

# QD800 对舌鳞癌细胞生物学行为的影响

李志刚 曹雨庵 杨凯

**【摘要】** 目的 研究近红外量子点(QD800)对人舌鳞癌细胞(Tca8113细胞)的生长、成瘤、增殖及凋亡的影响。方法 (1) QD800对Tca8113细胞标记后6h、12h、24h、3d、5d、7d用流式细胞仪检测细胞的标记率及平均荧光强度。(2)用浓度为10nmol/L的QD800标记的Tca8113细胞及未标记的Tca8113细胞行裸鼠皮下成瘤,观察QD800对Tca8113细胞成瘤能力的影响。(3)用流式细胞仪检测QD800对Tca8113细胞增殖及凋亡的影响。结果 (1) QD800对Tca8113细胞标记后6h、12h、24h、3d、5d、7d用流式细胞仪检测细胞的标记率分别为92.30%、77.07%、67.36%、49.59%、15.25%、8.37%,平均荧光强度分别为211.23、187.63、113.08、100.47、85.86、47.28。(2) Tca8113/QD800组和Tca8113组在皮下接种24d后肿瘤的平均重量分别为(1.22±0.12)g、(1.25±0.16)g。(3) Tca8113/QD800和Tca8113体内成瘤24d后细胞的平均增殖指数为(48.21±1.13)%、(47.25±1.27)%,平均凋亡指数为(11.33±0.65)%、(10.66±0.57)%。结论 用近红外量子点QD800标记Tca8113细胞后不影响其生长、成瘤、增殖及凋亡能力。

**【关键词】** 舌肿瘤; 量子点; 细胞增殖; 细胞凋亡; 成瘤

**Effect of QD800 on the biological behaviour of tongue squamous cell carcinoma** LI Zhi-gang, CAO Yu-an, YANG Kai. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Xin Qiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China

Corresponding author: YANG Kai, Email: 156786804@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of near-infrared fluorescent quantum dots (QD800) on the growth, tumor formation, proliferation and apoptosis of human tongue squamous cell Tca8113 *in vitro* and *in vivo*. **Methods** Flow cytometry detection of the labeling rate and the average fluorescent intensity of Tca8113 cells labeled by QD800 on 6 h, 1 d, 3 d, 5 d, and 7 d. Tca8113 cells were labeled by QD800(Tca8113/QD800). Tca8113/QD800 were inoculated respectively subcutaneously into nude mice. The tumor formation of Tca8113/QD800 and Tca8113 was observed and compared *in vivo*. The proliferation and apoptosis of Tca8113/QD800 and Tca8113 cells from tumors formed *in vivo* were analyzed by flow cytometry. **Results** The labeling rate of Tca8113 cells labeled by QD800 on 6 h, 1 d, 3 d, 5 d, and 7 d were respective 92.30%, 77.07%, 67.36%, 49.59%, 15.25%, 8.37%, the average fluorescent intensity were 211.23, 187.63, 113.08, 100.47, 85.86, 47.28. The tumor weight of Tca8113/QD800 and Tca8113 *in vivo* were respective (1.22±0.12)g, (1.25±0.16)g. The cell proliferation index of Tca8113/QD800 and Tca8113 *in vivo* were (48.21±1.13)%, (47.25±1.27)% respectively, the apoptosis index were (11.33±0.65)%, (10.66±0.57)%. **Conclusion** The growth, tumor formation, proliferation and apoptosis of human tongue squamous cell Tca8113 *in vitro* and *in vivo* were not affected by NIRF-QD800.

**【Key words】** Tongue neoplasms; Quantum dots; Cell proliferation; Apoptosis; Tumorigenesis

近年来半导体量子点(semiconductor quantum dots, QDs)作为纳米荧光探针,具有荧光量子产率高,光化学稳定性好,发光度强,不易被光解或漂白,斯托克斯(Stokes)位移大的优点<sup>[1]</sup>,而发射光的波长范围窄且呈对称分布,不同半导体材料的QDs或同一材

料不同粒径的QDs在同一光源照射下发射出不同颜色的光,这使得用不同粒径大小QDs标记细胞内不同的细胞器成为可能,QDs的发光特征具有严格的量子尺寸效应,通过改变QDs粒径大小可获得从紫外到近红外范围(或从蓝色到红色波长范围)内任意点的光谱<sup>[2]</sup>,这些特点为QDs标记活细胞进行长期观察或同时观察多种活细胞的相互作用及变化情况提供了可能<sup>[3-4]</sup>。

近年来发展起来的发射波长在近红外光范围内(700~900 nm)的量子点的荧光不仅对人体组织具有强的穿透力,同时也可避免组织自发荧光(400~600 nm)的干扰,特别适合行体内非侵入的医学成像。QDs 优

