

阿达玛变换光谱显微成像分析乳腺癌组织肿瘤标志物的分布

徐昊¹, 陈创², 刘春梅¹, 彭俊¹, 李雁², 张志凌¹, 唐宏武^{1*}

1. 武汉大学化学与分子科学学院生物医学分析化学教育部重点实验室, 湖北 武汉 430072

2. 武汉大学中南医院肿瘤科, 肿瘤生物学行为湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430071

摘要 自行研制的多功能阿达玛变换光谱成像显微系统具有获取微小组织样品的高分辨荧光光谱和荧光图像的能力。由于量子点具有激发区域宽、可以一元激发多元发射、荧光峰形狭窄、亮度高、抗光漂白能力强等特点, 非常适合作为荧光标记物应用于光谱显微成像分析领域。采用荧光发射波长为 610 nm 的量子点荧光探针分别免疫标记乳腺癌标志物人表皮生长因子受体 2(HER2) 和雌激素受体(ER), 通过激光诱导荧光法和荧光原位光谱成像法分析癌组织中 HER2 和 ER 的光谱特征和定量信息, 采用阿达玛变换光谱显微成像系统对阳性乳腺癌组织与阴性正常乳腺组织进行对比分析, 其结果表明该仪器可有效用于肿瘤标志物在癌组织内的定量研究, 是定量检测乳腺癌 HER2 和 ER 分布的新技术。该技术建立的针对肿瘤标志物的半定量和定量分析方法, 所得结果优于常规的定性分析方法。

关键词 阿达玛变换; 光谱成像; 量子点; 乳腺癌

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)12-3216-04

引言

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤, 乳腺癌关键标志物的准确检测对于病人的治疗选择、预后判断和随访监测均极为重要, 当前最常用的乳腺癌关键标志物为乳腺癌细胞核中表达的雌激素受体(ER)和胞膜上表达的人类表皮生长因子受体 2(HER2), 是乳腺癌病人的临床常规检测项目^[1-3]。

形态学证据是研究细胞生理和病理过程的有力手段^[4], 同时, 光谱技术如荧光光谱、拉曼光谱、可见光反射光谱等也逐渐应用于肿瘤的临床检测^[5-7]。对于切片组织样品和细胞样品, 免疫荧光标记法是疾病检测的常用技术。量子点作为荧光标记物, 具有荧光峰狭窄、宽激发、抗光漂白等特点, 是可用于免疫荧光标记的高效荧光基团^[8-10]。结合光谱分析与形态学分析这两种分析手段和显微成像技术的光谱显微成像分析技术同时具有光谱分辨和空间分辨能力, 非常适合于获取各类微小样品内部化学成分的定性、定量和分布等信息^[11]。因此, 利用光谱显微成像技术能够更直观地显示细胞、组织内的化学成分分布信息、甄别病变过程与程度。

阿达玛变换是一种基于矩阵运算的光信号调制技术, 能显著提高系统的信噪比^[12], 基于该技术的光谱分析仪器可

获得信噪比更高的光谱图像^[13]; 同时阿达玛变换技术也可以对光学图像进行调制, 获得更高质量的图像。本研究所使用的阿达玛变换光谱显微成像系统, 既能获得样品的荧光光谱, 也能通过分光谱成像获得 512×511 像素的灰度图像^[14]。其灰度值代表被分析样品的信号响应强度, 直接反映了所检测指标的高低水平。通过图像本身的长宽和灰度位深以及成像波长, 获得具有四维信息的图像。四维图像技术所提供的信息, 反映了样品中被测指标的空间位置分布和发射波长以及发射强度的信息, 可以作为生物医学分析领域研究和疾病诊断的依据。

利用量子点对乳腺癌组织进行免疫荧光标记, 利用阿达玛变换光谱显微成像技术对乳腺癌组织进行显微荧光光谱分析与分光谱成像分析, 可以得到癌变组织中标志物(如 ER、HER2 等)在组织中的分布状况与表达强度等信息。该技术针对肿瘤标志物的半定量和定量分析方法, 所得分析结果优于常规的定性分析方法。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

乳腺浸润性导管癌组织切片及对照正常组织切片由武汉

收稿日期: 2008-11-22, 修订日期: 2009-02-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(10874135)和国家自然科学基金创新群体项目(20621502)资助

作者简介: 徐昊, 1982年生, 武汉大学化学与分子科学学院博士研究生 e-mail: netmousehxh@sina.com

* 通讯联系人 e-mail: hwtang@whu.edu.cn

大学中南医院提供。

荧光标记技术采用发射波长为 610 nm 的 CdSe/ZnS 量子点荧光探针试剂盒,由武汉珈源量子点技术开发有限公司生产。

研究中使用自行研制的色散型多功能阿达玛变换光谱显微成像系统对样品进行分析。荧光激发光源为美国 Melles Griot 公司生产的 35LAP 431 型小型氩离子激光器。

