

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 32720131150553

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

智能铁蛋白纳米探针用于光动力治疗过程中 caspase-3 的实时活性监测研究

Activatable Ferritin Nanocomplex for Real-Time Monitoring of Caspase-3 Activation during Photodynamic Therapy (PDT)

王 静 静

指导教师姓名: 朱雷 副教授

专业名称: 流行病学与卫生统计学

论文提交日期: 2016 年 4 月

论文答辩日期: 2016 年 5 月

学位授予日期: 2016 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2016 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（朱雷）课题（组）的研究成果，获得（朱雷）课题（组）经费或实验室的资助，在（分子影像转化医学）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：王静静

2016 年 5 月 24 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

- () 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。
() 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：王静静
2016 年 5 月 24 日

目 录

中文摘要	I
英文摘要	III
第一章 绪论	1
1.1 分子影像技术诊断肿瘤	1
1.1.1 光学成像	2
1.1.2 X 射线计算机断层扫描 (CT)	3
1.1.3 磁共振成像 (MRI)	3
1.1.4 放射性核素成像	3
1.1.5 超声成像 (US)	4
1.1.6 不同成像方式优缺点	5
1.2 可活化探针的发展和应用	5
1.2.1 通过酶活化的可活化探针的设计和应用	7
1.2.2 通过 pH 活化的可活化探针的设计和应用	9
1.2.3 通过活性氧活化的可活化探针的设计和应用	11
1.2.4 通过 miRNAs 活化的可活化探针的设计和应用	11
1.3 细胞凋亡及其监测方法	12
1.4 肿瘤常见治疗方法及其优缺点	14
1.5 本论文选题依据和设想	15
第二章 可活化探针 FABP/ZnPc 的合成	16
2.1 前言	16
2.2 材料和方法	17
2.2.1 主要实验仪器和试剂	17
2.2.2 铁蛋白的提取和纯化	19
2.2.3 基于铁蛋白的可活化探针的制备	19
2.2.4 SDS-PAGE 检测蛋白	20
2.2.5 蛋白浓度的测定	22
2.2.6 终产物及中间产物的表征	22

2.3 结果和讨论	22
2.3.1 设计合成基于铁蛋白的可活化纳米探针 FABP/ZnPc.....	22
2.3.2 可活化探针 FABP/ZnPc 的结构表征	24
2.4 本章小结	28
第三章 探针 FABP/ZnPc 在实时监测细胞凋亡酶 caspase-3 中的应用	30
3.1 前言	30
3.2 材料和方法	31
3.2.1 可活化探针 FABP 的生物活性检测	31
3.2.2 细胞结合试验.....	31
3.2.3 光敏剂诱导细胞凋亡的可行性验证.....	31
3.2.4 细胞水平下监测 caspase-3 活性	31
3.2.5 可活化探针 FABP/ZnPc 诱导细胞凋亡验证.....	32
3.2.6 用 FITC-Annexin V 检验细胞凋亡.....	33
3.3 结果和讨论	34
3.3.1 可活化探针 FABP/ZnPc 监测酶 caspase-3 的可行性分析	34
3.3.2 FRT-C3 的细胞结合力检测	35
3.3.3 用 FABP/ZnPc 监测细胞凋亡的可行性分析.....	36
3.3.4 在活细胞中实时监测光动力治疗过程中酶 caspase-3 的活性.....	37
3.3.5 通过免疫印记实验和 Annexin V 染色来证明凋亡的产生	38
3.4 本章小结	39
第四章 探针 FABP/ZnPc 的光学成像和光动力治疗	40
4.1 前言	40
4.2 材料和方法	41
4.2.1 体外活性氧检测	41
4.2.2 细胞毒性检测.....	41
4.2.3 动物模型的构建	42
4.2.4 小鼠体内荧光成像和光动力治疗	42
4.2.5 肿瘤组织石蜡包埋及切片	42
4.2.6 切片的 HE 染色.....	43

