

树枝状大分子在荧光生物成像中的研究进展

左云飞,王 星,杨 飞,沈 红,吴德成*

(1. 中国科学院化学研究所,高分子物理与化学国家重点实验室,北京 100190;

2. 中国科学院大学,北京 100049)

摘要:树枝状大分子是一种具有精确三维结构的纳米材料。目前,对于树枝状大分子的研究,逐渐从合成和表征各式各样的树枝状大分子转向到对其特殊功能和应用的研究。传统的荧光成像探针大多数为小分子化合物,其发展受到特异性低、稳定性差、停留时间短、可修饰基团少和毒性大等缺点的限制。树枝状大分子具备独特的分子结构如大量可设计性的末端官能团和广阔的分子内空腔以及选择多样化的优势,使其在荧光生物成像领域中有良好的应用前景。本文重点介绍了基于树枝状大分子的有机荧光探针和量子点探针在生物成像方面最新的研究进展。

关键词:树枝状大分子; 荧光探针; 生物成像

引言

荧光成像是一种快速、方便的生物医学成像方法,可以特异性的、非破坏性的、实时或原位成像,是生物医学领域非常重要的检测手段,在毒理学、病理学、疾病的诊断和治疗等方面具有重要的意义^[1]。荧光成像探针对特定的细胞内或细胞外的分子可以产生或改变检测信号,而对比度在细胞、组织和器官的可视化成像过程中起着关键的作用。因此,发展灵敏度高,特异性强,稳定性好的荧光成像探针是生物成像的主要研究方向。但是,传统的荧光成像探针大多数为小分子化合物,其发展受到特异性低、稳定性差、停留时间短、可修饰基团少和毒性大等缺点的限制。通过开发基于高分子的生物荧光探针来克服传统荧光探针的缺陷是目前研究的一个热点^[2]。

树枝状大分子是近年来通过人工合成的一种新型纳米级的高分子材料,具有非常规整的树枝状三维结构,精确可控的分子量及尺寸,大量可设计性的末端官能团和广阔的分子内空腔^[3]。从 1998 年 Schlüter A D^[4]首次提出“树枝状大分子”这一名称至今,人们对于树枝状大分子的研究,从合成和表征各式各样的树枝状大分子逐渐转向到对其特殊功能和应用的研究。树枝状大分子具备独特的分子结构和选择多样化的优势使其在荧光生物成像领域有很大应用前景。很多研究表明,树形大分子可以提高荧光成像探针的耐光性和特异性^[5]。

基于树枝状大分子的荧光分子探针,按照荧光分子类型,可分为传统有机荧光探针和量子点(Quantum Dot, QD)荧光探针;从荧光基团的发光性质讲,有机荧光探针又可分为聚集淬灭(Aggregation Caused Quenching, ACQ)的荧光探针(见图 1A)和聚集发光(Aggregation Induced Emission, AIE)荧光探针(见图 1B)^[6]。

1 有机荧光分子

传统荧光小分子探针结构中一般含有芳香族结构,在水中难溶且有聚集的趋势;另一方面,当荧光分

10.14028/j.cnki.1003-3726.2016.09.018

收稿:2016-05-20;修回:2016-07-19;

基金项目:国家自然科学基金(21474115);

作者简介:左云飞(1993—),男,硕士,主要研究方向为设计合成生物成像探针;

* 通讯联系人,E-mail:dcwu@iccas.ac.cn.

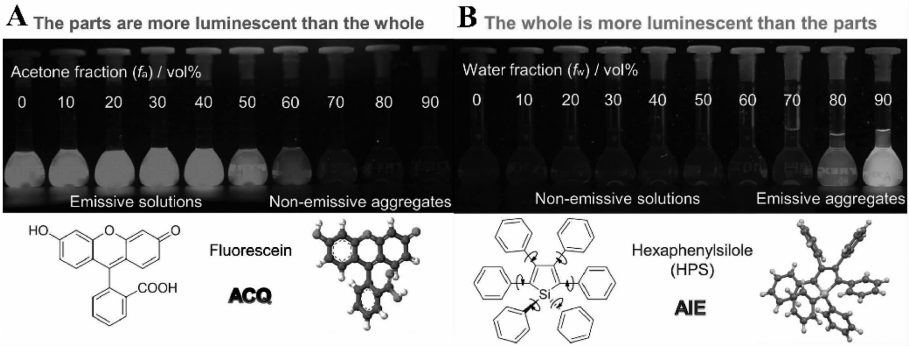


图 1 (A)ACQ 分子及其聚集淬灭现象和(B)AIE 分子及其聚集发光现象^[6]

