

doi: 103969/j. issn. 0490-6756. 2016. 01. 032

用于 $A\beta$ 标记的新型近红外荧光染料 BPAD-2 的制备与生物学评价

程 妍, 欧阳向硕, 梁 田, 张志荣

(四川大学药学院, 四川 成都 610041)

摘 要: 以邻羟基苯乙酮为初始原料, 通过缩合反应合成了 2-(2-[2-(4-羟基苯基)乙烯基]苯并吡喃-4-)-丙二腈(BPAD-2), 并通过¹H-NMR 与 MS 确认结构; 考察所制备探针的荧光光谱; 通过荧光染色考察探针的 $A\beta$ 结合标记; 通过荧光成像考察探针的血脑屏障通过能力. 结果表明 BPAD-2 的最大发射波长为 658 nm; BPAD-2 荧光标记的 $A\beta$ 呈亮红色; BPAD-2 尾静脉注入正常小鼠后脑内显示荧光信号, 10 min 内荧光强度达到最高, 随着时间延长荧光强度逐渐减弱. 说明苯并吡喃结构的 BPAD-2 具有近红外荧光性质, 并显示良好的 $A\beta$ 荧光标记和血脑屏障通过能力.

关键词: $A\beta$; 苯并吡喃; 荧光标记; 阿尔茨海默病

中图分类号: R96 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2016)01-0193-05

Synthesis and evaluation of near infrared fluorescent dye BPAD-2 for β -amyloid plaques

CHENG Yan, OUYANG Xiang-Shuo, LIANG Tian, ZHANG Zhi-Rong

(West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu, 610041, China)

Abstract: BPAD-2 was synthesized by condensation reaction with 1-(2-hydroxy-phenyl)-ethanone as the primary reagent, and confirmed by ¹H-NMR and MS. Fluorescence spectra were observed; fluorescence staining was performed to evaluate labelling ability for β -amyloid plaques; fluorescent imaging was performed to evaluate blood-brain barrier penetrating ability. The emission maximum of BPAD-2 in PBS was at 658 nm; BPAD-2 showed bright red labelling of β amyloid plaques; BPAD-2 penetrated the blood-brain barrier and peaked at 10 min postinjection and showed reasonable washout from the brain. BPAD-2 showed specific labelling of β -amyloid plaques and had good blood-brain barrier penetrating ability.

Key words: β amyloid; Benzopyrane; Fluorescent labeling; Alzheimer's disease

1 引 言

β -淀粉样蛋白($A\beta$), 是淀粉样前蛋白(APP)在脑神经细胞壁 β -及 γ -分泌酶切割下形成的 38~43

个氨基酸组成的肽链, 以 β -折叠构型的多聚体或不溶性纤维的形式存在. 正常的衰老过程中脑内 $A\beta$ 的产生与清除处于平衡状态. 脑内 $A\beta$ 的过量产生、聚集、沉积导致一系列神经细胞凋亡过程而最

收稿日期: 2014-06-20

基金项目: 教育部博士点新教师基金(20130181120114); 四川大学青教启动基金(2012SCU11091)

作者简介: 程妍(1983-), 女, 四川省成都人, 博士, 讲师, 主要研究领域为分子影像药理学。

通讯作者: 张志荣 E-mail: zrzl@vip. sina. com

终导致阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease, AD)等疾病的发生发展^[1, 2]. 因此, 研究在体观察与检测 A β 的方法, 可为 AD 的早期诊断、治疗效果评价以及治疗药物的研究等提供极大便利.

