

还原响应荧光探针的研制

赵泽恺, 王璐, 薛敬伟, 张灿*

(中国药科大学新药研究中心, 南京 210009)

摘要 基于荧光共振能量转移(FRET)原理和胞质中的还原环境,对载体在细胞胞质中的稳定性进行了表征。首次合成了同时具有FRET效应和还原响应性的新型荧光探针偶联物:3-羧酸-7-羟基-香豆素-硫-硫-异硫氰酸荧光素(CHC-SS-FITC)。以脂质体为模型载体,制备了荷载荧光探针偶联物的脂质体,并评价了探针偶联物的荧光共振能量转移效应和还原响应性。以巨噬细胞为模型细胞,通过激光共聚焦显微技术考察了载药纳米脂质体在巨噬细胞中稳定性。结果表明,本研究设计的新型荧光探针偶联物CHC-SS-FITC,由于同时具备FRET效应的高灵敏度和还原环境触发式响应的强抗干扰能力,克服了传统表征手段的不足,为纳米载体在细胞胞质中的稳定性表征开辟新的道路。

关键词 探针偶联物;荧光共振能量转移;还原响应性;稳定性;细胞质

中图分类号 R914;R944 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2014)05-0535-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20140505

Development of reduction response probes

ZHAO Zekai, WANG Lu, XUE Jingwei, ZHANG Can*

Center of Drug Discovery, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) principle and the reductive environment in the cytoplasm, this study attempted to characterize the stability of the carrier in cells. A new probe conjugation with FRET and reduction responsibility simultaneously, (3-COOH-7-OH-coumarin)-(sulfur-sulfur)-(fluorescein isothiocyanate) (CHC-SS-FITC), was first synthesized. With liposome being used as model carrier, (CHC-SS-FITC)-liposome was prepared and the FRET effect and reduction responsibility of CHC-SS-FITC were assessed. The stability of drug-loading liposome in macrophages was investigated by laser scan confocal microscopy. Results showed that the reduction response FRET probes (CHC-SS-FITC) could be used to characterize the stability of nano-carrier in cytoplasm, due to the high sensitivity and strong counter-interference of the carrier.

Key words probe conjugation; fluorescence resonance energy transfer; reduction responsibility; stability; cytoplasm

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81273468)

载药纳米粒在细胞胞浆内的稳定性是影响药效发挥的关键,常规表征纳米载体稳定性的方法由于灵敏度低,抗干扰能力差,不适用于细胞水平表征。近年来,随着荧光探针发展的日趋成熟,基于荧光共振能量转移原理(fluorescent resonance energy transfer, FRET)的应用受到了广泛关注^[1-4]。荧光能量共振转移是指在两个不同的荧光团中,一个荧光团(供体, donor)的发射光谱和另一个荧光团(受

体, acceptor)的吸收光谱有一定的重叠,当二者的距离在10~100 Å时^[5],可以用供体的激发光激发出受体的荧光。由于荧光共振能量转移具有超强的分辨率和极高的灵敏度,因此可以用于表征纳米载体的稳定性^[6]。

基于荧光共振能量转移原理,本文首次合成了同时具有FRET效应和还原响应性(reduction responsibility)的荧光探针偶联物:3-羧酸-7-羟基-

香豆素-硫-硫-异硫氰酸荧光素[(3-COOH-7-OH-coumarin)-(sulfur-sulfur)-(fluorescein isothiocyanate),CHC-SS-FITC]^[7]。该探针偶联物由一对荧光探针 3-羧酸-7-羟基-香豆素(3-COOH-7-OH-coumarin,CHC)(供体)和异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate,FITC)(受体)通过二硫键共价结合。当探针偶联物处于还原环境时,二硫键断裂,CHC与FITC之间的距离增大,造成FRET信号减弱或消失。

由于细胞胞质为具有高浓度谷胱甘肽的强还原环境^[8],本研究将探针偶联物载入纳米载体中,当载体保持稳定时,探针偶联物不会从载体中泄露,体系的FRET信号最强(FRET ON);当载体解体时,探针偶联物释放出来,在胞质中谷胱甘肽的作用下,二硫键发生还原而断裂,两个荧光探针从偶联物中断裂下来,距离增大,FRET信号改变,因此可以通过FRET信号的变化来观测纳米载体在细胞胞质中的稳定性。

