

· 基础研究 ·

生物素-链霉亲和素介导受体靶向卵巢癌 SKOV3 细胞量子点体外成像的研究*

聂丽菊^{①②} 许恒毅^② 叶称连^① 黄小林^② 刘雯婷^① 傅芬^①

摘要 目的:研制一种生物素-亲和素系统(BAS)介导叶酸受体(FR)靶向量子点(QD)荧光探针,初步验证其靶向性及信号放大效应。方法:采用活泼酯法,将链霉亲和素(SA)与QD共价偶联制备QD-SA并对其物理特性进行验证;采用活泼酯法以牛血清蛋白为载体合成生物素化叶酸(FA)。通过生物素化FA与QD-SA结合制备BAS介导叶酸受体(FR)靶向QD探针,比较该探针对于卵巢癌SKOV3细胞及FR表达阴性的肺癌A549细胞的识别情况,并验证其靶向特异性;对比该探针在生物素化FA孵育1、4 h时成像的效果;比较该探针与未经BAS介导的QD-FA探针在不同孵育时间对卵巢癌SKOV3细胞成像的差异。结果:BAS介导FR靶向QD探针可特异性识别FR表达阳性的卵巢癌SKOV3细胞,且孵育4 h较1 h荧光信号明显增强,同等条件下其产生的荧光强度较未经BAS介导的QD-FA探针明显增强。结论:制备了一种特异性好、灵敏度高的BAS介导FR靶向QD探针,该探针在卵巢癌早期诊断方面具有潜在应用价值。

关键词 生物素-链霉亲和素 叶酸 量子点 卵巢癌细胞 体外成像

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.20140842

Biotin-streptavidin system-mediated folate receptor-targeted quantum dot *in vitro* imaging of ovarian cancer SKOV3 cells

Liju NIE^{1,2}, Hengyi XU², Chenlian YE¹, Xiaolin HUANG², Wenting LIU¹, Fen FU¹

Correspondence to: Fen FU; E-mail: fu_fen@163.com

¹Department of Gynecologic Oncology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006; ²State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China.

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81372518).

Abstract Objective: To develop a biotin-streptavidin system (BAS)-mediated folate receptor (FR)-targeted quantum dot (QD) fluorescent probe and preliminarily validate the targeting ability and signal amplification effect of the probe. **Methods:** Streptavidin (SA) was covalently coupled with QD through the active ester method; the physical characteristics of the prepared QD-SA were verified. Biotinylated folate was synthesized through the carrier bovine serum albumin using the same method and then reacted with QD-SA to form the special probe. The probe was used to identify SKOV3 cells and FR-negative A549 cells to verify its targeting specificity. QD-SA was used as the contrast. SKOV3 cells were imaged using the BAS-mediated FR-targeted QD probe with a biotinylated folate incubation time of 1 or 4 h. Various reaction times were also tested between the probe and the QD-FA that was formed without BAS mediation. **Results:** The BAS-mediated FR-targeted QD probe specifically recognized FR-positive SKOV3 cells. The probe obtained higher fluorescent intensity after 4 h than after 1 h of biotinylated folate incubation. The BAS-mediated FR-targeted QD probe also had a stronger fluorescent signal than the QD-FA probe. **Conclusion:** The proposed probe presents a great potential in the early diagnosis of ovarian cancer because of its high specificity and sensitivity.

Keywords: biotin-streptavidin, folic acid, quantum dots, ovarian cancer cell, imaging *in vitro*

卵巢癌是妇科常见恶性肿瘤,虽其发病率位于女性生殖系统肿瘤中第3位,但病死率却居于首位。大多数卵巢癌被确诊时已是晚期,其5年生存率仅为30%,研究表明早期发现卵巢癌可使其5年生存率增长至92%^[1]。因此,早期诊断和治疗卵巢癌是改善患

者预后提高其生存率的重要因素^[2]。目前临床上常规诊断卵巢癌方法为经阴道超声、磁共振成像、实验室肿瘤标记物和组织学检查等,这些方法通常难以满足临床对卵巢癌早期精确诊断的需求。研究表明癌症患者外周血中循环肿瘤细胞的出现早于可见的

