

岩藻糖基吡喃睛荧光探针在原发性肝癌早期诊断的探究

龚卓玮

(华东理工大学生物工程学院 河北 保定 071000)

【摘要】原发性肝癌作为一发病隐匿，早期多无明显症状，诊断时容易受到肝炎和肝硬化的干扰，难以早期发现且预后较差，严重危害人类的生命健康。因此能否实现肝癌的早期诊断对于疾病的有效治疗至关重要。本实验从一项比甲胎蛋白（AFP）阳性率更高的肝癌血清标志物— α -L-岩藻糖苷酶（AFU）入手，合成了一种以吡喃睛荧光单元（DCM）为主体，偶联岩藻糖残基的灵敏识别 AFU 的小分子荧光探针。通过利用紫外吸收光谱，荧光光谱等溶液分析手段，分析了其光化学性质和响应 AFU 的灵敏度及特异性。结果表明，该新型探针在原发性肝癌早期诊断领域应该具有较大的潜力。

【关键词】原发性肝癌；荧光探针； α -L-岩藻糖苷酶；早期诊断

1 研究背景

我国慢性乙型肝炎病毒的感染率较高，肝癌发病率也较高^[3]。原发性肝癌（PHC）的特点是恶性程度高、易转移和预后差^[1]。PHC 的高死亡率是由于早期检测的诊断准确性不足所致，且肝癌常被误诊为肝炎等其它肝脏疾病。因此，肝癌的早期诊断对肝癌的诊断和治疗具有重要意义^[2]。

糖基化是低聚糖添加到蛋白质或脂类中的一个重要的生理过程。细胞表面蛋白质糖基化模式的改变往往是细胞癌变向恶性肿瘤转化的特征。肿瘤的侵袭和转移等过程通常都涉及异常糖基化^[1-2]。

α -L-岩藻糖苷酶（ α -L-fucosidase, AFU）属于溶酶体酸性水解酶组，是一种脂质体酶，涉及多种岩藻糖基化多糖的降解，在 pH 为 4-6.5 间活性最佳，可以催化水解去除 L-岩藻糖残基。被认为是与肝癌和结直肠癌的早期诊断和预后相关的肿瘤标志物；还有报道称，AFU 的表达水平可以用于区分黏液表皮样癌和口腔癌。但目前有关 AFU 在肝癌诊断和预后中作用的研究还较有限。

目前靶向 AFU 荧光探针的报道较少，且缺少可在体内直接检测内源性 AFU 的荧光探针。故我们希望开发一种能够在体内监测 AFU 水平的新型荧光探针。目前较多为基于单个荧光团的探针的激发（通常在 UV 范围内）和发射（蓝色或绿色）波长都相对较短，不利于体内成像和检测。因此开发具有较长的激发和发射波长的单荧光团的比例荧光探针是十分有必要的。

2 研究方法

2.1 探针的合成

2.1.1 吡喃睛荧光单元（DCM）的合成

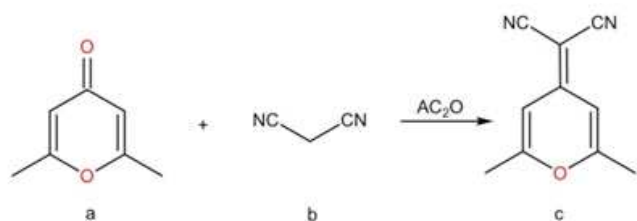


图 1 DCM 的合成路线

物质 a（1,6-二甲基- γ -吡喃酮）和物质 b（丙二腈）溶于物质 c（醋酸酐），140℃回流搅拌，得到 DCM 粗品。薄层色谱（TLC）监测反应进程。重结晶结合 TLC 进一步提纯。减压蒸馏去除乙酸乙酯和甲醇得到纯净的 DCM。

