

论著·基础研究

量子点荧光探针检测结直肠癌中的 p53 和 EGFR 共表达^{*}

周玮玮¹, 王磊^{2△}, 杨栋梁²

(1. 沧州市中心医院病理科, 河北沧州 061001; 2. 沧州医学高等专科学校, 河北沧州 061001)

摘要:目的 利用量子点(QDs)荧光探针同时检测结直肠癌组织标本中的两种肿瘤标志物 p53、表皮生长因子受体(EGFR)。方法 QDs 荧光探针检测结直肠癌中 p53 和 EGFR 的共表达, 并对 TNM 分期、分化程度等因素进行统计学分析。结果 p53 在结直肠癌组织中强阳性率为 48.6%, 与 N 分期显著相关($P<0.05$), EGFR 和 p53 共表达在结直肠癌组织中的阳性率为 67.1%, 与 N 分期显著相关($P<0.05$), 与其他因素无关($P>0.05$)。结论 QDs 法有助于定量分析 p53 和 EGFR 在结直肠癌中的协同表达, 可为临床上结直肠癌的预后提供依据。

关键词:量子点; 结肠癌; 直肠癌; p53; 表皮生长因子受体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.08.001 **中图法分类号:**R365

文章编号:1673-4130(2018)08-0897-04 **文献标识码:**A

Co-expression of p53 and EGFR in colorectal cancer detected by quantum dots fluorescence probe^{*}

ZHOU Weiwei¹, WANG Lei^{2△}, YANG Dongliang²

(1. Department of Pathology, Central Hospital of Cangzhou, Cangzhou, Hebei 061001, China;

2. Cangzhou Medical College, Cangzhou, Hebei 061001, China)

Abstract: **Objective** Simultaneous detection of two tumor markers p53 and EGFR in colorectal cancer samples. **Methods** Co-expression of p53 and EGFR in colorectal cancer detected by QDs fluorescence probe. TNM staging, grade and other factors were analyzed. **Results** The strong positive rate of p53 in colorectal cancer was 48.6%. It was significantly correlated with the N staging ($P<0.05$), the positive rate of EGFR and p53 in colorectal carcinoma was 67.1%. It was significantly correlated with the N staging ($P<0.05$), and was independent of other factors ($P>0.05$). **Conclusion** The method of QDs is helpful to quantitative analysis of co expression of p53 and EGFR in colorectal cancer, and it can provide the basis for clinical prognosis of colorectal cancer.

Key words: QDs; colon cancer; rectal cancer; p53; EGFR

结直肠癌是常见的消化道恶性肿瘤,排在胃肠道肿瘤的第二位^[1]。根据肿瘤的分期分级标准^[2],可确定肿瘤 TNM 分期与高中低分化等级,从而决定治疗并评估预后。寻找提高肿瘤的信息标记,以多因子表达作为判断癌症生物学行为及预后的参考指标,可以帮助有复发风险的患者从辅助治疗中受益。量子点(QDs)具备荧光强度高、稳定性好、灵敏度高、特有的光学性质,其吸收光谱宽而连续、发射光谱窄且对称,可反复激发和长时间观察。在同一激发光照射下,可同时实现对多种肿瘤特异性标志物的检测^[3-7]。本实验利用 QDs 荧光探针示踪 p53、表皮生长因子受体(EGFR)两种抗体,探讨 QDs 应用于结直肠癌组织标本中 p53、EGFR 突变抗原同时检测的临床意义。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 光学显微镜(OLYMPUS); 荧光显微镜(BX51, OLYMPUS); 多光谱成像系统(Nuance Fx, CRI)。单克隆鼠抗人 EGFR 抗体(1:200, Origene 公司); 单克隆兔抗人 p53 抗体(1:200, Origene 公司); 生物素化羊抗鼠 IgG(1:300, Origene 公司); QDs 标记的链霉亲和素 QDs-SA-525(1:50, 武汉珈源量子点公司); QDs 标记的羊抗兔 IgG-605(1:50, 武汉珈源量子点公司)。

1.2 方法

1.2.1 结直肠癌组织标本收集 收集沧州市中心医院 2015 年 1 月至 2017 年 1 月结直肠癌组织标本 70 例,标本用 10% 中性福尔马林固定,石蜡包埋后保存,

^{*} 基金项目:沧州市科学技术研究与发展指导计划项目(162302105)。

作者简介:周玮玮,女,主治医师,主要从事分子病理学方向研究。△ 通信作者, E-mail: czmcwanglei@126.com。

本文引用格式:周玮玮,王磊,杨栋梁. 量子点荧光探针检测结直肠癌中的 p53 和 EGFR 共表达[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(8): 897-900.