作者单位:①江西省南昌大学第二附属医院妇产科(南昌市330006);②江西省南昌大学食品科学与技术国家重点实验室

*本文课题受国家自然科学基金项目(编号:81372518)资助

通信作者:傅芬 fu_fen@163.com

实体瘤^[3],因此,寻找特异性靶向卵巢癌细胞的生物探针是目前研究的热点^[4]。量子点(quantum dot, QD)是一种新型半导体纳米晶体,具有荧光量子效率高、光化学稳定性好以及不会发生光漂白作用等优点^[5],可结合抗体、多肽等制备高性能的荧光探针,靶向肿瘤细胞,实现肿瘤的早期诊断^[6-7]。由于叶酸受体(folate receptor, FR)在卵巢癌细胞表面表达高为95%^[8],当叶酸(folic acid, FA)与QD偶联制成生物荧光探针后,可通过FA与FR的高亲和力(Kd为0.19 nM^[9])结合,将QD高效富集在肿瘤细胞表面,实现细胞的特异性靶向成像。然而,叶酸分子量小,直接连接到QD表面后,其分子结构及其结合活性基团可能被改变,影响其生物活性。因此,本研究使用生物素-亲和素系统(biotin-avidin system, BAS),介导QD与FA偶联制备BAS介导FR靶向QD探针。利用该探针同时检测卵巢癌SKOV3细胞及肺癌A549细胞,验证其靶向特异性,对比该探针与未经BAS介导的QD-FA探针在卵巢癌SKOV3细胞成像中的差异,以明确BAS的信号放大作用。本研究旨在建立一种快速、特异、高效靶向卵巢癌细胞成像方法,为卵巢癌早期诊断提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

羧基化水溶性QD购自美国Ocean NanoTech公司;QD-FA由本课题组前期合成;生物素氨基己基-N-羟基丁二酰亚胺活性酯、链霉亲和素(streptavidin, SA)购自上海华蓝化学公司;牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)购自韩国BIOSHARP公司;4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)购自南京森贝伽生物科技有限公司;1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N,N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、N,N-二环己基碳二亚胺(DCC)购自美国Sigma-Aldrich公司,其他试剂为分析纯;卵巢癌SKOV3细胞由江西省南昌大学第一附属医院实验中心馈赠;12孔细胞培养板购自江苏海门博洋实验器材厂;直热式CO₂培养箱购自美国Thermo scientific公司;倒置荧光显微镜为日本Nikon公司产品。

1.2 方法

1.2.1 QD-SA的合成及其物理特性验证 采用活泼酯法将QD表面的羧基与SA的氨基共价结合形成QD-SA,其合成方法参照文献[10]进行。具体如下:取100 μL QDs(浓度为8 μM)溶于pH为5.5的100 μL的硼酸缓冲液(borate buffer, BB)中,按照QD:EDC摩尔比1:1 000, QD:NHS摩尔比为1:2 000分别加入EDC/NHS,室温反应5~10 min。调整溶液pH至8~8.5,加入SA 1.056 mg,持续混匀2 h后,加入10 μL含5%

BSA的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)封闭10 min终止反应。QD-SA复合物10 000 r/min离心,离心5 min,除去沉淀,使用pH为7的2 mL BB在100 K超滤管中洗涤,最后重悬于pH为7的0.1 mL BB中并通过琼脂糖凝胶电泳验证其偶联效果。此外,采用动态光散射分析仪及透射电子显微镜对QD偶联前后物理性质进行分析,以了解其特性改变。