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.18.053

基金项目:国家自然科学基金(30872925)

作者单位:400037 重庆,第三军医大学新桥医院口腔颌面外科(李志刚);苏州大学附属第二医院口腔科(曹雨庵);重庆医科大学附属第一医院口腔颌面外科(杨凯)

通讯作者:杨凯, Email: 156786804@163.com

良好的光学特征已在活体非侵入原位研究癌细胞在体内的发生发展, 癌症的早期诊断, 药物在体内的转运过程等领域显示出了巨大的发展前景<sup>[5-6]</sup>, QDs 对肿瘤细胞的生长、成瘤、增殖及凋亡是否有影响呢? 舌鳞癌是最常见的口腔鳞癌之一, 5 年生存率仅为 50%, 对其研究具有重大意义。近年来证明用具有穿膜作用的肽段表面修饰的 QDs 能对细胞进行快速有效地标记<sup>[7]</sup>。本研究利用近红外荧光量子点 Qtracker™ QD800 标记人舌鳞癌细胞 (Tca8113 cells), 观察被 Qtracker™ QD800 标记后 Tca8113 的生长、成瘤、增殖、凋亡能力的改变情况。

## 材料和方法

### 一、细胞株及实验动物

人舌鳞癌 Tca8113 细胞系购自重庆医科大学生命科学学院。BALB/C-nu/nu 裸鼠由重庆医科大学实验动物中心提供。3~4 周龄, 雌性, 5 只, 体重 19~22 g。恒温恒湿条件下饲养, 垫料、饲料和饮水均经灭菌处理。所有实验操作程序均经过实验动物研究所实验动物使用管理委员批准。

### 二、仪器和试剂

流式细胞仪 (美国 BD 公司 FACS Vantage, SE), 冷冻低速离心机 (德国 HERMLE, Z233MK-2), 倒置荧光显微镜 (日本 NIKON 公司, TE2004-U), 电子天平 (FA-JA), Qtracker™ 800 Cell Labeling Kit (美国 Invitrogen 公司)。

### 三、方法

1. QD800 对 Tca8113 细胞的标记: QD800 标记 Tca8113 细胞根据 Qtracker™ 800 Cell Labeling Kit 提供的实验步骤进行, 简述如下: (1) 制备 10 nmol/L 的 QD800 标记液待用。(2) 将用胰蛋白酶消化后的 Tca8113 细胞移入 EP 管内, 共 5 管, 每管  $1 \times 10^6$  个细胞。(3) 然后每管加入 0.2 ml QD800 标记液, 吹打均匀。(4) 置于 5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中共同培养 1 h 后冷冻低速离心 5 min (1000 r/min, 4 °C)。(5) 弃去培养液, PBS 冲洗细胞 2 次, 洗掉未进入细胞内的 QD800。(6) 将 5 支 EP 管内用 QD800 标记的细胞 (Tca8113/QD800) 分别接种在 6 孔板内, 加入培养基继续培养。

分别在 6 h、12 h、24 h、3 d、5 d、7 d 将标记好的细胞消化吹打成悬液, 用流式细胞仪 (Flow Cytometer, FCM) 分别检测在 6 个时间点的标记率及荧光强度。实验重复 3 次, 取平均值计算标记率及荧光强度。

2. 平板克隆形成实验: 将 Tca8113/QD800 和

Tca8113 细胞悬液分别接种于 6 孔板内, 接种细胞数均为 200 个细胞, 轻轻晃动 6 孔板使细胞分散均匀, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中静止培养 21 d, 出现肉眼可见的克隆, 弃去培养液, PBS 小心冲洗细胞 3 次, 甲醇固定 15 min, 姬姆萨 (Giemsa) 染色 15 min, 流水轻轻洗去染色液, 在空气中自然干燥。普通光镜下计数大于 50 个细胞的克隆数, 然后计算克隆形成率, 克隆形成率 = (克隆数/接种细胞数) × 100%。实验重复 3 次, 取平均值。

3. 裸鼠皮下移植瘤细胞增殖能力和凋亡能力的检测: 按前面实验方法制备 Tca8113/QD800, 立即用于如下实验。于 5 只裸鼠左和右背部皮下分别接种浓度为  $2 \times 10^6$  个/ml 的 Tca8113/QD800 和 Tca8113 各 0.1 ml, 观察裸鼠皮下肿瘤的生长情况, 待肿瘤生长 24 d 后断颈处死所有裸鼠, 剥离出肿瘤, 用电子天平称重量。将 10 块新鲜肿瘤组织 (Tca8113/QD800、Tca8113 各 6 块) 分别制成肿瘤细胞悬浮液, 用流式细胞仪分别检测细胞的增殖和凋亡。