Figure 1 (A) An ACQ molecule and its quenching phenomena, and (B) an AIE molecule and its quenching phenomena^[6]

子通过物理作用或化学作用结合到生物分子上时,这些荧光分子会自发地聚集。由于传统的荧光分子在聚集时,往往导致发射荧光的强度大幅减弱甚至淬灭,所以在实际使用过程中,为了避免荧光分子因聚集导致淬灭的影响,不仅需要严格控制荧光分子探针在很低的浓度范围内,还需要控制生物分子上荧光分子的数量^[6]。而很低浓度的荧光探针往往不能获得高荧光强度导致成像对比度不高,这给生物成像带来了很大困难。

1.1 聚集淬灭的荧光探针

呈现发散状的立体树状大分子作为荧光探针载体,能够提高特异性,增强稳定性,改善水溶性,有利于长循环并且可以降低毒性。目前,树枝状大分子在荧光成像的应用研究主要集中在通过化学键合和物理包埋荧光小分子的方式来开发新型树枝状大分子荧光探针。

苝酰亚胺(Perylene diimides, PDIs)具有共轭的平面结构(如图 2A 所示),是一种典型的 ACQ 分子。PDIs 及其衍生物消光系数高、荧光量子产量高、荧光颜色丰富、化学和光热性质稳定,广泛应用于荧光探针、有机光伏和生物医药领域^[7]。但是,PDIs 在生物医用领域的发展受到了聚集淬灭效应以及在有机溶剂中溶解度不高的限制,故需要改性成在有机溶剂或水中易溶解的 PDIs 衍生物。树枝状大分子结构具有大量可设计性的末端官能团,通过合成以 PDIs 为内核的树枝状大分子,能够得到溶解度好的荧光大分子,可有效抑制 π - π 堆积导致的荧光淬灭而应用到生物成像^[7]。

国内尹梅贞课题组以 PDIs 及其衍生物作为荧光发色基团为核,通过“点击”化学反应或 ATRP,合成了含有多种化学结构的树枝状荧光探针,实现不同荧光成像的应用需求(见图 2B)^[8]。国外 Müllen 等开发了一系列以 PDIs 为核的水溶性树枝状大分子荧光探针,包括非离子取代基的、阴离子取代基的和阳离子取代基的(见图 2C)^[8]。类似的方法也可以用在其它 ACQ 荧光分子改性上。

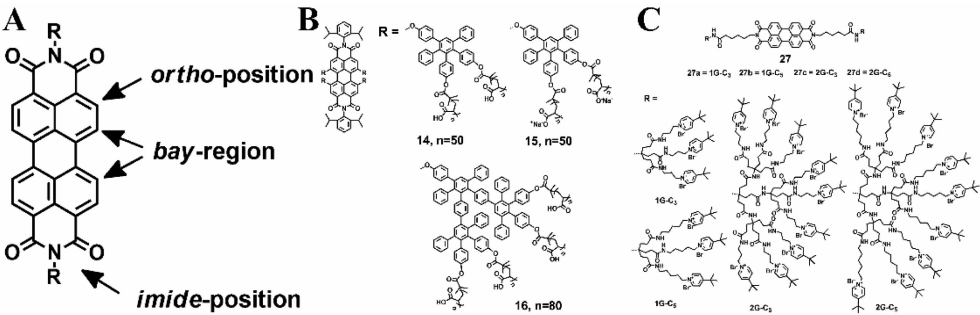


图 2 (A)苝酰亚胺的结构、(B)羧基化的苝酰亚胺树枝状大分子和(C)阳离子吡啶取代基的苝酰亚胺树枝状大分子^[8]

Figure 2 (A) General structure of PDIs, (B) PDIs with polymeric carboxylates, and (C) PDI-cored cationic pyridine dendrimers^[8]

除了以荧光分子为内核合成树形荧光探针外,还可以在树枝状分子的末端接上荧光分子,通过控制树枝状分子的尺寸大小调控荧光亮度,以及接枝不同的生色团改变荧光的颜色。用这种方法制得的树形荧光探针,不但可以实现荧光生色团局部有序的聚集,从而避免传统荧光分子 ACQ 效应的发生,而且有很高的摩尔吸光率(可达 $7 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$),化学性质稳定,适用于普通生物成像、特异性成像、传感和成像^[9]。