1.2.2 生物素化FA的合成 首先将FA与BSA结合,再与生物素结合制备生物素化FA。1)FA-PEG-NH₂的偶联:FA 6 mg溶解于600 μL二甲基亚砜中,加入DCC 3 mg、NHS 3 mg及三乙胺60 μL共同暗室反应4 h,加入双氨基聚乙二醇30 mg暗室反应过夜;反应完全后离心,使用-20℃丙酮沉淀,乙酸乙酯洗涤3次,置于通风柜中干燥并避光保存。2)FA-PEG-BSA的偶联:FA-PEG-NH₂ 5 mg、EDC 2.5 mg、NHS 2.5 mg溶于pH为7的500 μL BB中,共同室温反应10 min;加入BSA 8.35 mg,室温反应2 h,透析纯化3次后于4℃冰箱保存。3)生物素化FA的制备:长链生物素:FA-PEG-BSA摩尔比为20:1混合后室温孵育30 min,将混合溶液于4℃超纯水透析3 d,4℃保存备用。

1.2.3 BAS介导FR靶向QD在卵巢癌SKOV3细胞体外成像中的应用 取对数生长期的卵巢癌SKOV3细胞及肺癌A549细胞,接种于12孔板内,细胞约1×10⁶/mL。37℃、5%CO₂培养箱中孵育24 h;吸弃所有孔内培养基,PBS洗涤1次后加入生物素化FA(对照组不加)分别孵育1、4 h;PBS洗涤后加入QD-SA(QD-SA:生物素化FA为1:20)共孵育30 min;PBS洗涤3次后加入适量DAPI核染料,室温反应20 min;使用PBS洗净并重悬,倒置荧光显微镜下观察细胞染色结果。此外,将孵育的卵巢癌SKOV3细胞分为加入生物素化FA组、未加入组,共同孵育4 h, PBS洗净后分别加入QD-SA及QD-FA反应30、60 min,随后用PBS洗净,加入DAPI,其余操作同前,以验证BAS的信号放大效应。

2 结果

2.1 BAS介导FR靶向QD探针捕获卵巢癌细胞的原理

BAS是一种新型生物标记技术,将SA修饰的QD与BSA介导合成的生物素化FA结合,可明显增加细胞表面FR结合FA的数目,使更多的QD靶向在细胞表面,增强荧光信号,提高检测灵敏度,从而实现快速、特异、高效靶向卵巢癌细胞成像(图1)。

2.2 QD-SA的物理特性验证

2.2.1 QD-SA的性质 本实验制备的QD-SA在常温下为澄清的红色溶液。动态光散射分析(图2A)表明其水化粒径分布较集中,平均为(25.5±0.6)nm, Zeta电位为(-48.2±5.3)mv,透射电子显微镜显示(图2B)

该粒子大小均一,平均为(9±0.5)nm。

2.2.2 琼脂糖凝胶电泳 电泳迁移率主要取决于分子大小、介质粘度及颗粒所带电荷。QD及QD-SA在凝胶电泳中均能由阴电极向阳电极泳动,但QD(左侧)的迁移率明显快于QD-SA(右侧)。这是由于在同等电泳条件下QD偶联SA后,形成的QD-SA粒径较QD增大,其表面负电荷也由于羧基与SA表面氨基的反应消耗而较QD表面负电荷少,因此在电场中QD-SA由阴电极向阳电极泳动的速度较QD更慢(图2C)。

2.3 BAS介导FR靶向QD捕获卵巢癌SKOV3细胞

2.3.1 BAS介导FR靶向QD捕获卵巢癌SKOV3细胞及肺癌A549细胞荧光强度对比 未经生物素化FA孵育及QD-SA反应的卵巢癌SKOV3细胞膜表面未见荧光(图3A),而经生物素化FA孵育后的卵巢癌

SKOV3细胞在加入QD-SA后,细胞膜表面均可见较强的荧光,其中孵育4h时尤为明显(图3B、3C)。此外,只加有QD-SA反应的卵巢癌SKOV3细胞及经生物素化FA孵育4h再加入QD-SA反应的肺癌A549细胞膜表面均未见明显荧光(图3D、3E)。表明BAS介导FR靶向QD可特异性识别FR表达阳性的卵巢癌SKOV3细胞,且随着FA与细胞孵育时间的延长,FA与细胞表面FR结合数量增加,进而产生的荧光信号也增强。