实验前进行 4 μm 连续切片,并于 60 ℃ 恒温箱中过夜,备用。

1.2.2 苏木精-伊红(HE)染色 对标本进行 HE 染色,结合病历资料和判定标准,参照 TNM 国际分期标准和镜下形态学组织分化程度,对肿瘤进行分期和分级。

1.2.3 QDs 荧光标记 将切片依次浸泡脱蜡,分别在梯度乙醇(100%、95%和 85%)中依次浸泡 10 min 脱苯。切片经下行乙醇水化,无水乙醇 5 min,95%乙醇 2 次(每次 2 min),85%乙醇 2 min;75%乙醇 2min,自来水冲洗,ddH₂O 洗 2×2 min。采用高压修复法(EDTA,pH9.0),室温自然冷却,自来水冲洗,ddH₂O 洗 2×2 min,PBS 洗涤(2×2 min)。滴加已稀释的一抗(鼠抗人 EGFR 抗体、兔抗人 p53 抗体)混合液,置于湿盒 37 ℃ 温箱中孵育 2 h,PBS-T 洗涤(3×5 min)。加入已稀释的生物素化羊抗鼠 IgG,置于湿盒 37 ℃ 温箱中孵育 30 min,PBS-T 洗涤(3×5 min)。滴加已稀释的 QDs-SA-525 和 QDs 标记的羊抗兔 IgG-605,37 ℃ 湿盒中孵育 60 min,PBS-T 洗涤(3×5 min)。待组织标本干后,用缓冲甘油封片。用荧光显微镜在紫外光激发下观察成像。

1.2.4 判断标准 采用半定量评分方法,在高倍镜下每个标本取视野 4 个不同点,且每个点的视野至少有 100 个细胞。根据阳性细胞所占百分比进行评估,阳性细胞数≤10%为阴性,>10%为阳性^[8]。

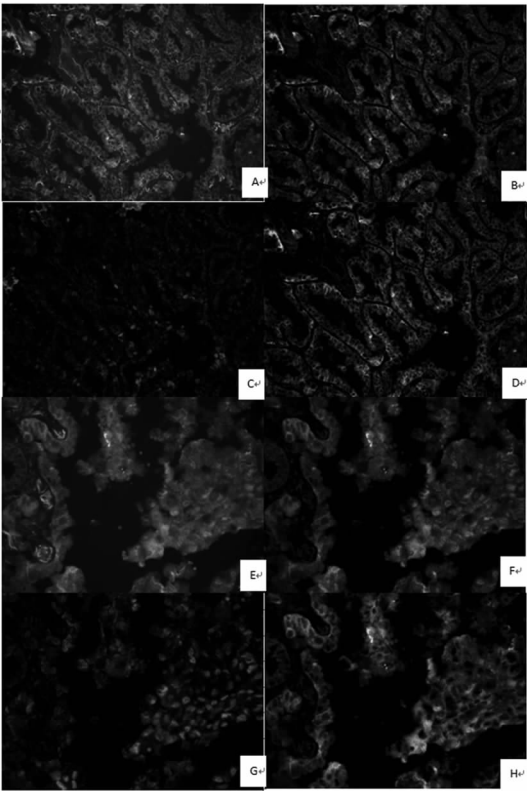
1.3 统计学处理 数据利用 SPSS19.0 软件进行统计学分析,阳性表达与各参数相关性分析采用四格表和行列表,Pearson 卡方(理论频数>5)或连续校正卡方(1<理论频数<5)检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 结直肠癌组织的形态学观察 结直肠癌镜下表现大多为腺癌,主要由柱状细胞,黏液分泌细胞以及未分化细胞构成。经镜下形态学观察,肿瘤细胞呈乳头样、腺管状排列结构。QDs 标记后在蓝光激发下,p53 出现红色荧光信号为阳性,出现在细胞核;EGFR 出现绿色荧光信号为阳性,出现在细胞膜,见图 1。