目录

4.3 结果和讨论	44
4.3.1 FABP/ZnPc 光动力治疗可行性分析.....	44
4.3.2 FABP/ZnPc 对细胞的光动力治疗研究.....	45
4.3.3 可活化探针 FABP/ZnPc 在体内成像中的应用.....	47
4.3.4 可活化探针 FABP/ZnPc 用于肿瘤的光动力治疗.....	48
4.4 本章小结	51
第五章 总结和展望	52
攻读硕士期间已发表和待发表和论文情况	53
参 考 文 献	54
致 谢	64

厦门大学博硕士论文摘要库

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Molecular Imaging on Diagnosis of Tumors	1
1.1.1 Optical Imaging.....	2
1.1.2 X-ray Computed Tomography (CT)	3
1.1.3 Magnetic Resonance Imaging (MRI)	3
1.1.4 Radionuclide Imaging.....	3
1.1.5 Ultrasound (US)	4
1.1.6 Advantages and Disadvantages of different Imaging Modalities	5
1.2 Development and Application of Activatable Probes	5
1.2.1 Design and Application of Enzyme-activated Activatable Probes	7
1.2.2 Design and Application of pH-activated Activatable Probes.....	9
1.2.3 Design and Application of ROS-activated Activatable Probes	11
1.2.4 Design and Application of miRNAs -activated Activatable Probes	11
1.3 Apoptosis and the Methods of Monitoring Apoptosis	12
1.4 Advantages and Disadvantages of Treatments of Cancer	14
1.5 Basis and Design of this Dissertation	15
Chapter 2 Synthesis of Activatable Probes FABP/ZnPc	16
2.1 Introduction	16
2.2 Materials and Method	17
2.2.1 Instruments and Materials.....	17
2.2.2 The Extraction and Purification of Ferritin	19
2.2.3 Preparation of Ferritin-based Activatable Probe	19
2.2.4 Detection of Ferritin by SDS-PAGE.....	20
2.2.5 Determination of Ferritin Concentration	22
2.2.6 Characterization of the Products.....	22
2.3 Results and Discussion	22
2.3.1 Design and Synthesis of Activatable Probes FABP/ZnPc.....	22
2.3.2 Characterization of FABP/ZnPc	24

2.4 Summary	28
Chapter 3 The Application of FABP/ZnPc for Real-time Monitoring Caspase-3 Activities	30
3.1 Introduction	30
3.2 Materials and Method.....	31
3.2.1 Biochemical Activity Detection of FABP.....	31
3.2.2 Cell Uptake	31
3.2.3 Feasibility of Apoptosis Induced by Photosensitizer.....	31
3.2.4 The Monitoring of Caspase-3 Activitiy.....	31
3.2.5 Verification of Apoptosis Induced by FABP/ZnPc	32
3.2.6 Verification of Apoptosis by FITC-Annexin V Staining	33
3.3 Results and Discussion	34
3.3.1 Feasibility of Monitoring Caspase-3 by FABP/ZnPc.....	34
3.3.2 Cell Uptake of FRT-C3.....	35
3.3.3 Feasibility of Monitoring Apoptosis by FABP/ZnPc	36
3.3.4 Monitoring of Caspase-3 in Living Cells	37
3.3.5 Verification of Apoptosis by Western-Blot and Annexin V Staining	38
3.4 Summary	39
Chapter 4 Optical Imaging and Photodynamic Therapy	40
4.1 Introduction	40
4.2 Materials and Method.....	41
4.2.1 In Vitro Detection of ROS	41
4.2.2 Cytotoxicity Assay.....	41
4.2.3 Animal Model.....	42
4.2.4 In Vivo Optical Imaging and Photodynamic Therapy.....	42
4.2.5 Tissue Sections of Tumor	42
4.2.6 HE Staining of Tumor.....	43
4.3 Results and Discussion	44
4.3.1 Photodynamic Therapy by FABP/ZnPc	44
4.3.2 Photodynamic Therapy of cells by FABP/ZnPc.....	45
4.3.3 The Application of FABP/ZnPc in Optical Imaging.....	47
4.3.4 FABP/ZnPc for Photodynamic Therapy	48
4.4 Summary	51
Chapter 5 Conclusions and Outlooks	52