2.3.2 QD-FA与BAS介导FR靶向QD捕获卵巢癌SKOV3细胞的荧光强度对比 QD-FA与BAS介导FR靶向QD共同捕获细胞时,在相同的反应时间内,QD-FA所产生的荧光强度明显偏弱,而随着反应时间的延长,各细胞膜表面的荧光强度逐渐增强(图4)。

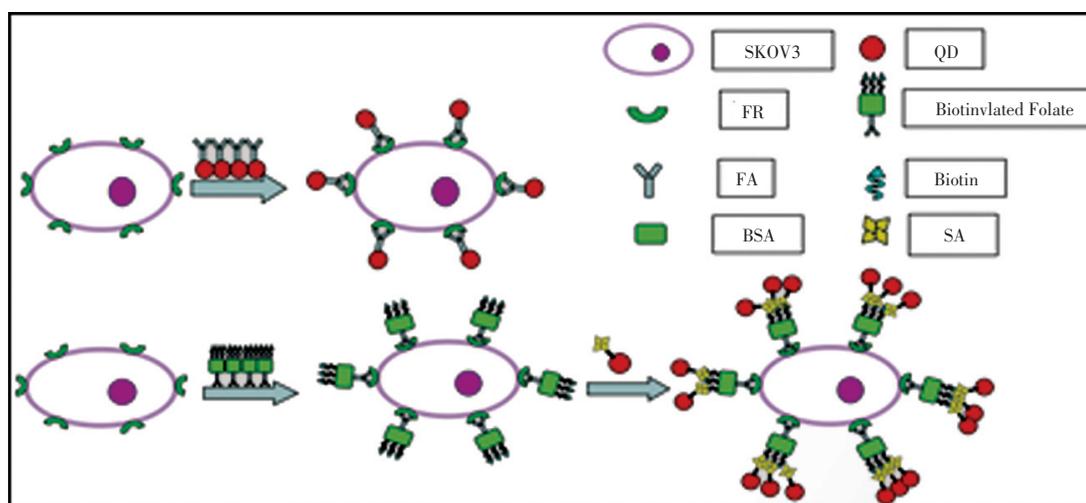
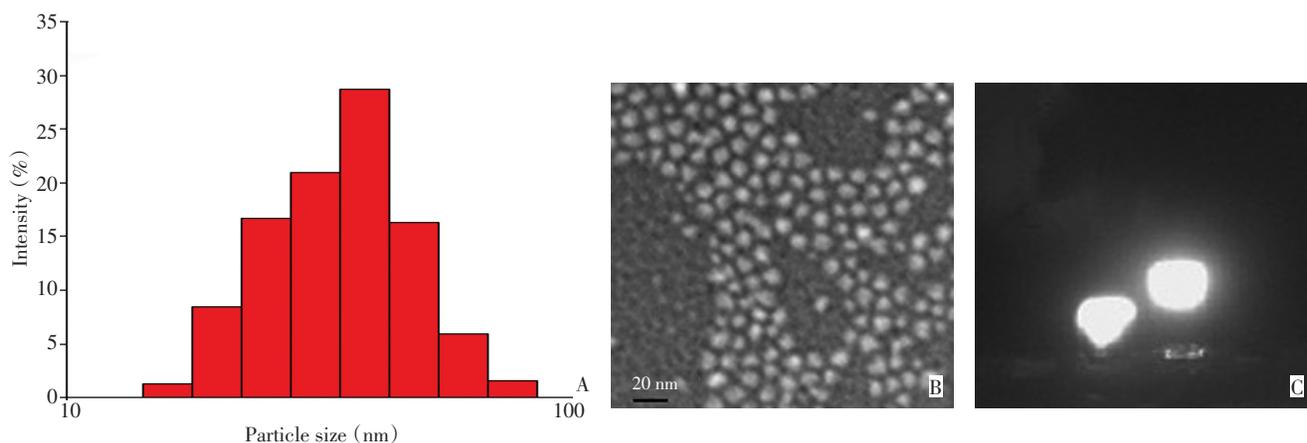