分子影像技术通过对活体内的重要分子, 特别是对疾病的产生、发展有重要作用的基因或分子及其传导途径进行成像, 具有无创、实时等优势, 可从分子水平为疾病的发生、发展等提供重要信息^[3, 4]. 光学成像领域中新兴的近红外荧光成像(near-infrared fluorescence imaging), 在其光谱范围(600-900 nm)内生物体的自发荧光干扰较小; 能穿透更深层的组织, 实现对深层组织和器官的探测与成像^[5]. 因此, 利用近红外荧光成像技术对 A β 进行在体造影是可行的^[6, 7]. 荧光成像的关键在于寻找合适的荧光探针用于标记体内的 A β . 刚果红是用于 A β 体外染色的经典染料, 但因其分子大且结构中带电荷, 不易通过血脑屏障进入脑内, 因而不适合用于 A β 的在体标记. 本研究设计了一种不同于刚果红结构的具有推-拉电子结构的苯并吡喃小分子染料 BPAD-2, 并初步探讨了其荧光性质、A β 斑块标记和血脑屏障通过能力.

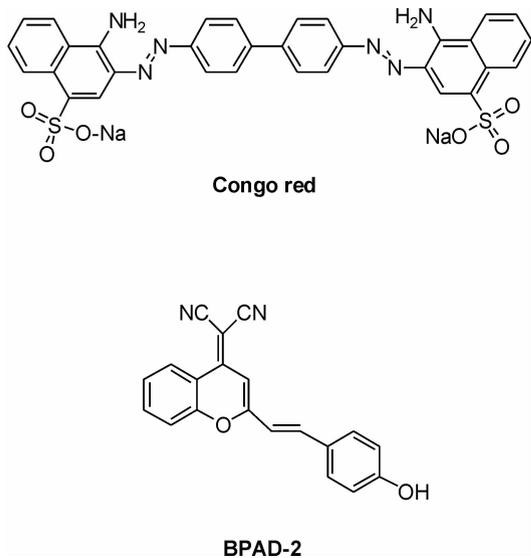


图 1 刚果红和 BPAD-2 的结构式

Fig. 1 Chemical Structure of Congo red and

BPAD-2

2 材料与方法

2.1 材料

中压柱层析系统(Buchi, 瑞士)、400 MHz 核磁共振仪(Varian INOVA-400 ¹H-NMR, 美国)、Agilent 6410B 型高效液相色谱-质谱联用仪(Ag-

ilent, 美国)、高效液相色谱仪(岛津, 日本)、CM1950 冰冻切片仪(Leica, 德国)、高速冷冻离心机(Beckman, 美国)、Aviovert 40 CFL 荧光倒置生物显微镜(Zeiss, 德国)、QuickView 3000 活体发光成像仪(BioReal, 奥地利).

邻羟基苯乙酮(99%, 阿拉丁试剂)、钠(AR, 科龙化工试剂)、对羟基苯甲醛(AR, 科龙化工试剂)、丙二腈(99%, 西亚试剂), 有机溶剂均为分析纯.

2.2 方法^[8]

2.2.1 合成方法 1.2.1 1-(2-羟基苯基)-1,3-丁二酮的制备(1) 邻羟基苯乙酮 9.93 g(72.9 mmol)溶于 150 mL 乙酸乙酯后, 加入钠 6.01 g(261.0 mmol), 室温下反应 3 h, 溶液由黄色变为土黄色. 反应结束后, 抽滤, 将所得滤饼溶于 300 mL 水中, 用冰醋酸调节 pH 至 7, 搅拌过夜. 抽滤, 得到浅黄色固体 4.97 g. 产率为 32.6%.

1.2.2 2-甲基苯并吡喃酮的制备(2) 向 100 mL 圆底烧瓶中依次加入化合物 1(4.44 g, 24.9 mmol)、50 mL 醋酸和 4 mL 浓硫酸, 回流半小时. 将热溶液倾倒入 300 mL 冰水中, 用无水碳酸钠调节 pH 至 7. 二氯甲烷萃取后有机相用无水硫酸镁干燥, 抽滤旋蒸, 得到黄色晶体 3.10 g. 产率为 77.9%. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm): δ 8.18 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz), 7.67-7.62 (m, 1H), 7.43-7.26 (m, 2H), 6.20 (s, 1H), 2.40 (s, 3H).

