DOI：10.19789/j.1004-9398.2024.03.002
文献引用：常子彦，姚颖芳，徐珍珍，等．胰岛素淀粉样纤维的近红外聚集诱导发光荧光探针[J]．首都师范大学学报（自然科学版），2024，45（3）：15-24. CHANG Z Y，YAO Y F，XU Z Z，et al. Aggregation-induced emission（AIE）active NIR probe of insulin amyloid fibrils[J]. Journal of Capital Normal University（Natural Science Edition），2024，45（3）：15-24.

胰岛素淀粉样纤维的近红外聚集诱导发光荧光探针*

常子彦，姚颖芳，徐珍珍**，廖　清，付红兵

（首都师范大学化学系，光功能材料与器件重点实验室，北京　100048）

摘要：为了快速检测淀粉样纤维以及深入研究淀粉样纤维化过程的动力学和结构特性的机理，实现对阿尔茨海默病（AD）等的早期监测，本文设计了一种两亲性的聚集诱导发光（AIE）荧光探针（E）-1-丁基-4-（4-（二苯胺基）苯乙烯基）吡啶-1-溴化鎓（BSTI）。荧光探针BSTI表现出高的结合亲和力、高的开关比、高的光稳定性和良好的双光子激发荧光特性，并兼具适当的相对分子质量以及可穿越血脑屏障的潜能。当其与牛胰岛素淀粉样原纤维结合后，表现出强烈的近红外（NIR）荧光发射，开关比>100。此外，基于BSTI的淀粉样原纤维的双光子荧光成像也表现出较高的信噪比。BSTI有望成为检测体内淀粉样原纤维的理想探针，并应用于AD的早期监测。

关键词：聚集诱导发光；荧光探针；胰岛素淀粉样原纤维；近红外发射
中图分类号：O64　　**文献标志码**：A

Aggregation-induced emission（AIE）active NIR probe of insulin amyloid fibrils*

CHANG Ziyan，YAO Yingfang，XU Zhenzhen**，LIAO Qing，FU Hongbing

（Key Laboratory of Optical Functional Materials and Devices，Department of Chemistry，Capital Normal University，Beijing　100048）

Abstract：In order to study the mechanism of rapid detection of amyloid fibrils and the kinetic and structural properties of the amyloid fibrillation process for early monitoring of Alzheimer’ disease（AD），this paper designed an amphiphilic AIE fluorescent probe（E）-1-butyl-4-（4-（diphenylamino）styryl）pyridin-1-ium bromide（BSTI）. The BSTI exhibits high binding affinity，high on-off ratio，high photostability and good two-photon excitation fluorescence properties，as well as appropriate molecular weight and the potential to cross the blood-brain barrier. When combined with bovine insulin amyloid fibrils，it exhibits strong NIR emission with an on/off ratio >100. In addition，BSTI-based two-photon fluorescence imaging of amyloid fibrils also exhibited a high signal-to-noise ratio. Which make BSTI an ideal probe for detecting amyloid fibrils in vivo and early monitoring of AD.

收稿日期：2024-02-28
* 国家自然科学基金项目（22275125，22150005，22090022）；国家重点研发计划项目（2022YFA1204402，2018YFA0704805，2018YFA0704802）；北京市自然科学基金项目（KZ202110028043）；北京市教育委员会研发计划项目（KM202210028016，BPHR202203119）
** 通信作者：xuzhenzhen@cnu.edu.cn

Keywords: aggregation-induced luminescence; fluorescent probe; insulin amyloid fibrils; near-infrared emission
CLC: O64 **DC**: A

0 引 言

蛋白质错误折叠和聚集形成的淀粉样纤维聚集体会引发如阿尔茨海默病(Alzheimer' disease, AD)等神经退行性疾病[1]。淀粉样原纤维斑块的形成和聚集是AD的重要病理特征之一[2]。因此,通过动态监测淀粉样原纤维,研究蛋白质纤维化过程对进一步了解神经系统疾病,特别是AD至关重要。

自从美国食品药品监督管理局批准了第一个淀粉样纤维成像探针以来,针对蛋白质淀粉样斑块的荧光探针开发取得了重要进展[3]。蛋白质淀粉样纤维化斑块的检测有圆二色谱法[4]、原子力显微镜[5]、扫描电镜[6]和小分子荧光检测[7]等方式。如Dyrager等[8]设计合成了推拉式苯并噻唑衍生物检测淀粉样聚集体的荧光探针;Zhang等[9]基于姜黄素的结构,在末端引入电子供体和受体,设计了姜黄素衍生物,用于和蛋白质淀粉样原纤维特异性结合。另外,牛胰岛素因其结构简单、相对分子质量小、易于形成研究所用的成熟纤维而使其成为研究蛋白淀粉样变性的良好模型[10-11]。染料硫黄素T(thioflavin T, ThT)作为商业化的荧光探针,也被广泛应用于淀粉样纤维荧光成像[12-15]。然而,聚集荧光猝灭效应、探针荧光与生物背景自荧光范围难以区分、血脑屏障穿透有限等固有缺陷严重阻碍了这些荧光探针在体内淀粉样纤维检测中的应用[16-17]。

近年来,聚集诱导发光(aggregation-induced luminescence, AIE)荧光探针被认为是一种具有前途的理想的检测手段,其在溶液状态基本不发光,但在聚集态的时候会发出很强的荧光[18]。由于AIE活性探针能够特异性地与淀粉样纤维结合并发射荧光,因此成为检测蛋白纤维发生过程的理想选择对象[19-20]。2019年,Fu等[21]设计合成了近红外AIE荧光探针QM-FN—SO_3,该探针具有超高信噪比(signal to noise ratio, S/N)(S/N=50)、与Aβ斑块结合亲和力高、有效的血脑屏障透过性、高性能近红外发射等特点,实现了活体Aβ斑块的原位实时高保真成像。理想的AIE荧光探针应具有以下特性:(1)高水溶性,这保证了探针在水中的良好分散性,避免了初始聚集带来的背景干扰,确保了结果的可靠性;(2)适当的疏水基团,这确保其能够与淀粉样纤维的疏水区域结合,对分子内运动进行限制,从而实现高强度的荧光发射以及对淀粉样纤维化的准确监测;(3)激发和发射波长处于红外区域,这使得探针能够与生物基底自发荧光有效分离,减少光散射,实现深层组织穿透,同时最小化对生物体的光损伤,从而提高了检测的准确性和可靠性[22-24]。

