维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)04-0337-03

半导体量子点对口腔鳞癌 BcaCD885 细胞生长、侵袭和转移能力影响的体外研究

杨 凯,陈 睿,孙德平

(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(QDs)对口腔鳞癌 BcaCD885 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 BcaCD885 共培养,观察 QDs 对 BcaCD885 细胞生长的影响;②用 QDs 标记 BcaCD885 细胞(BcaCD885/QDs),然后用 transwell 小室法和冲刷实验,观察 BcaCD885/QDs 细胞侵袭、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 BcaCD885 细胞的生长情况;②BcaCD885/QDs 细胞和 BcaCD885 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 BcaCD885 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;肿瘤;生长;粘附;侵袭;转移

【中国图书分类法分类号】R730 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-10-24

Study on effect of semiconductor quantum dots on growth, invasion and metastasis of BcaCD885 cancer cell line in vitro

YANG Kai, 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 BcaCD885 cancer cell line. ***Methods***: ① Different concentrations of QDs was applied to BcaCD885 cells, and the cell growth of control and three test groups were compared respectively; ② BcaCD885 cells were labeled by QDs (BcaCD885/QDs), then transwell chambers and wash way were used to dectect the difference of invasion and metastasis ability between BcaCD885/QDs and BcaCD885 cells. ***Results***: ① Different concentrations of QDs showed no negative effects on growth of BcaCD885 cells; ② The ability of invasion, attachment and motive of BcaCD885 cells were not significantly different between test and control group($P>0.05$). ***Conclusion***: QDs show no effect on cytobiological behavior of living BcaCD885 cells.

【Key words】Semiconductor quantum dots(semiconductor nanocrystals); Oral caviy; Neoplasms; Growth; Attachment; Invasion; Metastasis

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,它具有光化学稳定性好、荧光度强、激发光谱宽,而发射光谱窄且对称分布等特点,他在对细胞和细胞内分子标记成像后长期示踪观察研究方面显示出独特的优势[1-3]。随着近年来生物亲和性纳米技术的发展[4],为半导体量子点用于在活体条件下研究癌症的早期诊断、靶向观察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。虽然目前研究已表明半导体量子点标记活细胞后对细胞没有毒性,但半导体量子点进入癌细胞后是否影响其侵润、转移等生物学行为这些关键问题目前还未见报道。本课题利用半导体量子点[CdSe/ZnS]标记口腔鳞癌细胞 BcaCD885,观察被量子点标记后的 BcaCD885 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

口腔鳞癌细胞 BcaCD885(四川大学华西口腔医学院),最大发射波长为 605nm 的半导体量子点 [CdSe/ZnS](美国

作者介绍:杨 凯(1965-),男,博士,副教授,
主要研究方向:口腔颌面-头颈肿瘤临床及相关基础研究。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470893)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

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 [CdSe/ZnS]量子点的荧光和形态观察 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。

1.2.2 量子点对 BcaCD885 细胞生长的影响 将生长旺盛的 BcaCD885 细胞按 2×10^4 个/ml 的浓度接种到 4 块 24 孔培养板内，每孔 0.18ml，分为 4 组，培养 24h 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 0.02ml，实验组分为 A、B、C 组，分别加入 0.02ml 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 0.1μmol/L、1μmol/L、2μmol/L。每天各组随机取三孔用 0.1%胰酶充分消化，吹打细胞培养液，制成单细胞悬液，用血球计算板计算细胞，计算平均值，连续 7 天，绘制各组的细胞生长曲线。

1.2.3 量子点对 BcaCD885 细胞侵袭分析 将量子点与 BcaCD885 共同培养，量子点浓度为 2μmol，培养 2h 后，用 0.1%胰酶充分消化后离心得到被量子点标记的 BcaCD885 细胞(即 BcaCD885/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 8μm 的聚碳酸多孔滤膜分为上下两室，在滤膜上下分别铺以 15μg matrigel，于 37℃下重建 1h 后备用。将 BcaCD885/QDs 和 BcaCD885 以 2×10^5 细胞加入 transwell 小室的上室中，37℃培养 12h，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 BcaCD885 细胞粘附分析 分别制备浓度为 5×10^6/L 的 BcaCD885/QDs 和 BcaCD885 细胞悬液，取 12 孔细胞培养板，每孔加悬液 0.2ml。培养 30、60、90、120min 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 BcaCD885 细胞趋化运动分析 该实验与前面 1.2.3 实验(量子点对 Tca8113 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 量子点的形态和荧光特征

