

^{19}F 核磁共振探针用于体外和活细胞内 弗林蛋白酶的活性检测

王丁俐, 梁高林

(中国科学技术大学化学系, 安徽合肥 230026)

摘要: 设计合成了 ^{19}F 磁共振成像探针 CBT-Lys(FMBA)-Cys(StBu)-Arg-Arg-Val-Arg-Ac(1), 经 GSH 还原和肿瘤细胞内高表达的弗林蛋白酶识别剪切后, 1,2-氨基硫醇与氰基发生缩合反应生成二聚体, 其具有亲脂性的大环内核, 可以通过 π - π 堆积自组装形成纳米粒子, 导致 ^{19}F 核磁共振信号因横向弛豫而消失. 使用透射电镜(TEM)、扫描电镜(SEM)、高效液相色谱(HPLC)对生成的纳米粒子的组成和结构进行了表征, 通过细胞摄取和 ^{19}F NMR 波谱分析其对弗林蛋白酶的检测能力. 结果表明, 该探针很容易被细胞摄取, 能够检测肿瘤细胞中的弗林蛋白酶, 使之 ^{19}F NMR 信号消失, 可潜在应用于 ^{19}F 磁共振成像.

关键词: 弗林蛋白酶; 自组装; ^{19}F 核磁共振

中图分类号: O657.61 **文献标识码:** A doi:10.3969/j.issn.0253-2778.2015.02.004

引用格式: Wang Dingli, Liang Gaolin. ^{19}F MR imaging probe for furin detection in vitro and in living cells[J]. Journal of University of Science and Technology of China, 2015, 45(2):112-116.

王丁俐, 梁高林. ^{19}F 核磁共振探针用于体外和活细胞内弗林蛋白酶的活性检测[J]. 中国科学技术大学学报, 2015, 45(2):112-116.

^{19}F MR imaging probe for furin detection in vitro and in living cells

WANG Dingli, LIANG Gaolin

(Department of Chemistry, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China)

Abstract: The ^{19}F magnetic resonance imaging (MRI) probe 1, CBT-Lys(FMBA)-Cys(StBu)-Arg-Arg-Val-Arg-Ac, was designed and synthesized. The probe can be reduced by GSH and cleaved by furin which is upregulated in several cancers to yield active intermediate. The 1,2-aminothiol group and cyano group of the intermediate condense quickly to yield the dimer which self-assembles into nanoparticles at or near the locations of furin in cells, inducing a clear turn-off of its ^{19}F NMR signal. The nanoparticles were characterized by scanning electron microscope (SEM), transmission electron microscope (TEM), high performance liquid chromatography (HPLC). Furthermore, results of cell uptake indicate that probe 1 can be easily uptaken by tumor cells resulting in ^{19}F NMR signal “off” for the detection of furin activity inside cells. The proposed ^{19}F NMR probe could be potentially applied to ^{19}F MRI in the future.

Key words: furin; self-assembly; ^{19}F nuclear magnetic resonance

收稿日期:2014-03-06;修回日期:2014-03-17

基金项目:国家自然科学基金(21375121,91127036)资助.

作者简介:王丁俐,女,1989年生,硕士.研究方向:分析化学. E-mail: wdl@mail.ustc.edu.cn

通讯作者:梁高林,博士/教授. E-mail: gliang@ustc.edu.cn

0 引言

磁共振成像(MRI)广泛应用于医疗诊断,已经成为研究各种生理活动最有效的手段之一^[1].然而,由于生物样本的背景中存在大量的水质子, ^1H MRI存在对比度-噪声比低的缺陷^[2].对于特定目标的成像, ^{19}F 的高灵敏度(83%相对于 ^1H),100%自然丰度以及生物体内几乎为零的背景信号,使得 ^{19}F MRI成为很有前景的方法^[3-4].Takaoka等^[5]研究发现,含 ^{19}F 的分子组装成具有大分子量的聚集体时,其 ^{19}F NMR波谱信号严重变宽以致消失,并将此机制用于蛋白质^[6]和酶^[7]的检测.