1.2.3 2-甲基苯并吡喃腈的制备(3) 化合物 2 (3.10 g, 19.4 mmol)溶于 4 mL 乙酸酐, 再加入丙二腈(1.44 g, 21.8 mmol), 回流 21 h, 旋蒸溶剂, 向圆底烧瓶中加入 5 mL 水并回流 30 min, 抽滤, 滤饼用乙醇重结晶, 得到淡红色固体 1.58 g. 产率为 39.3%. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm): δ 8.94 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 7.70-7.62 (m, 1H), 7.45-7.25 (m, 2H), 6.73 (s, 1H), 2.44 (s, 3H).

1.2.4 2-{2-[2-(4-羟基苯基)乙烯基]苯并吡喃-4-}丙二腈的制备(4, BPAD-2) 化合物 3(416.1 mg, 2.00 mmol)和对羟基苯甲醛(268.4 mg, 2.20 mmol)溶于 10 mL 正丙醇, 再加入 200 μ L 哌啶, 回流 10 h. 加水终止反应, 用乙酸乙酯/水萃取, 乙酸乙酯层旋蒸得粗产物. 粗产物经柱层析(乙酸乙酯/正己烷洗脱)纯化, 得固体 247.1 mg. 产率 39.6%. ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm): δ

8.92 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 7.75-7.71 (m, 1H), 7.60-7.47 (m, 4H), 7.45-7.43 (m, 1H), 6.95-6.84 (m, 3H), 6.68 (d, 1H, $J = 16.0$ Hz). MS: m/z 313 ($M^+ + H$).

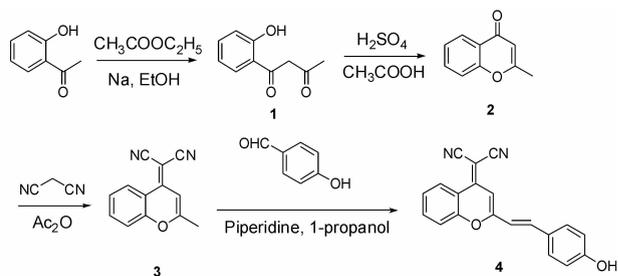


图 2 BPAD-2 的合成路线

Fig. 2 Synthesis route of BPAD-2

2.2.2 高效液相色谱测定 BPAD-2 色谱条件: 泵(LC-10AT);紫外检测器(SPD-10A);Cosmosil C18 色谱柱 (Nakalai Tesque, 5C₁₈-AR- II, 4.6 mm \times 150 mm);流动相(乙腈/水: 7/3);流速(1.0 mL/min);检测波长($\lambda = 254$ nm). 精密称取 BPAD-2 适量溶解于乙腈,并用乙腈稀释至 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,取 $5 \mu\text{L}$ 进样,记录色谱图.

2.2.3 荧光激发波长与荧光发射波长的测定 精密称取 BPAD-2 适量溶解于甲醇,并用甲醇稀释至 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. 应用荧光分光光度计进行荧光检测. 固定激发/发射波长并 $400 \sim 750$ nm 连续扫描发射/激发波长,绘制波形图像.

精密称取 BPAD-2 适量溶解于乙醇,并用 PBS 稀释至 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (乙醇含量 1%). 应用荧光分光光度计进行荧光检测. 固定激发/发射波长并 $400 \sim 750$ nm 连续扫描发射/激发波长,绘制波形图像.

2.2.4 A β 染色 配制浓度为 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的探针滴加覆盖 APP/PS1 转基因小鼠脑切片 (10 μm)^[9-11], 室温培育 10min; 切片按 40% 乙醇 (2min)、40% 乙醇 (2min)、纯水 (30 s) 的顺序进行漂洗, 风干后应用荧光倒置生物显微镜观察荧光斑点. 配制 0.125% 刚果红 (A β 染色剂) 滴加于直接相邻的脑切片, 按同法操作, 用于确认切片脑 A β 斑点的位置.