Table of Contents

Publications during Master Study	53
References	54
Acknowledgements	64

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

随着分子影像学的发展,治疗诊断学已成为现在医学研究的热点。目前各种先进的医学成像技术已被用在医学成像,例如光学成像,磁共振成像(MRI),单光子发射计算机断层扫描(SPECT),正电子发射断层扫描(PET)和光声成像,从而促进了分子成像探针和医学成像的发展。分子成像探针结构复杂,能够结合特定生物标志物并产生成像信号用于疾病的诊断。迄今为止,一些成像探针已应用到临床,例如 ^{18}F -FDG,但是探针的低靶向性特点限制了成像探针的应用。因此,开发由特定的靶向基团和成像配基组成的高度敏感的可活化探针是迫切需要的,并引起了科学家的广泛关注。最有潜力的可活化探针结构包括酶的底物,触发器和连接基团三部分。理想的探针应具有快速细胞摄取,特异性活化能力,未活化探针低荧光效率但活化后具有高荧光效率特性,以及在病变细胞内的高滞留率的特性。

可活化探针在其完整状态是没有荧光信号的并能够被特定的生物分子和生理环境激活,从而实现特定区域成像信号的方法并进行疾病的诊断。由于染料染料自淬灭机制,从1996年出现了基于生物分子和近红外染料的第一代可活化探针以来,可活化探针的发展有着悠久的历史。第二代可活化探针是由荧光团(供体)和淬灭剂(受体)通过短肽连接而成,短肽被特定的生物标志物或者特定生理环境裂解而得到放大的荧光信号。由于荧光团和淬灭剂之间距离很短,探针荧光通过荧光共振能量转移(FRET)而淬灭,然后通过特定靶向生物标记物或生理环境激活。随着纳米技术的不断发展,新型纳米成像探针逐步设计和开发。纳米材料如纳米金,硫化铜(CuS),量子点(QDs)和氧化铁纳米颗粒(IONPs)在医学成像中的应用促进了第三代可活化探针的发展。这些纳米材料小尺寸,大比表面积和高效率荧光淬灭的优良特性使它们成为设计可活化探针的潜在材料。基于纳米材料的第三代可活化探针是通过把纳米材料和荧光团连接在短肽或聚合物设计而成。此外,其他可活化探针,包括基于蛋白质,抗体和纳米颗粒的可活化探针正在广泛的应用于治疗诊断学研究。

研究表明,光动力治疗能够诱导细胞凋亡,促进细胞凋亡酶caspase-3的产

摘要

生，而实时监测酶 caspase-3 的活性变化有助于细胞凋亡机制的研究，并能够筛选出有效的光动力治疗药物。通过在铁蛋白表面修饰荧光淬灭对并在其内部包裹光敏剂，我们设计了敏感性高，稳定强的可活化探针 FABP/ZnPc 用于实时监测酶 caspase-3 活性，并对肿瘤进行光动力治疗。在近红外光的照射下，多肽底物被光动力治疗过程产生的酶 caspase-3 裂解，产生强的荧光信号。通过体外细胞实验和体内动物实验，我们证明了探针 FABP/ZnPc 能够进入细胞，达到实时监测细胞凋亡的目的。此外，探针的设计和合成具有普遍性和通用性，可以靶向其他蛋白酶或生物标记物，也可以包裹小分子光热治疗（PTT）材料用于肿瘤的光热治疗，具有广阔的应用前景。