还原响应的FRET探针CHC-SS-FITC灵敏度高、抗干扰能力强,以此表征纳米载体在细胞胞浆中稳定性的方法尚未见研究报道,对研究载药纳米载体给药后在细胞中药效的发挥有一定指导意义。

1 材料

1.1 试剂

CHC(纯度98%,百灵威科技有限公司);FITC

(纯度98%,美国Sigma公司);L-还原型谷胱甘肽(glutathione,GSH,纯度98%)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,纯度98%)(上海阿拉丁试剂有限公司);胱胺二盐酸盐(cystamine dihydrochloride,AED,纯度99%,上海萨恩化学技术有限公司);二碳酸二叔丁酯((Boc)₂O,纯度98%,国药集团化学试剂有限公司);1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDCI,纯度98.5%,吉尔生化上海有限公司);1,5-十八醇-L-谷氨酸-组氨酸(1,5-octadecanol-L-glutamine-histidine,SA₂GH,实验室自制^[9]);大豆磷脂(soybean phospholipids,SPC,上海太伟药业有限公司);胆固醇(cholesterol,Chol,上海惠兴生化试剂有限公司),其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

超声波细胞粉碎机(JY92-IIN,宁波新芝生物科技股份有限公司);ZetaPlus电位粒径分析仪(美国Brookhaven公司);荧光检测器(RF-10AXL,日本Shimadzu公司);激光共聚焦显微镜(日本Olympus公司)。

1.3 细胞

鼠腹腔巨噬细胞根据文献^[10]提取分离。

2 方法与结果

2.1 探针偶联物的合成

CHC-SS-FITC的合成路线如图1所示。

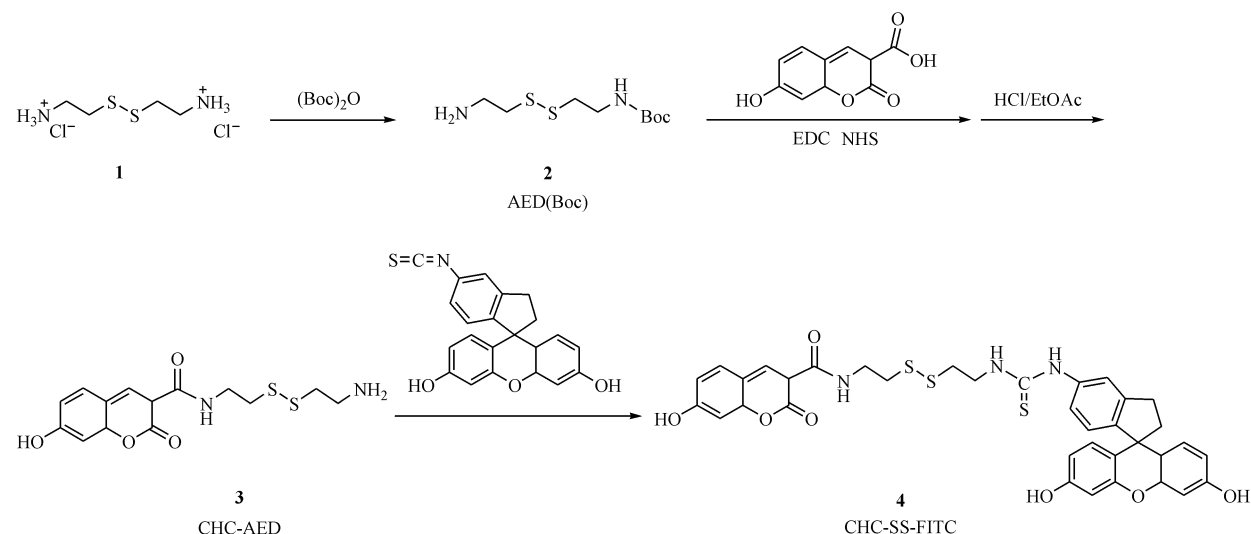


Figure 1 Synthesis of (3-COOH-7-OH-coumarin)-(sulfur-sulfur)-(fluorescein isothiocyanate) (CHC-SS-FITC)