在激光共聚焦显微镜下量子点为接近圆型的椭圆红色荧光体(图 1)，最大发射波长为 605nm，荧光强度比值为 250。

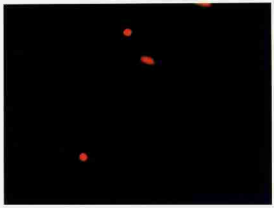


图 1 [CdSe/ZnS]半导体量子点
(激光共聚焦显微镜 ×600000)

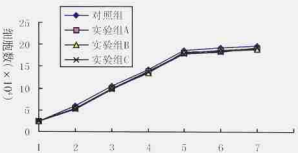


图 2 对照组和各实验组的生长曲线

2.2 量子点对 BcaCD885 细胞生长的影响

用不同时间各组细胞数绘制对照组和各实验组的生长曲线(图 2)，各实验组和对照组生长情况无显著差异($P>0.05$)。结果表明本实验中不同浓度的量子点未影响 BcaCD885 细胞的生长。

2.3 量子点对 BcaCD885 细胞侵袭能力的影响

铺在多孔滤膜表面上的 matrigel 形成类似天然基底膜的结构，细胞穿过 matrigel 的能力反映了该细胞的侵袭能力。实验发现：BcaCD885/QDs 和 BcaCD885 穿膜细胞均数分别为 69.3±4.1、72.8±5.7，两均数间无显著差异($P>0.05$)，表明经量子点标记后的 BcaCD885 细胞未影响其侵袭能力。

2.4 量子点对 BcaCD885 细胞粘附性的影响

不同时间点 BcaCD885/QDs 和 BcaCD885 细胞的粘附率见表 1。

结果表明：经量子点标记后的 BcaCD885 细胞其粘附能力未发生改变。

2.5 量子点对 BcaCD885 细胞趋化运动的影响

BcaCD885/QDs 和 BcaCD885 侵袭至滤膜下表面的细胞数目分别为 78.9±4.6、82.4±5.7，两均数间

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 不同时间点 BcaCD885/QDs 和 BcaCD885 细胞的粘附率

时间(min)	细胞粘附率(%)		P 值
	BcaCD885/QDs	BcaCD885	
30	9.6±1.5	10.3±2.3	>0.05
60	14.6±2.3	15.4±3.0	>0.05
90	28.9±3.4	30.1±3.2	>0.05
120	39.3±3.8	40.6±4.1	>0.05

无显著差异（$P>0.05$），表明经量子点标记后的 BcaCD885 细胞未影响其趋化运动能力。

3 讨 论

癌症是威胁人类生命健康的重大疾病之一，目前我们对癌症的研究基本上采用的都是“终点分析”(Endpoint analyses)，即在某一“终点”取出肿瘤标本或癌细胞进行相关研究，这些基于死细胞的检测研究使得许多重要信息得以丢失。如何直接在活细胞生理条件从单细胞水平乃至分子水平对癌细胞的生长、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”技术之一就是发展适合于活细胞检测体系的细胞或分子标记物。

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)组成的尺寸小于 100nm 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[3,5]。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尺寸效应，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[1-5]，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；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[5]。在此基础上，本课题首次用半导体量子点[CdSe/ZnS]标记口腔鳞癌细胞BcaCD885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细胞生理条件用于肿瘤医学的研究提供依据。

本课题所用的量子点为美国量子点公司提供的[CdSe/ZnS]量子点，其最大发射波长为 605nm，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，再利用量子点外壳表面上的 Zn 元素与巯基之间具有强大的结合力，将同时带有巯基和羧基的特殊高分子物质修饰包裹在[CdSe/ZnS]的表面，使其该量子点不仅具有水溶性和生物相容性，同时游离的羧基还可以与带有胺基的蛋白质、抗体等生物分子在特定条件下进行连接而制备成各种分子探针。本课题用该半导体量子点[CdSe/ZnS] 标记口腔鳞癌细胞 BcaCD885 后研究证明：不同浓度的[CdSe/ZnS]量子点未影响 BcaCD885 细胞的生长，量子点[CdSe/ZnS]进入 BcaCD885 细胞后不影响癌细胞的侵袭力、粘附性和趋化运动能力，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。

（通讯作者：杨 凯，13648304197，E-mail:cqfyyk@yahoo.com.cn）

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] Chan WCW,Maxwell DJ,Gao XH,et al.Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging[J].Curr Opin Biotechnol,2002;13(1):40-46.

[4] 杨 凯. 生物功能化半导体量子点对活细胞内蛋白质分子可视化的研究进展[J].国际生物医学工程杂志,2006;29(3):142-144.

[5] Jaiswal JK,Mattoussi H,Mauro JM,et al.Long-term multiple color imaging of live cells us ing quantum dot bioconjugates [J].Nat Biotechnol,2003;21(1):47-51.