2.2 EGFR、p53 表达与结直肠癌病理特征的关系 70 例胃癌组织标本中,T1、T2、T3、T4a、T4b 分期分别为 0、9、35、22 和 4 例,N0、N1、N1a、N1b、N2b 分别

为 48、9、2、5 和 6 例;高、中、低分化分别为 0、47 和 23 例。根据 QDs 标记后激发产生荧光情况,对组织标本中表达的强度和密度进行综合判断,按照阳性表达的强弱程度分为 0、1+、2+和 3+四个等级等。QDs 标记的 70 例胃癌组织中,EGFR 阳性 68 例,占 97.1%,其中强阳性(3+)35 例,占 50.0%;p53 阳性 49 例,占70.0%,其中强阳性(3+)34 例,占 48.6%。年龄、性别等一般资料差异无统计学意义($P>0.05$)。T 分期中,EGFR(强)阳性率在 T2 分期最高,p53(强)阳性率在 T3 分期最高,但比较差异无统计学意义($P>0.05$)。N 分期中,p53 因子(强)阳性率均在 N1a 分期最高,为 100.0%,阳性率差异有统计学意义($P<0.05$);组织分化程度分级中,所有标本均无高分化,EGFR 强阳性率在低分化中最高,为 65.2%,差异无统计学意义($P>0.05$)。结果见表 1。



注:A 表示 QDs 双标图像,20×10;B 表示分离后 p53、EGFR 双色图像,20×10;C 表示分离后 p53 单色图像,20×10;D 表示分离后 EGFR 单色图像,20×10;E 表示 QDs 双标图像,40×10;F 表示分离后 p53、EGFR 双色图像,40×10;G 表示分离后 p53 单色图像,40×10;H 表示分离后 EGFR 单色图像,40×10

图 1 QDs 同时检测结直肠癌中的 p53、EGFR

表 1 EGFR、p53 表达与结直肠癌病理特征的关系

因素	组别	n	EGFR						p53					
			阳性	率(%)	P	强阳性	率(%)	P	阳性	率(%)	P	强阳性	率(%)	P
性别	男	43	42	97.7	0.736	19	44.2	0.191	31	72.1	0.485	20	46.5	0.663
	女	27	26	96.3		16	59.3		18	66.7		14	51.9	
年龄	≥60 岁	36	35	97.2	0.967	15	41.7	0.151	25	69.4	0.917	18	50.0	0.806

续表 1 EGFR、p53 表达与结直肠癌病理特征的关系

因素	组别	n	EGFR						p53					
			阳性	率(%)	P	强阳性	率(%)	P	阳性	率(%)	P	强阳性	率(%)	P
T 分期	<60 岁	34	33	97.1		20	58.8		24	70.6		16	47.1	
	T2	9	8	88.9	0.160	4	44.4	0.713	4	44.4	0.329	3	33.3	0.440
	T3	35	35	100.0		19	54.3		25	71.4		17	48.6	
	T4a	22	21	95.5		11	50.0		17	77.3		13	59.1	
	T4b	4	4	100.0		1	25.0		3	75.0		1	25.0	
N 分期	N0	48	46	95.8	0.918	22	45.8	0.573	37	77.1	0.017	24	50.0	0.295
	N1	9	9	100.0		4	44.4		2	22.2		2	22.2	
	N1a	2	2	100.0		1	50.0		2	100.0		2	100.0	
	N1b	5	5	100.0		4	80.0		4	80.0		3	60.0	
	N2b	6	6	100.0		4	66.7		4	66.7		3	50.0	
分级	高	0	0	0.0	0.600	0	0.0	0.075	0	0	0.617	0	0.0	0.930
	中	47	46	97.9		20	42.6		32	68.1		23	48.9	
	低	23	22	95.7		15	65.2		17	73.9		11	47.8	