1-(叔丁氧羰基)脲胺(AED(Boc),**2**)的合成
脲胺二盐酸盐(**1**, 3.0 g, 13.3 mmol)溶于甲醇 150 mL 中,加入三乙胺(5.79 mL, 39.9 mmol)后,室温下缓慢滴加二碳酸二叔丁酯(2.9 g, 13.3 mmol)的 MeOH 溶液,加完后室温搅拌 5 h。反应结束后,将反应液旋干,加入 1 mol/L NaH_2PO_4 水溶液 60 mL,用乙醚萃取(60 mL \times 2),水层用 1 mol/L NaOH 水溶液调节 pH 至 9 后,乙酸乙酯萃取(40 mL \times 2),合并乙醚、乙酸乙酯层,用水洗涤(60 mL \times 2),无水硫酸钠干燥,蒸除溶剂,得白色油状物 1.57 g,收率:46.8%。

3-(4,5-二硫-1-氮杂庚酰胺基)-7-羟基-2-氧代-2H-苯并呋喃(CHC-AED,**3**) 将 3-羧酸-7-羟基-香豆素(80 mg, 0.39 mmol), EDC HCl(96.7 mg, 0.50 mmol)及 NHS(71.5 mg, 0.62 mmol)溶于氯仿 10 mL,室温搅拌 3 h;将化合物 **2**(97.9 mg, 0.39 mmol)溶于氯仿 10 mL,加入三乙胺(117.8 mg, 1.16 mmol),室温搅拌 1 h 后加入上述混合溶液中,室温继续搅拌 12 h。水洗 3 次,饱和食盐水洗 2 次,有机层无水 Na_2SO_4 干燥后旋蒸,将所得白色油状物溶于饱和 HCl 的乙酸乙酯溶液 20 mL, 5 $^\circ\text{C}$ 搅拌 12 h。旋干溶剂得黄色固体 182 mg。

3-((3,4-二硫-1-(3-(3',6'-二羟基-3-氧代-3H-螺[异苯并呋喃-1,9'-氧杂蒽]-5-基)硫脲基))己酰胺基)-7-羟基-2-氧代-2H-苯并呋喃(CHC-SS-FITC,**4**) 将化合物 **3**(42 mg, 0.11 mmol),对二甲氨基吡啶(10.9 mg, 0.09 mmol)及 FITC(43.4 mg, 0.11 mmol)溶于无水 DMF 8 mL 中, N_2 保护下室温搅拌 12 h。加入水 40 mL,用 1 mol/L 盐酸水溶液调节 pH 至 2~3,再用乙酸乙酯萃取(20 mL \times 3),合并有机层,用水洗涤(30 mL \times 2),无水硫酸钠干燥,蒸除溶剂,再经制备型薄层色谱纯化得黄色固体 11 mg。 ^1H NMR(300 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) δ : 8.76(1H, s, ArH), 8.12(1H, s, NH), 7.57(1H, m, ArH), 7.18(1H, m, ArH), 6.89(1H, m, ArH), 6.73(4H, m, ArH), 6.70(3H, m, ArH), 6.55(2H, m, ArH), 4.03(2H, t, $J = 5.9$ Hz, NHCH_2), 3.82(2H, t, $J = 5.9$ Hz, NHCH_2), 3.40(4H, m, CH_2SSCH_2)。ESI $^+$ -MS(m/z): Calcd. for $\text{C}_{35}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_9\text{S}_3$ ($M + \text{H}$) $^+$, 730.0; Found, 730.0。

2.2 荷载探针偶联物的脂质体的制备

采用薄膜分散法制备荷载探针偶联物的纳米

脂质体[(CHC-SS-FITC)- $\text{SA}_2\text{GH/L}$]。精密称取大豆磷脂 120 mg、阳离子脂质材料 SA_2GH 30 mg、胆固醇 15 mg,加入氯仿 4 mL 和甲醇 2 mL, 37 $^\circ\text{C}$ 水浴超声 1 min 使溶解,再加入 CHC-SS-FITC 35 μg ,充分混合均匀,加入 500 mL 茄形瓶中,于 40 $^\circ\text{C}$ 水浴真空条件下抽去有机溶剂,再真空干燥过夜,所得薄膜用纯净水 5.6 mL 于 37 $^\circ\text{C}$ 水浴中充分水合,探头超声后,定容至 5 mL,依次过 0.45 μm 滤膜和 0.22 μm 滤膜,即得(CHC-SS-FITC)- $\text{SA}_2\text{GH/L}$ 。