关键词：可活化探针；细胞凋亡；铁蛋白；Caspase-3；光动力治疗

Abstract

Theranostics has become a hot topic in current medical research with the rapid development of medical imaging. Nowadays variety of advanced medical imaging technologies have been utilized in medical imaging, for instance optical imaging, magnetic resonance imaging (MRI), emission tomography (PET), single-photon emission computed tomography (SPECT) and photoacoustic imaging, thus contributing to the development of molecular imaging probes and medical imaging. Molecular imaging probes are complex that capable of binding to specific biomarker and generating imaging signal for disease diagnosis. To date, some imaging probes have been applied to clinical, for example ^{18}F -FDG, however, these probes are limited by their low targeting efficiency. Therefore, highly sensitive activatable probes that comprise of specific targeting ligands and imaging moieties are attractive and in urgently needed. A highly promising approach that incorporates a desired activatable probes is one wherein the probe is tripartite, being composed of a self-immolative linker between the enzyme substrate/trigger group and the reporter moiety in the fluorescently silent probe. Ideal probe characteristics include rapid cell uptake and highly selective activation to yield the reporter, low fluorescence efficiency of the unactivated probe but high fluorescence efficiency of the reporter, and high quality retention of the reporter inside the diseased cells.

Activatable probes are imaging signal silent in their intact state and have ability to be activated by specific biomolecules and physiological environment changes to achieve boosting imaging signal in region of interest for diagnosis. Activatable probes have a long history since the first generation. In view of dye-dye self-quenching mechanism, biomolecules-based activatable probes with NIR dyes emerged in 1996 as the first generation of activatable probes. The second generation of activatable probes consists of a fluorophore (donor) and a quencher (acceptor) with a small peptide as linker to be cleaved by specific biomarker for amplified fluorescent signal. The probes were initially quenched through fluorescence resonance energy transfer (FRET) due to the short distance of fluorophore and quencher, and activated by specific biomarker or physiological environment. With the tremendous development of nanotechnology over years, novel nano-imaging probe was gradually designed and

developed. The application of nano-materials for instance gold nanoparticles, copper sulfide (CuS), quantum dots (QDs) and iron oxide nanoparticles (IONPs) in medicine imaging have facilitated the development of the third generation of activatable probes. The excellent characteristics of these nano-materials such as small size, large specific surface area and high fluorescence quenching efficacy make them promising candidates for the design of activatable probes. Nanomaterials-based activatable probes was designed by attached nanomaterials and fluorophores to small peptide or polymer. In addition, other activatable probes including protein-based, antibody-based and NPs-based activatable probes for theranostics are under intense research.

Previous studies showed that photodynamic therapy can induce apoptosis and promote the generate of caspase-3. Real-time monitoring of caspase-3 activity is helpful for the understanding of apoptosis mechanism and the screening of photodynamic therapy agents effectively. By modifying fluorophore and quencher to the surface of ferritin and encapsulating photosensitizers in ferritin, we successfully designed activatable probe FABP/ZnPc with high sensitivity and stable stability for real-time monitoring of the caspase-3 activity. Upon the near-infrared light irradiation, the peptide substrate is cleaved by caspase-3 and strong fluorescence signal is generated. We demonstrated that probe FABP/ZnPc is capable of real-time monitoring of apoptosis by in vitro cell experiments and in vivo animal experiments. In addition, the design and synthesis of probes is generally and versatility, the probe can target to other proteases or biomarkers. Also, small molecule materials can be encapsulated to ferritin for photothermal therapy (PTT), providing the broad prospects of the probe.

Keywords: Activatable Probe; Apoptosis; Ferritin; Caspase-3; Photodynamic Therapy

第一章 绪论

恶性肿瘤从发现到至今已有悠久的历史，其发病率居高不下并呈现迅速上升的趋势，根据有关调查数据显示恶性肿瘤发病率的递增速度已高达年均5%以上。经过世界卫生组织（WHO）的调查公布，每年全世界死于慢性疾病人数有2400余万，而肿瘤占其中650余万。作为发展中国家，与七十年代相比中国居民恶性肿瘤死亡率增加了83.1%。据近几年我国癌症普查的结果显示，平均每十万人里边就有癌症患者286人，而死亡人数达到181人，死亡率呈逐年升高趋势。到目前为止，恶性肿瘤仍然占据全世界最主要的致死原因，其发生和发展均严重危害到人类生命健康。所以，进一步研究恶性肿瘤发病机制，提高其发现和治疗水平并减少其发病率是至关重要的。众所周知，实现恶性肿瘤的早发现早治疗便会提高恶性肿瘤的治愈率，因此恶性肿瘤的早期诊断在医学领域引起了人们广泛的专注。随着医学影像学的发展，使得肿瘤表面特异性生物标志物可视化成为可能，人们对肿瘤的认识也取得了前所未有的提高，也使得肿瘤的早期诊断成为可能。