近年来,尽管在淀粉样纤维的AIE荧光探针方面取得了一系列进展,但是还有很多问题仍亟待突破,比如新的分子结构设计以及高性能探针材料的开发等。本文设计了一种结构简单、具有两亲性的AIE近红外荧光探针(E)-1-丁基-4-(4-(二苯胺基)苯乙烯基)吡啶-1-溴化鎓((E)-1-butyl-4-(4-(diphenylamino)styryl)pyridin-1-ium bromide, BSTI),并用于淀粉样原纤维的近红外光(near infrared, NIR)荧光检测,通过表征基本光物理性质和作为淀粉样纤维探针性能,探讨其作为体内检测和淀粉样原纤维成像的理想探针的可能,并为理想探针的开发提供实验指导和理论依据。

1 材料和方法

1.1 试剂

用于有机合成的4-二苯胺基苯甲醛、无水Na_2SO_4、NaCl、K_2CO_3、无水$MgSO_4$、丙三醇、Al_2O_3、硅胶均购自阿法埃莎(中国)化学有限公司,使用时未经进一步纯化;分析纯哌啶、四氢呋喃、4-甲基-1-丁基吡啶溴盐、无水乙醇、二氯甲烷、石油醚、丙酮、乙酸乙酯(EA)、甲醇、甲苯和浓HCl购自北京化学试剂公司;ThT和牛胰岛素购自北京索莱宝科技有限公司,使用时未经进一步纯化。实验用水均为超纯水。

1.2 仪器

使用美国奥豪斯公司生产的AP250D型号的分析天平称样品和试剂质量;使用日本岛津公司生产的UV-VIS-NIR 3600型紫外-可见吸收光谱仪和Horiba FluoroMax-4-NIR型荧光光谱仪测试溶液吸收、发射光谱及荧光量子产率;使用德国布鲁克公司的Advance型核磁共振及美国赛默飞世尔科技的Themo Scientific Orbitrap Exploris 480型高分辨质谱仪确定分子结构;使用德国徕卡公司的Leica SP5

型双光子成像光谱仪获取双光子成像光谱;使用日本日立株式会社生产的Hitachi H-7650型场发射透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)表征样品微观形貌;使用德国默克公司的Milli-Q型仪器制备超纯水,电阻率为18.2 MΩ·cm。

1.3　BSTI的合成

将0.230 g 1-丁基-4-甲基溴化吡啶鎓、0.274 g 4-二苯胺基苯甲醛和20 mL乙醇加入圆底烧瓶中,于50 ℃的条件下搅拌1 h;加入2滴哌啶作为催化剂,加热并回流过夜,冷却至室温(溶液呈暗红色);加H_2O淬灭反应,分别用30 mL二氯甲烷提取混合溶液5次,并合并有机相;用20 mL饱和NaCl溶液清洗有机相2次;用无水Na_2SO_4干燥过夜后,用硅胶柱色谱法进行柱层析纯化(洗脱液是体积比为8∶1的二氯甲烷与甲醇的混合溶液),并得到亮橙色固体,相关合成过程如图1所示。

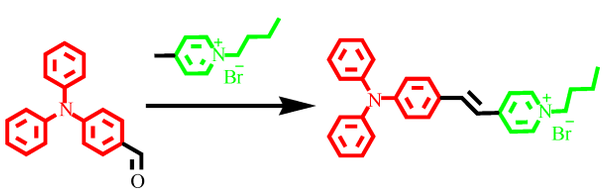


图1　(E)-1-丁基-4-(4-(二苯胺基)苯乙烯基)吡啶-1-溴化鎓(BSTI)的合成示意

1.4　BSTI亲脂性测定

亲脂性是衡量探针穿过血脑屏障的重要物理量。(1)将2 mL正辛醇加入2 mL 2.00 μmol/L的水溶液中,然后以3 000 r/min、离心半径为20 cm、5 min离心并分离出辛醇相的有机物,标记为混合物1;(2)加入2 mL H_2O,按照上述步骤再进行一次离心并分离,取出水相物质,标记为混合物2;(3)将混合物1和混合物2倒入比色皿中,在激发波长为465 nm、激发和发射狭缝宽度为2.5 nm的条件下测试荧光强度(F),相关结果分别记为F_{L1}、F_{L2},将数据代入公式$\log P=\log(F_{L1}/F_{L2})$,求出$\log P$,即在有机相(辛醇)和水相中分配系数的对数。

1.5　胰岛素原纤维聚集物的制备与表征

将5 mg胰岛素溶解在0.01 mol/L HCl中,并使用0.2 μm过滤器过滤溶液,在混合器中以600 r/min、60 ℃持续搅拌24 h;冷却溶液,取出胰岛素原纤维,在4 ℃条件下保存;用Tris-HCl(pH 7.4)缓冲溶液稀释上述溶液20倍,获得测试样品,在80 kV的电压,利用TEM分析成像。

1.6　解离常数测定

用饱和结合法测定探针与牛胰岛素纤维解离常数。具体实验操作方法如下:取25 μL 5 mg/mL成熟牛胰岛素纤维,加入1 500 μL Tris-HCl溶液,得到83 mg/L原纤维混合液,再加入不同物质的量浓度梯度的探针(设置探针在溶液中的最终含量为1.00~20.00 μmol/L),在室温条件下,锡箔纸包裹混合溶液试剂瓶,避光情况下振荡10 s,待探针与淀粉样纤维充分结合后再测荧光光谱,同时记录混合溶液在最大发射波长时的荧光强度值,待荧光强度变化不大时,停止测试。用单位点结合方程拟合采集的实验数据,测定荧光探针与淀粉样纤维的解离常数(K_d)。

1.7　胰岛素原纤维的原位荧光探针监测

将ThT和BSTI分别加入胰岛素溶液中,在60 ℃,600 r/min持续搅拌孵育;每小时从孵育混合物中取出含探针的胰岛素溶液25 μL,然后用Tris-HCl(pH 7.4)缓冲液稀释。胰岛素、BSTI和ThT的最终含量分别为83 mg/L、2.00和2.00 μmol/L。

1.8　BSTI作为原位探针的动力学聚集实验

实验中BSTI的物质的量浓度固定为3.81 μmol/L,牛胰岛素纤维的物质的量浓度为5.80~17.50 μmol/L,在探针物质的量浓度不变的条件下,单体孵育中每隔1 h取出5份不同体积的混合溶液,分别为15、20、25、30和35 μL;重复上述操作10次,直至取到10 h内的混合溶液。将上述的混合液进行稀释,再依次测定最大荧光强度,做时间与荧光强度的关系图。实验重复3次。

将实验得到的光谱数据使用AmyloFit软件(https://amylofit.com)进行聚集动力学的理论分析。

2　实验结果

2.1　BSTI的合成与表征

4-甲基-1-丁基-吡啶溴盐和4-二苯胺基苯甲醛在乙醇中发生缩合反应,得到BSTI目标分子,利用核磁共振氢谱与质谱对其进行分析,相关结果如图2所示。核磁共振氢谱结果表明产物含有13组峰,且峰面积的比例与目标产物的质子数一致;质谱结果显示质荷比(m/z)=405.210 6,而理论计算的分子离子峰m/z=405.233 1,二者相符,表明合成得到了BSTI。

