基础研究 文章编号:0253-3626(2009)12-1629-03

半导体量子点对人骨肉瘤 MG-63 细胞生长、侵袭和转移能力的影响研究

陈 睿,杨 凯,陈 丹,项 立
(重庆医科大学附属第一医院口腔颌面外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究半导体量子点(Semiconductor quantum dots,QDs)对人骨肉瘤 MG-63 细胞的生长、侵袭、粘附和趋化运动能力的影响。方法:①用不同浓度的 QDs 与人骨肉瘤 MG-63 细胞共培养,观察 QDs 对骨肉瘤 MG-63 细胞生长的影响;②用 QDs 标记骨肉瘤 MG-63 细胞(MG-63/QDs),然后用 transwell 小室法和冲刷实验,观察骨肉瘤 MG-63/QDs 细胞的侵袭、粘附和趋化运动能力的变化。结果:①不同浓度的 QDs 均未影响骨肉瘤 MG-63 细胞的生长情况;②骨肉瘤 MG-63/QDs 细胞和 MG-63 细胞的侵袭、粘附和趋化运动能力无显著性差异($P>0.05$)。结论:用 QDs 标记骨肉瘤 MG-63 细胞后不影响其生长、侵润和转移能力,为半导体量子点在活体生理条件下用于肿瘤学的研究提供了科学依据。

【关键词】半导体量子点(纳米微晶体);口腔;骨肉瘤;生长;粘附;侵袭;转移
【中国图书分类法分类号】R349.54 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-09-03

Study on effect of semiconductor quantum dots on growth, invasion and metastasis of human oral osteosarcoma cell line MG-63 in vitro

CHEN Rui, et al
(*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effect of semiconductor quantum dots (QDs) on growth, invasion and metastasis of human oral osteosarcoma cell line MG-63. *Methods*: ① QDs of different concentrations were applied to MG-63 cells, and the cell growth of control and three test groups were compared respectively. ②MG-63 cells were labeled by QDs (MG-63/QDs); then transwell chambers and wash away were used to detect the difference in invasion and metastasis ability between MG-63/QDs and MG-63 cells. *Results*: ① QDs of different concentrations showed no negative effects on growth of MG-63 cells; ② The ability of invasion, attachment and movement of MG-63 cells were not significantly different between test and control group ($P>0.05$). *Conclusion*: QDs show no effect on cytobiological behavior of living MG-63 cells.

【Key words】Semiconductor quantum dots (Semiconductor nanocrystals); Oral cavity; Osteosarcoma; Growth; Attachment; Invasion; Metastasis

在活体条件下对体内肿瘤细胞进行长期示踪监测,对其生长、侵袭和转移等病理生理过程进行实时可视化研究是目前肿瘤学研究的难点和热点。近年来基于纳米技术发展起来的半导体量子点(Semiconductor quantum dots,QDs)与传统荧光检测探针相比,它具有发光度强、光化学稳定性好,不易被漂白等独特的光学特性[1-3],它在对肿瘤细胞标记后长期成像示踪观察研究方面显示出独特的优势,它将为在活体条件下对恶性肿瘤的早期诊断和在活体下直接对肿瘤的病理生理过程进行实时可视化研究提供了可能[2]。本研究用半导体量子点[CdSe/ZnS]标记人骨肉瘤细胞,观察被量子点标记后的人骨肉瘤细胞其生长、侵袭和转移等生物学行为的改变情况,为半导体量子点用于活体下对肿瘤细胞的实时原位可视化研究提供依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料和仪器

人骨肉瘤细胞 MG-63(上海中科院细胞库),最大发射波

作者介绍:陈 睿(1975-),男,主治医师,硕士,
研究方向:口腔颌面-头颈肿瘤临床及相关基础研究。
通讯作者:杨 凯,男,教授,E-mail: cqfyyk@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30470893,30872925)。

长为 525 nm 的半导体量子点[CdSe/ZnS]（美国 Quantum Dot 公司），倒置相差荧光显微镜（日本 NIKON 公司，TE2004-U 型），激光共聚焦显微镜（日本 OLYMPUS 公司，IX 系列），transwell 小室（美国 Costar 公司）

1.2 实验方法

1.2.1 量子点对 MG-63 细胞的标记 先用无血清的培养液稀释量子点，载玻片上涂片，在激光共聚焦显微镜下观察量子点的发光颜色，发光强度和形态。将 2×10^4 个/ml 浓度的 MG-63 细胞接种在 6 孔培养板内，细胞贴壁后加入使其终浓度为 1 μmol/L 的量子点共同培养 2 h，然后在激光共聚焦显微镜下观察量子点进入细胞内的情况。