2.2.5 正常小鼠脑成像 取 BPAD-2 (2.0 mg/kg, 含 20% 二甲亚砜, 70% 生理盐水), 经尾静脉注射入正常小鼠体内 (♀, 6 w, 昆明种小鼠, 四川大学实验动物中心, 3 只/时间点). 分别于注射后 5、10、20、30 以及 60 min 时断头取脑并称量. 取未

注射药液的小鼠脑作为空白对照.

利用 QuickView 3000 光学成像系统对各时间点的脑进行成像. 激发光与发射光选择系统内自带波长 (激发光: 474 nm; 发射光: 586 nm). 其他成像参数分别为: exposure time (1 sec); vertical pixel shift speed (6.5); horizontal pixel shift RO speed (1 MHz); EM gain (0); binning (1 \times 1). 确定整脑为感兴趣区域 (ROI) 并计算荧光信号. 调节空白对照脑信号为 0 (sum = 0). 荧光信号由 QuickView 3000 软件计算而得. 最终的荧光信号通过脑重量进行校正 (荧光信号/脑重量).

3 结果

3.1 探针的设计与制备

分子识别与荧光技术是荧光探针应用的两个基本条件, 苯并吡喃具有平面刚性共轭结构, 是保持与 A β 亲和力的关键; 在苯并吡喃的两端分别引入推电子基团 (羟基) 和拉电子基团 (二氰基亚甲基), 通过中间的碳碳双键增加 $\pi-\pi^*$ 跃迁的共轭体系, 形成推-拉电子作用的共轭结构, 使探针分子产生的荧光向近红外光区移动. 以邻羟基苯乙酮为初始原料, 通过缩合反应合成了 BPAD-2, 并通过核磁共振氢谱、质谱进行了结构确认; 运用高效液相色谱进行 BPAD-2 的纯度确认, BPAD-2 在 4 min 处出峰, 纯度大于 99% (图 3).

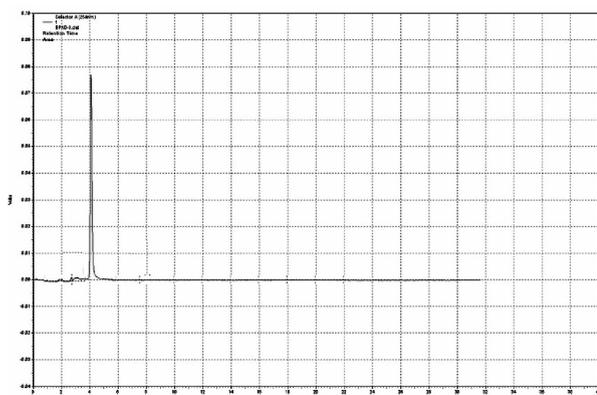


图 3 BPAD-2 的 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC chart of BPAD-2

3.2 BPAD-2 的荧光性质

如图 4 所示, BPAD-2 在甲醇中的激发与发射波长分别为 479 nm 和 601 nm. 当溶剂为 PBS 时, 激发与发射波长红移, 分别为 500 nm 和 658 nm, 具有近红外荧光特性. 近红外光区内生物体的自发荧光干扰较小, 在生物组织中穿透深度大,

BPAD-2 的光学性质显示了对 A β 进行近红外荧光成像的潜在能力。

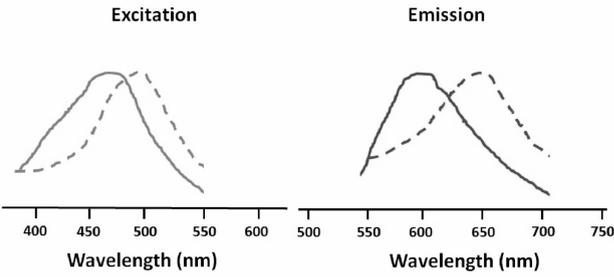


图 4 BPAD-2 的荧光光谱

实线为在甲醇中的光谱,虚线为 PBS 中的光谱

Fig. 4 Fluorescence spectra of BPAD-2

full line; in methanol, dotted line: PBS.