聚酰胺-胺(PAMAM)树枝状大分子因其结构独特、功能化容易和应用价值高引起了人们广泛的关注,是近年来迅速发展的一类聚合物^[10]。Albertazzi 等报道了基于 PAMAM 的 pH 荧光探针,通过调节树枝状荧光分子的物理化学性质,如选择合适的 pH 敏感荧光分子接枝到 PAMAM 末端,实现了在活海拉细胞中,能够有选择地对不同细胞器进行 pH 值的测量^[11]。此外,也可以通过物理作用,将树枝状大分子与荧光分子复合,形成荧光探针。如第 5 代 PAMAM 树枝状大分子末端有大量的氨基,经强烈的静电相互作用吸附荧光分子,加入交联剂 CaCl_2 ,通过双乳液法形成一个载药的双交联荧光纳米水凝胶,同时实现荧光成像和药物治疗(如图 3 所示)^[12]。

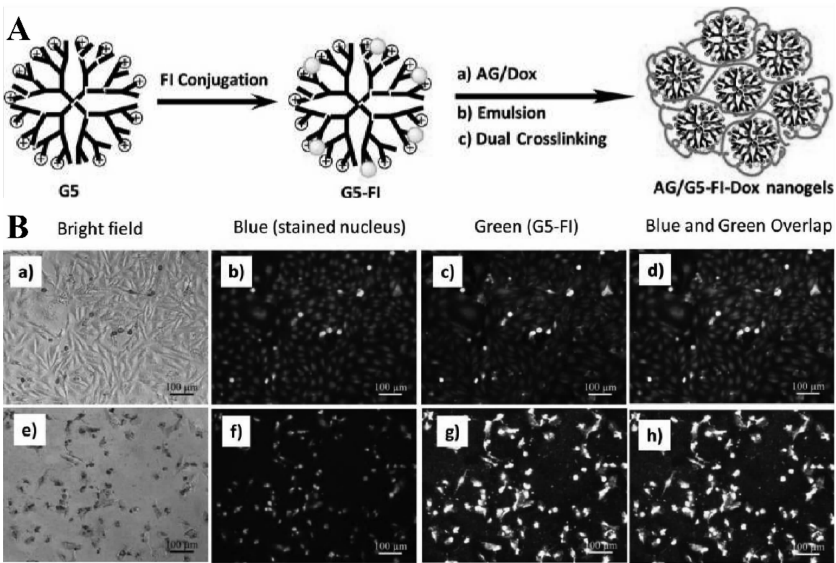


图 3 (A)AG/G5-FI-DOX 纳米水凝胶的制备过程示意图以及(B)a—d) 50 $\mu\text{g/mL}$ AG/G5-FI 纳米水凝胶和 e—h) 50 $\mu\text{g/mL}$ G5-FI 与 CAL-72 细胞共培养 48h 后的光学成像图^[12]

Figure 3 (A) The formation of AG/G5-FI-DOX nanogels, and (B) optical and fluorescence microscopy images of CAL-72 cells after 48h culture with (a—d) AG/G5-FI nanogels (50 $\mu\text{g/mL}$) and (e—h) G5-FI (50 $\mu\text{g/mL}$)^[12]

1.2 聚集发光的荧光探针

在 2001 年,唐本忠院士课题组发现了一个与以往 ACQ 荧光分子所不同的现象:如图 1B 所示,该噻咯分子(HPS)在溶液中几乎不发光,但随着不良溶剂的增多,荧光分子逐渐聚集,荧光强度随之增强^[13]。这种因聚集所导致荧光强度增强的现象被定义为“聚集诱导发光”。AIE 的发现给荧光探针设计提供了一种新的思路,AIE 型的荧光探针研究成为了人们关注的热点^[14~17]。结合树枝状分子独特的结构和 AIE 分子的特点,人们开发了很多新的功能材料,建立了 AIE 树枝状大分子体系^[18~22]。