BSTI分子的相关光物理表征结果如图3所示。在辛醇相和水相中的荧光光谱(图3(a))结果显示,$\log P$=1.13。不同物质的量浓度BSTI在水溶液中吸

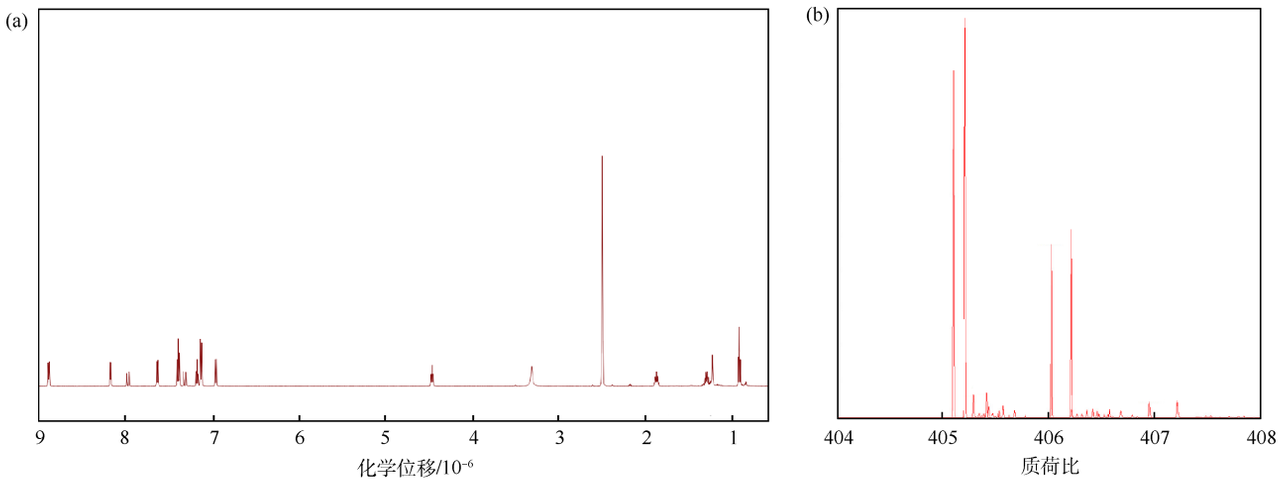
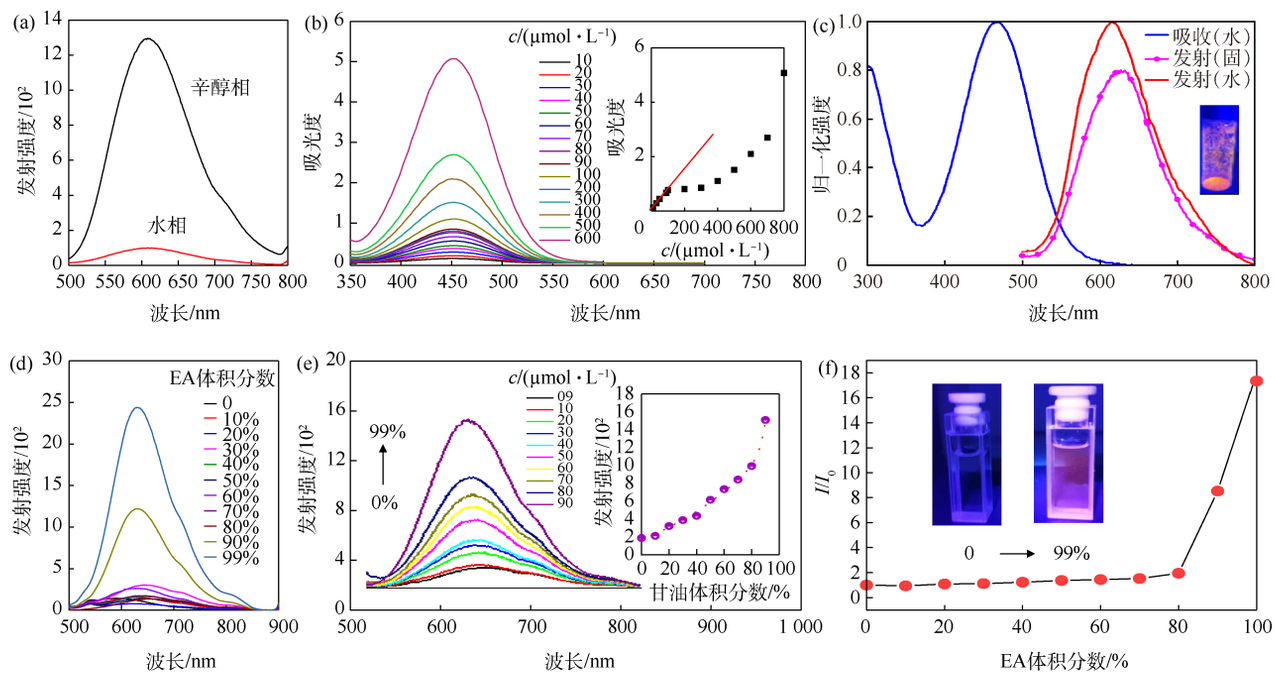


图2　化合物BSTI的结构表征

(a)核磁共振氢谱;(b)质谱



注:c为物质的量浓度。

图3　BSTI的光物理表征

(a)水相和辛醇相中的荧光光谱;(b)不同浓度在H_2O中的吸收光谱及最大吸收强度线性关系;(c)在H_2O和固态中的归一化吸收光谱和发射光谱;(d)在H_2O-乙酸乙酯(EA)混合溶液中的发射光谱;(e)甘油-乙醇混合物中的BSTI发射光谱与甘油含量的关系;(f)α_{AIE}与EA含量的关系

收光谱和发射光谱结果表明,其在455 nm处表现出最大吸收,通过紫外-可见滴定法测定(图3(b))BSTI在水中的溶解度可达100.00 μmol/L,在1.00~2.00 μmol/L具有较好的线性关系,为A=20 086c+2 005,R^2=0.993 22,式中:A为吸光度,c为物质的量浓度,R为线性相关度,则BSTI在水中摩尔消光系数为20 086 L/(mol·cm)。BSTI在水中荧光量子产率(Φ)极低,Φ=0.1%;而BSTI粉末却在626 nm左右表现出强烈的红光发射,Φ=20.0%,比在水中高出100倍,这表明BSTI是一个AIE荧光探针[25-27]。BSTI在不同溶剂中的光物理参数统计如表1所示,最大吸收峰的位置在溶剂中大体相同、差别不大,而发射峰的位置差别较大,并且峰位置变化与极性相关。这说明BSTI是一种典型的扭曲的分子内电荷转移(twisted intramolecular charge transfer,TICT)分子。BSTI在不良溶剂EA和良溶剂H_2O混合溶剂