2.1.2 DCM 的糖基化

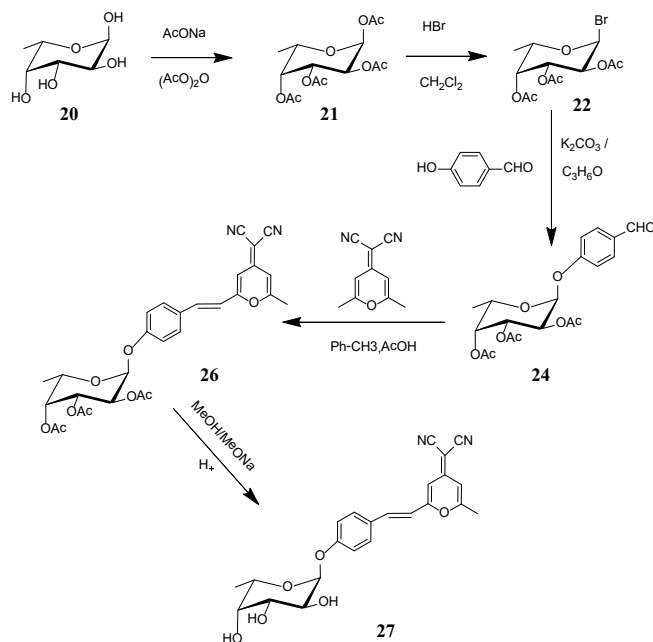


图 2 岩藻糖的合成及糖基化路线

合成思路为先保护岩藻糖（20）的羟基，将其乙酰化，方便后续 1 位溴代反应的发生，然后通过对羟基苯甲醛连接岩藻糖和 DCM，溴代岩藻糖的溴原子取代对羟基苯甲醛的羟基，DCM 的甲基与对羟基苯甲醛的醛基缩合。最终再将乙酰化的岩藻糖基的乙酰基还原为羟基得到（E）-1-（6-甲基-2-吡喃睛基）-2-（4-O-岩藻糖苯基）乙烯（27），即为所需 α -L-Fuc-DCM 探针。该探针发生由分子内电荷转移（ICT）产生荧光。当其结合靶标物 AFU 后，AFU 水解岩藻糖基产生的羟基为供电子基，DCM 的氰基为吸电子基，从而产生荧光响应。

2.2 探针在溶液水平的表征

2.2.1 紫外光谱的响应

采用 DMSO（二甲基亚砜）：PBS（0.01mol，pH=7.4）=1:100（v:v）溶液作为溶剂。将该探针分子溶解到 400 LDMSO:PBS=1:100（v:v）的溶剂中，在 1×1cm 的标准石英比色皿中制成浓度为 100 μ mol/L 的溶液。在该溶液中逐次加入 2.5 μ L 含岩藻糖苷酶（AFU）的血清，在 37℃ 下恒温孵育 10min 后，测试体系紫外吸收的变化。

2.2.2 荧光光谱的响应

2.2.2.1 探针对 AFU 标准品的荧光光谱响应

采用 DMSO（二甲基亚砜）：PBS（0.01mol，pH=7.4）

=1:100 (v:v) 溶液作为溶剂。将 α -L-Fuc-DCM 探针溶解到 400 L DMSO:PBS=1:100 (v:v) 溶剂中, 在 1×1cm 的标准石英比色皿中制成浓度为 100 μ mol/L 的溶液。激发波长设置为 470nm。在该溶液中逐次加入 20 μ L 120 U/L α -L-岩藻糖苷酶 (AFU) 标准品, 37℃ 恒温孵育 10min 后, 测试该体系的荧光强度。

2.2.2.2 探针含 AFU 血清的荧光光谱响应

采用 DMSO (二甲基亚砜): PBS (0.01mol, pH=7.4) =1:100 (v:v) 溶液作为溶剂。将 α -L-Fuc-DCM 探针分子溶解到 400 L DMSO:PBS=1:100 (v:v) 溶剂体系中, 在 1×1 cm 标准石英比色皿中制成浓度 100 μ mol/L 的溶液。激发波长设置为 470nm。在该溶液中逐次加入 2.5 μ L 含岩藻糖苷酶 (AFU) 血清, 37℃ 下恒温孵育 10min 后, 测试荧光强度的变化。

2.2.3 探针测试条件的测定

2.2.3.1 缓冲液对检测结果的影响

表 1 不同缓冲液组加入的试剂含量

| 缓冲液 | pH | | | |
|----------|-----|---------------------------|--------------------------|-------------------|
| 1×PBS | 7.4 | DCM-岩藻糖探针 (10 μ L) | 0.5mM HSA (5 μ L) | 血清 (6 μ L) |
| 10×PBS | 7.4 | | | |
| Tris-HCl | 8.2 | | | |
| MES | 5.8 | | | |

采用 DMSO (二甲基亚砜): PBS (0.01mol, pH=7.4) =1:100 (v:v) 溶液作为溶剂, 得到 α -L-Fuc-DCM 的 DMSO 溶液。分别加入到 400L 的不同 pH 值缓冲液中, 探针的终浓度为 100 μ mol/L; 再加入 6 μ L 含 AFU 的患者血清, 37℃ 恒温孵 10 min 后转移至在 1×1cm 标准石英比色皿中混合均匀, 激发波长 470 nm, 测试荧光强度的变化。

2.2.3.2 血清含量对检测结果的影响

采用 DMSO (二甲基亚砜): PBS (0.01mol, pH=7.4) = 1:100 (v:v) 溶液作为溶剂。将该探针分子溶解到 400L DMSO:PBS=1:500 (v:v) 溶剂中, 制成浓度为 20 μ mol/L 溶液。再分别向其中加入 0 μ L、1 μ L、3 μ L、6 μ L、9 μ L、12 μ L、20 μ L 的血清。37℃ 恒温孵育 10 min。转移至在 1×1cm 的标准石英比色皿中混合均匀制成溶液。激发波长 470 nm, 测试荧光强度的变化。