1.2 实验过程

如图 1 所示,量子点荧光探针可以分别为细胞表面的 HER2 及细胞核中的 ER 进行标记成像。取连续两张乳腺癌组织切片,一张用抗 ER 对癌组织细胞核上的目标蛋白 ER 进行识别,另一张用抗 HER2 对癌组织细胞膜上的目标蛋白 HER2 进行识别,然后用对应的生物素修饰的二抗对两种一抗进行特异性偶联。最后用量子点标记的链霉亲和素与二抗上的生物素进行偶联;这样即可使 610 nm 量子点分别特异性地标记在目标蛋白 ER 和 HER2 上。按相同步骤处理正常乳腺组织样品作为阴性对照。

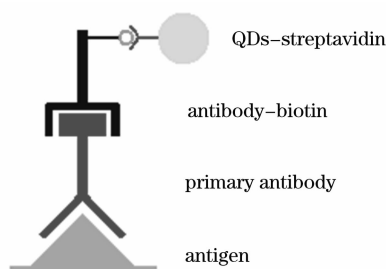


Fig. 1 Schematic diagram of the CdSe-ZnS QDs immunostaining the breast tumor tissues via biotin-streptavidin system

将量子点标记过的组织切片置于显微镜下,将仪器成像波长调至 610 nm 处,使用 120 mW,波长 488 nm 的激光激发样品的荧光,用阿达玛变换显微成像技术采集样本的四维荧光图像。

2 结果与讨论

2.1 乳腺癌组织的荧光光谱分析

阿达玛变换光谱显微成像系统可以测定细胞等微小样品或者组织样品中某一微小局部的荧光光谱,获得的荧光光谱峰形作为判断是否有病变及病变程度的依据。图 2 即为使用 610 nm 量子点所标记的正常乳腺组织和癌变组织的荧光光谱对照。对于病变组织,由于出现了特定的蛋白(ER 或 HER2)使得量子点免疫荧光探针能通过特异性结合与样品进行偶联,在 610 nm 处出现了明显的量子点的荧光峰,即可以判断为阳性样本;而对于正常组织,则不能特异性结合,虽然荧光光谱中仍然具有一定的自发荧光,但 610 nm 处没有明显的量子点的特征发射,故判定该组织为标志物阴性样本。因此可以利用荧光光谱的峰形峰位情况初步判定标志物阳性病人与标志物阴性病人。

使用的这种一抗-二抗-量子点的三步偶联法,只要改换

标记链霉亲和素的量子点的发射波长,即可更换对样品荧光标记的颜色或波长。而选择合适的抗体组合,即可针对不同的样品进行标记。因此该标记方法有较好的通用性,利于应用。

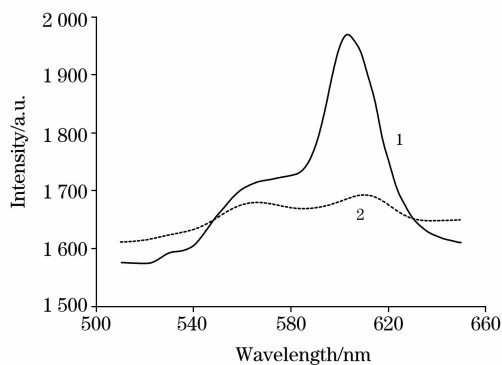


Fig. 2 Fluorescence spectra of the positive and negative breast cancer specimen coupled by 610 nm QDs immunofluorescence probe

1: Positive; 2: Negative

使用量子点作为荧光探针的优越性在于量子点具有荧光激发范围宽,荧光发射强,发射峰峰形对称且半峰宽狭窄,因此具有谱峰识别的特征性强,谱图分辨率高等特点,有利于对光谱谱图的解析。由于不同波长的量子点可以使用同样波长的光源激发,在同时使用两种或多种不同波长的量子点荧光探针进行双色或者多色标记时,或者更换不同发射波长的量子点染色时,都只需使用单一的光源即可满足激发荧光的要求,并且所得到的发射峰也不易出现谱峰重叠和光学信号混淆。

荧光光谱分析发现样品在 610 nm 处有荧光发射峰,故可以初步判断有 ER 或 HER2 表达。对于癌组织内肿瘤标记物的分布情况,仅仅分析荧光光谱是不够的,需要利用阿达玛成像技术作进一步的形态学分析,并且考虑到单纯依靠光谱进行分析有可能会受到非特异性吸附的干扰,吸附于样品表面的量子点荧光探针在受到激光激发后同样会有响应,这些信号就会造成假阳性的可能。因此除光谱分析外,要获得比较可靠的分析结果需要对染色样品进行荧光光谱显微成像分析。