中的发射光谱如图 3(d)所示,随着 EA 体积的增大,荧光强度增加,在 EA 体积分数为 90% 和 99% 时,荧光显著增强。将最大发射波长对应的荧光强度与 EA 的体积分数作图(图 3(f)),得到 I/I_0 的最大值是 18,即 AIE 指数 α=18,表明 EA 体积分数为 99% 时的最大荧光强度比在纯 H_2O 增强了 18 倍,实现了“开-关”(ON-OFF)。由于 AIE 分子发光受溶剂黏度的高度影响[28-29],探究了 BSTI 分子在不同比例乙醇/甘油混合溶液中的荧光强度(图 3(e)),随着甘油含量的增加,BSTI 的荧光强度增加了 8 倍,表明黏度限制了 BSTI 分子内旋转,这再次证实了 BSTI 具有 AIE 活性。

2.2　BSTI 与淀粉样纤维结合性能表征

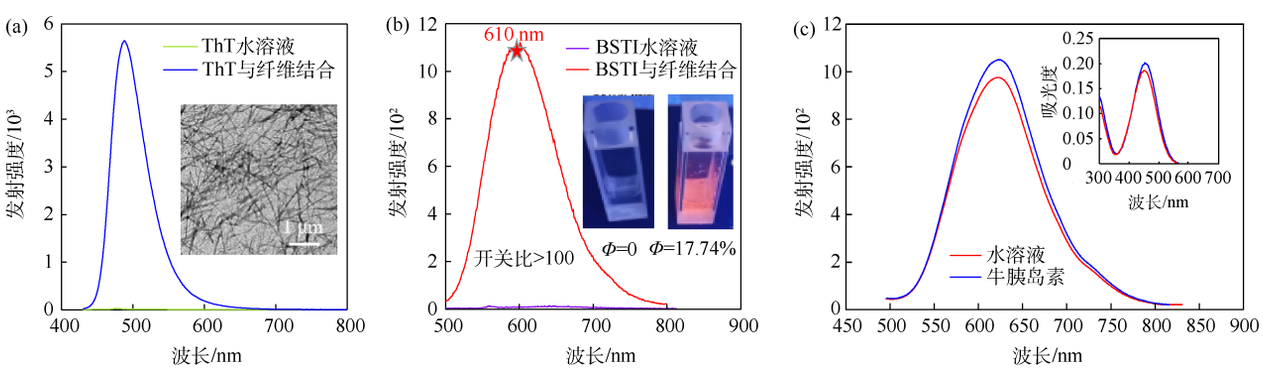
为了探究 BSTI 与淀粉样纤维的结合能力与机制,根据之前报道的方法孵育牛胰岛素纤维[30]。ThT 在缓冲溶液基本没有发光,加入孵育的成熟纤维后,荧光强度明显增强,最大发射峰位置在 489 nm 处(图 4(a));插图中的 TEM 图像显示,孵育出的成熟纤维,呈现细丝状,长度大约是几微米,测得对应的宽度 7~10 nm,与文献[30]的结果相一致,成功孵育了实验所需的牛胰岛素纤维。BSTI 在 Tris-HCl 溶液中呈弱发射状态(图 4(b)),然而在加入成熟的胰岛素原纤维后,观察到强烈的 NIR 荧光,增强倍数超过 100 倍,同时实现了从 626~610 nm 的蓝移。作为一种典型的 TICT 活性分子,蓝移表明 BSTI 分子具有疏水区域,能够与淀粉样原纤维结合。相比之下,加入天然牛胰岛素后,BSTI 在 Tris-HCl 溶液中仍保持弱发射性,吸收和发射光谱无明显差异(图 4(c))。

为了定量评价 BSTI 与淀粉样原纤维的结合亲和力,采用荧光滴定法得到了 BSTI/原纤维的 K_d。当胰岛素原纤维质量浓度为 83 mg/L 时,BSTI 的 K_d=3.81 μmol/L(图 5(a)),ThT 的 K_d=4.56 μmol/L(图 5(b)),表明 BSTI 的结合亲和力比 ThT 更强。在不同盐浓度和 pH 缓冲液条件下,BSTI 与牛胰岛素纤维结合后的荧光强度变化不大,这排除了静电相互作用在 BSTI 与淀粉样纤维结合中起主导作用的可能(图 5(c~e))。在 ThT/原纤维聚集溶液中加入 BSTI 后,ThT 在 485 nm 处的荧光强度降低,而在 610 nm 处的发射峰强度显著增加(图 5(f)),这表明了 ThT/原纤维复合物向 BSTI/原纤维复合物的转变。当添加 BSTI 的物质的量浓度达到 1.00 μmol/L 时,

表 1　BSTI 在不同溶剂和胰岛素中的光物理数据

溶剂	摩尔消光系数	折射率	最大吸收波长/nm	最大发射波长/nm	斯托克斯位移/cm^{-1}	荧光量子产率/%
H_2O	80.40	1.333	455	626	6 004	0.10
乙醇	24.30	1.361	476	650	5 624	1.83
丙酮	20.70	1.359	465	674	6 669	0.92
四氢呋喃	7.58	1.407	460	632	5 866	7.43
二氯甲烷	9.08	1.424	510	663	4 525	3.70
中药	4.80	1.445	499	631	4 192	9.80
甲苯	2.38	1.375	475	590	4 103	9.28
胰岛素	—	—	468	610	4 974	17.74