弗林蛋白酶在体内平衡、阿尔茨海默氏病、炭疽病、埃博拉发热以及癌症中起着重要作用^[8].许多种癌症都高表达弗林蛋白酶,包括非小细胞肺癌、头部和颈部的鳞状细胞癌等^[9].因此,弗林酶的表达为某些癌症的早期发展检测提供了依据.它能够识别剪切特定的氨基酸序列 Arg-X-Lys/Arg-Arg↓X,其中 Arg 是精氨酸,Lys 是赖氨酸,X 可以是任意氨基酸,↓表示酶切位点^[10].

本研究设计了化合物 **1**,包含肽链 Arg-Arg-Val-Arg-Ac,能够被弗林酶识别剪切,同时双硫键被细胞内谷胱甘肽(GSH)还原为巯基,得到 **1-Core**.**1**,2-氨基硫醇与氰基缩合,生成二聚体 **1-D**,具有亲脂性的大环内核,通过 π - π 堆积自组装形成纳米粒子^[11],导致 ^{19}F NMR 信号因横向弛豫而消失(如图1).同时,设计打乱氨基酸顺序的对照化合物 **1-Scr**,使之不能被弗林酶识别剪切.化合物 **1** 和 **1-Scr** 的结构式如图2所示.

1 实验

1.1 仪器与试剂

实验所用主要仪器和型号为:Agilent 1200 高效液相色谱仪;JEOL 2010 透射电子显微镜(TEM);JEOL-JSM-6700F 扫描电子显微镜(SEM);Bruker AV III WB-600 MHz 核磁共振波谱仪;Ultriflex II MALDI-TOF/TOF 质谱仪.

实验所用试剂购自 Adamas 公司或生工,均为分析纯及以上;培养基 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)购自 Thermo Fisher Scientific,