2.2.3.3 孵育时间对检测结果的影响

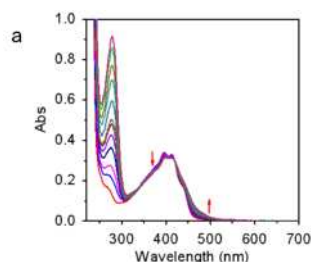
将该探针分子溶解到 400 μ L DMSO:PBS= 1:100 (v:v) 的溶剂中, 制成浓度为 100 μ mol/L 的溶液, 再向其中加入 6 μ L 的血清。37℃ 下分别恒温孵育 1min、2min、5min、10min、15min、20min、25min、30min。转移至在 1×1 cm 的标准石英比色皿中混合均匀制成溶液。激发波长 470nm, 测试荧光强度的变化。

2.2.3.4 探针浓度对检测结果的影响

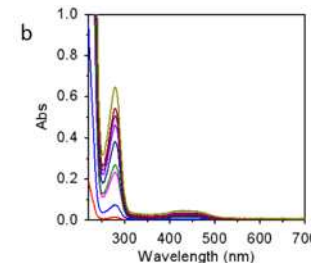
将 6 μ L 血清溶解至 400 μ L PBS (0.01mol, pH=7.4) 缓冲液中。选取 7 个浓度梯度的探针: 0 μ M、1 μ M、5 μ M、10 μ M、50 μ M、100 μ M、200 μ M、500 μ M。在 37℃ 下恒温孵育 10min 后, 转移至在 1×1cm 的标准石英比色皿中混合均匀制成溶液。470nm 波长激发, 测试荧光强度的变化。

3 研究结果

3.1 紫外光谱的响应



a. 探针含 AFU 血清的紫外响应

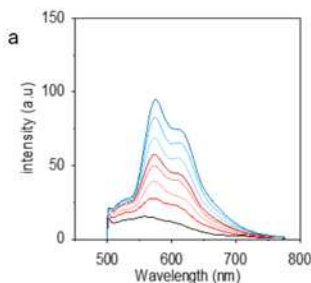


b. 未加入 AFU 血清的紫外响应

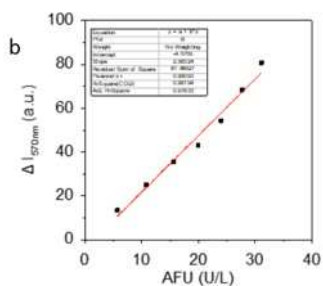
图 3

图 3a 为 α -L-Fuc-DCM 探针含岩藻糖苷酶 (AFU) 血清的紫外检测结果。对比图 3b 表明探针含岩藻糖苷酶 (AFU) 血清的紫外检测在 375nm 处吸收下降, 在 275nm、470nm 处吸收上升。表明该受体分子对含岩藻糖苷酶 (AFU) 血清有紫外响应。由于原发性肝癌患者血清中还含有除岩藻糖苷酶 (AFU) 以外的其它蛋白质等物质, 故认为 275nm 处吸收变化是受血清中其他组分影响而产生的。

3.2 荧光光谱的响应



a. 探针含 AFU 标准品的荧光响应



b. 探针含 AFU 标准品的标准曲线

图 4

α -L-Fuc-DCM 探针含岩藻糖苷酶 (AFU) 的荧光光谱检测结果如图 4a 所示。结果表明 α -L-Fuc-DCM 探针本身无荧光发射, 在加入 AFU 标准品后, α -L-Fuc-DCM 探针含 AFU 标准品有荧光响应, 并在 570nm、620nm 处有发射峰出现。随 AFU 含量的增加, 570nm 处的荧光强度也依次均匀上升。取 570nm

处的荧光峰值和探针分子的差值 (ΔI_{570nm}) 与加入的 AFU 含量拟合成标准曲线, 如图 4b 所示, 可以看出该探针分子对 AFU 的荧光响应有良好的线性关系 ($R^2=0.98194$)。