注:—指无数据。



注:ThT 为染料硫黄素 T;插图为成熟纤维的透射电子显微镜图;Φ 为荧光量子产率。

图 4　BSTI 与淀粉样纤维结合在不同溶液的光谱性能表征

(a)Tris-HCl 体系中 ThT 的发射光谱;(b)Tris-HCl 体系中 BSTI 的发射光谱;(c)水体系中 BSTI 的吸收和发射光谱

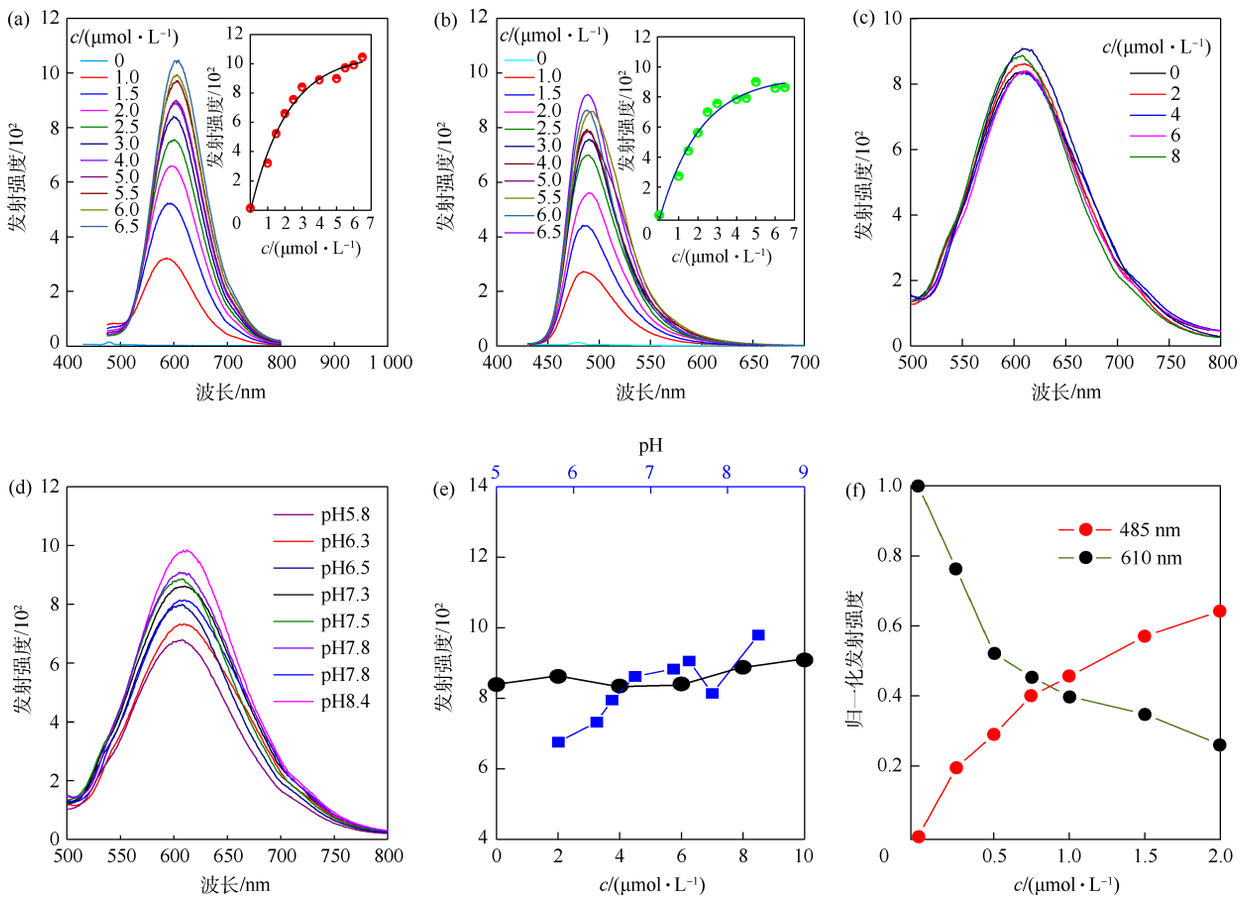


图5　BSTI与淀粉样纤维结合机制研究

(a)BSTI与牛胰岛素淀粉样纤维饱和结合实验;(b)ThT与牛胰岛素淀粉样纤维饱和结合实验;(c、d)BSTI在不同盐浓度、pH时的胰岛素纤维溶液中的荧光光谱;(e)最大发射强度与NaCl物质的量浓度和pH的关系;(f)BSTI取代ThT的荧光光谱

BSTI对ThT的置换效率接近60%,这表明BSTI具有疏水区域,能够与ThT竞争相同的结合位点。上述结果表明BSTI与牛胰岛素纤维的结合力强于ThT。

由于BSTI分子具有NIR荧光发射以及较高亲和力,因此探索其作为荧光探针监测淀粉样纤维化动态过程的可能性。淀粉样原纤维的形成过程大致分为3个步骤:(1)淀粉样原纤维成核阶段;(2)在晶体核上连续延伸;(3)达到平衡[31]。分别用BSTI和ThT作为非原位荧光探针,做监测牛胰岛素淀粉样纤维化过程(0~11 h)的荧光光谱(图6(a、b)),得到荧光探针发射强度的浓度曲线(图6(c))。表明随着时间的推移,二者最大荧光发射峰强度呈S形增强,最后趋于稳定,这与文献[32-33]的报道一致。此外,BSTI对成核阶段的反应时间明显早于ThT,说明BSTI对原纤维的检测更敏感,在早期孵育期就可以检测到微聚集的原纤维。

使用BSTI作为原位探针,验证BSTI是否对纤维化聚集过程有影响。用BSTI作为原位探针时(图7(a、b)),其S曲线的荧光强度、拐点和平台周期与BSTI作为非原位探针的平台周期(图6(c))基本一致。为了避免光谱测试中的误差,本文采集了BSTI存在下孵育的纤维的TEM图像,如图7(c)所示。与图4(a)中的插图比较,二者在形貌上没有太大差异,都呈现的是细丝纤维状,长度约几十纳米,宽度为10 nm。进一步以BSTI作为原位探针进行了动力学聚集实验,研究了胰岛素淀粉样纤维化的机制。不同初始胰岛素蛋白单体浓度下的BSTI荧光强度与时间关系如图7(d)所示,将得到的数据进行聚集动力学的理论分析[34],研究单体聚集化机制,可以得到半衰期与初始蛋白浓度对数之间的指数为-1.534(图7(e));进一步拟合初始蛋白浓度与孵育时间关系如图7(f)所示,不同物质的量浓度的曲线生长均符合S型生长情况,而且各个曲线之间相互不影响。

