

脂筏特异性 AIE 荧光探针的设计、合成及其应用

陈悦, 郝玫茜, 鞠曹云*, 张灿**

(中国药科大学高端药物制剂与材料研究中心, 南京 210009)

摘要 脂筏(lipid raft)是由饱和磷脂、鞘磷脂以及胆固醇组成的位于细胞膜的液态有序微区,与细胞的许多生理/病理过程密切相关。基于脂筏区与非脂筏区脂质组成与分布的差异,本研究设计并合成了一种具有聚集诱导发光(aggregation-induced emission, AIE)特性的脂筏探针胆固醇-三聚乙二醇-四苯乙烯(TCHS-TPE)用于细胞膜上脂筏区的便捷特异性成像。本研究首先成功合成了 TCHS-TPE,同时测定了 TCHS-TPE 的光物理性质以评价其 AIE 特性,最后采用激光共聚焦显微镜研究了 TCHS-TPE 对 B16F10 黑色素瘤细胞膜上脂筏区的特异性成像。与现有脂筏探针霍乱毒素 B(CTxB)相比, TCHS-TPE 脂筏探针具有操作简单、特异性高等优势。该荧光探针的成功合成将为研究脂筏区相关生理、病理过程提供有利工具,并为其他脂筏区成像探针的设计奠定了理论基础。

关键词 脂筏; 荧光探针; 聚集诱导发光; 胆固醇

中图分类号 R914.5 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2020)05-0514-08

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20200502

引用本文 陈悦, 郝玫茜, 鞠曹云, 等. 脂筏特异性 AIE 荧光探针的设计、合成及其应用[J]. 中国药科大学学报, 2020, 51(5): 514-521.

Cite this article as: CHEN Yue, HAO Meixi, JU Caoyun, et al. Design, synthesis and application of AIE fluorescent probe for lipid raft [J]. J China Pharm Univ, 2020, 51(5): 514-521.

Design, synthesis and application of AIE fluorescent probe for lipid raft

CHEN Yue, HAO Meixi, JU Caoyun*, ZHANG Can**

Center of Advanced Pharmaceuticals and Biomaterials, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Lipid rafts composed of saturated phospholipids, sphingomyelin, and cholesterol are usually defined as liquid ordered microdomains located in the cell membrane. Lipid rafts are involved in many physiological and pathological processes of cells. Based on the difference in composition and distribution between lipid raft and non-raft domains, a lipid raft probe with aggregation-induced emission (AIE), cholesterol-triethylene glycol-tetraphenylethylene (TCHS-TPE), was designed and synthesized for convenient and specific imaging of lipid raft domains on cell membranes in this study. In this paper, TCHS-TPE was successfully synthesized, and the photophysical properties of TCHS-TPE were measured to evaluate its AIE characteristics. And finally the specific imaging of TCHS-TPE on the lipid raft region of B16F10 melanoma cell membrane was studied using confocal laser scanning microscopy. Compared with the existing lipid raft probe cholera toxin B (CTxB), the TCHS-TPE lipid raft probe has the advantages of simple operation and high specificity. The successful synthesis of the fluorescent probe will provide a useful tool for studying the physiological and pathological processes related to lipid raft domains, and offer a theoretical basis for the design of imaging probes for other lipid raft domains.

Key words lipid raft; fluorescent probe; aggregation-induced emission; cholesterol

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81930099, No. 81773664, No. 81473153)

收稿日期 2020-05-25 通信作者 *Tel: 025-83271171 E-mail: jucaoyun@cpu.edu.cn

**Tel: 025-83271171 E-mail: zhangcan@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (No. 81930099, No. 81773664, No. 81473153)

脂筏(lipid raft)是由细胞膜上的饱和磷脂、鞘磷脂以及胆固醇构成的高度动态的有序微区^[1-3]。研究表明,脂筏与免疫信号传导、胞吞与胞吐、病毒入侵、肿瘤的发生与发展等多种生理、病理过程密切相关;脂筏区可以调节膜蛋白与信号蛋白之间的相互作用及蛋白构象,继而调控下游信号的传导^[4-5]。因此,特异性标记脂筏对于研究脂筏区相关生理、病理过程具有重要意义。

目前,常用的脂筏区探针根据其检测机制分为两大类。一类是基于脂筏区特异性的脂质组成设计的脂类探针与分子标志物检测探针^[6]。脂筏区富含的糖基磷脂酰肌醇-锚定蛋白(glycosylphosphatidylinositol- anchored proteins, GPI-AP)的 GPI 部分由亲水的聚糖部分与疏水的饱和磷脂尾部组成,亲水的聚糖部分可使跨膜蛋白暴露于细胞膜外,而疏水的饱和磷脂部分可使跨膜蛋白通过疏水作用力锚定在细胞膜的脂筏区域^[7-8]。但是 GPI 结构复杂且合成难度高,而胆固醇-三聚乙二醇与 GPI 的结构相似,均由脂筏区的固有脂质以及长度为 20 Å 的亲水链组成,因此,有研究人员利用胆固醇-三聚乙二醇结构,并在其上引入荧光基团作为模拟 GPI 的探针,用于脂筏区成像^[9]。另一类是基于脂筏区脂质分布特点设计的环境敏感性探针^[10]。与非脂筏区相比,脂筏区脂质排布紧密,含水量低,黏度高且极性低。脂筏区紧密的脂质排布使疏水性的大位阻化学结构难以嵌入脂筏区,从而被排出到细胞膜外的水相环境中形成聚集体;而非脂筏区脂质排布疏松,疏水性的大位阻化学结构易插入,并以单体形式存在于非脂筏区。因此,有研究人员针对脂筏区与非脂筏区的脂质排布差异,构建了具有适当位阻的荧光探针对于脂筏区进行成像^[11]。虽然这些探针已经得到了一定程度的应用,但是仍存在特异性不足和灵敏度有