细胞增殖检测: (1) 将细胞浓度调整为  $1 \times 10^6$  个/ml。(2) 取 1 ml 肿瘤细胞悬液离心 (11 000 × g, 4 °C) 5 min 后去上清液。(3) 将肿瘤细胞加入 -20 °C 浓度为 70% 的乙醇固定, 放于 4 °C 冰箱过夜。(4) 将肿瘤细胞乙醇悬液离心 (11 000 × g, 4 °C) 5 min。(5) 用 PBS 洗涤细胞 2 次。(6) 加入 PI 染液 1 ml, 4 °C 避光 30 min。(7) 用流式细胞仪检测。用下列公式计算肿瘤细胞的增殖指数 (proliferation index, PI),  $PI = (S + G2/M) / (G0/G1 + S + G2/M) \times 100\%$ 。

细胞凋亡检测: (1) 将各细胞浓度调整为  $1 \times 10^6$  个/ml。(2) 分别取 1 ml 肿瘤细胞悬液离心 (11 000 × g, 4 °C) 5 min 后去上清液。(3) 用 4 °C 的 PBS 洗涤细胞 2 次。(4) 加入 200 μl Annexin V 染色液于室温下放置 15 min。(5) 再加入 PI 染色液 1 ml 混匀 5 min。(6) 用流式细胞仪检测。用下列公式计算肿瘤细胞的凋亡指数 (apoptosis index, AI),  $AI = (\text{凋亡细胞数} / \text{所测细胞总数}) \times 100\%$ 。

### 四、统计学分析

采用 SPSS 12.0 统计软件进行处理。计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 *t* 检验和方差分析, 以  $P < 0.05$  为有显著性差异。

## 结 果

1. QD800 对 Tca8113 细胞不同时间点的标记率: QD800 对 Tca8113 细胞标记后 6 h、12 h、24 h、3 d、5 d、7 d 用流式细胞仪检测细胞的标记率分别为 92.30%、77.07%、67.36%、49.59%、15.25%、8.37%