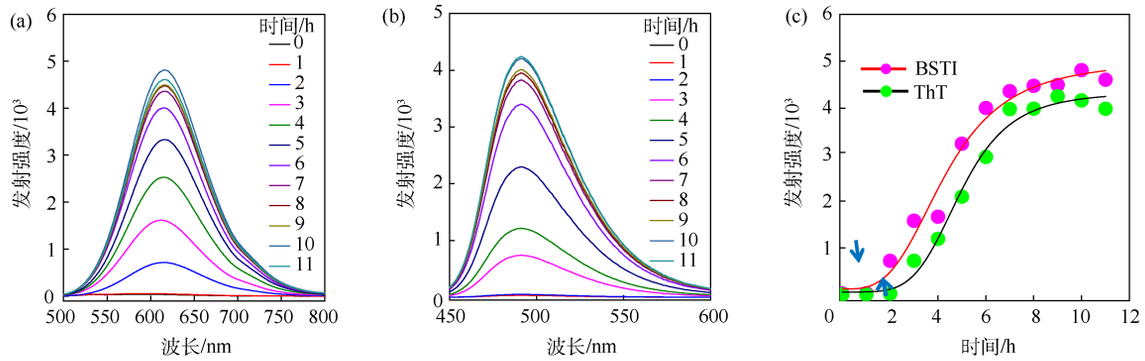


图 6　牛胰岛素淀粉样纤维化过程检测

(a、b)BSTI 和 ThT 探针监测牛胰岛素淀粉样纤维化过程的荧光光谱;(c)BSTI 和 ThT 最大荧光发射峰强度与时间的关系

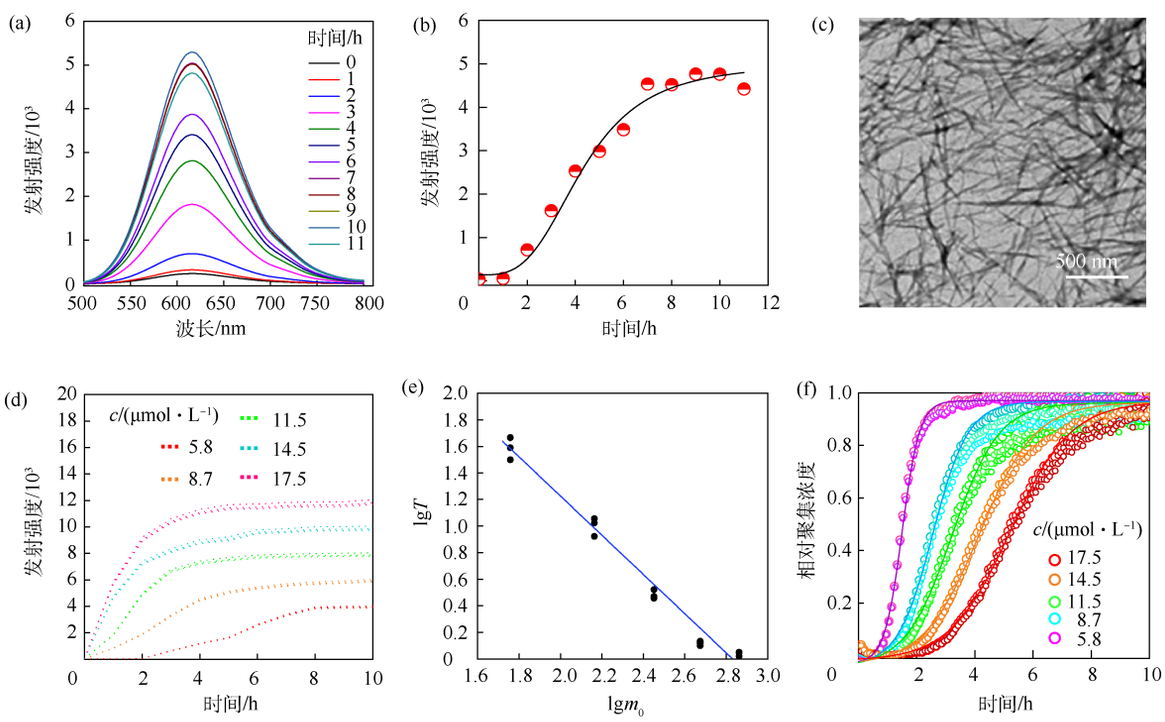


图 7　BSTI 作为原位探针的动力学聚集实验

(a)BSTI 探针监测牛胰岛素淀粉样纤维化过程的荧光光谱;(b)BSTI 最大荧光发射峰强度与时间的关系;(c)胰岛素 BSTI 存在下孵育得到的 TEM 图像;(d)不同物质的量浓度胰岛素和恒定物质的量浓度的 BSTI 作为原位探针的聚集实验动力学曲线;(e)最初以可溶形式存在的一半蛋白质聚集的时间与初始单体浓度的函数关系;(f)不同物质的量浓度胰岛素标准化实验数据的全局拟合

2.3　BSTI 光稳定性与双光子成像

分别用 BSTI 和 ThT 同时染色牛胰岛素淀粉样纤维的共聚焦图像,结果如图 8(a、b)所示。红色通道和绿色通道中均能看到与淀粉样纤维聚集物形貌相符的明亮荧光,BSTI 和 ThT 成像的淀粉样纤维聚集物的存在和分布结果几乎一致。BSTI 和 ThT 的 *S*/*N* 定量评价结果如图 8(c)所示,BSTI 作为探针成像的 *S*/*N* 比明显高于 ThT。用 450 nm 连续激发 ThT 和 BSTI 同一个固定点位置的时间超过 1 800 s,光稳定性结果如图 8(d)所示,二者的荧光强度均随着时间的延长而衰减。在高密度光持续照射 1 800 s 后,BSTI 和 ThT 的荧光强度分别降低至初始值的 85% 和 60%。利用 BSTI 对淀粉样纤维进行双光子激发共聚焦成像,结果如图 8(e)所示,在 830 nm 的飞秒激光脉冲激发下,可得到强的双光子成像图,同时观察到原纤维的精细结构。BSTI 与原纤维结合强度的测试结果如图 8(f)所示,背景荧光有强的 *S*/*N*、分辨率高,可以合理地预测,BSTI 在组织成像方面的额外优势还包括优越的分辨率,以及双光子近红外成像。

