

基于纳米偏光特性的 生物光学探针在乳腺癌 检测识别中的应用研究

刘 义¹, 王 慧²

¹临沂市妇幼保健院医学装备科, 山东 临沂

²临沂市妇幼保健院检验科, 山东 临沂

收稿日期: 2023年7月24日; 录用日期: 2023年8月28日; 发布日期: 2023年9月4日

摘 要

乳腺癌发病率逐年上升, 已成为女性最常见的肿瘤之一, 严重危及女性的身体健康。随着乳腺癌诊疗技术的发展, 迫切需要新的诊断技术以提高诊断效率, 延长乳腺癌患者生存期, 因此探索一种快速简便准确的肿瘤检测方法显得尤为重要。金纳米棒(AuNRs)因其独特的光学特性以及易于制备修饰等特点, 在生物医学领域得到广泛应用。本文总结了乳腺癌(BC)的分子分型和金纳米棒(AuNRs)的合成、表征及修饰情况, 并探索了基于偏光特性的金纳米棒-波形蛋白抗体(AuNRs-AntiVimentin)生物光学探针在乳腺癌组织样本检测中的临床应用。生物光学探针易于合成, 操作简单, 观测效果较好, 与传统免疫组化的乳腺癌阳性检出率没有显著差异, 这为乳腺癌组织样本的快速检测提供了新的思路和方法。

关键词

金纳米棒, 偏光特性, 乳腺癌, 生物光学探针

Research on the Application of Biooptical Probe Based on Nano Polarization in Detection and Recognition of Breast Cancer

Yi Liu¹, Hui Wang²

¹Medical Equipment Department, Linyi Maternal and Child Health Care Hospital, Linyi Shandong

²Clinical Laboratory, Linyi Maternal and Child Health Care Hospital, Linyi Shandong

Received: Jul. 24th, 2023; accepted: Aug. 28th, 2023; published: Sep. 4th, 2023

Abstract

The incidence rate of breast cancer has increased year by year, and has become one of the most common tumors in women, seriously endangering women's health. With the development of breast cancer diagnosis and treatment technology, new diagnostic technologies are urgently needed to improve the diagnostic efficiency and prolong the survival period of breast cancer patients. Therefore, it is particularly important to explore a fast, simple and accurate tumor detection method. AuNRs have been widely used in the biomedical field due to their unique optical properties and ease of preparation and modification. This paper summarized the molecular typing of breast cancer (BC) and the synthesis, characterization and modification of AuNRs, and explored the clinical application of AuNRs-AntiVimentin based on polarization characteristics in the detection of breast cancer tissue samples. Biooptical probes are easy to synthesize, simple to operate, and have good observation effect. There is no significant difference between the positive detection rate of breast cancer and that of traditional immunohistochemistry, which provides new ideas and methods for rapid detection of breast cancer tissue samples.

Keywords

AuNRs, Polarization Characteristics, Breast Cancer, Biooptical Probes

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

乳腺癌(BC)是我国女性最常见的恶性肿瘤,因其高死亡率和发病率而成为全球女性主要的健康问题。据统计,转移性乳腺癌患者的五年生存率低于 30% [1]。乳腺癌在形态学和分子水平上具有高度异质性,需要根据分子亚型制定不同的治疗方案。对于非转移性乳腺癌,治疗的目标是消除肿瘤,防止转移和复发,对于转移性乳腺癌,治疗的目标是减轻症状并延长患者的寿命。目前乳腺癌常见的治疗方案包括局部区域治疗和全身治疗。局部治疗包括手术和放射治疗;全身治疗包括内分泌治疗、化疗、靶向治疗以及免疫治疗[2]。尽管乳腺癌诊疗技术取得了长足的进步,但仍存在一些不足:如手术的创伤面大、化学药物的不良副作用及耐药性、化疗的特异性差及毒性大,免疫治疗引起的不良反应等[3] [4] [5],这些都限制了乳腺癌诊疗技术的进一步发展,因此,探索一种快速、简便、准确的乳腺癌检测识别方法显得尤为重要。