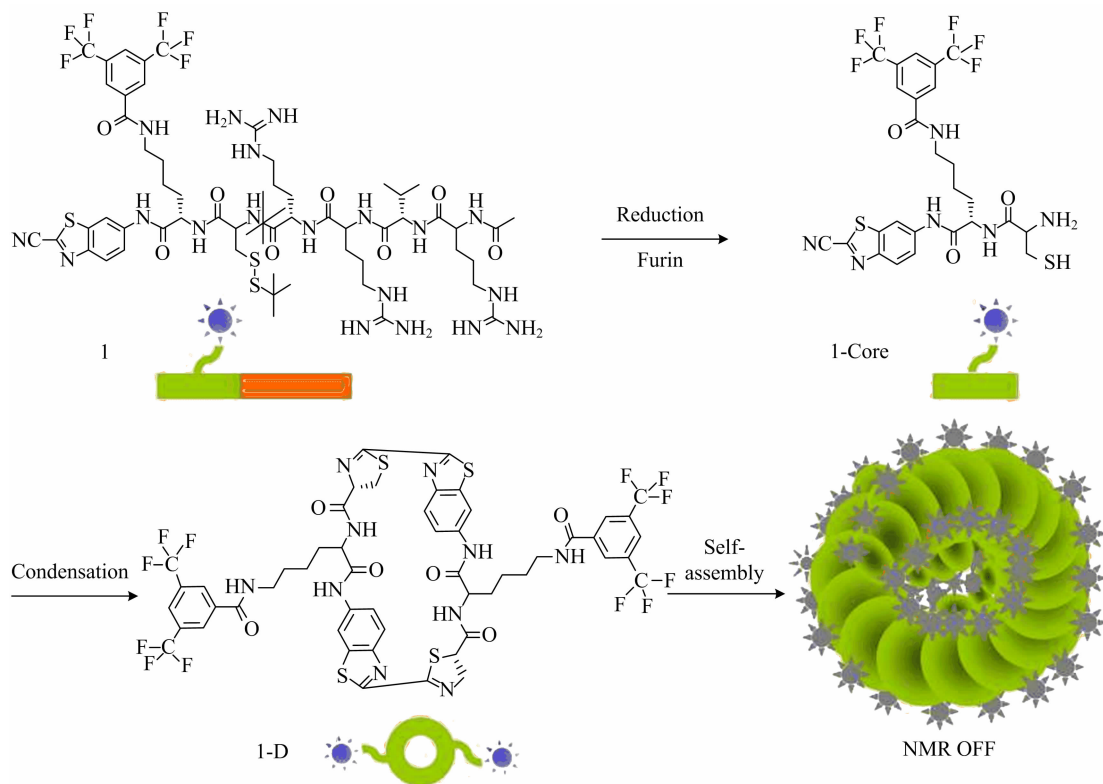


图1 肿瘤细胞内由还原和弗林酶控制的缩合反应,及自组装生成 ^{19}F 纳米粒子导致 ^{19}F NMR信号消失的示意图

Fig. 1 Schematic illustration of reduction and furin-controlled condensation and self-assembly of ^{19}F NMR nanoparticles inducing ^{19}F NMR signal "off" for furin activity detection in cancer cells

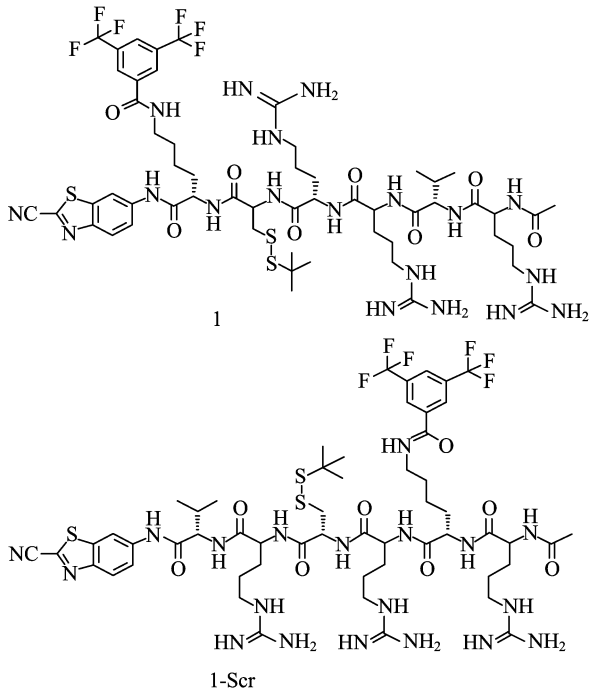


图 2 化合物 1 和 1-Scr 的结构式。

Fig. 2 Chemical structures of 1 and 1-Scr

胎牛血清(FBS)购自四季青;细胞裂解液为 RIPA 缓冲液(25 mmol/L Tris · HCl pH 7.6, 150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 1% 脱氧胆酸钠, 0.1% SDS)。

1.2 化合物 1 和 1-Scr 的合成

化合物 CBT-Lys-Cys(StBu)-Arg-Arg-Val-Arg-Ac 的合成参考文献[12]。室温下将 49.8 mg 该化合物溶于 2 mL DMF, 再加入 16 mg HBTU, 6 mg HOBt, 14 μ L DIPEA, 以及 20 mg 3,5-双(三氟甲基)苯甲酸, 搅拌反应过夜, 经 HPLC 纯化后得到

化合物 1。化合物 1-Scr 的合成方法除肽链中的氨基酸顺序不同外, 其他同化合物 1。

合成的化合物 1 和 1-Scr 的化学结构由高分辨基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(HR-MALDI-TOF/MS)和 ^1H NMR 波谱验证。

1.3 弗林蛋白酶控制的缩合反应

将高表达弗林蛋白酶的 MDA-MB-468 细胞用 150 μ L RIPA 缓冲液裂解, 冷冻离心后胞内不溶物沉淀在离心管底部, 取上清液, 提取胞内蛋白。将化合物 1 或 1-Scr 分别加入到上清液中(100 μ mol/L, 100 μ L), 在 37 $^\circ\text{C}$ 的水浴锅中孵育 6 h。直接蘸取上述混合液进行 TEM 和 SEM 表征, 然后将化合物 1 与细胞裂解液共同孵育后的混合物用 HPLC 进行分析(方法: CH_3CN (0.1% TFA), 10%~70%, 60 min), 检测波长 320nm, 该波长为 CBT 中苯并噻唑结构的特征吸收波长。