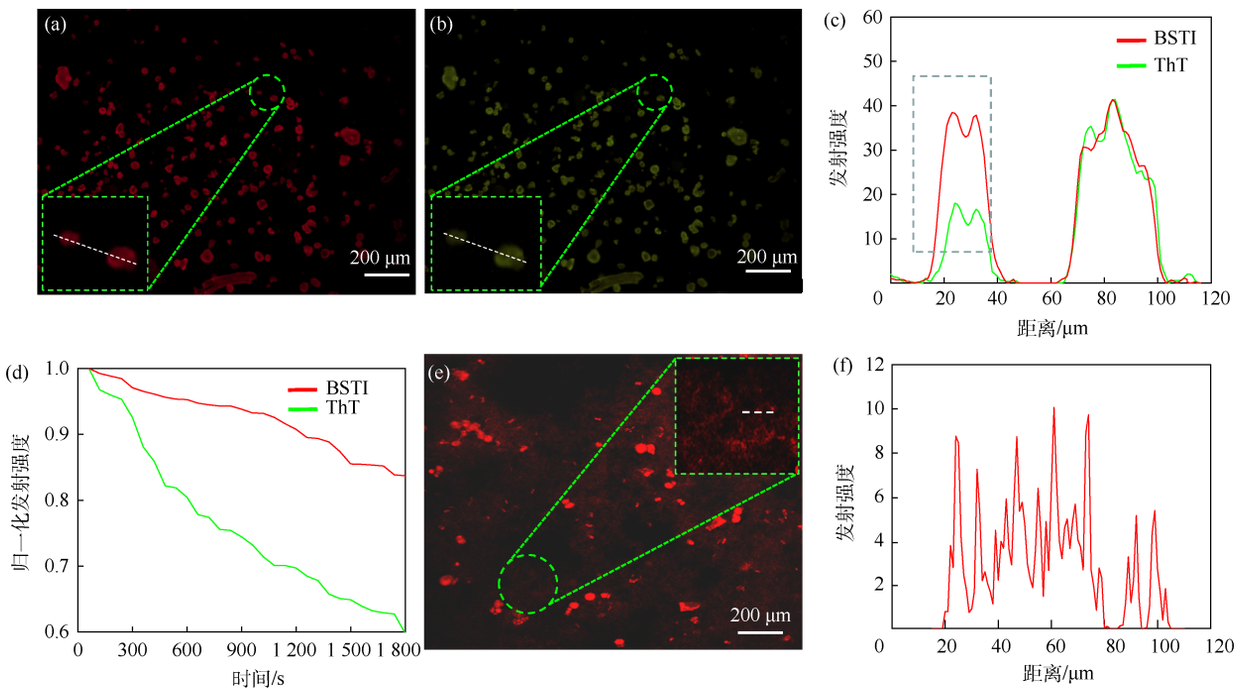


图8　BSTI探针对胰岛素纤维的荧光成像

(a、b)BSTI和THT共同染色牛胰岛素淀粉样纤维的共聚焦图像;(c)BSTI和ThT与原纤维结合的强度曲线;(d)BSTI和ThT的光稳定性比较;(e)平衡阶段淀粉样蛋白结构的双光子扫描发光图像;(f)图8(e)中BSTI与原纤维结合的强度谱

3　讨　论

3.1　BSTI分子设计及基本性质表征

溴化吡啶离子基团赋予了BSTI在水中卓越的溶解性能,这一特性对于生物荧光探针的应用至关重要。同时,通过巧妙地引入亲脂性三苯胺基团,本文成功地提高了BSTI的亲脂性,从而增强了其与纤维疏水区域的结合能力。紫外-可见滴定实验进一步证实了BSTI在水中的良好溶解度,这一优势使其成为生物体内应用材料的有力候选者。此外,亲脂性测试结果显示,BSTI不仅具备良好的亲脂性,而且相对分子质量较小。这一特点尤为重要,因为血脑屏障对药物的穿透性有严格限制,通常只允许亲脂性强且相对分子质量为400~500的小分子药物通过。因此,BSTI有望顺利穿透血脑屏障,为淀粉样纤维的体内检测提供了新的可能。这一发现对于生物医学领域的研究具有深远意义。

3.2　BSTI与淀粉样纤维结合性能表征

BSTI展现出与天然蛋白的非相互作用特性,却能特异性地与胰岛素原纤维结合。无论是在原位还是非原位的探针应用中,BSTI均能清晰地揭示成熟纤维的形貌。值得注意的是,当BSTI与牛胰岛素单体共同孵育时,所观察到的纤维形貌与单独孵育时的形貌高度一致。这一结果有力地证明了BSTI作为探针,在纤维化的研究过程中并未引入任何显著的影响。

通过分析,可以确定纤维的成核过程遵循二次成核动力学过程,且反应级数为2。这一结果与实验数据高度吻合,进一步证实了二次成核在纤维化过程中的主导地位。重要的是,当BSTI作为原位探针时,其在纤维生长过程中的表现并未对纤维化产生明显的阻碍或促进作用。这些结果不仅进一步支持了BSTI与淀粉样纤维的特异性结合能力,而且为其在监测蛋白质纤维化过程中的应用提供了有力证据。因此,BSTI有望成为一种有效的工具,实现对淀粉样纤维化过程的早期动态监测。

为了更深入地理解BSTI与纤维化的关系,未来的研究可以进一步探索BSTI与不同类型的淀粉样纤维的结合机制,以及其在更复杂生物体系中的应用潜力。此外,通过结合先进的成像技术和计算模拟方法,也可以更直观地揭示BSTI在纤维化过程中的动态行为和作用机制。

3.3　BSTI光稳定性与双光子成像

光稳定性对于荧光探针在生物成像中的应用至关重要,其决定了探针在持续激发下的荧光强度稳定性。与常用的蛋白质淀粉样纤维探针ThT相

比,BSTI在长期动态生物成像中展现出卓越的光稳定性,这一优势使得BSTI在长时间观察生物过程时能够保持稳定的荧光信号,从而提高成像的准确性和可靠性。

双光子显微成像技术因其穿透深度强、对生物样品损伤小以及高分辨率等特点,在生物学研究中占有重要地位。BSTI探针的D-π-A离子型分子结构赋予了其强推拉偶极特性,这一特性有效地保证了大的双光子吸收截面[35-37]。因此,BSTI探针具有强大的双光子激发近红外荧光能力,这使得其在生物成像方面展现出高分辨率和高组织穿透深度等显著优势。这些优势使得BSTI探针在复杂的生物环境中能够实现更深层次的成像观察,为生物学研究提供了有利的工具。

BSTI探针凭借其卓越的光稳定性和双光子激发近红外荧光能力,在生物成像领域展现出巨大的应用潜力。未来的研究可以进一步探索BSTI探针在生物体内的分布和代谢过程,以及其在不同生物模型中的应用效果,为生物医学研究提供新的视角和方法。

参 考 文 献

[1] JUN Y W, CHO S W, JUNG J, et al. Frontiers in probing Alzheimer's disease biomarkers with fluorescent small molecules[J]. ACS Central Science, 2019,5(2):209-217.

[2] YUAN Y, ALMOHAMMADI H, PROBST J, et al. Plasmonic amyloid tactoids[J]. Advanced Materials, 2021,33(51):2106155.

[3] JIA L, WANG W, YAN Y, et al. General aggregation-induced emission probes for amyloid inhibitors with dual inhibition capacity against amyloid β-protein and α-synuclein[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2020,12(28):31182-31194.

[4] TANAKA M, KAWAKAMI T, OKINO N, et al. Acceleration of amyloid fibril formation by carboxyl-terminal truncation of human serum amyloid A[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2018, 639: 9-15.

[5] SO M, KIMURA Y, YAMAGUCHI K, et al. Polyphenol-solubility alters amyloid fibril formation of α-synuclein[J]. Protein Science, 2021,30(8):1701-1713.

[6] NESTEROV E E, SKOCH J, HYMAN B T, et al. In vivo optical imaging of amyloid aggregates in brain: design of fluorescent markers[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2005,44(34):5452-5456.

[7] RAYMOND S B, SKOCH J, HILLS I D, et al. Smart optical probes for near-infrared fluorescence imaging of Alzheimer's disease pathology[J]. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 2008, 35 (Suppl 1):S93-S98.