1.1 分子影像技术诊断肿瘤

分子影像学是医学影像学的一个分支，目的在于用高敏感性仪器检测、定位和监测细胞、组织和生物体的关键分子过程，是在分子水平和细胞水平下用影像法对复杂的生物学过程进行成像，并将复杂的生活学过程通过简单明了的图像方式展现出来的一门学科。与传统生命科学相比，分子影像将复杂的生物学过程变成直观的图像，从分子成像的结果中人们能够成功检测到疾病的发生，进而进行疾病的早期治疗以达到增强疾病治愈率的目的[1, 2]。除此之外，分子影像手段能够实时监视多个分子事件，实现了在活体上连续观察药物治疗的效果，在分子生物学以及微流体技术等学科迅速发展的推动下，分子影像发展十分迅速，目前科学家已经筛选出大量决定疾病发展进程的关键分子靶点，对于疾病的早期诊断和治疗发挥了重大作用。另外，基因分析的应用使得特定疾病病人的确定更加容易化，所以靶向不同疾病生物标记物的新型探针不断出现，此治疗策略的优点是靶向性强，在最大化发挥疾病治疗效果的同时不对正常组织造成非特异性损伤

[3-5]。分子影像学不止是传统的影像学技术如CT、MRI、SPECT、PET、光声成像和光学成像，而是医学、工程学和生物学等多学科交叉的科学，目的在于无损伤、实时的成像，进而发现分子水平或者细胞水平的异常。科学家也不断用合成的方法设计研究低浓度即可对靶向生物分子产生可检测信号的新型智能探针。

1.1.1 光学成像

随着基因组学和现代光学成像技术的成熟，作为新型研究领域的光学成像逐步发展起来，传统的光学成像方法主要是内镜成像，新型光学成像技术是通过在体内引入荧光物质来检测病变的组织，其优点是使得显像深度增加。光学成像可实时观察标记的分子在活体内的活动，检测活体内活体内动态代谢过程，探测蛋白酶的活性和基因行为等[6-8]。迄今为止，最常用的光学成像技术主要包括两种，分别是荧光成像和生物发光成像，其中小动物活体荧光成像技术是指在特定波长的光线下，当其遇到具有荧光性质的荧光染料（如Cy5.5、RFP、FITC和Cyt等）时，发射具有不同光谱特性的信号，由高敏感性的光电照相机（如CCD相机）捕获，其原理如图1-1。目前，近红外的检测深度已从体表发展到浅层组织和深层组织，使得光学成像的临床转化成为可能。荧光成像不仅用于观测疾病发展进程，研究肿瘤发病机制，还可用于动脉粥样硬化等疾病的研究[9, 10]。生物发光则是利用荧光素酶标记细胞，在荧光素的作用下，将其化学能转化为光能实现成像，生物发光成像可观测到疾病发展进程及治疗反应，常被用于抗癌药物的研究，干细胞的研究以及监测细胞凋亡等方面。