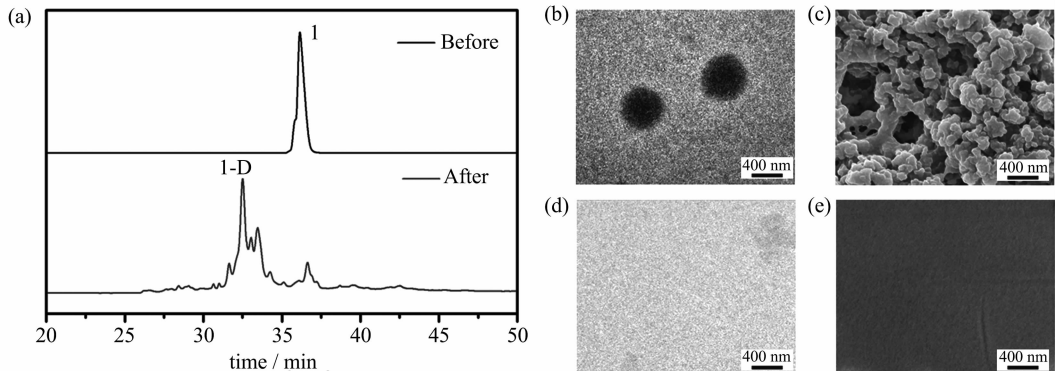
1.4 细胞摄取实验

在 37 $^\circ\text{C}$, 5% CO_2 的细胞培养箱中, 用无血清的培养基培养 MDA-MB-468 细胞和几乎不表达弗林蛋白酶的 LoVo 细胞 4 h。移去培养基, 分别加入 500 μ mol/L 的化合物 1 和 1-Scr(溶解于 DMEM) 500 μ L, 继续培养 0.5 h。然后移去培养基, PBS 洗涤 3 次后, 用 100 μ L RIPA 缓冲液裂解细胞, 细胞裂解液直接用于 ^{19}F NMR 波谱分析。

2 结果与讨论

2.1 自组装形成的纳米粒子的表征

如图 3(a)所示, 化合物 1 与 468 细胞裂解液孵育后, 其 HPLC 谱图发生明显变化。化合物 1 经



(a) upper, HPLC trace of 1 in water; lower, HPLC trace of the incubation mixture of 1 at 100 μ mol/L after incubation with cell lysate at 37 $^\circ\text{C}$ for 6 h (absorption at 320 nm); (b) TEM and (c) SEM images of the ^{19}F -NPs of 1 in the above incubation mixture; (d) TEM and (e) SEM images of the 1-Scr incubation mixture

图 3 弗林蛋白酶控制的 ^{19}F 纳米粒子自组装的体外表征

Fig. 3 In vitro characterization of furin-controlled self-assembly of ^{19}F nanoparticles

GSH 还原和弗林蛋白酶剪切后, 缩合形成二聚体 (**1-D**), 其在 HPLC 谱图上保留时间为 32.5 min. 基质辅助激光解吸/电离 (MALDI) 质谱证实了该峰确为化合物 **1-D**. TEM 和 SEM 照片 (图 3(b), 3(c)) 显示, 形成的纳米粒子大小均一, 平均粒径为 300~400 nm. 作为对照, 化合物 **1-Scr** 在相同条件下与细胞裂解液孵育后, 没有形成纳米粒子 (图 3(d), 3(e)).

综上所述, 化合物 **1** 能被弗林蛋白酶识别剪切, 其还原产物缩合形成二聚体 (**1-D**) 后, 能够自组装形成纳米粒子.