最近,AIE 树枝状大分子在生物成像领域也有一些报道,如通过用 PAMAM 作为一个“分子胶”粘附上一种聚集发光型荧光分子 TCMPE,制备得到纳米复合物 $G_n\text{-TCMPE}$ ($n=0\sim4$),其荧光强度可以通过加入三氟乙酸的量来调节,研究还发现 $G_4\text{-TCMPE}$ 具有优良的耐光性和较低的细胞毒性,能够选择性地成像海拉细胞的细胞质(见图 4C)^[23]。这项研究为细胞荧光成像提供了一种新颖的通过非共价键形式构造纳米探针的方法(见图 4B)^[23]。

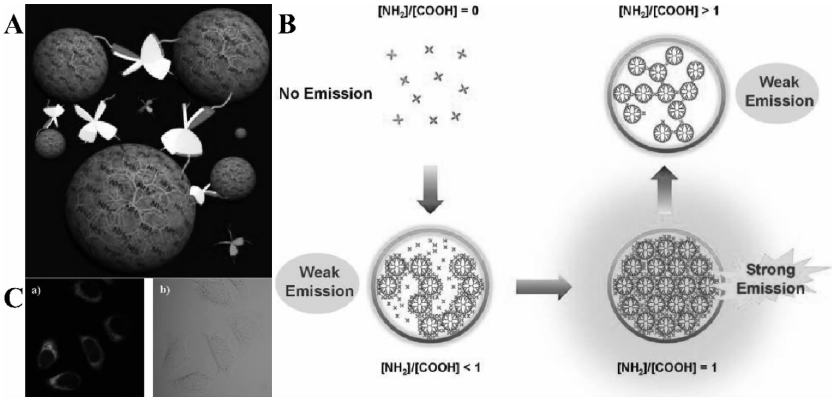


图 4 (A) G_n -TCMPE($n=0\sim4$)纳米粒子的结构示意图、(B)PAMAM 树枝状大分子与 TCMPE 的自组装行为示意图和(C)由 G_4 -TCMPE($E_x=375\text{nm}$)染色的海拉细胞成像图^[23]

Figure 4 (A) Schematic diagram of the nanoparticles G_n -TCMPE ($n=0\sim4$), (B) schematic diagram of self-assembly between PAMAM Dendrimer and TCMPE, and (C) images of HeLa cells stained by G_4 -TCMPE ($E_x=375\text{nm}$)^[23]

2 量子点

与有机荧光分子相比,QD 作为一种新的荧光材料,具有比有机荧光分子更出色的光学性质,如具备激发波长宽、发射波长窄且对称、荧光颜色可调控、发光效率高以及抗光漂白能力强等特点^[24],而且很容易受到量子点表面状态变化的影响,因此 QD 得到了大量科学家的关注和研究,在荧光生物成像领域可以作为有机荧光分子的替代物^[25]。但是由于 QD 高的比表面积,容易团聚并且会产生有毒的重金属离子,所以其生物应用一直受到特异性低、生物相容性差、生物降解难和毒性高等缺点的限制^[2]。要解决以上问题,通常可以采用高分子来修饰 QD。

经典的半导体量子点,一般为重金属的硫或硒化物。研究发现通过二氢硫辛酸 PAMAM 树枝状大分子物理包埋的对 pH 敏感的 CdSe/CdZnS 无机半导体纳米晶体,得到水溶性的稳定量子点,制得 pH 荧光探针,可以实现模拟人体生理环境 pH 值 6~8 范围的检测^[26]。

树枝状大分子内部有大量的空腔,也可以作为一个纳米反应器用来直接制备 QD。聚乙二醇单甲醚(MPEG)与超支化的聚酰胺-胺(HPAMAM)通过 pH 敏感的酰肼相连,制备得到以阳离子树枝状大分子为内核和 PEG 为外壳的多臂亲水性超支化聚合物 HPAMAM-*g*-PEG,可以作为一个纳米反应器在水溶液中制备 QD(如图 5 所示)^[27]。

树枝状大分子是一种纳米材料,其尺寸一般小于 2nm,本身就可以设计成有机纳米量子点,用来替代有毒的半导体量子点,实现荧光生物成像^[8]。Majoral 和 Blanchard-Desce 等发现一种树枝状大分子有非常大双光子吸收截面,能够发射荧光,或许可用作传统量子点的替代物(见图 6)^[28]。