2. 乳腺癌分子分型和波形蛋白

Perou 等人[6]于 2000 年提出了乳腺癌分子分型,将乳腺癌分为四种亚型:管腔型(Luminal Subtype),正常乳腺样型(Normal Breast-like Subtype),人表皮生长因子受体-2 过表达型(HER2 Over-expression Subtype)和基底细胞样型(Basal-like Subtype)。此外,管腔类型分为管腔 A 亚型和管腔 B 亚型[7]。根据雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)和 HER-2 和 Ki67 表达的免疫组织化学检测结果,乳腺癌临床分为 Luminal A 型, Luminal B 型、HER2 过表达型和 Basal-like 型(三阴型)等。

波形蛋白 Vimentin (Vim)是一种 III 型中间丝细胞骨架蛋白,主要在间充质来源的细胞中表达,因此它具有复杂的生物学功能,在各种肿瘤进化的上皮细胞-间充质转化(EMT)中起重要作用。Vim 参与细

胞迁移、分化、增殖、粘附和侵袭[8]。越来越多的证据也证实, Vim 通过调节 EMT 与肿瘤的发生和发展密切相关[9]。Vim 在乳腺癌不同分型、分期和临床病理特征中显现出不同的表达水平, 表明 Vim 与乳腺癌有着十分密切的关系, 这也显示了 Vim 作为乳腺癌诊断治疗的新的标记性因子的潜力和价值[10]。有研究发现[11] [12] [13], Vim 在基底样乳腺癌(BLBC)组的阳性率为 0.21%, 高于管腔组(4.13%)、HER16 过表达组(7.11%)和正常乳腺样组(1.44%), Vim 在三阴性乳腺癌中的阳性表达率为 2.29%, 高于管腔 A 型(1.33%), 管腔 B 型(3.66%), HER2 过表达型(2.45%)。这表明基底细胞样乳腺癌和三阴性乳腺癌具有高侵袭性, 同时也证明了 Vim 是乳腺癌预后不良的重要因子之一[14]。

3. 金纳米棒的特性

金纳米棒(AuNRs)因其表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)表现出优异的光学性质, 可在紫外可见光谱上显示强吸收峰, 在生物传感器、生物探针、药物载体、生物分子的检测、识别多功能高分辨率成像和医疗诊断等生物医学领域得到广泛应用[15], 如图 1 所示。AuNRs 作为纳米材料具有以下优点[16]: 一是具有独特的光电特性, 既具有局域表面等离子体共振(LSPR)特性。二是合成简单, 通过成熟的合成方法, 可以生成高度稳定的 AuNRs。三是 AuNPs 具有高表面体积比、优异的生物相容性、低毒性等特点。四是可以通过调节长径比来调节 AuNRs 的特性。五是 AuNPs 易于修饰, 可以为各种有机或生物配体的功能化提供平台。这些优点使得 AuNRs 具有广阔的研究价值和应用潜力。

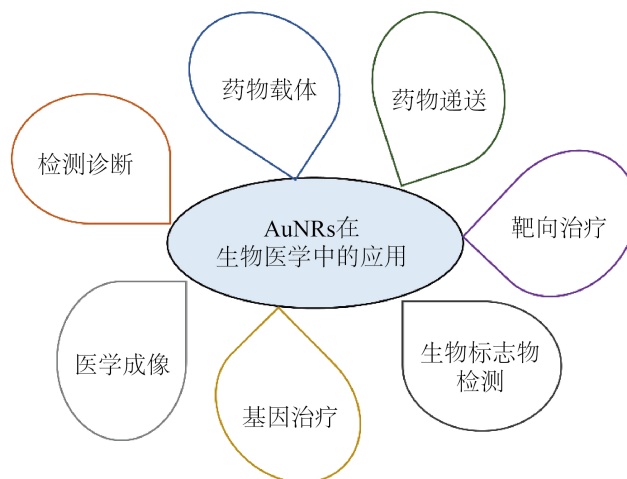


Figure 1. Application of AuNRs in various fields of biomedicine

图 1. AuNRs 在生物医学各个领域的应用

AuNRs 是各向异性纳米材料, 具有双折射特性, 即光去极化特性[17]。偏光显微镜是用于研究各向异性材料的一种显微镜, 能够对各向异性纳米材料选择性成像。所以可以通过偏光显微镜观察 AuNRs 的偏光特性, 可以追踪 AuNRs 标记的细胞和组织位置, 这为 AuNRs 作为生物光学探针的探索提供了实验基础。