限的局限^[12-13],需要继续研究高选择性和灵敏度的脂筏探针。

2001 年,唐本忠院士团队发现具有噻咯母核结构的荧光染料在聚集状态下荧光会显著增强,并将具有这类现象的染料命名为 AIE 荧光染料(aggregation-induced emission luminogens, AIEgens)。当 AIEgens 以单体形式存在时,其激发态具有较高的扭曲程度,使分子内共轭程度下降,发射出较短波长的荧光;而当以聚集态形式存在时,分子内自由旋转受限,其激发态具有较高的共轭程度,能发射较长波长的荧光^[14-15]。这一聚集诱导发光特性有利于脂筏区脂质聚集状态的成像。

基于此,本研究针对传统荧光染料灵敏度有限和脂筏成像探针特异性不强的局限,设计了基于聚集诱导发光母核的脂筏成像探针胆固醇-三聚乙二醇-四苯乙烯(TCHS-TPE)。该探针以经典的 AIEgens 四苯乙烯(TPE,图 1 蓝色部分)作为荧光基团;在 TPE 的侧链羧基上对称引入三聚乙二醇(PEG₃,图 1 黑色部分)作为亲水连接臂,保证 TPE 能够暴露在细胞膜外;并在两侧 PEG₃ 的氨基上同时引入胆固醇(图 1 红色部分)作为细胞膜锚定分子。TCHS-TPE 首先利用胆固醇的疏水作用锚定在脂筏区或非脂筏区;当其位于脂筏区时,由于脂筏区紧密的脂质排布,大体积的 TPE 被挤出细胞膜暴露于水相环境中以聚集态存在,此时分子自由旋转受阻,可发射出较长波长的荧光(绿光);而当位于非脂筏区时,由于脂质排布疏松,疏水性的 TPE 可嵌入细胞膜,大部分以单体形式存在,此时分子可自由旋转,发射出较短波长的光(深蓝光)。因此,可以通过检测 TCHS-TPE 的发射荧光准确区分脂筏区与非脂筏区,实现细胞膜脂筏的高选择性成像。

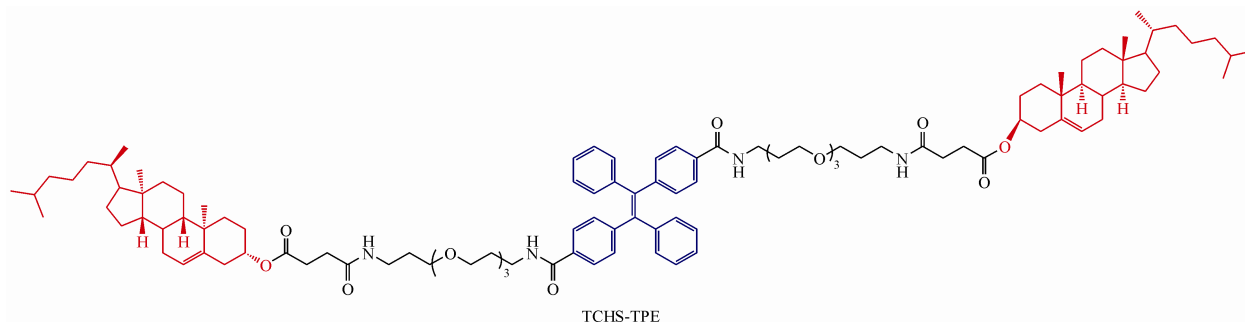
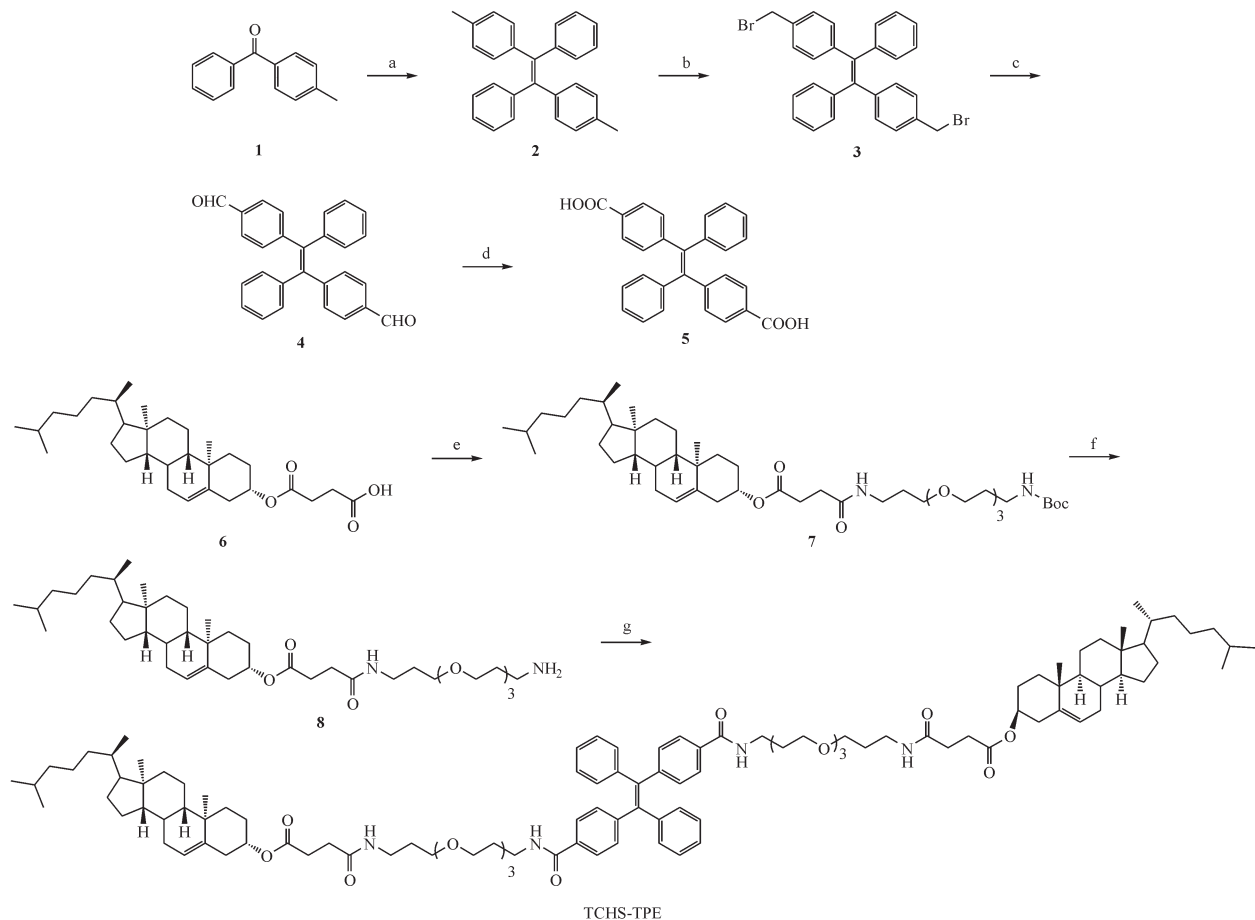