表 2 EGFR 和 p53 共表达与结直肠癌临床病理特征的关系

因素	组别	n	EGFR+p53					
			阳性(n)	率(%)	P	强阳性(n)	率(%)	P
性别	男	43	30	69.8	0.555	11	25.6	0.309
	女	27	17	63.0		10	37.0	
年龄	≥60 岁	36	24	66.7	0.93	9	25.0	0.348
	<60 岁	34	23	67.6		12	35.3	
T 分期	T2	9	3	33.3	0.146	1	11.1	0.264
	T3	35	25	71.4		12	34.3	
	T4a	22	16	72.7		8	36.4	
	T4b	4	3	75.0		0	0.0	
N 分期	N0	48	35	72.9	0.035	13	27.1	0.696
	N1	9	2	22.2		2	22.2	
	N1a	2	2	100.0		1	50.0	
	N1b	5	4	80.0		2	40.0	
	N2b	6	4	66.7		3	50.0	
分级	高	0	0	0.0	0.763	0	0.0	0.541
	中	47	31	66.0		13	27.7	
	低	23	16	69.6		8	34.8	

2.3 EGFR 和 p53 共表达与结直肠癌临床病理特征的关系 N 分期中,两种因子阳性共表达在 N1a 分期最高,强阳性率差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

3 讨 论

对于癌症的早期诊断来说,肿瘤标志物单一检测结果容易产生“假阳性”,建立简单有效的方法同时检测多种肿瘤特异性标志物,为癌症诊断提供全面可靠的信息,对于癌症的早期诊断及预后具有重要意义^[9-14]。QDs 是由Ⅱ~Ⅵ族或Ⅲ~Ⅴ族元素组成的稳定的纳米微晶,由于纳米级尺寸效应和量子限域效

应,使其具有独特的荧光性能。在 QDs 合成过程中,通过控制合成时间、温度等条件,可选择性制备不同粒径的 QDs,从而实现在同一光源下受激发产生不同颜色的荧光,将多色 QDs 分别标记在不同肿瘤标志物分子信标末端,形成多种抗原的 QDs 荧光探针,与相应抗原特异性结合后,受激发产生不同颜色荧光信号,即可对多种肿瘤标志物进行同时定量检测。与传统的免疫组织化学法(IHC)相比,该法能够实现多种多种因子同时标记。与传统的荧光染料相比,QDs 具有荧光稳定性好、灵敏度高优点,经探针标记后的抗原受激发后,荧光强度在较长的时间内可保持稳定、

寿命长,结果的重现性良好。本研究用 QDs 实现了对结直肠癌组织标本中 p53 和 EGFR 的标记,得到了清晰的双色图像。

p53 是重要的肿瘤抑制因子,在细胞周期的调控、细胞凋亡和肿瘤形成及发展中具有十分重要的作用。EGFR 参与肿瘤细胞的增殖、血管生成、侵袭、转移及凋亡抑制等基因调控,在多种肿瘤组织中有高表达,其在结直肠癌中的高表达与结直肠癌的发生、发展及生物学行为密切相关,目前已经成为新的研究热点。p53 和 EGFR 在结直肠癌中共表达的研究国内外鲜有报道。本研究利用 QDs 探针标记成像并对结果统计分析,实验结果发现结直肠癌组织标本中的 EGFR 阳性率占 97.1%,p53 阳性率占 70.0%。其中,p53 阳性表达与淋巴结转移相关。两种因子共表达与结直肠癌临床病理特征的关系的分析中,两种因子阳性表达与淋巴结转移相关。因此,两种因子阳性协同表达与淋巴结转移密切相关,但具体机制尚不明确。QDs 技术有助于定量分析 p53 和 EGFR 在结直肠癌中的协同表达,这为临床上结直肠癌的预后具有重要作用,但由于研究报道较少,本组实验标本数量有限,有待于后续大样本研究进一步验证 p53 和 EGFR 在结直肠癌中的应用价值。

QDs 探针用于多色原位成像可揭示多种特异性标志物在肿瘤侵袭过程中的作用机制,这也使得此类研究逐渐成为热点^[15-17]。同时,QDs 快速检测多种肿瘤标志物的试剂条或芯片的开发,也必将成为研究的重要方向。