3 其它

除了通过化学键合和物理包埋将荧光分子引入到树枝状大分子上以外,还可以设计合成自发蓝色荧光且无毒的 HPAMAM 纳米粒子,该粒子可被人肝癌细胞表面的血型糖蛋白受体识别,用于细胞的荧光成像(见图 7)^[29]。

类似的,一种超支化共轭聚电解质也被用于生物成像。它具有核壳结构,在水溶液中的荧光发射波长为 565nm,量子产率为 12%,斯托克斯位移为 143nm。它的 PEG 壳使得非特异性作用减低,同时与 HER2 的抗体相结合,可以特异性对 HER2 过量的癌症细胞成像^[30]。

除了有机荧光分子和量子点之外,有机无机配合物的荧光分子,如 Vinogradov 课题组采用内核对氧

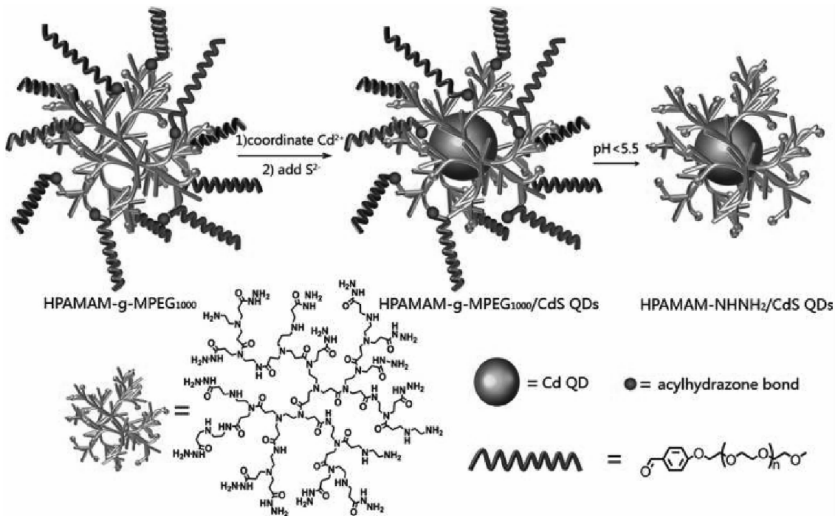


图 5 pH 敏感的水溶性 CdS QD/HPAMAM- g-MPEG 纳米复合材料的制备过程
Figure 5 Preparation of water-soluble CdS QD/HPAMAM- g-MPEG nanocomposites with pH-sensitive properties

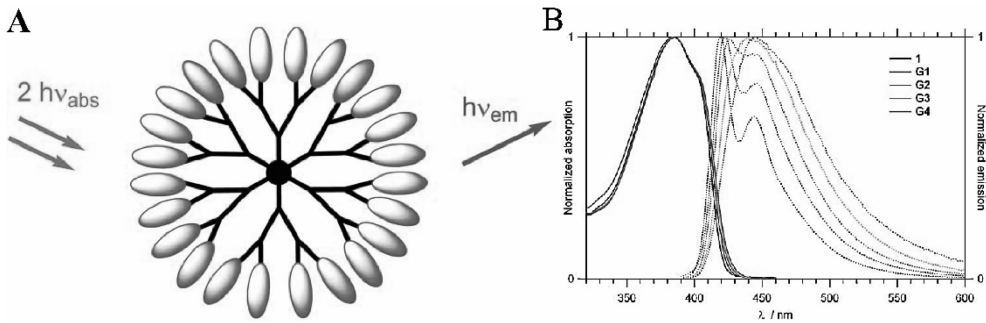


图 6 (A)树枝状有机“纳米量子点”的双光子吸收示意图和(B)荧光分子 1 与树枝状大分子 G1-G4 在甲苯中的归一化吸收和发射光谱^[28]

Figure 6 (A) Schematic representation of dendritic two-photon absorbing fluorescent organic “nanodots”, and (B) normalized absorption and emission spectra in toluene of dendrimers G1-G4 and model chromophore 1^[28]