Figure 1 Structure of cholesterol-triethylene glycol-tetraphenylethylene (TCHS-TPE)

1 合成路线

本研究以4-甲基二苯甲酮为原料(**1**)通过McMurray 偶联得到化合物**2**,继而在过氧化苯甲酰(BPO)的引发下与*N*-溴代丁二酰亚胺(NBS)进行自由基反应生成化合物**3**,随后通过苄基溴水解得

到化合物**4**,化合物**4**经氧化反应得到化合物**5**。此外,胆固醇琥珀酸单酯(**6**)与(3-(2-(2-(3-氨基丙氧基)乙氧基)乙氧基)丙基)氨基甲酸叔丁酯(Boc-TOTA)通过酰胺缩合并脱去Boc 保护基得到化合物**8**。最终化合物**5**与化合物**8**进行酰胺缩合得到目标探针TCHS-TPE。具体合成路线见路线1。



Scheme 1 Synthesis of cholesterol-triethylene glycol-tetraphenylethylene (TCHS-TPE)

Reagents and reaction conditions: (a) TiCl_4 , Zn, tetrahydrofuran (THF), 75 °C, overnight; (b) *N*-bromosuccinimide (NBS), benzoyl peroxide (BPO), CCl_4 , 80 °C, overnight; (c) NaHCO_3 , dimethyl sulfoxide (DMSO), 95 °C, 4 h; (d) tert-butyl hydroperoxide (tBuOOH), CuCl, MeCN, 25 °C, overnight; (e) tert-butyl (3-(2-(2-(3-aminopropoxy)ethoxy)ethoxy)propyl)carbamate (Boc-TOTA), 2-(1*H*-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU), *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA), CHCl_3 , 25 °C, overnight; (f) HCl, 1,4-dioxane, 0 °C, 5 h; (g) TBTU, DIPEA, CHCl_3 , 25 °C, overnight

2 实验部分

2.1 试剂

胆固醇琥珀酸单酯(CHEMS, 纯度 98%)、(3-(2-(2-(3-氨基丙氧基)乙氧基)乙氧基)丙基)氨基甲酸叔丁酯(Boc-TOTA, 纯度 98%, 上海皓鸿生物医药科技有限公司)、4-甲基二苯甲酮(纯度 98%)、含 1.0 mol/L TiCl_4 的 CH_2Cl_2 溶液(上海萨恩化学技术有限公司)、四氢呋喃(THF, 纯度 99.5%)、2-

(1*H*-苯并三偶氮 L-1-基)-1,1,3,3-四甲基脲四氟硼酸酯(TBTU, 纯度 98%)(上海萨恩化学技术有限公司);*N*-溴代丁二酰亚胺(NBS, 纯度 99%, 上海阿拉丁试剂有限公司);过氧化苯甲酰(BPO, 纯度 97%, 美国 Alfa aesar 公司);其他试剂均为分析纯;霍乱毒素 B-Alexa 594(CTXB-Alexa 594, 赛默飞世尔科技有限公司);Cell Counting Kit-8(CCK-8, 碧云天生物技术有限公司)。

2.2 仪器

PSL-1810 磁力搅拌低温恒温水槽(上海爱朗仪器有限公司);ZetaPlus 粒径电位分析仪(布鲁克海文公司);EU-2600A 紫外分光光度计(上海昂拉仪器有限公司);Cary Eclipse 荧光分光光度计(安捷伦科技有限公司);LSM700 激光共聚焦显微镜(卡尔蔡司光学有限公司)。