图1 QD-FA与BAS介导FR靶向QD探针捕获卵巢癌SKOV3细胞原理图

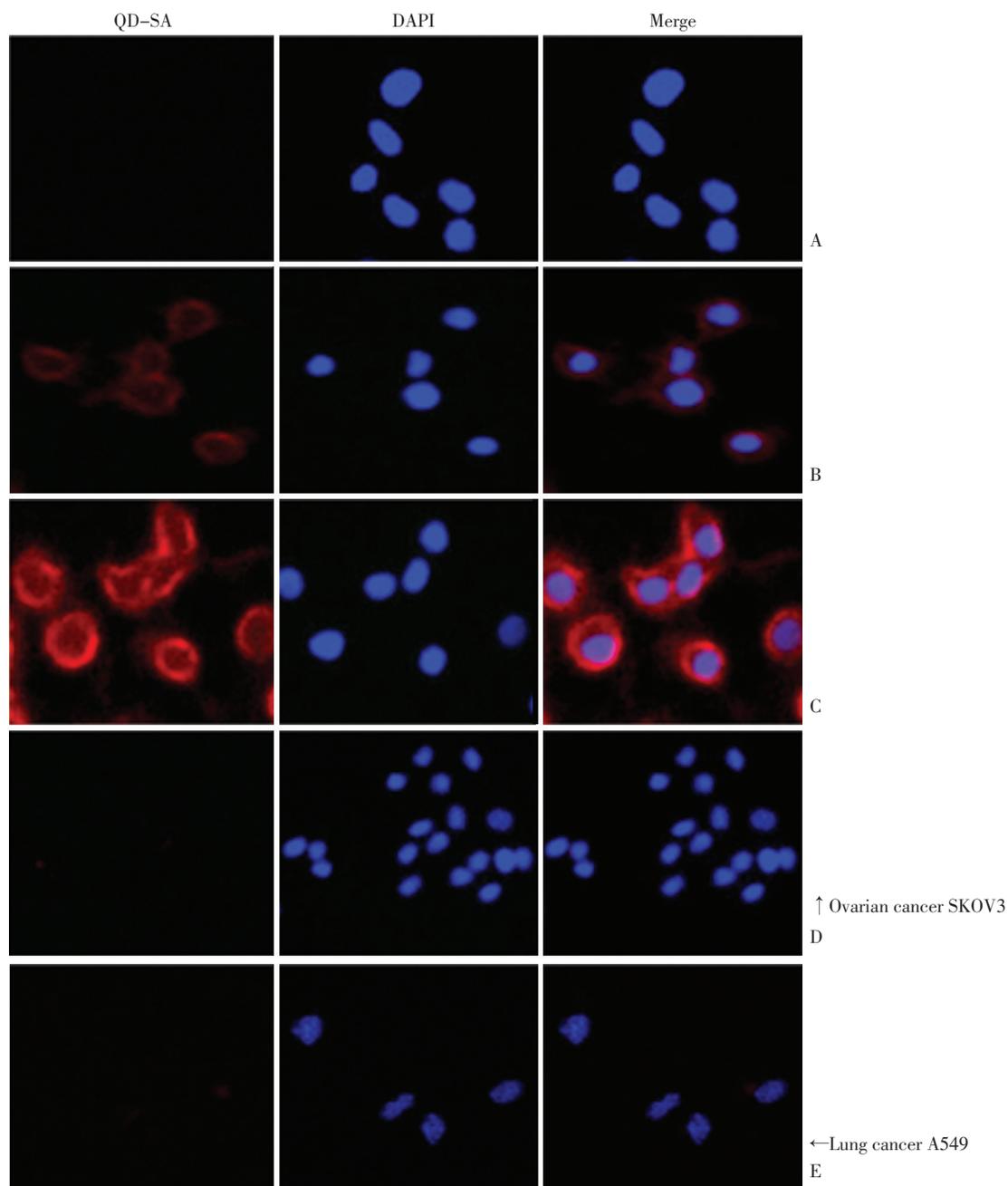
Figure 1 Schematic of QD-FA and BAS-mediated FR-targeted QD probe for capturing SKOV3 cells