2.2 乳腺癌组织的荧光光谱成像分析

由于系统采集到的是灰度图像,故红色量子点和细胞的绿色自发荧光在图片中都成黑白图像。每一幅图片中的每一个像素点,都具有 4 个坐标属性,水平坐标 X ,垂直坐标 Y ,点灰度值 Z 以及波长 λ 。对图 3 来说,图片只采集于 610 nm,因此 $\lambda=610$ nm。则关于 λ 变化区别的问题无需讨论。只需要观察其在 610 nm 处的信号分布与信号强度状况。

如果每隔 5 或 10 nm 波长,对染色过的病变组织样品采集一幅荧光灰度图像。由于采用 610 nm 波长的量子点标记,在这组光谱成像图片中与量子点发射峰所对应的 610 nm 图像具有最佳的成像效果,信号最强,信噪比最好,这与光谱峰形提供的信息一致,也符合此前对量子点溶液做光谱成像的结果^[16]。故统一在 610 nm 处对染色标记的样品进行光谱

成像分析。

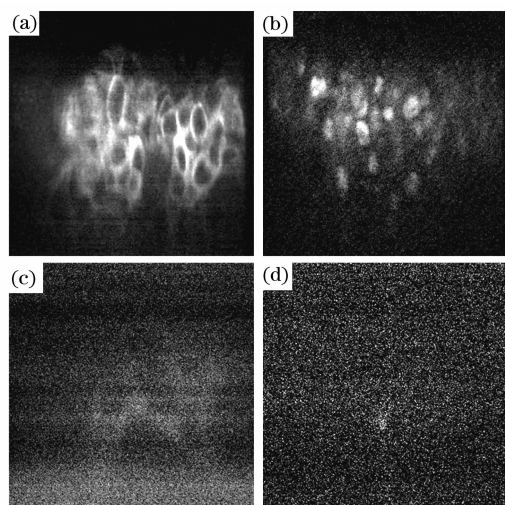


Fig. 3 4D images (at 610 nm) of 610 nm QDs stained breast cancer specimen

(a): QDs identified HER2; (b): QDs identified ER;
(c): Negative control for (a); (d): Negative control for (b)

由于阿达玛变换光谱成像系统具有很好的光谱选择性,因此在图 3 所示的乳腺癌组织的光谱显微成像图片中,绝大部分自发荧光的信号都被分光系统所滤去,参与成像的几乎只是量子点的荧光。并且由于量子点即使在标记后也具有很好的抗光漂白性^[15],在经过一定时间照射后,光谱成像图片中的自发荧光会更少,但同时量子点荧光却不会发生明显变化。这对图像分析的稳定和可重复性提供了很好的保证。

图 3(a)是样本标记 HER2 的光谱显微成像图片,图 3(b)是标记 ER 的光谱显微成像图片。图 3(a)中,610 nm 量子点通过对 HER2 的靶向识别将细胞膜的轮廓清晰地显示出来,图 3(b)中,量子点指示了细胞核上 ER 的存在。而在对图 3(a)和(b)相对应的阴性对照图 3(c)和(d)中,得到的只

是很淡的背景信号。该四维图像给出了细胞内部这两种肿瘤标志物的化学分布情况,作为指导个体化治疗和判断预后的依据。根据图片的灰度值,可计算出不同区域、不同细胞中的肿瘤标志物的表达量。表达量高的区域,量子点的荧光更强,相应的像素灰度值较高。对不同点或区域的灰度值进行量化比较,是光谱成像方法的优势。而常规荧光成像技术所得到的荧光显微照片除了很难消除自发荧光的干扰外,更重要的是很难从中提取用于可以进行量化分析的数据。

结合细胞的形态,针对光谱成像图片中荧光信号的分布也可以鉴定荧光标记的状况,可以判定荧光是来自于探针针对癌组织的特异性偶联还是来自于样本对非特异性吸附。如果染色不成功,非特异性吸附严重,这种状况下虽然可以得到类似图 2 的荧光光谱,但是四维荧光图象的信息就和已知的肿瘤标志物在细胞内的分布模式出现差异,出现整个细胞或者整片组织都出现响应的异常状况。这种来自四维图片的异常状态较普通的荧光照片中的信息更清晰和明确。因此,利用四维图像很容易区别荧光信号是来自于偶联还是来自于非特异性吸附,这有助于提高诊断准确性,克服假阳性干扰。

与普通荧光成像分析相比,分光谱成像分析能精细辨别分析成分在样品中的分布情况,具有更好的信噪比和更强的抗干扰能力,尤其是在被分析成分含量较低时,其灵敏度和准确性更高于普通的荧光成像分析法。