2.3 细胞

黑色素瘤 B16F10 细胞(中国科学院上海细胞生物学研究所)。

2.4 探针的合成

1,2-二(4-甲基苯)-1,2-二苯乙烯(TMTPE, **2**)的合成

向 100 mL 两颈瓶中加入锌粉(13.34 g, 122.30 mmol)、无水四氢呋喃(20 mL),于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 缓慢加入 TiCl_4 (245 mL, 244.60 mmol),移至室温搅拌 0.5 h。将该混合溶液加热回流 2 h 后,加入 4-甲基二苯甲酮(12.00 g, 61.14 mmol),回流过夜。反应完成后,冷却至室温,加入 10% K_2CO_3 水溶液,搅拌 0.5 h 后,抽滤得滤液。该滤液用二氯甲烷溶液(200 mL \times 2)萃取,之后用饱和氯化钠溶液(200 mL \times 2)洗涤,收集有机层,无水硫酸钠干燥,减压浓缩,柱色谱(CHCl_2 -MeOH, 20:1)纯化,得黄色固体 10.53 g,收率:96.0%。 ^1H NMR(300 MHz, CDCl_3), δ : 7.24~7.01 (5H, m, Ar-H), 6.92 (12H, dd, $J=4.4, 2.7\text{ Hz}$, Ar-H), 2.27 (9H, s, Ar- CH_3)。

1,2-二苯基-1,2-二(4-溴甲基苯)乙烯(TBTPE, **3**)的合成

将 TMTPE(6.00 g, 16.7 mmol), *N*-溴代丁二酰亚胺(6.50 g, 36.7 mmol), 过氧化苯甲酰(404 mg, 1.67 mmol)溶于 CCl_4 溶液 25 mL 中回流 2 h。反应完成后,抽滤,二氯甲烷(200 mL \times 2)萃取滤液,饱和氯化钠溶液(200 mL \times 2)洗涤,收集有机层,无水硫酸钠干燥,减压浓缩,柱色谱纯化,得黄色固体 5.78 g,收率:78.7%。 ^1H NMR(500 MHz, CDCl_3) δ : 7.12 (10H, dt, $J=6.8, 5.3\text{ Hz}$, Ar-H), 7.04~6.97 (8H, m, Ar-H), 4.42 (4H, d, $J=7.8\text{ Hz}$, Ar- CH_2)。

1,2-二苯基苯-1,2-二(4-醛基苯)乙烯(TPE-TCHO, **4**)的合成

将 TBTPE(5.78 g, 13.15 mmol)以及碳酸氢钠(1.65 g, 19.6 mmol)溶解于二甲基亚砜 25 mL 中, $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 搅拌 4 h,待反应结束后减压蒸馏。二氯甲烷

(200 mL \times 2)萃取,饱和氯化钠溶液(200 mL \times 2)洗涤,收集有机层,无水硫酸钠干燥,减压浓缩,得黄色固体 3.46 g。

1,2-二苯基苯-1,2-二(4-羧基苯)乙烯(TPE-TCOOH, **5**)的合成

将 TPE-TCHO(1.62 g, 4.18 mmol)以及叔丁基过氧化氢(4.2 mL, 20.91 mmol)溶解于乙腈 40 mL 中,室温搅拌过夜。待反应结束后采用饱和亚硫酸氢钠溶液淬灭反应,乙酸乙酯萃取,有机层经无水硫酸钠干燥,过滤并浓缩。将获得的粗产物通过柱色谱纯化,得黄色固体 0.96 g,收率:54.7%。 ^1H NMR(300 MHz, CDCl_3) δ : 8.09 (4H, d, $J=5.4\text{ Hz}$, Ar-H), 7.83 (3H, d, $J=8.4\text{ Hz}$, Ar-CH), 7.35 (2H, d, $J=2.5\text{ Hz}$, Ar-CH), 7.18~6.97 (9H, m, Ar-CH)。

胆固醇-1-(Boc-氨基)-4,7,10-三氧杂-13-十三癸胺(CHS-NH₂-Boc, **7**)的合成

将胆固醇半琥珀酸酯(化合物 **6**, 1.00 g, 2.00 mmol)、TBTU(642 mg, 2.00 mmol)以及 *N,N*-二异丙基乙胺(430 μL , 2.6 mmol)溶解于 CHCl_3 30 mL 中。室温活化 1 h 后,加入 1-(Boc-氨基)-13-氨基-4,7,10-三氧杂十三烷(641 mg, 2.00 mmol)室温搅拌 8 h。反应完成后,减压浓缩并将粗产物通过柱色谱纯化(CHCl_2 -MeOH, 20:1)得白色固体 1.42 g,收率:90.0%。 ^1H NMR(300 MHz, CDCl_3) δ : 5.35 (1H, d, $J=4.2\text{ Hz}$, Cholesterol-CH), 4.60 (1H, d, $J=8.3\text{ Hz}$, Cholesterol-CH), 3.75~3.48 (12H, m, $2\times\text{ArCON-CH}_2$, $4\times\text{O-CH}_2$), 3.35 (2H, dd, $J=11.7, 5.8\text{ Hz}$, O- CH_2), 3.21 (2H, d, $J=6.0\text{ Hz}$, OCN- CH_2), 2.62 (2H, s, OCN- CH_2), 2.44 (2H, d, $J=6.7\text{ Hz}$, OCO- CH_2), 2.30 (2H, d, $J=7.9\text{ Hz}$, Cholesterol- CH_2), 2.08~1.69 (6H, m, $3\times\text{Cholesterol-CH}_2$), 1.68~1.22 (13H, m, $6\times\text{Cholesterol-CH}_2$, Cholesterol-CH), 1.21~0.76 (21H, m, $1\times\text{Cholesterol-CH}$, $4\times\text{Cholesterol-CH}_2$, $4\times\text{Cholesterol-CH}_3$), 0.67 (3H, s, Cholesterol- CH_3)。