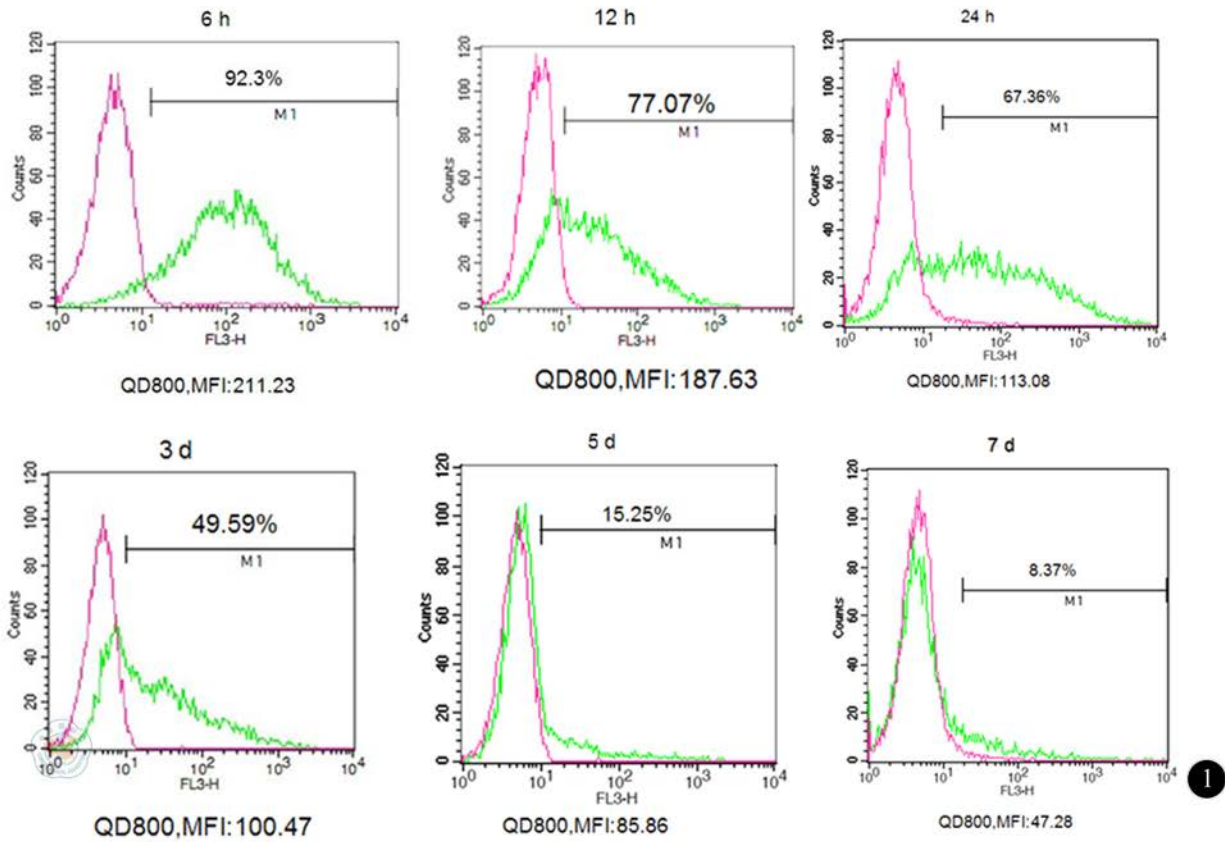


图1 6个不同时间点QD800对Tca8113的标记率及平均荧光强度随着时间的增加而降低

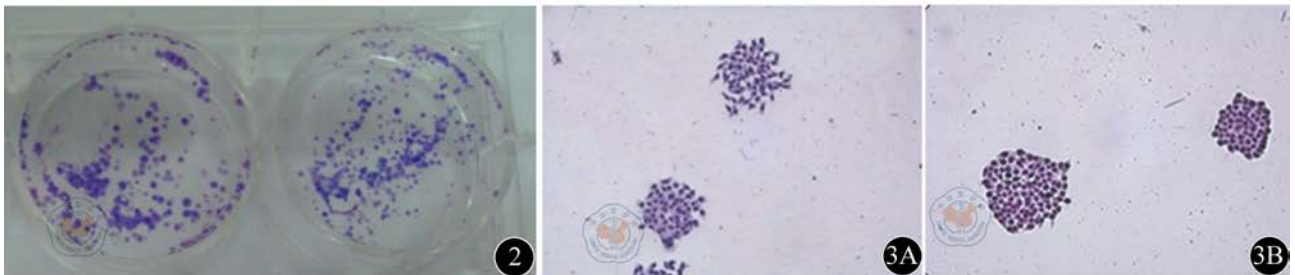


图2 左侧为Tca8113第21天时的克隆结果, 右侧为Tca8113/QD800细胞第21天时的克隆结果 图3 3A代表Tca8113细胞在第21天形成的集落, 3B代表Tca8113/QD800细胞在第21天形成的集落(姬姆萨染色 ×200)

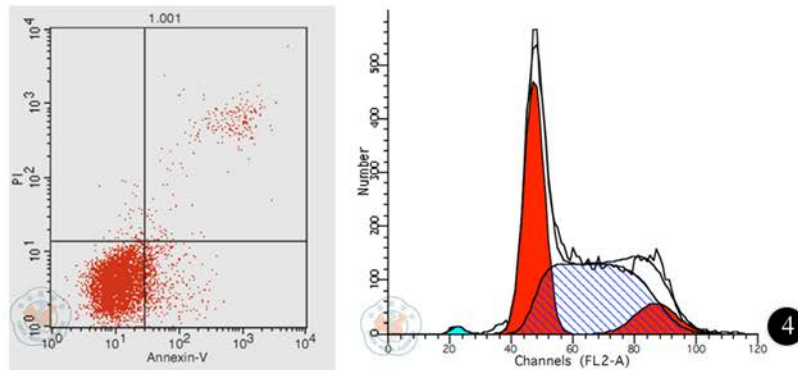


图4 左侧为凋亡流式细胞图, 右图为细胞周期检测图

(取平均值计算标记率本处只是取3次标记率的平均值)。平均荧光强度(荧光强度是量子点的发光强度,本处只是取3次荧光强度的平均值)分别为211.23、187.63、113.08、100.47、85.86、47.28(图1)。

2. QD800对Tca8113细胞克隆形成的影响: Tca8113/QD800和Tca8113细胞培养21d后克隆形成率分别为(66.7±5.6)%和(65.3±4.3)% (图2), 两均数间无显著差异(P>0.05), 表明经QD800标



记后的 Tca8113 细胞克隆形成能力无改变。姬姆萨染色后 Tca8113/QD800 和 Tca8113 细胞第 21 天形成的集落在倒置荧光显微镜下的成像(图 3)。