所得脂质体粒径分布均一(150 nm),表面带正电(+30 mV),CHC-SS-FITC 的包封率大于 90%。

2.3 探针偶联物的 FRET 效应和还原响应性

2.3.1 CHC-SS-FITC 的 FRET 效应 精密称取 CHC-SS-FITC 7 mg 于 100 mL 棕色量瓶中,即得 70 $\mu\text{g/mL}$ CHC-SS-FITC 储备液。移取储备液 300 μL 与纯净水 2.7 mL 充分混匀后,用荧光分光光度计,在激发波长 405 nm,发射波长 447 nm 下,分别扫描并记录 CHC-SS-FITC 的荧光激发光谱和发射光谱,结果如图 2 所示。

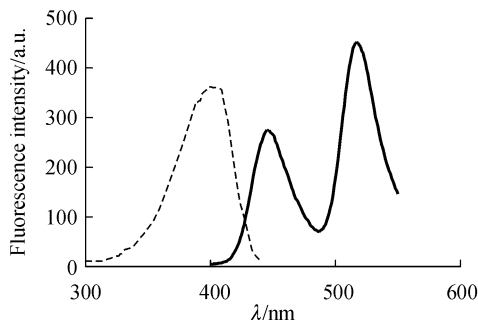


Figure 2 Fluorescence spectra of CHC-SS-FITC

--- Excitation; — Emission

由图 2 可见,当用激发波长为 405 nm 的激发光激发 CHC-SS-FITC 时,能够同时产生两种荧光:供体 CHC 的蓝色荧光($E_m = 447$ nm)和受体 FITC ($E_m = 519$ nm)的绿色荧光,这是由于供体 CHC 和受体 FITC 之间的距离很近(小于 100 Å),并且供体 CHC 的发射光谱与受体 FITC 的激发光谱有一定的重叠,使得 CHC 荧光的能量一部分用来激发 FITC,出现 FITC 的绿色荧光。结果表明,CHC-SS-FITC 具有 FRET 效应。

2.3.2 CHC-SS-FITC 的还原响应性

谷胱甘肽浓度对 CHC-SS-FITC 荧光的影响 取 CHC-SS-FITC 储备液 300 μL ,分别配制含不同

浓度(0,0.003,0.03,0.3,3 mg/mL)谷胱甘肽的纯净水3 mL,37 ℃孵育120 min后用荧光分光光度计扫描并记录荧光发射光谱,结果如图3所示。

由图3可见,在120 min内,随着谷胱甘肽浓度的增加(0~3 mg/mL),CHC的蓝色荧光($E_m = 447$ nm)逐渐增强,而FITC的绿色荧光($E_m = 519$ nm)逐渐减弱,这是因为二硫键的断裂,使CHC与FITC之间的距离增大,超过能够发生FRET的最远距离(大于100 Å),造成FRET信号减弱(FRET OFF),并且,当谷胱甘肽浓度增大至300 $\mu\text{g/mL}$ 后,FRET信号已基本保持不变,结果表明,CHC-SS-FITC的FRET信号具有谷胱甘肽浓度依赖性;在120 min内,谷胱甘肽(300 $\mu\text{g/mL}$)足够使CHC-SS-FITC还原。

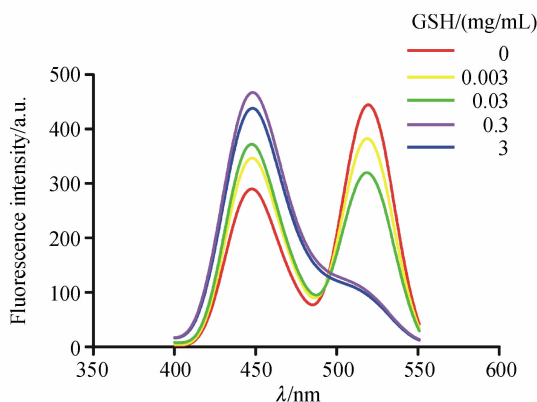


Figure 3 Fluorescence spectra of CHC-SS-FITC in the presence of different concentration of glutathione (GSH)