胆固醇-1-氨基-15-氧代-4,7,10-三氧杂-14-氮杂十八烷-18-酸酯(CHS-NH₂, **8**)的合成

在 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下将氯化氢-1,4-二氧六环(4.50 mL, 9.00 mmol)溶液逐滴加入到 CHS-NH₂-Boc(1.42 g, 1.80 mmol)中, $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 5 h。减压蒸馏,将溶液的 pH 调至中性,二氯甲烷 200 mL 萃取,有机层经无

水硫酸钠干燥,过滤,浓缩,得到棕色固体893 mg。

胆固醇-1-氨基-4,7,10-三氧杂-13-十三癸胺-四苯基乙烯-1-氨基-4,7,10-三氧杂-13-十三癸胺-胆固醇(TCHS-TPE,9)的合成

将CHS-NH₂(505 mg, 0.75 mmol)、TBTU(312 mg, 0.97 mmol)、*N,N*-二异丙基乙胺(161 μ L, 0.97 mmol)溶解于CHCl₃ 30 mL中。室温活化1 h后,加入TPE-TCOOH(314 mg, 0.75 mmol)室温搅拌8 h。反应完成后,减压浓缩并将粗产物经柱色谱进行纯化(CHCl₂-MeOH, 20:1)后得到白色固体416 mg, 收率:50.8%。¹H NMR(500 MHz, CDCl₃) δ : 7.54(4H, d, J =8.2 Hz, 2 \times Ar-H), 7.12~7.04(9H, m, 2 \times Ar-H), 7.00~6.96(5H, m, 2 \times Ar-H), 5.35(1H, d, J =3.2 Hz, 2 \times Cholesterol-CH), 4.64~4.54(1H, m, 2 \times Cholesterol-CH), 3.61(12 H, s, 4 \times O-CH₂, 2 \times ArCON-CH₂), 3.53(8H, dd, J =10.3, 5.3 Hz, 4 \times O-CH₂), 3.47(8H, t, J =5.9 Hz, 4 \times O-CH₂), 3.31(4H, dd, J =12.1, 6.0 Hz, 2 \times OCN-CH₂), 2.60(4 H, t, J =6.9 Hz, OCN-CH₂), 2.42(4H, t, J =7.0 Hz, OCO-CH₂), 2.30(4H, d, J =7.7 Hz, 2 \times Cholesterol-CH₂), 1.98(4H, dd, J =21.3, 16.4 Hz, 2 \times Cholesterol-CH₂), 1.85(8H, dt, J =8.2, 4.9 Hz, 6 \times Cholesterol-CH₂), 1.76~1.39(26H, m, 12 \times Cholesterol-CH₂, 2 \times Cholesterol-CH), 1.19~1.04(12H, m, 6 \times Cholesterol-CH₂), 1.00(8H, d, J =12.0 Hz, 2 \times Cholesterol-CH, 2 \times Cholesterol-CH₃), 0.95~0.85(22H, m, 2 \times Cholesterol-CH₂, 6 \times Cholesterol-CH₃), 0.66(6H, d, J =13.9 Hz, 2 \times Cholesterol-CH₃)。HRMS(ESI⁺): Calcd. for C₁₁₀H₆₀N₄O₁₄(M+H)⁺ 1762.1920, Found 1763.1990。

2.5 TCHS-TPE的光物理性质

为了证明TCHS-TPE具有聚集诱导发光的特性,本研究首先配制10 μ mol/L TCHS-TPE的水、甲醇、乙醇、二甲亚砆、二氯甲烷溶液,应用紫外分光光度计扫描并记录紫外吸收光谱,结果如图2-A所示。相比于有机溶剂,TCHS-TPE在水溶液中325 nm左右的吸收峰强度大幅减弱,且发生轻微蓝移,分析原因可能是由于水分子与四苯乙烯结构中酰胺键的氧原子形成了分子间氢键, n 轨道能级下降, $n \rightarrow \pi$ 跃迁能增大,K吸收带蓝移。

随后,配制10 μ mol/L TCHS-TPE的水与二甲亚砆不同比例的溶液,采用荧光分光光度计扫描

并记录荧光发射光谱,结果如图2-B所示。随着溶剂中水的增加,荧光发射强度逐渐增强。当水的比例增至50%时,荧光强度较40%的水增加2.6倍。且测得水中TCHS-TPE无定形聚集体的有效粒径为229 nm(图2-C)。以上结果均说明TCHS-TPE具有聚集诱导发光特性。

为了证明TCHS-TPE具有脂筏特异性成像的潜力,通过荧光分光光度计对不同极性溶剂中的TCHS-TPE进行荧光发射光谱扫描,结果如图2-D所示。在水溶液中,TCHS-TPE以聚集体形式存在,最大荧光发射波长为472 nm;而在有机溶剂中,TCHS-TPE以单体形式存在,在甲醇与乙醇溶液中的最大荧光发射波长为381 nm,在二甲亚砆溶液中的最大荧光发射波长为378 nm,而在二氯甲烷溶液中的最大荧光发射波长为358 nm。由此可以看出,在不同有机溶剂中TCHS-TPE的最大荧光发射波长不同,这是由于TCHS-TPE结构中酰胺键上的羰基氧原子和氨基氮原子含有孤对电子可作为电子供体,而TPE结构可作为电子受体,这种弱的供-受体(donate-acceptor, D-A)结构导致最大荧光发射波长随着溶液极性的减小发生轻微蓝移。