4. 金纳米棒的合成、表征及修饰

金纳米棒的制备合成方法主要有模板法、电化学法、光诱导法和晶种生长法[18]。模板法是以多孔氧化铝薄膜为模板, 通过电化学沉积方法生成 AuNRs, 本方法存在制作过程繁琐, 生产效率低的问题; 电化学法是在电解池中将阴阳两极浸入到电解质溶液中生成 AuNRs, 其缺点是合成过程复杂且重复率低;

光化学法是利用不同波长的光对特定反应溶剂条件下的生长溶液进行照射产生 AuNRs 的方法, 其存在产生 AuNRs 长短不一且稳定性差的现象; 晶种生长法是一种制备 AuNRs 最广泛的方法。它具有制备方法简单、生产率高、对设备要求低等优势。其合成原理是氯金酸(HAuCl₄·3H₂O)中的金离子被硼氢化钠(NaBH₄)快速还原, 并在十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)溶液中以种子的形式变成 AuNRs。晶种生长法主要分为两个步骤[19]: 一是晶种的合成; 二是在生长液中生成 AuNRs。在制备过程中, 可以通过调节生长液中的反应参量调节 AuNRs 的形貌和尺寸, 如图 2 所示。

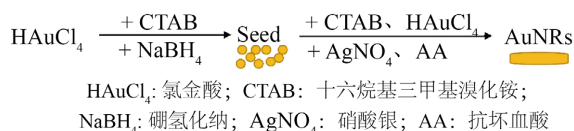


Figure 2. Schematic diagram of AuNRs prepared by seed growth method

图 2. 种子生长法制备 AuNRs 示意图

AuNRs 常用的表征方法主要有以下几种[20]: 一是紫外可见光谱, 用于检测 AuNRs 的生长和吸收光谱。二是透射电子显微镜, 用于直接显示图像, 观察 AuNRs 的形貌和尺寸。三是 Zeta 电位测量, 用于监测 AuNRs 表面发生的电位变化。

AuNRs 主要有物理吸附、化学吸附两种修饰方法[21]。物理吸附是通过无机材料或者有机材料包裹 AuNRs 表面, 是将生物受体(抗体、DNA 等)固定在 AuNRs 上最简单的方法。它是将阴阳离子聚电解质强烈吸附在 AuNRs 表面, 不容易被竞争分子取代, 然后再用超滤以及配体交换的方式将生物受体吸附在 AuNRs 表面[22]。化学吸附是通过化学键将生物受体(抗体、DNA 等)与 AuNRs 偶联。主要是利用硫对金的强亲和力, 巯基分子具有硫原子, 可以与 AuNRs 表面的金原子形成金硫键, 从而将巯基分子吸附在金纳米粒子表面。AuNRs 功能化后作为高性能材料手段广泛应用于光学探针、生物传感、载带药物等领域。

5. AuNRs 生物光学探针在乳腺癌临床检测中的应用

近些年, AuNRs 光学探针在癌症的诊断识别领域不断发展, 相关的研究成果越来越多。本团队前期利用种子生长法, 合成种子和小尺寸的 AuNRs。通过 Na₂S 溶液, 对 AuNRs 再生长进行调控, 得到目的波长的 AuNRs。将波形蛋白抗体(AntiVim)通过酰胺共价键修饰到 AuNRs 上, 合成了 AuNRs-AntiVim 光学探针。同时采用透射电镜(TEM)、紫外-可见光谱(UV-Vis)表征了 AuNRs 和 AuNRs-AntiVim 的形貌和光学特征, 具体实验方法和合成过程参考文献[23]。我们利用该生物光学探针探索其在乳腺癌组织样本临床检测的应用效果。

我们选取 9 例乳腺癌组织样本作为实验材料, 使用 AuNRs-AntiVim 光学探针和传统的免疫组化两种方法检测组织中 Vim 蛋白的表达。Vim 属于胞质蛋白, 免疫组化(IHC)以组织样本胞质染为棕黄色或棕褐色作为阳性细胞的判断标准。光学探针标记以胞质中出现红色颗粒作为阳性细胞的判断标准。当阳性占比为>30%记为阳性。通过偏光显微镜观察 AuNRs-AntiVim 光学探针的标记情况, 使用生物显微镜观察传统免疫组化染色情况。结果如图 3 所示: 在 AuNRs-AntiVim 光学探针标记的乳腺癌组织样本中附着了大量红色斑点, 染色位置准确, 显示效果清晰, 易于观察, 具有较好的检测识别效果, 与常规免疫组化染色效果相近。