参考文献

- [1] WITTEKIND C, OBERSCHMID B. TNM classification of malignant tumors 2010 [J]. *Pathologe*, 2010, 31 (5): 333-334.
- [2] ZHANG H, GUO J, SONG G, et al. Prognostic factors for transarterial chemoembolization combined with sustained oxaliplatin-based hepatic arterial infusion chemotherapy of colorectal cancer liver metastasis [J]. *Chinese J Cancer Res*, 2017, 29 (1): 36-44.
- [3] FU T, QIN H Y, HU H J, et al. Aqueous synthesis and fluorescence-imaging application of CdTe/ZnSe core/shell quantum dots with high stability and low cytotoxicity [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2010, 10 (3): 1741-1746.
- [4] CHEN C, SUN S R, GONG Y P, et al. Quantum dots-based molecular classification of breast cancer by quantitative spectroanalysis of hormone receptors and HER2 [J]. *Biomaterials*, 2011, 32 (30): 7592-7599.
- [5] LIU X L, PENG C W, CHEN C, et al. Quantum dots-based double-color imaging of HER2 positive breast cancer invasion [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 409 (3): 577-582.
- [6] YANG X Q, CHEN C, PENG C W, et al. Quantum dot-based quantitative immunofluorescence detection and spectrum analysis of epidermal growth factor receptor in breast cancer tissue arrays [J]. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6 (15): 2265-2273.
- [7] 赵朋月, 宋建, 刁路明, 等. 量子点免疫荧光技术检测基质 Cav-1、LDH-B 和 PKM2 蛋白在人肺腺癌中的表达及其临床意义 [J]. *肿瘤*, 2012, 32 (9): 731-737.
- [8] PENG C W, LIU X L, CHEN C, et al. Patterns of cancer invasion revealed by QDs-based quantitative multiplexed imaging of tumor microenvironment [J]. *Biomaterials*, 2011, 32 (11): 2907-2917.
- [9] WANG Y, LI Y, CHEN Z, et al. The evaluation of colorectal cancer risk in serum by anti-DESMIN-conjugated CdTe/CdS quantum Dots [J]. *Clin Lab*, 2017, 63 (3): 579-586.
- [10] MIYASHITA M, GONDA K, TADA H, et al. Quantitative diagnosis of HER2 protein expressing breast cancer by single-particle quantum dot imaging [J]. *Cancer Med*, 2016, 5 (10): 2813-2824.
- [11] WANG S, WEN Y, WANG Y, et al. Pattern recognition of cells via multiplexed imaging with monosaccharide-imprinted quantum Dots [J]. *Anal Chem*, 2017, 89 (10): 5646-5652.
- [12] SHAN G, TANG T. Expression of cyclin D1 and cyclin E in urothelial bladder carcinoma detected in tissue chips using a quantum dot immunofluorescence technique [J]. *Oncol Lett*, 2015, 10 (3): 1271-1276.
- [13] YUAN J P, WANG L W, QU A P, et al. Quantum dots-based quantitative and in situ multiple imaging on ki67 and cytokeratin to improve ki67 assessment in breast cancer [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (4): e0122734.
- [14] KWON S, CHO C H, LEE E S, et al. Automated measurement of multiple cancer biomarkers using quantum-dot-based microfluidic immunohistochemistry [J]. *Anal Chem*, 2015, 87 (8): 4177-4183.
- [15] 向清明, 王林伟, 袁静萍, 等. 量子点标记双分子探针技术观察乳腺癌 HER-2 与 Ki-67 协同表达 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2016, 32 (4): 464-466.
- [16] FANG M, YUAN J P, PENG C W, et al. Quantum dots-based in situ molecular imaging of dynamic changes of collagen IV during cancer invasion [J]. *Biomaterials*, 2013, 34 (34): 8708-8717.
- [17] WANG C, HOU F, MA Y. Simultaneous quantitative detection of multiple tumor markers with a rapid and sensitive multicolor quantum dots based immunochromatographic test strip [J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 68 (15): 156-162.