综上,TCHS-TPE在有机溶剂中发射出波长为358 nm到381 nm的深蓝色荧光,而在水中发射出波长为472 nm的绿色荧光。以上结果显示,TCHS-TPE在聚集状态与在单体状态发射出的波长差异明显,差值达到100 nm左右,两种状态之间的荧光发射不会相互干扰,充分证明TCHS-TPE具有脂筏特异性成像的潜力,可进行后续的细胞脂筏成像研究。

2.6 TCHS-TPE对B16F10细胞的脂筏成像方法

2.6.1 TCHS-TPE对B16F10细胞的安全性考察

首先对TCHS-TPE在细胞水平的安全性进行考察,本研究选择了脂筏区相对丰富的B16F10黑色素瘤细胞作为模型细胞,通过CCK-8试剂盒考察不同浓度(0.5, 1, 2, 4, 8, 10, 20, 50, 100 μ mol/L)的TCHS-TPE对B16F10细胞的毒性。如图3所示,上述一系列浓度对B16F10细胞均无明显的毒性,表明TCHS-TPE具有良好的安全性。

2.6.2 TCHS-TPE最佳孵育浓度的筛选

在上述安全性良好的浓度范围内,采用流式细胞术考察不同浓度(2, 4, 10, 20, 50 μ mol/L)的TCHS-TPE对

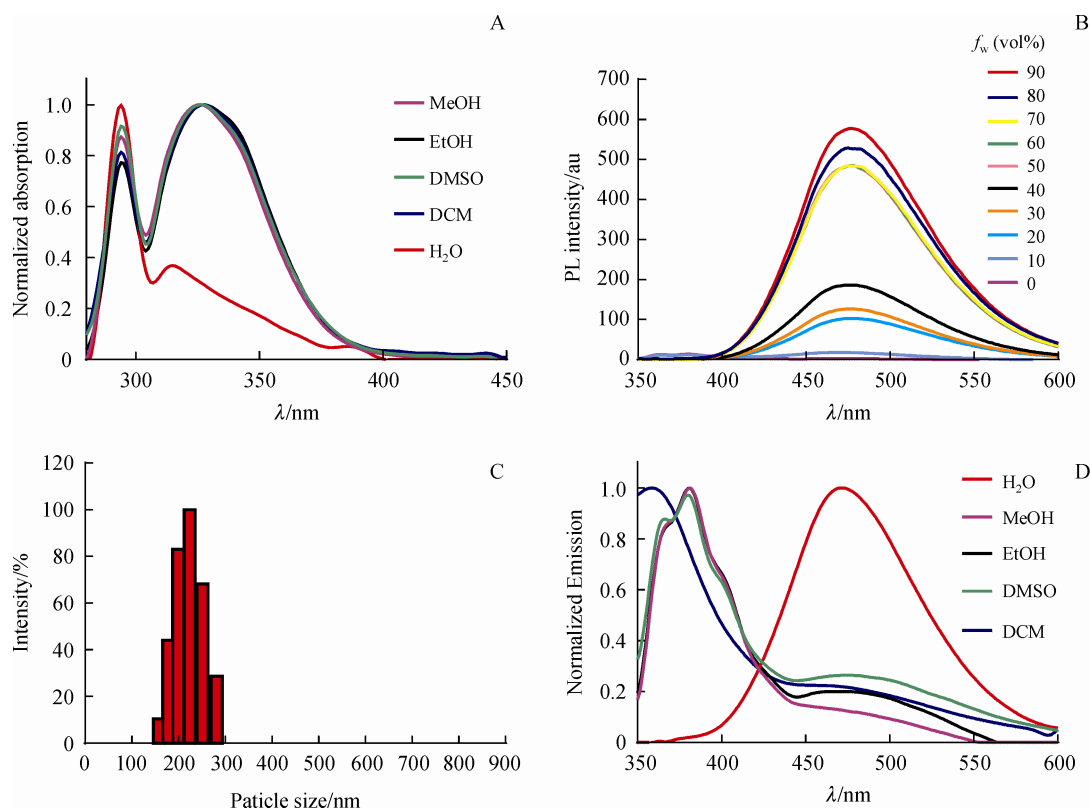


Figure 2 Photophysical properties of TCHS-TPE *in vitro*

A: Normalized UV absorption of TCHS-TPE in MeOH, EtOH, dimethyl sulfoxide (DMSO), methylene chloride (DCM) and H₂O. Concentration: 10 $\mu\text{mol/L}$; B: Photo luminescence (PL) spectra of TCHS-TPE in water/DMSO mixtures with different water fractions (f_w). Concentration: 10 $\mu\text{mol/L}$; Excitation wavelength: 305 nm; C: Particle size distributions of TCHS-TPE aggregates in the water/DMSO mixture with a 99% water fraction. Concentration: 10 $\mu\text{mol/L}$; D: Normalized PL spectra of TCHS-TPE in MeOH, EtOH, DMSO, DCM and H₂O. Concentration: 100 $\mu\text{mol/L}$.