我们用 AuNRs-AntiVim 光学探针和常规免疫组化(IHC)两种方法对 9 例乳腺癌阳性组织样本进行 Vim 阳性检出率的统计, 用 McNemar's 检验, 并用 SPSS 软件进行统计分析(P < 0.05 时表明阳性检出率差异

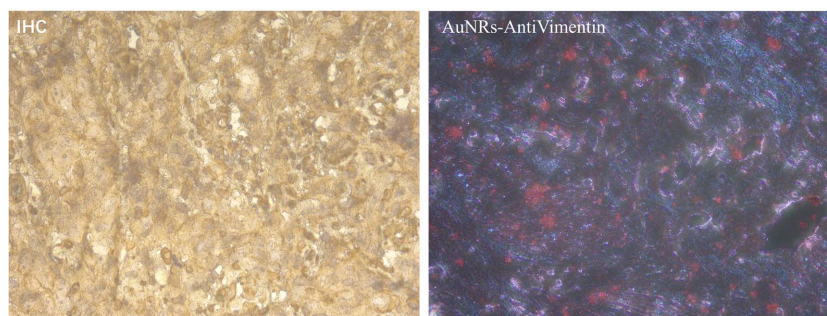


Figure 3. Comparison of the staining effect of AuNRs AntiVim and IHC on Vim in breast cancer tissue (400×)

图 3. AuNRs-AntiVim 与 IHC 对乳腺癌组织中 Vim 的染色效果对比(400×)

具有统计学意义)。由于收集的样本数量较少,暂不考虑乳腺癌病理分期与检验结果之间的关系,只对两种方法的 Vim 阳性检出率进行比较。从表 1 我们可以看到: IHC 检测乳腺癌阳性患者 7 例, AuNRs-AntiVim 光学探针检测乳腺癌阳性患者 5 例。采用 McNemar 检验统计结果表明,两种方法的阳性率差异统计上没有显著性差异($P = 0.625 > 0.05$)。

Table 1. Testing data statistics

表 1. 检测数据统计

IHC	AuNRs-AntiVim		合计	P
	阳性	阴性		
阳性	4	3	7	0.625
阴性	1	1	2	
合计	5	4	9	

6. 讨论

乳腺癌是妇科最常见的妇科癌症之一,是全球女性癌症死亡的主要原因。2021 年全球癌症数据显示,2021 年,女性乳腺癌成为全球最常见癌症,约占新发癌症病例的 11.7%。其中,中国女性 2021 年乳腺癌新发例数为 42 万,也成为我国女性新发癌症病例数之首[24]。目前,虽然乳腺癌的诊断治疗技术已取得了一定的进步,但仍然缺乏新的检测手段对乳腺癌进行快速诊断,提高患者的诊断效率和生存率。传统的癌症病理诊断的金方法为免疫组化,其存在步骤繁琐、诊断周期长等不足,这也推动了新的诊断方法不断地创新和丰富[25]。

AuNPs 具有多种独特的功能特性,易于合成,引起了广泛的关注。它们的内在特征(光学、电子和物理化学特性)可以通过改变纳米颗粒的特征(如形状、尺寸和纵横比)来改变。它们应用于广泛的医疗领域[26]。目前国内外对于 AuNRs 生物光学探针识别检测乳腺癌的报道并不多。我们通过 AuNRs-AntiVim 生物光学探针,探索了一种基于纳米材料检测乳腺癌的新方法。临床实验结果表明,利用 AuNRs 的偏光特性可以对肿瘤组织细胞进行染色标记,而且染色效果明显,统计分析显示与传统免疫组化的染色效果无显著差异。同时本方法步骤简便,可以为患者争取宝贵的救治时间。肿瘤检测和纳米新材料有机结合的创新,如果能够实现规模化应用,必将有力推动技术创新和产业融合。

Vim 是 EMT 的标志蛋白,在乳腺癌组织中高表达,是乳腺癌诊断的重要肿瘤标记物[27]。但 Vim 蛋白的表达不能作为乳腺癌确诊的充要条件,需结合血清学、病理学及多种肿瘤标记蛋白(ER、PR、Ki-67、