1.2.2 量子点对 MG-63 细胞生长的影响 将生长旺盛的 MG-63 细胞按 2×10^4 个/ml 的浓度接种到 4 块 24 孔培养板内，每孔 0.18 ml，分为 4 组，培养 24 h 使细胞生长相对同步化后，对照组加入含 15%小牛血清的 PRMI1640 培养液 0.02 ml，实验组分为 A、B、C 组，分别加入 0.02 ml 不同高浓度的半导体量子点[CdSe/ZnS]，使实验组 A、B、C 组所加入量子点后的终浓度分别为 0.1、1、2 μmol/L，每天各组随机取 3 孔用 0.1%胰酶充分消化，吹打细胞培养液，制成单细胞悬液，用血球计数板计数细胞，计算平均值，连续 7 d，绘制各组的细胞生长曲线。

1.2.3 量子点对 MG-63 细胞侵袭分析 将量子点与 MG-63 共同培养，量子点浓度为 2 μmol/L，培养 2 h 后，用 0.1%胰酶充分消化后离心得到被量子点标记的 MG-63 细胞（即 MG-63/QDs）。细胞侵袭重建基底膜实验在 transwell 小室中进行，transwell 小室被孔径为 8 μm 的聚碳酸多孔滤膜分为上下两室，在滤膜上下分别铺以 15 μg matrigel，于 37℃下重建 1 h 后备用。将 MG-63/QDs 和 MG-63 以 2×10^5 个细胞加入 transwell 小室的上室中，37℃培养 12 h，侵袭至滤膜下表面的细胞用 HE 染色后，随机选择 5 个 400 倍显微视野，以平均数作为穿膜细胞数来表示肿瘤细胞的侵袭能力。

1.2.4 量子点对 MG-63 细胞粘附分析 分别制备浓度为 5×10^9 个/L 的 MG-63/QDs 和 MG-63 细胞悬液，取 12 孔细胞培养板，每孔加悬液 0.2 ml。培养 30、60、90、120 min 后弃去未粘细胞。Hank's 液轻洗 2 遍收集未粘附细胞计数，每时间点随机取 3 孔求平均值，计算不同时间的粘附率，计算公式：粘附率 = 粘附细胞数/总细胞数 × 100%。

1.2.5 量子点对 MG-63 细胞趋化运动分析 该实验与前面 1.2.3 实验（量子点对 MG-63 细胞侵袭分析）的差异在于聚碳酸多孔滤膜表面未铺 matrigel，其余步骤和方法相同，仍随机选择 5 个 400 倍显微视野统计滤膜下表面的细胞数目，以细胞的相对数目来表示肿瘤细胞的趋化运动能力。

2 结 果

2.1 量子点对 MG-63 细胞的标记

在激光共聚焦显微镜下量子点为绿色荧光体（如图 1 所示），最大发射波长为 525 nm，荧光强度比值为 245。量子点进入细胞后主要分布在胞浆内（如图 2 所示）。



图 1 [CdSe/ZnS]半导体量子点（激光共聚焦显微镜 ×8 000）

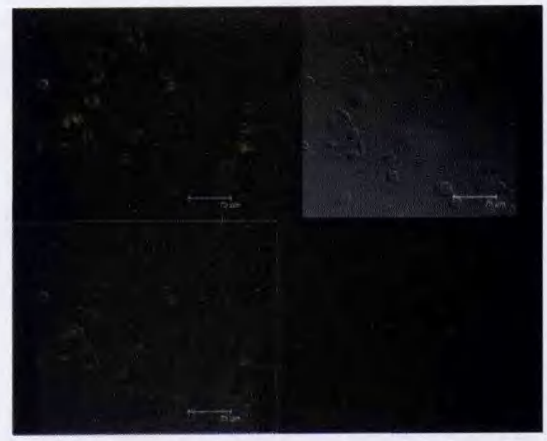


图 2 MG-63/QDs 细胞（激光共聚焦显微镜 ×200）

2.2 量子点对 MG-63 细胞生长的影响

用不同时间点各组细胞数绘制对照组和各实验组的生长曲线（如图 3 所示），各实验组和对照组生长曲线基本一致。结果表明本实验中不同浓度的量子点未影响 MG-63 细胞的生长。

2.3 量子点对 MG-63 细胞侵袭能力的影响

将量子点与 MG-63 共培养并消化离心后得到 MG-63/QDs 细胞。实验表明：MG-63/QDs 和 MG-63 穿膜细胞均数分别为 73.3±3.1、74.6±2.7，两均数间差异无统计学意义（$P>0.05$），表明经量子点标记后的 MG-63 细胞未影响其侵袭能力。

2.4 量子点对 MG-63 细胞粘附性的影响

不同时间点 MG-63/QDs 和 MG-63 细胞的粘附率见表 1。分析表中数据，其结果表明，经量子点标记后的 MG-63 细胞其粘附能力未发生改变。

2.5 量子点对 MG-63 细胞趋化运动的影响

MG-63/QDs 和 MG-63 侵袭至滤膜下表面的细胞数目分别为 80.9±5.7、83.1±4.6，两均数间无显著差异（$P>0.05$），表明经量子点标记后的 MG-63 细