3 结 论

基于阿达玛变换光学编码原理的色散型多功能阿达玛变换显微成像光谱仪,结合量子点免疫荧光探针技术,实现了对乳腺癌样品的显微荧光光谱分析。通过对乳腺癌组织的四维图像分析,获得了病变组织中肿瘤标志物 ER 和 HER2 的分布情况,这种分析技术的灵敏度更高,抗干扰能力更强,对提高分子病理检测的准确性及指导癌症病人的个体化治疗具有重要实用价值。(徐昊和陈创均为第一作者)

参 考 文 献

- [1] Helga Bernhard, Julia Neudorfer, Kerstin Gebhard, et al. *Cancer Immunol Immunother*, 2008, 57: 271.
- [2] WANG Xiao-yi, TAN Jin-xiang, WU Kai-nan, et al(王小毅,谭金祥,吴凯南,等). *Journal of Endocrine Surgery(内分泌外科杂志)*, 2007, 1(4): 231.
- [3] WANG Jun(王 军). *J. Int. Oncol.(国际肿瘤学杂志)*, 2007, 34(1): 21.
- [4] Marilyn S. Bartlett, Jay A Fishman, et al. *J. Clin. Microbiol.*, 1988, 26(6): 1100.
- [5] Tang Hongwu, Yang Xuebin, Jennifer Kirkham, et al. *Anal. Chem.*, 2007, 79(10): 3646.
- [6] WANG Wei, LIU Wen-kai, SU Shi-guang(王 卫,刘文凯,苏时光). *China Journal of Modern Medicine(中国现代医学杂志)*, 2006, 16(4): 553.
- [7] ZHANG Yang-de, LI Luo-si(张阳德,李罗丝). *China Medical Engineering(中国医学工程)*, 2006, 14(1): 40.
- [8] Warren C W Chan, Dustin J Maxwell, Gao Xiaohu, et al. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2002, 13: 40.
- [9] Chen C, Chen L D, Zhang Z L, et al. *J. Clin. Oncol.*, 2008, 7(3): 179.
- [10] Chen Liangdong, Liu Jia, Yu Xuefeng, et al. *Biomaterials*, 2008, 29: 4170.
- [11] Turner J F. *Chemical Imaging Comes of Age. Spie's Oemagazine*, 2002. 30.
- [12] Harwit M O, Sloane N J. *Hadamard Transform Optics*. London: Academic Press, 1979.
- [13] MEI Er-wen, GU Wen-fang, CHEN Guan-quan, et al(梅二文,顾文芳,陈观权,等). *Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学)*, 1995, 23: 594.

- [14] Xu Hao, Peng Jun, Tang Hongwu, et al. *Analyst*, 2009, 134: 504.
- [15] XU Hao, TANG Hong-wu, LI Ying, et al(徐 昊, 唐宏武, 李 莹, 等). *Journal of Analytical Science(分析科学学报)*, 2008, 24(4): 385.

The Distribution Analysis of the Biomarkers on Breast Cancer Tissues by Hadamard Transform Spectral Microscopic Imaging

XU Hao¹, CHEN Chuang², LIU Chun-mei¹, PENG Jun¹, LI Yan², ZHANG Zhi-ling¹, TANG Hong-wu^{1*}

1. Key Laboratory of Analytical Chemistry for Biology and Medicine (Ministry of Education) College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China
2. Department of Oncology, Zhongnan Hospital of Wuhan University & Hubei Key Laboratory of Tumor Biological Behaviors, Wuhan 430071, China

Abstract Multi-functional Hadamard transform spectral microscopic imaging system was employed to provide high-resolucional fluorescence spectrum and image of tiny samples such as single cells and tissues. Semiconductor quantum dots (QDs) have several photo-physical advantages such as broad excitation spectrum, multi-color fluorescence with one single wavelength light source, narrow fluorescence emission peak, high photostability and long fluorescence lifetime, which make QDs good markers of the fluorescence spectral imaging microscopic analysis in biomedical applications. Based on immunostaining with quantum dots (QDs) emitting at 610 nm to tag and trace two breast cancer biomarkers human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) and estrogen receptor (ER) in human breast cancer tissue with in situ fluorescence imaging, sensitive spectra and images were obtained. Moreover, by comparing the differences of fluorescence spectra and 4D images between positive samples, (the human breast cancer tissues) and negative control, (the normal human breast tissues) by Hadamard transform spectral microscopic imaging system, a method to evaluate tumor malignancy of breast cancer tissues based on the analysis of distribution of HER2 and ER was proposed. The results show that the Hadamard system can be applied to visualize and quantitatively measure the subcellular proteins such as HER2 and ER inside the tumor tissues. The method developed with the above technique can be applied to quantitatively evaluate tumor malignancy and is advantageous over conventional method.

Keywords Hadamard transform; Spectral microscopy; Quantum dots; Breast cancer

(Received Nov. 22, 2008; accepted Feb. 26, 2009)

* Corresponding author