bichelberger MA, et al. Zwitterionic surface coating of quantum dots reduces protein adsorption and cellular uptake [J]. *Nanoscale*, 2016, 8(41): 17794-17800. DOI:10.1039/c6nr05805a.
- [22] Manshian BB, Soenen SJ, Al-Ali A, et al. Cell type-dependent changes in CdSe/ZnS quantum dot uptake and toxic endpoints [J]. *Toxicol Sci*, 2015, 144(2): 246-258. DOI:10.1093/toxsci/kfv002.
- [23] Tu Z, Achazi K, Schulz A, et al. Combination of surface charge and size controls the cellular uptake of functionalized graphene sheets [J]. *Adv Funct Mater*, 2017, 27(33): 1701837. DOI:10.1002/adfm.201701837.
- [24] Zhao Y, Shaffer TM, Das S, et al. Near-infrared quantum dot and <sup>89</sup>Zr dual-labeled nanoparticles for *in vivo* Cerenkov imaging [J]. *Bioconjug Chem*, 2017, 28(2): 600-608. DOI:10.1021/acs.bioconjchem.6b00687.
- [25] Liu X, Braun GB, Qin M, et al. *In vivo* cation exchange in quantum dots for tumor-specific imaging [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 343. DOI:10.1038/s41467-017-00153-y.
- [26] Jiang Y, Pu K. Advanced photoacoustic imaging applications of near-infrared absorbing organic nanoparticles [J]. *Small*, 2017, 13(30): DOI:10.1002/smll.201700710.
- [27] Nekolla K, Kick K, Sellner S, et al. Influence of surface modifications on the spatiotemporal microdistribution of quantum dots *in vivo* [J]. *Small*, 2016, 12(19): 2641-2651. DOI:10.1002/smll.201600071.
- [28] Huang N, Cheng S, Zhang X, et al. Efficacy of NGR peptide-modified PEGylated quantum dots for crossing the blood-brain barrier and targeted fluorescence imaging of glioma and tumor vasculature [J]. *Nanomedicine*, 2017, 13(1): 83-93. DOI:10.1016/j.nano.2016.08.029.
- [29] 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: 1739-1745. DOI:10.2147/IJN.S23348.
- [30] Cai W, Shin DW, Chen K, et al. Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects [J]. *Nano Lett*, 2006, 6(4): 669-676. DOI:10.1021/nl052405t.
- [31] Tang J, Huang N, Zhang X, et al. Aptamer-conjugated PEGylated quantum dots targeting epidermal growth factor receptor variant III for fluorescence imaging of glioma [J]. *Int J Nanomedicine*, 2017, 12: 3899-3911. DOI:10.2147/IJN.S133166.

(收稿日期:2019-09-30)