3.3 A β 染色

为了考察对 A β 的选择性和标记能力,将 BPAD-2 与脑内 A β 斑块在室温下培育,并通过刚果红对相临脑切片的染色确认脑内 A β 斑块的位置.结果如图 5 所示,BPAD-2 标记的荧光点与刚果红确认的 A β 斑块位置一致,标记点在显微镜下观察呈亮红色荧光.染色结果提示:BPAD-2 能够选择性结合 A β 斑块,并有效地荧光标记 A β 斑块.

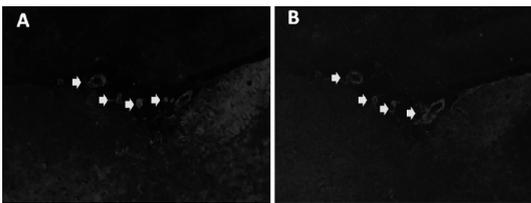


图 5 BPAD-2 对脑内 A β 斑块的荧光染色标记 (A),相临脑切片用刚果红染色以确认 A β 斑块位置 (B).

Fig. 5 Labeling of β -amyloid plaques was visualized by staining with BPAD-2 in AD brain section

(A); The adjacent section was stained with Congo red (B), a pathological dye commonly used for staining β -amyloid plaques.

3.4 正常小鼠脑成像

为了考察血脑屏障通过能力,取正常小鼠经尾静脉注入 BPAD-2 后进行脑部的荧光成像.结果如图 6 所示,注入 BPAD-2 的正常小鼠脑内迅速显示荧光信号,注射后 10 min 内荧光强度达到峰值;随着时间延长,荧光强度逐渐减弱,到达 60 min 时脑内荧光强度已降为进脑量峰值的 37%(图 7).

4 讨论

理想的 A β 标记,一方面需保证荧光探针与

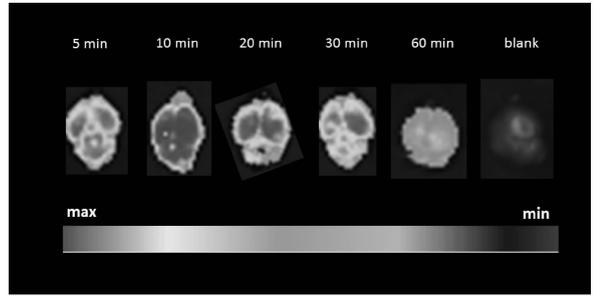


图 6 正常小鼠静脉注射 BPAD-2(2.0 mg/kg)后不同时间点的脑荧光成像
Ex 474 nm, Em 586 nm.

Fig. 6 Ex vivo fluorescence images of brains at different time points after intravenous injection of BPAD-2 (2.0 mg/kg) in normal mice
Ex 474 nm, Em 586 nm.

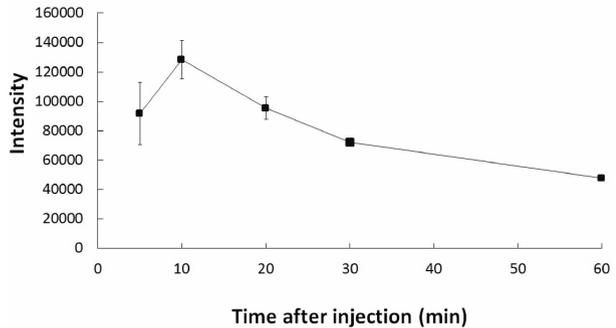


图 7 正常小鼠静脉注射 BPAD-2(2.0 mg/kg)后不同时间点脑荧光强度的变化
 $n=3$, Ex 474 nm, Em 586 nm.

Fig. 7 Fluorescence intensity of brains at different time points after intravenous injection of BPAD-2 (2.0 mg/kg) in normal mice
 $n=3$, Ex 474 nm, Em 586 nm.