时间对CHC-SS-FITC荧光的影响 取CHC-SS-FITC储备液300 μL ,置于含谷胱甘肽终浓度为300 $\mu\text{g/mL}$ 的纯净水3 mL中,在不同时间点(15, 30, 45, 60, 120 min)用荧光分光光度计扫描并记录荧光发射光谱,结果如图4所示。

由图4可见,在相同谷胱甘肽质量浓度(300 $\mu\text{g/mL}$)下,随着时间的延长,FRET现象逐渐消失,并且在60 min时荧光光谱达到稳定。结果表明,CHC-SS-FITC的FRET信号具有时间依赖性;当谷胱甘肽质量浓度为300 $\mu\text{g/mL}$ 时,60 min能够使CHC-SS-FITC完全还原。

2.4 荷载探针偶联物的脂质体在巨噬细胞中的稳定性

以巨噬细胞为模型细胞^[8],通过激光共聚焦显微技术,考察(CHC-SS-FITC)-SA₂GH/L在细胞

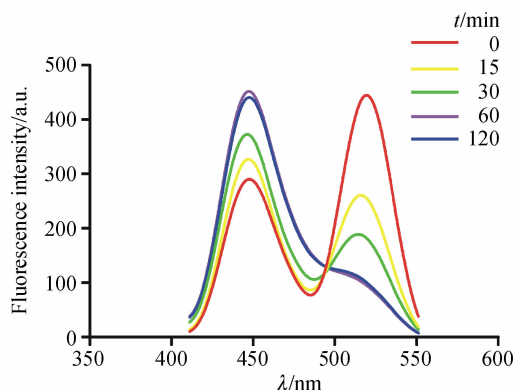


Figure 4 Fluorescence spectra of CHC-SS-FITC in the presence of different concentration of GSH

内的FRET信号随时间的变化。

将新鲜提取的巨噬细胞用含血清的DMEM培养基稀释后,接种于激光共聚焦小皿中(每皿 1×10^5 个细胞,1.5 mL),在孵箱内37 ℃培养24 h,弃去培养基,用预冷的PBS清洗(1 mL \times 2),加入用不含血清的培养基稀释成CHC-SS-FITC浓度为140 ng/mL的探针偶联物脂质体(1 mL),在孵箱内37 ℃孵育90 min,弃掉含药培养基,用预冷的PBS清洗(1 mL \times 2),加入空白DMEM,于不同时间点(0, 24, 48 h)用激光共聚焦显微镜下观察并拍照,结果如图5所示。

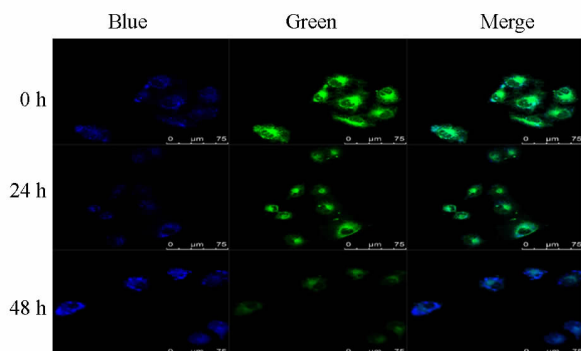


Figure 5 Fluorescence resonance energy transfer (FRET) signal change in macrophage (MΦ) for 48 h observed by laser scanning confocal microscope

当巨噬细胞与探针偶联物脂质体共孵育90 min后,洗去含药培养基,加入空白培养基并开始计时。由图5可见,0 h时,细胞呈现出强烈绿色荧光,而蓝色荧光微弱,表明脂质体被巨噬细胞摄取后依然保持稳定,其中的探针偶联物不释放(FRET ON);24 h时,与0 h相比绿色荧光略有减弱,说明此时脂质体稳定性有所降低,但大部分仍