A. Dynamic light scattering analysis; B. Transmission electron microscopy; C. Agarose gel electrophoresis

图2 QD-SA的物理特性验证图

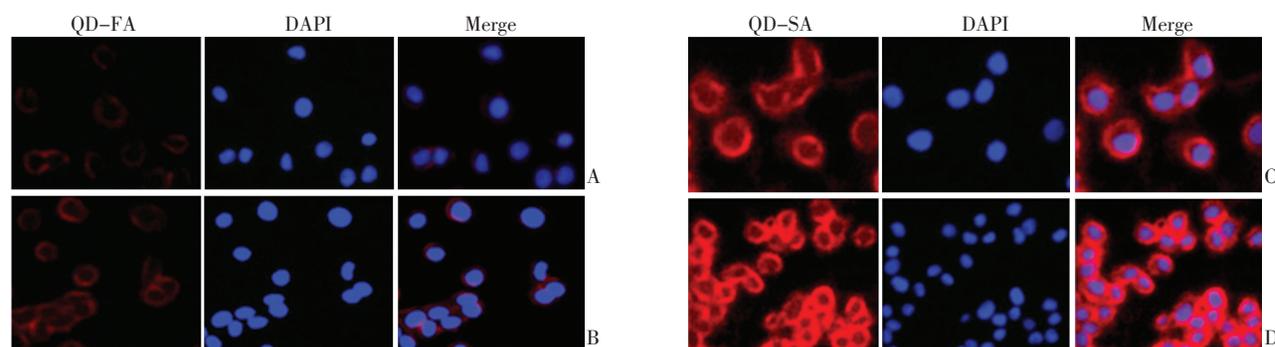
Figure 2 Physical characteristics of QD-SA



A. Blank; B. 1 h incubation of biotinylated folate; C and E. 4 h incubation of biotinylated folate; D. No biotinylated FA

图3 BAS介导FR靶向QD及QD-SA识别卵巢癌SKOV3细胞及肺癌A549细胞荧光强度比较

Figure 3 Comparison of fluorescent intensity between BAS-mediated FR-targeted QD and QD-SA probes in recognizing SKOV3 and A549 cells



A. 30 min; B. 60 min; BAS mediated FR targeted QD: C. 30 min; D. 60 min

图4 QD-FA及BAS介导FR靶向QD识别卵巢癌SKOV3细胞荧光强度比较

Figure 4 Comparison of fluorescent intensity between BAS-mediated FR-targeted QD and QD-FA probes in recognizing SKOV3 cells

卵巢癌起病隐匿、进展迅速,最主要的死亡原因是转移的发生,肿瘤的转移是一个涉及多步骤多因素的复杂过程。临床通常将具有转移潜能的肿瘤细胞脱离原发病灶,以极少的数量转移到血液、骨髓、淋巴结或远处器官称为肿瘤的微转移^[11]。实体恶性肿瘤的转移是一个晚期事件,而肿瘤的侵袭和微转移是早期事件。如果能够在发现可见实体瘤之前检查出外周血中极少量的循环肿瘤细胞,对于辅助医生进行肿瘤早期确诊以及对患者进行个体化治疗具有十分重要的意义。

BAS是目前发现的自然界中具有最强亲和力的物质,其中SA由4条序列相同的肽链组成,每条肽链均能结合1个生物素分子,可同时以多价形式结合生物素化的大分子和标记物^[12],具有极佳的灵敏性、特异性及生物相容性。本研究将荧光纳米标记物QD通过BAS与FA结合,成功制备了一种BAS介导FR靶向QD探针,该探针可显著提高QD的表面反应活性、生物相容性和分散稳定性。因FA及生物素均是小分子物质,制备过程直接偶联形成的复合物用于靶向卵巢癌SKOV3细胞,加入QD-SA后存在较大的空间位阻,结合至细胞表面的QD数量相对偏少,所产生的荧光信号较弱,难以实现高灵敏性的细胞检测。而BSA是牛血浆中含量最丰富的载体蛋白,表面富含活性氨基,能通过氨基与羧基反应同时与多个分子结合^[13]。故使用BSA作为连接载体,将FA和生物素偶联。本研究通过BAS介导FR靶向QD探针,及QD-SA对卵巢癌SKOV3细胞及肺癌A549细胞的识别实验,验证了该探针可特异性靶向卵巢癌SKOV3细胞,同时证明了随着FA与细胞反应时间的延长,FA与细胞表面FR结合数量有所增加,使结合至细胞表面的QD数量增多,所产生的荧光信号增强。通过与QD-FA对比识别卵巢癌SKOV3细胞,表明了BAS可明显增加细胞表面FR的结合数量,从而显著放大细胞表面QD的荧光信号,提高检测灵敏度,缩短检测时间,为成功用于卵巢癌的早期诊断带来契机。