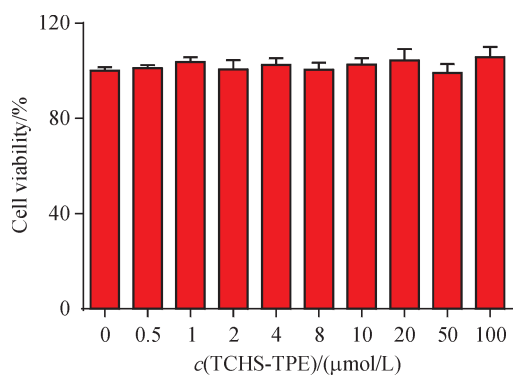


Figure 3 Cell viability of B16F10 cells after treatment with different concentration of TCHS-TPE

细胞膜脂筏区成像效果的影响,以筛选出最佳的探针浓度(图4-A,图4-B)。结果显示TCHS-TPE与B16F10细胞孵育的浓度越高,TCHS-TPE成功标记的阳性细胞率就越高,而当浓度达到20 $\mu\text{mol/L}$ 时,阳性细胞率达到平台,因此选取20 $\mu\text{mol/L}$ TCHS-TPE作为与B16F10细胞孵育的最佳浓度。

2.6.3 TCHS-TPE 与 B16F10 细胞最佳孵育时间的筛选 采用流式分析细胞术,考察不同时间(5, 10, 15, 30, 45 min)TCHS-TPE对细胞膜脂筏区成像效果的影响,以筛选出最佳孵育时间。由图4-C和图4-D所示,TCHS-TPE的阳性细胞率随着孵育时间的增加而增加,当孵育时间为15 min时,阳性细胞率达到平台,因此选取15 min作为TCHS-TPE与B16F10细胞孵育的最佳时间。

2.6.4 TCHS-TPE 对 B16F10 细胞膜的锚定 为了证明TCHS-TPE能锚定到细胞膜上且不被细胞内吞,通过激光共聚焦显微镜观察TCHS-TPE在B16F10细胞上的分布。将新鲜的B16F10细胞用含血清的DEME培养基重悬后,接种于激光共聚焦小皿中,于37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中培养24 h,待细胞贴壁后弃去培养基。采用预冷的PBS洗涤,加入20 $\mu\text{mol/L}$ 的TCHS-TPE,并于37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育15 min,弃掉培养基,用预冷的PBS洗涤,最终采用激光共聚焦观察

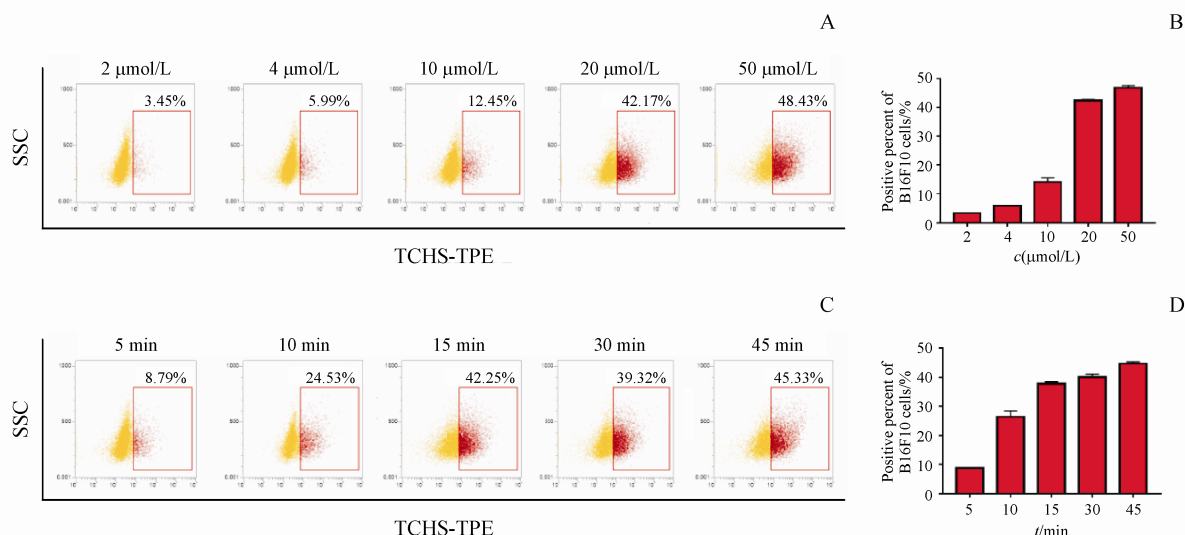


Figure 4 Screening of optimal imaging conditions for lipid raft on B16F10 cells

A: Flow cytometry analysis of positive percent of B16F10 cells after treatment with different concentration of TCHS-TPE; B: Quantitative analysis in A; C: Flow cytometry analysis of positive percent of B16F10 cells after treatment with 20 μmol/L TCHS-TPE for different times; D: Quantitative analysis in C

并拍摄。结果如图5所示, TCHS-TPE的荧光大部分都位于B16F10细胞膜上, 与明场的细胞轮廓基本重合, 且探针在细胞内几乎无荧光。表明TCHS-TPE不会被B16F10细胞内吞, 可有效锚定于细胞膜上。

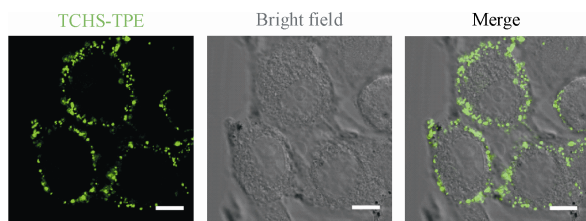


Figure 5 Fluorescent staining of TCHS-TPE in B16F10 cells (Scale bar, 10 μm)