[8] DYRAGER C, VIEIRA R P, NYSTRÖM S, et al. Synthesis and evaluation of benzothiazole-triazole and benzothiadiazole-triazole scaffolds as potential molecular probes for amyloid-β aggregation[J]. New Journal of Chemistry, 2017,41(4):1566-1573.

[9] ZHANG X L, TIAN Y L, ZHANG C, et al. Near-infrared fluorescence molecular imaging of amyloid beta species and monitoring therapy in animal models of Alzheimer's disease[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015,112(31):9734-9739.

[10] SUN Y. The creation of synthetic crystalline bovine insulin[J]. Protein & Cell, 2015,6(11):781-783.

[11] YUZU K, LINDGREN M, NYSTROM S, et al. Insulin amyloid polymorphs: implications for iatrogenic cytotoxicity[J]. RSC Advances, 2020, 10(62): 37721-37727.

[12] MORA A K, MURUDKAR S, ALAMELU A, et al. Benzothiazole-based neutral ratiometric fluorescence sensor for amyloid fibrils[J]. Chemistry (A European Journal), 2016,22(46):16505-16512.

[13] NEEDHAM L M, WEBER J, VARELA J A, et al. ThX-a next-generation probe for the early detection of amyloid aggregates[J]. Chemical Science, 2020, 11(18): 4578-4583.

[14] MUDLIAR N H, PETTIWALA A M, AWASTHI A A, et al. On the molecular form of amyloid marker, auramine O, in human insulin fibrils[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2016,120(49):12474-12485.

[15] NAIR R V, PADMANABHAN P, GULYÁS B, et al. Fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based ThT free sensing of beta-amyloid fibrillation by carbon dot-Ag composites[J]. Plasmonics, 2021,16(3):863-872.

[16] GALLARDO-FERNANDEZ M, HORNEDO-ORTEGA R, CEREZO A B, et al. Melatonin, protocatechuic acid and hydroxytyrosol effects on vitagenes system against alpha-synuclein toxicity[J]. Food and Chemical Toxicology, 2019,134:110817.

[17] ZIAUNYS M, SAKALAUSKAS A, SMIRNOVAS V. Identifying insulin fibril conformational differences by thioflavin-T binding characteristics[J]. Biomacromolecules, 2020,21(12):4989-4997.

[18] LUO J, XIE Z, LAM J W Y, et al. Aggregation-induced emission of 1-methyl-1, 2, 3, 4, 5-pentaphenylsilole[J]. Chemical Communications, 2001, 18(12): 1740-1741.

[19] CHEN J, GAO M, WANG L, et al. Aggregation-induced emission probe for study of the bactericidal mechanism of antimicrobial peptides[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2018, 10(14): 11436-11442.

[20] CUI Y, YUAN C, TAN H, et al. Plasmon-enhanced fluorescent sensor based on aggregation-induced emission for the study of protein conformational transformation [J]. Advanced Functional Materials, 2019, 29(18): 1807211.

[21] FU W, YAN C, GUO Z, et al. Rational design of near-infrared aggregation-induced-emission-active probes: in situ mapping of amyloid-β plaques with ultrasensitivity and high-fidelity[J]. Journal of the American Chemical Society, 2019, 141(7): 3171-3177.

[22] ZHANG Q, YU P, FAN Y, et al. Bright and stable NIR-II J-aggregated AIE dibodipy-based fluorescent probe for dynamic in vivo bioimaging [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2021, 60(8): 3967-3973.

[23] BAI H, HE W, CHAU J H C, et al. AIEgens for microbial detection and antimicrobial therapy [J]. Biomaterials, 2021, 268: 120598.

[24] NORBETR B, GRAEME S, TONY E, et al. No variation of physical performance and perceived exertion after adrenal gland stimulation by synthetic ACTH (Synacthen®) in cyclists [J]. European Journal of Applied Physiology, 2008, 104: 589-600.

[25] HEO C H, SARKAR A R, BAIK S H, et al. A quadrupolar two-photon fluorescent probe for in vivo imaging of amyloid-beta plaques[J]. Chemical Science, 2016, 7(7): 4600-4606.

[26] XU H, WU S L, LIN N J, et al. A NIR fluorescent probe for rapid turn-on detection and bioimaging of hypochlorite anion [J]. Sensors and Actuators B (Chemical), 2021, 346: 130484.

[27] FAN X, SIRIS R, HARTWIG O, et al. Rapid and large-area visualization of grain boundaries in MoS_2 on SiO_2 using vapor hydrofluoric acid [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2020, 12(30): 34049-34057.

[28] LI W, DING Y, TEBYETEKERWA M, et al. Fluorescent aggregation-induced emission (AIE)-based thermosetting electrospun nanofibers: fabrication, properties and applications [J]. Materials Chemistry Frontiers, 2019, 3(11): 2491-2498.

[29] KWOK R T K, LEUNG C W T, LAM J W Y, et al. Biosensing by luminogens with aggregation-induced emission characteristics[J]. Chemical Society Reviews, 2015, 44(13): 4228-4238.

[30] LYU Z, LI L, MAN Z, et al. Polarity-activated super-resolution imaging probe for the formation and morphology of amyloid fibrils [J]. Nano Research, 2020, 13(9): 2556-2563.

[31] REDDY P H, OLIVER D M. Amyloid beta and phosphorylated tau-induced defective autophagy and mitophagy in Alzheimer's disease[J]. Cells, 2019, 8(5): 488.

[32] HUANG H, LI P, ZHANG M, et al. Graphene quantum dots for detecting monomeric amyloid peptides [J]. Nanoscale, 2017, 9(16): 5044-5048.

[33] CHAKRABORTY P, RIVIERE G, LIU S, et al. Co-factor-free aggregation of tau into seeding-competent RNA-sequestering amyloid fibrils [J]. Nature Communications, 2021, 12: 4231.

[34] MEISL G, KIRKEGAARD J B, AROSIO P, et al. Molecular mechanisms of protein aggregation from global fitting of kinetic models[J]. Nature Protocols, 2016, 11(2): 252-272.

[35] LI L, SHANG X, WANG S, et al. Bilayered hybrid perovskite ferroelectric with giant two-photon absorption [J]. Journal of the American Chemical Society, 2018, 140(22): 6806-6809.

[36] SUN L, ZHU W, WANG W, et al. Intermolecular charge-transfer interactions facilitate two-photon absorption in styrylpyridine-tetracyanobenzene cocrystals [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2017, 56(27): 7831-7835.

[37] KIM H, KIM D, PARK J, et al. Hong-Ou-Mandel interference of two independent continuous-wave coherent photons[J]. Photonics Research, 2020, 8(9): 1491-1495.

(责任编辑:王 媛)