3. 裸鼠皮下移植瘤细胞增殖能力和凋亡能力的检测: Tca8113/QD800 组和 Tca8113 组在皮下接种 24 d 后。Tca8113/QD800 组和 Tca8113 组肿瘤的平均重量分别为  $(1.22 \pm 0.12)$  g、 $(1.25 \pm 0.16)$  g ( $P > 0.05$ )。表明 QD800 未影响 Tca8113 细胞体内成瘤能力。Tca8113/QD800 和 Tca8113 体内成瘤 24 d 后细胞的平均增殖指数为  $(48.21 \pm 1.13)$ %、 $(47.25 \pm 1.27)$ % ( $P > 0.05$ )，平均凋亡指数为  $(11.33 \pm 0.65)$ %、 $(10.66 \pm 0.57)$ %，差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )，说明 QD800 标记 Tca8113 细胞后不影响 Tca8113 细胞的增殖和凋亡水平(图 4)。

## 讨 论

舌鳞状细胞癌是最常见的口腔癌之一，恶性程度较高，生长迅速，浸润性强。早期舌癌 5 年生存率可达 70%，而晚期舌癌 5 年生存率仅有 30%，因此对舌鳞状细胞癌的研究具有重大意义<sup>[8]</sup>。如果能够从细胞水平对癌细胞用荧光标记物标记后，对癌细胞进行敏感的有效检测，从而进行早期诊断和个体化治疗，则能有效提高患者生存率。QDs 就是这种荧光标记物。由于 QDs 具有荧光量子产率高、光稳定性好等优良的光学特征，在对体内癌细胞非侵入可视化的监测方面具有很大的发展前景，因此发展对体内癌细胞非侵入可视化的监测方法对研究肿瘤的发生发展、早期诊断及治疗具有重大意义<sup>[9]</sup>。目前用 QDs 标记活细胞的方法主要有：非特异性内吞作用，脂质体转导法，电穿孔技术，显微注射，肽段转导或基于单克隆抗体等方法。近年来研究证明用具有穿膜作用的肽段表面修饰的 QDs 不仅对细胞能快速有效地标记，而且对活细胞没有损伤<sup>[10]</sup>。本研究用 QD800 标记 Tca8113 细胞，标记

6 h、12 h、24 h、3 d、5 d、7 d 后对 Tca8113 细胞的标记率为 92.30%、77.07%、67.36%、49.59%、15.25%、8.37%，但随着标记时间的延长及细胞不断分裂，标记率及平均荧光强度均逐渐下降。用 QD800 标记 Tca8113 细胞后，将 Tca8113/QD800 细胞及 Tca8113 细胞分别接种于具有免疫缺陷的裸鼠皮下，检测成瘤的重量无明显差别。通过流式细胞仪检测 QD800 进入 Tca8113 细胞后对细胞的生长、增殖、凋亡均无影响，这为 QDs 进一步用于非侵入活体原位可视化研究癌细胞提供了科学依据。

## 参 考 文 献

- [1] Dubertret B, Skourides P, Norris DJ, et al. *In vivo* imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science*, 2002, 298: 1759-1762.
- [2] Han M, Gao X, Su JZ, et al. Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules. *Nat Biotechnol*, 2001, 19: 631-635.
- [3] Shan Y, Wang L, Shi Y, et al. NHS-mediated QDs-peptide/protein conjugation and its application for cell labeling. *Talanta*, 2008, 75: 1008-1014.
- [4] Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, et al. Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging, and diagnostics. *Science*, 2005, 307: 538-544.
- [5] Mamot C, Drummond DC, Noble CO, et al. Epidermal growth factor receptor-targeted immunoliposomes significantly enhance the efficacy of multiple anticancer drugs *in vivo*. *Cancer Res*, 2005, 65: 11631-11638.
- [6] Gao X, Cui Y, Levenson RM, et al. *In vivo* cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol*, 2004, 22: 969-976.
- [7] Lei Y, Tang H, Yao L, et al. Applications of mesenchymal stem cells labeled with tat peptide conjugated quantum dots to cell tracking in mouse body. *Bioconjugate Chem*, 2008, 19: 421-427.
- [8] Liang W, Kao SY, Yang L, et al. Outcomes of oral squamous cell carcinoma in Taiwan after surgical therapy: factors affecting survival. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2003, 61: 751-758.
- [9] Walling MA, Novak JA, Shepard JR. Quantum dots for live cell and *in vivo* imaging. *Int J Mol Sci*, 2009, 10: 441-491.
- [10] Lei Y, Tang H, Yao L, et al. Applications of mesenchymal stem cells labeled with Tat peptide conjugated quantum dots to cell tracking in mouse body. *Bioconjug Chem*, 2008, 19: 421-427.

(收稿日期: 2013-09-12)

(本文编辑: 戚红丹)