综上所述,BAS介导FR靶向QD体系可敏感、特异、快速地对卵巢癌SKOV3细胞进行识别,为卵巢癌早期诊断提供了新思路。此外,BAS介导FR靶向QD体系还可用于多种FR表达阳性的肿瘤细胞的识别,在生物医学研究中有较大的应用潜力。

参考文献

- 1 Yurkovetsky Z, Skates S, Lomakin A, et al. Development of a multi-marker assay for early detection of ovarian cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(13):2159–2166.
- 2 Moore RG, MacLaughlan S, Bast RC Jr. Current state of biomarker development for clinical application in epithelial ovarian cancer[J]. *Gynecol Oncol*, 2010, 116(2):240–245.
- 3 Gorges TM, Pantel K. Circulating tumor cells as therapy-related biomarkers in cancer patients[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2013, 62(5):931–939.
- 4 Suriamoorthy P, Zhang X, Hao G, et al. Folic acid–CdTe quantum dot conjugates and their applications for cancer cell targeting[J]. *Cancer Nano*, 2010, 1:19–28.
- 5 Sugimoto H, Fujii M, Fukuda Y, et al. All-inorganic water-dispersible silicon quantum dots: highly efficient near-infrared luminescence in a wide pH range[J]. *Nanoscale*, 2014, 6(1):122–126.
- 6 Tabatabaei-Panah AS, Jeddi-Tehrani M, Ghods R, et al. Accurate sensitivity of quantum dots for detection of HER2 expression in breast cancer cells and tissues[J]. *J Fluoresc*, 2013, 23(2):293–302.
- 7 Zhao B, Li ZH, Song SP, et al. Nano-biosensors for detecting prostate cancer biomarkers[J]. *Chin J Clin Oncol*, 2014, 41(1):46–50. [赵彬, 黎振华, 宋世平, 等. 纳米生物传感器在前列腺癌早期检测中的应用[J]. *中国肿瘤临床*, 2014, 41(1):46–50.]
- 8 Ward CM, Acheson N, Seymour LW. Folic acid targeting of protein conjugates into ascites tumour cells from ovarian cancer patients[J]. *J Drug Target*, 2000, 8(2):119–123.
- 9 Chen C, Ke J, Zhou XE, et al. Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors[J]. *Nature*, 2013, 500(7463):486–489.
- 10 Xu H, Aguilar ZP, Yang L, et al. Antibody conjugated magnetic iron oxide nanoparticles for cancer cell separation in fresh whole blood[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(36):9758–9765.
- 11 Plaks V, Koopman CD, Werb Z. Cancer. Circulating tumor cells[J]. *Science*, 2013, 341(6151):1186–1188.
- 12 Deng L, Kitova EN, Klassen JS. Dissociation kinetics of the streptavidin–biotin interaction measured using direct electrospray ionization mass spectrometry analysis[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2013, 24(1):49–56.
- 13 Hamilton JA, Era S, Bhamidipati SP, et al. Locations of the three primary binding sites for long-chain fatty acids on bovine serum albumin[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88(6):2051–2054.

(2014-05-20收稿)

(2014-08-05修回)

(本文编辑:张佷)

作者简介

聂丽菊 专业方向为妇产科学临床与基础研究、循环肿瘤细胞的分离与检测。

E-mail: 704371590@qq.com