气会淬灭的荧光探针金属卟啉配合物,在外围接上 PEG,得到树枝状纳米探针,可以实现对血管和组织(脑)中的氧气含量的成像^[31]。

4 结语

从正式提出树枝状大分子这个名称至今已有近二十年的时间,人们对于树枝状大分子的研究,从最初的合成和表征各式各样的树枝状大分子,逐渐转向到利用其独特的结构开发一些特殊功能和应用的研究。目前,可以通过物理或化学作用将树枝状大分子与荧光物质结合起来,开发新的功能性荧光探针,甚至树枝状大分子自身可以作为荧光材料用来取代量子点。除此之外,还出现了一些多功能性的探针,如利用树枝状大分子自身可以作为药物载体,开发了集成像诊断和靶向治疗为一体的树枝状大分子荧光探针。树枝状大分子表现出独特的性质和优势使其在荧光生物成像领域中有良好的应用前景。但是,目前应用研究还不是很多,对于树枝状大分子在生物医学成像的应用还在探索研究的阶段,距离临床大规模使用还存在一定的距离,实用的多功能性生物医用树枝状大分子还需进一步开发研究。

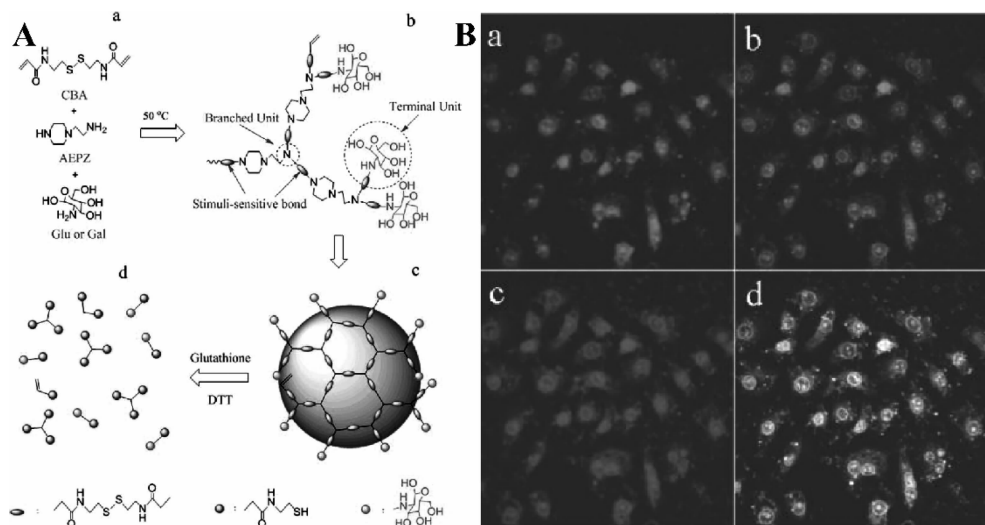


图 7 (A)HPAMAM 纳米粒子的制备过程和(B)N-Gal 与 HepG2 cells 细胞共培养 4h 后的激光共焦扫描显微镜图^[29]

Figure 7 (A) Synthesis of HPAMAM NPs, and (B) laser confocal scanning microscopic images of HepG2 cells after 4h of incubation with N-Gal NPs^[29]

参考文献:

- [1] Chen M J, Yin M Z. Prog Polym Sci, 2014, 39: 365~395.
- [2] Zhu Q, Qiu F, Zhu B S, Zhu X Y. RSC Adv, 2013, 3: 2071~2083.
- [3] 刘海峰, 王玉荣, 任艳. 高分子通报, 2005, 116~122.
- [4] Schluter A D. Top Curr Chem, 1998, 197: 165~191.
- [5] Kim Y, Kim S H, Tanyeri M, Katzenellenbogen J A, Schroeder C M. Biophys J, 2013, 10: 1566~1575.
- [6] Mei J, Hong Y, Lam J W Y, Qin A, Tang Y, Tang B Z. Adv Mater, 2014, 26: 5429~5479.
- [7] Liu K L, Xu Z J, Yin M Z. Prog Polym Sci, 2015, 46: 25~54.
- [8] Sun M M, Mullen K, Yin M Z. Chem Soc Rev, 2016, 45: 1513~1528.
- [9] Wolfbeis O S. Chem Soc Rev, 2015, 44: 4743~4768.
- [10] 牛书花, 王永, 张志娟, 付德刚, 孙岳明. 高分子通报, 2008, 106: 59~65.
- [11] Albertazzi L, Storti B, Marchetti L, Beltram F. J Amer Chem Soc, 2010, 132: 18158~18167.
- [12] Goncalves M, Maciel D, Capelo D, Xiao S, Sun W, Shi X, Rodrigues J, Tomas H, Li Y. Biomacromolecules, 2014, 15: 492~499.
- [13] Luo J, Xie Z, Lam J W, Cheng L, Chen H, Qiu C, Kwok H S, Zhan X, Liu Y, Zhu D, Tang B Z. Chem Commun, 2001, 1740~1741.
- [14] Zhu Z F, Qian J, Zhao X Y, Qin W, Hu R R, Zhang H Q, Li D Y, Xu Z P, Tang B Z, He S L. ACS Nano, 2016, 10: 588~597.
- [15] Mei J, Leung N L, Kwok R T, Lam J W, Tang B Z. Chem Rev, 2015, 115: 11718~11940.
- [16] Mei J, Hong Y, Lam J W Y, Qin A, Tang Y, Tang B Z. Adv Mater, 2014, 26: 5429~5479.
- [17] Kwok R T K, Leung C W T, Lam J W Y, Tang B Z. Chem Soc Rev, 2015, 44: 4228~4238.
- [18] Zeng Y, Li P, Liu X Y, Yu T J, Chen J P, Yang G Q, Li Y. Polym Chem, 2014, 5: 5978~5984.
- [19] Xu B, Zhang J B, Fang H H, Ma S Q, Chen Q D, Sun H B, Im C, Tian W J. Polym Chem, 2014, 5: 479~488.
- [20] Leung M, Lin Y S, Lee C, Chang C C, Wang Y X, Kuo C P, Singh N, Lin K R, Hu C W, Tseng C, Ho K. RSC Adv, 2013, 3: 2071~2083.
- [21] Huang G, Ma B, Chen J, Peng Q, Zhang G, Fan Q, Zhang D. Chem-eur J, 2012, 18: 3886~3892.
- [22] Hu R, Leung N L C, Tang B Z. Chem Soc Rev, 2014, 43: 4494~4562.
- [23] Liu X Y, Zeng Y, Liu J, Li P, Zhang D S, Zhang X H, Yu T J, Chen J P, Yang G Q, Li Y. Langmuir, 2015, 31: 4386~4393.
- [24] 杨永, 董晓庆, 张磊, 常津. 高分子通报, 2007, 98: 38~44.
- [25] Chang Y L, Liu N, Liu H, Yang Y M, Zhao Y L, Li Y P, Yuan H. Chem Res Chin Univ, 2015, 31: 514~518.
- [26] Somers R C, Lanning R M, Snee P T, Greytak A B, Jain R K, Bawendi M G, Nocera D G. Chem Sci, 2012, 3: 2980~2985.
- [27] Zhu L, Shi Y, Tu C, Wang R, Pang Y, Qiu F, Zhu X, Yan D, He L, Jin C, Zhu B. Langmuir, 2010, 26: 8875~8881.

- [28] Mongin O, Krishna T R, Werts M H V, Caminade A M, Majoral J P, Blanchard-Desce M. *Chem Commun*, 2006, 915~917.
- [29] Yang W, Pan C Y, Liu X Q, Wang J. *Biomacromolecules*, 2011, 12: 1523~1531.
- [30] Pu K Y, Shi J, Cai L, Li K, Liu B. *Biomacromolecules*, 2011, 12: 2966~2974.
- [31] Devor A, Sakadzic S, Saisan P A, Yaseen M A, Roussakis E, Srinivasan V J, Vinogradov S A, Rosen B R, Buxton R B, Dale A M, Boas D A. *Neurosci J*, 2011, 31: 13676~13681.

An Overview of Dendrimers Used in Fluorescent Bioimaging

ZUO Yun-fei, WANG Xing, YANG Fei, SHEN Hong, WU De-cheng*

(1. *State Key Laboratory of Polymer Physics & Chemistry, Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China*; 2. *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*)

Abstract: Dendrimers are a kind of nanomaterials with precise three dimensional structures. Recently, an emerging attention is received from synthesis and characterization of dendrimers towards their functions and applications. Currently, most of traditional fluorescence imaging probes developed are small molecules, but the weak specificity, poor stability, short duration time, and high toxicity greatly limit their applications. Dendrimers with many designable terminal functional groups and large intramolecular cavities are promising for applications in fluorescent biological imaging due to their diversity and unique molecular structures. Herein, we mainly introduce the recent progress of dendritic organic fluorescent probes and quantum dots probes for bioimaging.

Key words: Dendrimers; Fluorescent probes; Bioimaging