2.2 ^{19}F NMR 波谱分析

如图 4 所示, 根据 ^{19}F NMR 波谱分析, 在 RIPA 缓冲液中化合物 **1** 和 **1-Scr** 的 ^{19}F 信号化学位移分别为 -61.30 和 -61.44 ppm. 当它们分别与 468 细胞的裂解液孵育后, 经 GSH 还原和弗林蛋白酶剪切, 缩合形成的二聚体自组装形成纳米粒子, 化合物 **1** 的 ^{19}F 信号消失, 而作为对照化合物 **1-Scr** 的 ^{19}F 信号几乎保持不变.

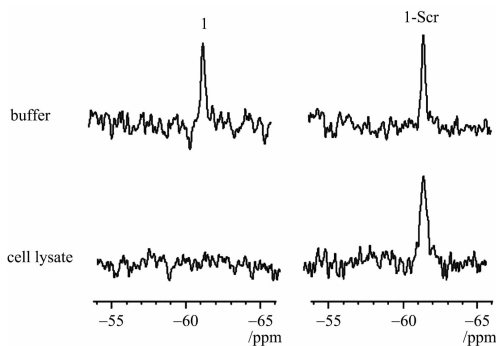


图 4 化合物 **1** 和 **1-Scr** 在 RIPA 缓冲液和 468 细胞裂解液中孵育后的 ^{19}F NMR 波谱图

Fig. 4 ^{19}F NMR spectra of **1/1-Scr** (100 $\mu\text{mol/L}$) in RIPA buffer and in the lysate of MDA-MB-468 cells after incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 6 h

经过体外实验验证, GSH 还原和弗林蛋白酶控制的缩合反应使得 ^{19}F NMR 信号消失. 而化合物 **1** 和 **1-Scr** 的细胞摄取实验进一步证实了该结论. 如图 5 所示, 经过 0.5 h 的摄取, 只有与化合物 **1** 一起孵育, 表达弗林蛋白酶的 468 细胞的 ^{19}F NMR 信号消失. 作为对照, 几乎不表达弗林蛋白酶的 LoVo 细胞^[12], 无论与化合物 **1** 还是 **1-Scr**, 它们的 ^{19}F 信号都能被检测. 另外, 这一结果还表明, 化合物 **1** 和 **1-Scr** 很容易被细胞摄取.

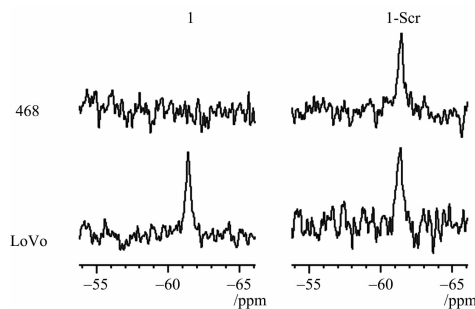


图 5 化合物 **1** 和 **1-Scr** 经 468 细胞和 LoVo 细胞摄取 0.5 h 后, 各自的细胞裂解液得到的 ^{19}F NMR 波谱图

Fig. 5 ^{19}F NMR spectra of the lysates of MDA-MB-468 cells and LoVo cells after incubated with **1/1-Scr** (500 $\mu\text{mol/L}$, dissolved in 500 μL DMEM) for 0.5 h

3 结论

通过对核磁共振探针 **1** 及其对照化合物 **1-Scr** 的 ^{19}F NMR 波谱分析, 可以得到结论, 该探针易被细胞摄取, 在肿瘤细胞内发生由谷胱甘肽和弗林蛋白酶控制的缩合反应, 经自组装后形成纳米粒子, 导致 ^{19}F NMR 信号消失. 利用这一现象, 可以检测活细胞中的弗林蛋白酶. 进一步地, 探针 **1** 可以潜在用于肿瘤靶向的 ^{19}F 磁共振成像.