然保持稳定;48 h 时,绿色荧光大幅度减弱,蓝色荧光相应增强,这是因为此时脂质体大部分已经解体,从脂质体中释放出来的 CHC-SS-FITC 响应胞浆内的谷胱甘肽而降解成两个荧光探针 CHC 和 FITC,呈现出从 FRET ON 到 FRET OFF 的转变。

3 讨 论

FRET 原理已被广泛应用于表征载体的稳定性,而这种表征稳定性的方法主要依靠以下两种方式:①将两个荧光探针直接共包载于载体中;②将一个荧光探针标记在载体上,另一个荧光探针则直接包载在载体中。虽然这两种方式都能够在一定程度上表征载体的稳定性,但也存在一定的问题,其中最主要的问题是极易受到载体粒径变化的干扰:在生理条件下,粒径会逐渐变大,此时即使载体还是稳定的,但两个荧光探针之间的距离也会随着载体粒径的增大而增大,从而使 FRET 现象减弱,造成一种载体已经部分解体的假象。

为了解决上述问题,本文首次合成了一种同时具有 FRET 效应和还原响应性的新型探针偶联物——CHC-SS-FITC。当荷载荧光探针偶联物的纳米载体稳定存在于细胞胞质时,其中的探针偶联物 CHC-SS-FITC 是不会释放出来,因此 FRET 效率也不会受到载体粒径因素的影响。当载体部分解体时,CHC-SS-FITC 释放出来,探针偶联物中的二硫键被胞质中的谷胱甘肽还原成一对荧光探针(FITC 和 CHC),导致探针分子间距离增大,最终造成 FRET 信号的减弱或消失。因此,还原响应的 FRET 探针 CHC-SS-FITC 灵敏度高,抗干扰能力强,可以用来表征纳米载体在细胞胞质中的稳定性。

参 考 文 献

- [1] Dennis AM, Rhee WJ, Sotto D, *et al.* Quantum dot-fluorescent protein FRET probes for sensing intracellular pH [J]. *ACS Nano*, 2012, **6**(4): 2 917 – 2 924.
- [2] Alabi CA, Love KT, Sahay G, *et al.* FRET-labeled siRNA probes for tracking assembly and disassembly of siRNA nanocomplexes [J]. *ACS Nano*, 2012, **6**(7): 6 133 – 6 141.
- [3] Bunschoten A, Buckle T, Kuil J, *et al.* Targeted non-covalent self-assembled nanoparticles based on human serum albumin [J]. *Biomaterials*, 2012, **33**(3): 867 – 875.
- [4] Chen KJ, Chiu YL, Chen YM, *et al.* Intracellularly monitoring/imaging the release of doxorubicin from pH-responsive nanoparticles using Forster resonance energy transfer [J]. *Biomaterials*, 2011, **32**(10): 2 586 – 2 592.
- [5] Liu HY, Wu SM, Cheng F, *et al.* Fluorescence resonance energy transfer based on quantum dots [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2010, **38**(7): 1 036 – 1 039.
- [6] Wang YQ, Ye C, Wang XM, *et al.* Application trends of fluorescent quantum dots in the research of nanomedicines [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2009, **40**(1): 8 – 15.
- [7] Lai J, Shah BP, Garfunkel E, *et al.* Versatile fluorescence resonance energy transfer-based mesoporous silica nanoparticles for real-time monitoring of drug release [J]. *ACS Nano*, 2013, **7**(3): 2 741 – 2 750.
- [8] Lushchak VI. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions [J]. *J Amino Acids*, 2012, **2 012**: 736 837.
- [9] Mo R, Sun Q, Xue J, *et al.* Multistage pH-responsive liposomes for mitochondrial-targeted anticancer drug delivery [J]. *Adv Mater*, 2012, **24**(27): 3 659 – 3 665.
- [10] Ye SS, Zeng YY, Yin LL. Effects of salidroside on proliferation, apoptosis, phagocytosis, ROS and NO production of murine peritoneal macrophages *in vitro* [J]. *Chin J Cell Mol Immunol* (细胞与分子免疫学杂志), 2011, **27**(3): 237 – 241.