A β 的选择性结合,另一方面荧光成像系统能够有效地捕获探针的荧光信号.近红外荧光染料的荧光团常具有较大的分子结构且带有电荷,因而不适合应用于脑内 A β 的标记.在设计探针时,通过苯并吡喃的平面刚性共轭结构保持与 A β 的结合性;在苯并吡喃的两端分别引入推电子基团(羟基)和拉电子基团(二氰基亚甲基),通过中间的碳碳双键增加 $\pi-\pi^*$ 跃迁的共轭体系,形成推-拉电子结构,使探针分子产生的荧光向近红外光区移动.脑内 A β 的染色结果说明 BPAD-2 能够选择性结合并荧光标记 A β 斑块.这也是苯并吡喃染料第一次成功地对 A β 进行标记.

A β 由神经细胞产生,并可进入脑脊液和血流,但主要倾向于形成聚集体或斑块沉积于脑内,并对神经元产生神经毒性.为了有效标记脑内 A β ,探

针应能够通过血脑屏障进入脑内, 因此考察了 BPAD-2 的血脑屏障通过能力. 据文献报道, 小于 600 Da 且脂溶性合适 (logP 2-5) 的分子能够以被动扩散的形式透过血脑屏障^[9]. BPAD-2 的分子量为 312, clogP 为 3.43 (ChemDraw Ultra 8.0 计算); 注入 BPAD-2 的正常小鼠脑内迅速显示荧光信号, 提示 BPAD-2 通过血脑屏障进入脑内, 且荧光信号能够被荧光成像系统捕获; 荧光信号的迅速减弱说明游离探针在脑内的滞留时间短; 由于正常小鼠脑内无 A β , 游离 BPAD-2 的快速排出有利于减少干扰荧光背景, 从而有利于提高成像质量.

本研究制备了一种具有推-拉电子结构的小分子苯并吡喃荧光染料 BPAD-2. BPAD-2 的最大发射波长位于近红外光区内, 具备适合近红外荧光成像的荧光性质; BPAD-2 选择性标记 A β , 并能够有效通过血脑屏障进入脑内. 本研究为 BPAD-2 开展 A β 的体内示踪及进一步活体动物成像实验研究奠定了重要基础.

参考文献:

- [1] Selkoe D J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy[J]. *Physiol Rev*, 2001, 81(2): 741.
- [2] Hardy J, Selkoe D J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics [J]. *Science*, 2002, 297(5580): 353.
- [3] Selkoe D J. Imaging Alzheimer's amyloid[J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(8): 823.
- [4] Mathis C A, Wang Y, Klunk W E. Imaging beta-amyloid plaques and neurofibrillary tangles in the aging human brain[J]. *Curr Pharm Des*, 2004, 10(13): 1469.
- [5] Weissleder R, Ntziachristos V. Shedding light onto live molecular targets [J]. *Nat Med*, 2003, 9(1): 123.
- [6] Hilderbrand S A, Weissleder R. Near-infrared fluorescence: application to in vivo molecular imaging [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2010, 14(1): 71.
- [7] Nesterov E E, Skoch J, Hyman B T, *et al.* In vivo optical imaging of amyloid aggregates in brain: design of fluorescent markers[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2005, 44(34): 5452.
- [8] 黄晓梅. 基于苯并吡喃的阴离子化学传感器及羧酰胺功能材料的研究[D]. 华东理工大学, 2011: 41.
- [9] Chapman P F, White G L, Jones M W, *et al.* Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice[J]. *Nat Neurosci*, 1999, 2(3): 271.
- [10] Bilkei-Gorzo A. Genetic mouse models of brain aging and Alzheimer's disease[J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 142(2): 244.
- [11] Kawarabayashi T, Younkin L H, Saido T C, *et al.* Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease[J]. *J Neurosci*, 2001, 21(2): 372.
- [12] 彭彩霞, 刘蓉, 王建枝. AD 转基因模型研究进展. 神经损伤与功能重建, 2007, 2(4): 197.