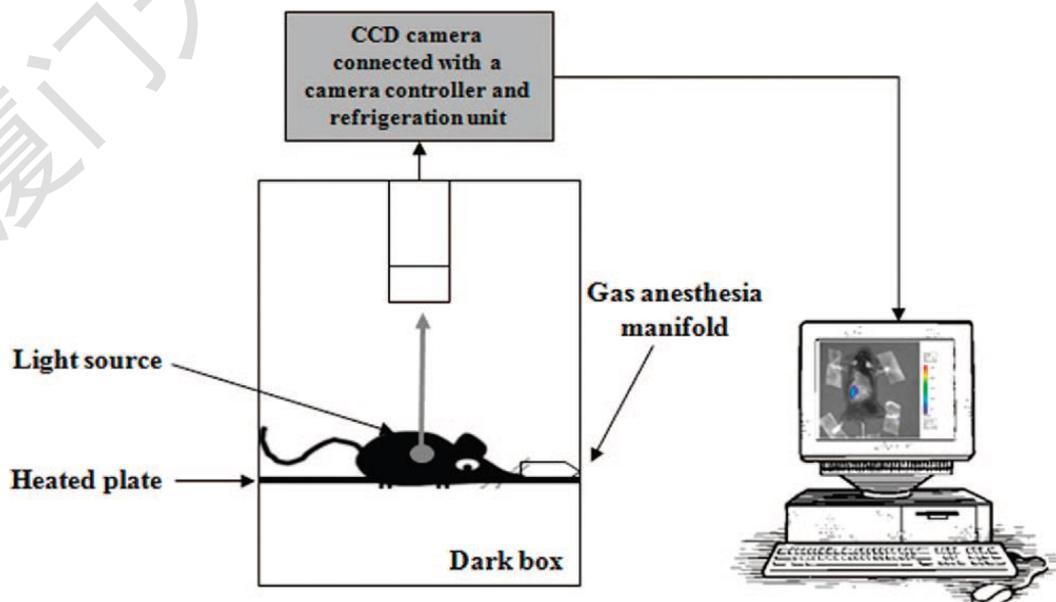


图 1-1 小动物光学成像原理图。

Fig 1-1 The schematics of small animal optical imaging.

1.1.2 X射线计算机断层扫描 (CT)

利用X线束对人体特定层面进行旋转扫描，由探测器接受该层面穿透后剩余的X射线信息，经计算机处理而获得重建图像即为X射线计算机断层扫描。CT成像可以观察到不重叠的一系列解剖图像，特别是三维解剖信息，可显示出检查部位内部结构，与常规X线相比，CT图像组织间的差异更明显，有利于实性团块、囊肿和肿瘤的鉴别。

1.1.3 磁共振成像 (MRI)

磁共振成像技术从1973年提出后便被大量应用于生物医学研究，现已成为临床诊断必不可少的工具之一。众所周知，生物体氢含量丰富，将生物体置于外磁场中时，氢质子形成纵向磁化，利用氢质子在磁场中收到射频脉冲的激励发生的磁共振现象，脉冲停止后受激励的质子产生信号，经采集和计算机处理后获得图像称为磁共振成像。最初核磁共振成像被用于观测生理病理条件下生物体解剖结构变化及形态学变化，随着快速成像技术、磁共振血管造影及扩散加权成像法的发展，磁共振被用来研究生物体的活动机制，如Ogawa等人发展了血氧水平相关磁共振法 (BOLD-MRI) 来研究机体脑功能[11]。迄今为止，磁共振成像已被广泛应用于基因治疗成像，疾病的早期诊断，活细胞和分子水平显微成像等方面。

1.1.4 放射性核素成像

放射性核素成像需要向受检人体或者动物体内注射含有放射性核素的示踪药物，经过新陈代谢后进入机体组织或者器官，在机体内按照不同浓度分布，同时核素在衰变的过程中辐射出 γ 射线，通过体外对核素的检测判断核素的体内分布，实现对生物体成像的目的。由于放射性示踪药物在人体内的分布同时隐含了生物体结构和功能信息，近年来核素成像技术和相关药物发展极快，其中最主要也是影响力最大的放射性成像技术是PET，小动物PET在药效学研究、疗效评价、新药筛选和基因表达显像已获得广泛应用[12-14]。PET成像需要用放射性核素（如 ^{11}C ， ^{13}N ， ^{15}O ， ^{18}F ）来标记分子影像探针得到高靶向的显影剂，通过静脉注射方式将探针引入人体靶器官，可以在病人临床症状还未表现出现前，发现疾病功能代谢等早期改变，从分子水平发现病变，且PET可进行动态成像，动态采

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.