HER2 等)的表达情况进行综合诊断。后续我们将扩大样本量, 增加对乳腺癌相关特异性蛋白的检测, 进一步验证本技术的检测效力和检测成本。同时, 该方法处在初步的探索阶段, 还存在很多需要优化改进的地方, 如对工艺参数、AuNRs 调控和设备硬件进行优化和完善, 不断提高 AuNRs 尺寸均一性、生物光学探针的稳定性和观测效果的清晰度。

基金项目

2021 年度山东省医务职工科技创新计划项目, 序号: 09。

参考文献

- [1] Riggio, A.I., Varley, K.E. and Welm, A.L. (2021) The Lingering Mysteries of Metastatic Recurrence in Breast Cancer. *British Journal of Cancer*, **124**, 13-26. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-01161-4>
- [2] Burstein, H.J., Curigliano, G. and Thürlimann, B. (2021) Customizing Local and Systemic Therapies for Women with Early Breast Cancer: The St. Gallen International Consensus Guidelines for Treatment of Early Breast Cancer 2021. *Annals of Oncology*, **32**, 1216-1235. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.06.023>
- [3] Condorelli, R. and Vaz-Luis, I. (2018) Managing Side Effects in Adjuvant Endocrine Therapy for Breast Cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*, **18**, 1101-1112. <https://doi.org/10.1080/14737140.2018.1520096>
- [4] Omidi, Y., Mobasher, M., Castejon, A.M. and Mahmoudi, M. (2022) Recent Advances in Nanoscale Targeted Therapy of HER2-Positive Breast Cancer. *Journal of Drug Targeting*, **30**, 687-708. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2022.2055045>
- [5] Malik, J.A., Ahmed, S., Jan, B., et al. (2022) Drugs Repurposed: An Advanced Step towards the Treatment of Breast Cancer and Associated Challenges. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **145**, Article ID: 112375. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112375>
- [6] Perou, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S.X., Lønning, P.E., Børresen-Dale, A.L., Brown, P.O. and Botstein, D. (2000) Molecular Portraits of Human Breast Tumours. *Nature*, **406**, 747-752. <https://doi.org/10.1038/35021093>
- [7] Cancer Genome Atlas Network (2012) Comprehensive Molecular Portraits of Human Breast Tumours. *Nature*, **490**, 61-70. <https://doi.org/10.1038/nature11412>
- [8] Cheng, F., Shen, Y., Mohanasundaram, P., Lindström, M., Ivaska, J., Ny, T. and Eriksson, J.E. (2016) Vimentin Coordinates Fibroblast Proliferation and Keratinocyte Differentiation in Wound Healing via TGF- β -Slug Signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **113**, E4320-E4327. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519197113>
- [9] Bronte, G., Puccetti, M., Crinò, L. and Bravaccini, S. (2019) Epithelial-to-Mesenchymal Transition and EGFR Status in NSCLC: The Role of Vimentin Expression. *Annals of Oncology*, **30**, 339-340. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy548>
- [10] Michaels, E., Worthington, R.O. and Rusiecki, J. (2023) Breast Cancer: Risk Assessment, Screening, and Primary Prevention. *Medical Clinics of North America*, **107**, 271-284. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2022.10.007>
- [11] Qu, T., Zhao, Y., Chen, Y., Jin, S., Fang, Y., Jin, X., Sun, L. and Ma, Y. (2019) Down-Regulated MAC30 Expression Inhibits Breast Cancer Cell Invasion and EMT by Suppressing Wnt/ β -Catenin and PI3K/Akt Signaling Pathways. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, **12**, 1888-1896.
- [12] Katsura, C., Ogunmwoyi, I., Kankam, H.K. and Saha, S. (2022) Breast Cancer: Presentation, Investigation and Management. *British Journal of Hospital Medicine*, **83**, 1-7. <https://doi.org/10.12968/hmed.2021.0459>
- [13] Tarighati, E., Keivan, H. and Mahani, H. (2023) A Review of Prognostic and Predictive Biomarkers in Breast Cancer. *Clinical and Experimental Medicine*, **23**, 1-16. <https://doi.org/10.1007/s10238-021-00781-1>
- [14] Su, Y., Hopfinger, N.R., Nguyen, T.D., Pogash, T.J., Santucci-Pereira, J. and Russo, J. (2018) Epigenetic Reprogramming of Epithelial Mesenchymal Transition in Triple Negative Breast Cancer Cells with DNA Methyltransferase and Histone Deacetylase Inhibitors. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **37**, Article No. 314. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0988-8>
- [15] Kalyane, D., Polaka, S., Vasdev, N. and Tekade, R.K. (2022) CD44-Receptor Targeted Gold-Doxorubicin Nanocomposite for Pulsatile Chemo-Photothermal Therapy of Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Pharmaceutics*, **14**, Article 2734. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122734>