2.7 TCHS-TPE对B16F10细胞脂筏区的特异性成像

本研究最后考察了TCHS-TPE对细胞膜脂筏区的特异性成像。CTxB-Alexa 594是商业化公认的脂筏染料, 它可通过与脂筏分子标志物神经节苷酯(GM1)结合进而实现脂筏区特异性成像。但GM1同样也有部分存在于非脂筏区上, 因此CTxB-Alexa 594的特异性不高, 并且CTxB通常以五聚体的形式存在, 易发生交联, 诱导大块脂筏区的形成, 可能会对细胞的正常生理功能产生干扰^[16]。如图6所示, TCHS-TPE的绿色荧光与CTxB-Alexa 594的红色荧光在细胞膜上大部分重叠, 不仅表明

TCHS-TPE可成功实现B16F10细胞脂筏区的特异性成像, 而且其与CTxB-Alexa 594的红色荧光不重叠的部分也表明其可能具有更高的选择性。

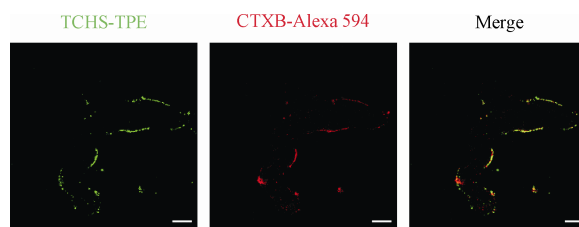


Figure 6 The fluorescence images of B16F10 cells stained with 20 μmol/L TCHS-TPE and 20 μg/mL of CTxB-Alexa 594 (Scale bar, 20 μm)

3 总结与展望

本研究通过分析脂筏区的脂质组成与分布, 设计合成了一种基于聚集诱导发光母核的脂筏特异性成像探针胆固醇-三聚乙二醇-四苯乙烯(TCHS-TPE)。该探针的体外光学性质证实了TCHS-TPE是一种聚集诱导发光荧光探针, 在聚集态与单体态时分别呈现出不同的最大荧光发射波长, 二者相差100 nm, 具有优异的区分脂筏区与非脂筏区的潜力。该探针在细胞水平与CTxB-Alexa 594的共定位实验也表明, TCHS-TPE可以标记细胞膜脂筏区, 且具有更高的脂筏区特异性。

本研究设计合成的细胞膜脂筏探针具有特异性高、安全性好、灵敏度高等优点。虽然目前该探

针只在肿瘤细胞膜脂筏区成像上取得了较好的效果,但是今后将进一步尝试将其应用于其他细胞(如免疫细胞、原代细胞等),考察其在不同细胞种类上的脂筏区成像效果,以期能为脂筏相关生理病理过程的探索提供更多的研究工具。

参 考 文 献

- [1] Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes [J]. *Nature*, 1997, **387**(6633): 569–572.
- [2] Sodt AJ, Pastor RW, Lyman E. Hexagonal substructure and hydrogen bonding in liquid-ordered phases containing palmitoyl sphingomyelin [J]. *Biophys J*, 2015, **109**(5): 948–955.
- [3] Ramstedt B, Slotte JP. Interaction of cholesterol with sphingomyelins and acyl-chain-matched phosphatidylcholines: a comparative study of the effect of the chain length [J]. *Biophys J*, 1999, **76**(2): 908–915.
- [4] Lingwood D, Binnington B, Róg T, *et al.* Cholesterol modulates glycolipid conformation and receptor activity [J]. *Nat Chem Biol*, 2011, **7**(5): 260–262.
- [5] Laganowsky A, Reading E, Allison TM, *et al.* Membrane proteins bind lipids selectively to modulate their structure and function [J]. *Nature*, 2014, **510**(7503): 172–175.
- [6] Sezgin E, Levental I, Grzybek M, *et al.* Partitioning, diffusion, and ligand binding of raft lipid analogs in model and cellular plasma membranes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, **1818**(7): 1777–1784.
- [7] Englund PT. The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors [J]. *Annu Rev Biochem*, 1993, **62**: 121–138.
- [8] Lingwood D, Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle [J]. *Science*, 2010, **327**(5961): 46–50.
- [9] Schäfer B, Orbán E, Borics A, *et al.* Preparation of semisynthetic lipoproteins with fluorescent cholesterol anchor and their introduction to the cell membrane with minimal disruption of the membrane [J]. *Bioconjug Chem*, 2013, **24**(10): 1684–1697.
- [10] Kim HM, Jeong BH, Hyon JY, *et al.* Two-photon fluorescent turn-on probe for lipid rafts in live cell and tissue [J]. *J Am Chem Soc*, 2008, **130**(13): 4246–4247.
- [11] Tian MG, Liu Y, Sun YM, *et al.* A single fluorescent probe enables clearly discriminating and simultaneously imaging liquid-ordered and liquid-disordered microdomains in plasma membrane of living cells [J]. *Biomaterials*, 2017, **120**: 46–56.
- [12] Sezgin E, Levental I, Mayor S, *et al.* The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, **18**(6): 361–374.
- [13] Levental I, Levental KR, Heberle FA. Lipid rafts: controversies resolved, mysteries remain [J]. *Trends Cell Biol*, 2020, **30**(5): 341–353.
- [14] Luo J, Xie Z, Lam JW, *et al.* Aggregation-induced emission of 1-methyl-1, 2, 3, 4, 5-pentaphenylsilole [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2001(18): 1740–1741.
- [15] Cai YJ, Gui C, Samedov K, *et al.* An acidic pH independent piperazine-TPE AIEgen as a unique bioprobe for lysosome tracing [J]. *Chem Sci*, 2017, **8**(11): 7593–7603.
- [16] Merritt EA, Sarfaty S, van den Akker F, *et al.* Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor GM1 pentasaccharide [J]. *Protein Sci*, 1994, **3**(2): 166–175.