参考文献 (References)

- [1] Weissleder R, Pittet M J. Imaging in the era of molecular oncology [J]. Nature, 2008, 452 (7187): 580-589.
- [2] Yu J X, Kodibagkar V D, Liu L, et al. ^{19}F -MRS/ ^1H -MRI dual-function probe for detection of β -galactosidase activity. [J]. Chem Sci, 2013, 4 (5): 2132-2142.
- [3] Higuchi M, Iwata N, Matsuba Y, et al. ^{19}F and ^1H MRI detection of amyloid beta plaques in vivo [J]. Nat Neurosci, 2005, 8 (4): 527-533.
- [4] Yu J X, Kodibagkar V D, Cui W N, et al. ^{19}F : A versatile reporter for non-invasive physiology and pharmacology using magnetic resonance. [J]. Curr Med Chem, 2005, 12 (7): 819-848.
- [5] Takaoka Y, Sakamoto T, Tsukiji S, et al. Self-assembling nanoprobe that display off/on ^{19}F nuclear magnetic resonance signals for protein detection and imaging. [J]. Nat Chem, 2009, 1(7): 557-561.
- [6] Takaoka Y, Kiminami K, Mizusawa K, et al. Systematic study of protein detection mechanism of self-assembling ^{19}F NMR/MRI nanoprobe toward rational design and improved sensitivity [J]. J Am Chem Soc, 2011, 133(36): 11725-11731.

- [7] Matsuo K, Kamada R, Mizusawa K, et al. Specific detection and imaging of enzyme activity by signal-amplifiable self-assembling ^{19}F MRI probes. [J]. Chem Eur J, 2013, 19: 12 875-12 883.
- [8] Thomas G. Furin at the cutting edge: From protein traffic to embryogenesis and disease [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002; 3(10): 753-766.
- [9] Mbikay M, Sirois F, Yao J, et al. Comparative analysis of expression of the proprotein convertases furin, PACE4, PC1 and PC2 in human lung tumours [J]. Br J Cancer, 1997, 75 (10): 1 509-1 514.
- [10] Hosaka M, Nagahama M, Kim W S, et al. Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway[J]. J Biol Chem, 1991, 266 (19): 12 127-12 130.
- [11] Liang G L, Ren H J, Rao J H. A biocompatible condensation reaction for controlled assembly of nanostructures in living cells [J]. Nat Chem, 2010, 2(3):54-60.
- [12] Cao C Y, Shen Y Y, Wang J D, et al. Controlled intracellular self-assembly of gadolinium nanoparticles as smart molecular MR contrast agents [J]. Sci Rep, 2013, 3:1024;doi: 10.1038/srep01024.

(上接第 111 页)

- [3] Games R A, Chan A H. A fast algorithm for determining the linear complexity of a binary sequence with period 2^n [J]. IEEE Transactions on Information Theory, 1983, IT-29(1):144-146.
- [4] Imamura K, Moriuchi T. A fast algorithm for determining the linear complexity of p -ary sequence with period p^n , p a prime [J]. IEICE Technical Report, 1993, IT93-75: 73-78.
- [5] Kaida T, Uehara S, Imamura K. An algorithm for the k -error linear complexity of sequences over $GF(3)$ with period 3^n [C]// Proceedings of the International Symposium on Information Theory and Its Applications. IEEE, 1996: 155-158.
- [6] Kaida T, Uehara S, Imamura K. An algorithm for the k -error linear complexity of sequences over $GF(p^n)$ with period p^n [J]. Information and Computation, 1999, 151(2): 134-147.
- [7] Lauder A G B, Paterson K G. Computing the error linear complexity spectrum of a binary sequence of period 2^n [J]. IEEE Transactions on Information Theory, 2003, 49(1): 273-280.
- [8] Kaida T. On the generalized Lauder-Paterson algorithm and profiles of the k -error linear complexity for exponent periodic sequences [C]// Sequences and Their Applications — SETA 2004, LNCS 3486. Heidelberg: Springer, 2005: 166-178.
- [9] Zhu Shixin, Yang Minghui. An approximation algorithm for computing the extension field k -error F_q -linear complexity of multisequences [J]. Journal of University of Science and Technology of China, 2013, 43(3): 202-205.
朱士信, 杨名慧. 多维序列扩域 k 错 F_q 线性复杂度的近似算法 [J]. 中国科学技术大学学报, 2013, 43(3): 202-205.