-
- [16] Saha, K., Agasti, S.S., Kim, C., Li, X. and Rotello, V.M. (2012) Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. *Chemical Reviews*, **112**, 2739-2779. <https://doi.org/10.1021/cr2001178>
- [17] Al Mannai, A., Al-Ansari, T. and Saoud, K.M. (2022) Quantification of Serum Exosome Biomarkers Using 3D Nanoporous Gold and Spectrophotometry. *Sensors*, **22**, Article 6347. <https://doi.org/10.3390/s22176347>
- [18] Yoo, S., Nam, D.H., Singh, T.I., Leem, G. and Lee, S. (2022) Effect of Reducing Agents on the Synthesis of Anisotropic Gold Nanoparticles. *Nano Convergence*, **9**, Article No. 5. <https://doi.org/10.1186/s40580-021-00296-1>
- [19] Zhang, H., Chen, Y., Chui, K.K., Zheng, J., Ma, Y., Liu, D., Huang, Z., Lei, D. and Wang, J. (2023) Synthesis of Biten Gold Nanoparticles with Single-Particle Chiroptical Responses. *Small*, **19**, e2301476. <https://doi.org/10.1002/smll.202301476>
- [20] Samim, M., Prashant, C., Dinda, A., Maitra, A. and Arora, I. (2022) Synthesis and Characterization of Gold Nanorods and Their Application for Photothermal Cell Damage [Retraction]. *International Journal of Nanomedicine*, **17**, 5063-5064. <https://doi.org/10.2147/IJN.S395107>
- [21] Mueller, E.N., Alina, T.B., Curry, S.D., Ganguly, S., Cha, J.N. and Goodwin, A.P. (2022) Silica-Coated Gold Nanorods with Hydrophobic Modification Show Both Enhanced Two-Photon Fluorescence and Ultrasound Drug Release. *Journal of Materials Chemistry B*, **10**, 9789-9793. <https://doi.org/10.1039/D2TB02197H>
- [22] Zhang, K. and Shen, X. (2013) Cancer Antigen 125 Detection Using the Plasmon Resonance Scattering Properties of Gold Nanorods. *The Analyst*, **138**, 1828-1834. <https://doi.org/10.1039/c3an36614f>
- [23] Zhang, Q., Zhang, Z., Zhang, H., Wang, H., Tang, Q., Wang, Y., Gao, Q., Liu, J. and Liu, Y. (2023) Development of a Method to Diagnose Endometrial Cancer Based on the AuNRs-AntiVimentin Optical Probe. *Cell Biology International*, **47**, 1281-1288. <https://doi.org/10.1002/cbin.12035>
- [24] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., *et al.* (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **71**, 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [25] Zhao, L., Du, X., Fang, B., Liu, Q., Yang, H., Li, F., Sheng, Y., Zeng, X., Zhong, H. and Zhao, W. (2022) Direct Investigations of the Electrical Conductivity of Normal and Cancer Breast Cells by Conductive Atomic Force Microscopy. *Ultramicroscopy*, **237**, Article ID: 113531. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2022.113531>
- [26] Kalyane, D., Polaka, S., Vasdev, N. and Tekade, R.K. (2023) Cancer Cell-Specific and Laser-Activatable NanoSeeds for Targeted Photothermal Ablation of Triple-Negative Breast Cancer. *Photochemistry and Photobiology*, **99**, 1157-1171. <https://doi.org/10.1111/php.13747>
- [27] Shao, W., Li, J., Piao, Q., Yao, X., Li, M., Wang, S., Song, Z., Sun, Y., Zheng, L., Wang, G., Liu, L., Yu, C., Huang, Y., Bao, Y. and Sun, L. (2023) FRMD3 Inhibits the Growth and Metastasis of Breast Cancer through the Ubiquitination-Mediated Degradation of Vimentin and Subsequent Impairment of Focal Adhesion. *Death & Disease*, **14**, Article No. 13. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-05552-2>