表 1 不同时间点 MG-63/QDs 和 MG-63 细胞的粘附率

时间(h)	细胞粘附率(%)		P 值
	MG-63/QDs	MG-63	
30	10.1 ± 2.1	9.9 ± 2.4	> 0.05
60	14.9 ± 2.5	16.1 ± 2.1	> 0.05
90	29.9 ± 3.4	30.7 ± 2.3	> 0.05
120	40.3 ± 3.6	41.8 ± 3.2	> 0.05

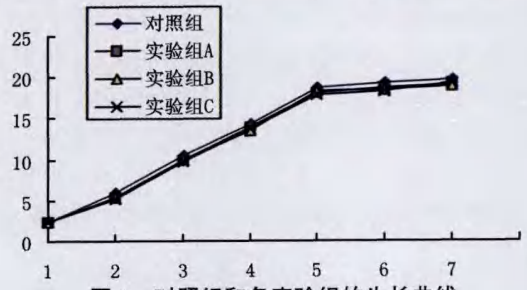


图 3 对照组和各实验组的生长曲线

胞未影响其趋化运动能力。

3 讨 论

骨肉瘤是较为常见的恶性肿瘤之一,由于局部浸润性强且易发生全身转移,目前治疗疗效差。如何直接在活体生理条件从单细胞水平乃至分子水平对肿瘤细胞的生长、浸润和转移等病理变化过程进行实时的动态可视化监测,研究其浸润转移机理和进行临床早期诊断是目前急需解决的问题,而要解决这一问题的"瓶颈"技术之一就是发展既适合于活体又易被灵敏检测的细胞或分子标记物[3-7]。

半导体量子点或称为半导体纳米微晶体(Semiconductor nanocrystals),它是由Ⅱ~Ⅵ族元素(如CdSe、CdS 等)或Ⅲ~Ⅴ族元素(如 InP、InAS)组成的长度小于 100 nm 的半导体纳米微晶体,这些半导体纳米微晶体与目前医学中所用的传统检测荧光探针相比,具有以下独特优良的光谱特性[1-7]:①半导体量子点荧光量子产率高,发光度强,光化学稳定性好,不易被光解或漂白,它的发光强度比目前用的有机荧光染料分子强 20 倍,光化学稳定性则提高了 100~200 倍[2,4]。这十分有利于长时间对被标记对象进行持续的动态观察;②量子点的发光特征具有严格的量子长度效应,通过改变量子点的粒径大小可在同一波长光激发下获得从紫外到近红外(或从蓝色到红色)波长范围内任意点的发射光谱,量子点这一独有的荧光特征为医学研究中常常需要同时进行多通道实时原位追踪观察提供了良好的基础[1-7];③目前研究也证明:量子点进入活细胞后对细胞没有毒性作用[2-5]。在此基础上,本课题首次用半导体量子点[CdSe/ZnS]标记骨肉瘤 MG-63 细胞后观察是否对肿瘤细胞的生长、浸润和转移等生物学行为产生影响,为半导体量子点能否在活体生理条件用于肿瘤细胞的实时"在线"研究提供科学依据。

本课题所用的量子点为[CdSe/ZnS],其最大发射波长为 525 nm,该量子点由半导体材料 CdSe 形成核,ZnS 包绕在 CdSe 的表面形成外壳,实验证明:不同浓度的该半导体量子点未影响人骨肉瘤 MG-63 细胞的生长,量子点经过内吞作用进入骨肉瘤 MG-63 细胞后不影响肿瘤细胞的侵袭、粘附和趋化运动能力,本研究为半导体量子点用于在活细胞生理条件下可视化研究肿瘤的生长、浸润和转移等病理变化过程提供了科学依据。

参 考 文 献

[1] Paul Alivisatos. The use of nanocrystals in biological detection[J]. Nat.Biotechnol,2004,22(1):47-52.

[2] 杨 凯. 半导体量子点荧光探针在恶性肿瘤中的应用[J].国外医学肿瘤学分册,2005, 32(11):836-838.

[3] Sukhanova A, Devy M, Venteo L, et al. Biocompatible fluorescent nanocrystals for immunolabeling of membrane proteins and cells[J]. Anal Biochem,2004,324(1): 60-67

[4] Jaiswal J K, Mattoussi H, Mauro J M,et al. Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates[J]. Nat Biotechnol,2003,21(1) :47-51.

[5] 孙德平,杨 凯,陈 睿.半导体量子点 -Smad4 单克隆抗体荧光探针的制备及免疫特异识别能力的检测[J]. 中华口腔医学杂志,2008,43(8):492-494.

[6] 杨 凯,孙德平,陈 睿.半导体量子点对舌鳞状细胞癌Tca8113系生物学行为影响的研究[J].中华口腔医学杂志,2007,42(8):483-486.

[7] 杨 凯,孙德平,陈 睿.半导体量子点 -Smad2 单克隆抗体荧光探针的制备及其相关性质检测[J].华西口腔医学杂志,2008,26(5):541-545.

(责任编辑:关蕴良)