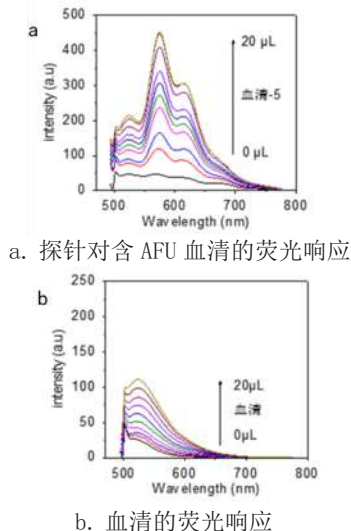


图 5

结果表明探针分子对含岩藻糖苷酶 (AFU) 血清有荧光响应, 并在 570nm、620nm 处有发射峰出现。该测试结果与 AFU 标准品所测结果一致 (如图 4a 和图 5b 所示)。后经测试血清荧光图谱可知在 525nm 出的荧光上升是由于血清影响所致。可能是血清中某些复杂组分 (蛋白等) 放大了测试结果。对比图 5a 和图 5b, 发现该探针的特异性较好——即存在有其它杂蛋白、糖类、盐离子等杂质的血清中依然能够有一定强度的荧光显现。因此我们认为该探针分子有潜力直接用作检测含 AFU 的病人血清。

3.3 探针测试条件的测定

3.3.1 缓冲液对检测结果的影响

在 pH=7.0-9.0 的范围内, 探针表现对 AFU 高的敏感度稳定性。对比之下于 MES 缓冲液 (偏酸性) 中的荧光强度较弱, 且与其它偏碱性的缓冲液呈现出的紫外吸收图谱不同。可能由于在中性偏碱的溶液条件下, AFU 剪切后的酚羟基更易形成氧负离子。而氧负离子在进行 ICT (分子内电荷转移) 过程时能够作为供电子基, 因此, 探针能够表现出更强的荧光响应。

3.3.2 血清含量对检测结果的影响

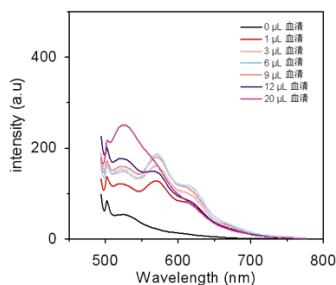


图 6 不同血清含量下的荧光响应

随着加入血清的量的增加, 荧光强度也随着升高。但血清含量过高也会导致 525 nm 处的血清特征峰过高, 影响测试的结果。故可选用 6 μ L 作为待测物的用量, 该用量下的荧光图谱不仅表现在探针特征峰 (约 570nm) 有较高的荧光发射, 同

时在血清特征峰处的荧光强度较低。同时选用 6 μ L 作为待测物的用量还可以表明: 该探针检测限很低。

3.3.3 孵育时间对检测结果的影响

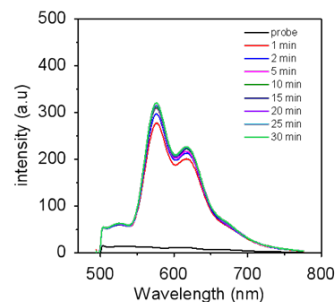


图 7 不同孵育时间下的荧光响应

由图 7 显示, 孵育 1min 后有较强荧光响应出现, 且 30min 内荧光结果较稳定。表明该探针灵敏性很强且在中性环境中非常稳定。认为可选用 10 min 作为测试的孵育时间。

3.3.4 探针浓度对检测结果的影响

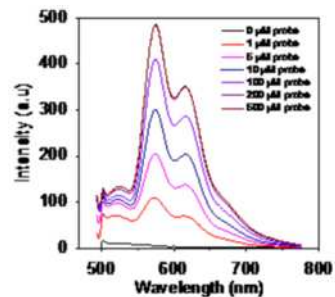


图 8 不同探针浓度下的荧光响应

如图 6 所示, 随着探针分子浓度的升高, 荧光强度也随之升高。当探针浓度超过 100 μ M 后, 荧光强度上升不明显。200 μ M 后荧光峰值不再提高。可能是受到血清中 AFU 含量的限制。血清样本中的 AFU 含量一定, 因此能够剪接探针的岩藻糖苷酶然后使其发光的量也是一定的。探针浓度至 200 μ M 后的体系已达到饱和, 故在实际测试中可以选取 100 μ M 为探针的测试浓度。

4 总结

本项目设计并合成了一种以小分子荧光染料为主体的, 能够靶向肝癌标志物 α -L-岩藻糖苷酶 (AFU) 的探针。并通过实验证实该探针具有分子量较小、灵敏度较好、特异性较高的特点。该探针的研究及开发可以为原发性肝癌的早期诊断提供一定的可能。

参考文献:

[1]Zhu RX, Seto WK, Lai CL, et al. Epidemiology of Hepatocellular Carcinoma in the Asia-Pacific Region[J]. Gut Liver, 2016,10(3):332-339

[2]Zeng F, Guo P, Huang Y, et al. Epidemiology of hepatitis B virus infection: results from a community-based study of 0.15 million residents in South China[J]. Sci Rep, 2016,6:36186

作者简介:

龚卓玮, 女, 华东理工大学生物工程学院本科在读, 随导师从事化学生物学交叉学科小分子荧光探针以及生物传感器方面的研究与学习。