

学校编码: 10384

学号: 20520120153474

分类号\_密级\_

UDC\_

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

糖靶向制剂应用于肿瘤定位研究

Sugar-targeted theranostics for research on localization of  
tumors

吴选俊

指导教师姓名: 韩守法教授

专 业 名 称: 化学生物学

论文提交日期: 2015 年 4 月

论文答辩时间: 2015 年 5 月

学位授予日期: 2015 年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2015 年 5 月

**Sugar-targeted theranostics for research on localization of  
tumors**

A Thesis Presented

by

**Xuanjun Wu**

**Supervisor: Prof. Shoufa Han**

Submitted to the graduated school of Xiamen University for the

Degree of

**Doctoral of Philosophy**

May 2014

Department of Chemistry, Xiamen University

## 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( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )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):

年 月 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）：

年 月 日

<b>目录</b>	
<b>摘要</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>III</b>
<b>第一章 绪论</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 荧光辅助癌症手术</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 荧光辅助癌症手术概述.....	1
1.1.2 荧光辅助癌症手术的研究进展.....	1
1.1.3 肝细胞癌症成像的困难及解决的办法.....	4
<b>1.2 酸度激活的荧光探针用于细胞溶酶体、活体组织的成像</b> .....	<b>5</b>
1.2.1 溶酶体商业化荧光探针在细胞生物学的应用及其缺点.....	5
1.2.2 酸度激活的荧光探针用于溶酶体、活体组织成像的研究进展.....	6
<b>1.3 信号激活的光声探针用于活体组织的成像</b> .....	<b>10</b>
1.3.1 光声成像概述.....	10
1.3.2 信号激活的光声探针用于活体成像的研究进展.....	11
<b>1.4 唾液酸与细胞免疫</b> .....	<b>13</b>
1.4.1 细胞糖萼上的唾液酸.....	13
1.4.2 细胞糖萼上的唾液酸参与调控细胞识别与免疫反应.....	15
1.4.3 代谢标记与生物正交反用于糖萼成像研究.....	16
<b>1.5 本工作的研究目标及主要内容</b> .....	<b>17</b>
1.5.1 糖靶向及酸敏感的微束用于肿瘤的定位研究.....	18
1.5.2 荧光素标记的唾液酸用于肿瘤的定位研究.....	18
1.5.3 酸敏感近红外荧光团标记的唾液酸用于肿瘤的定位研究.....	18
1.5.4 唾液酸靶向及酸敏感的囊泡用于肿瘤精准的双模式定位研究.....	19
<b>参考文献</b> .....	<b>19</b>
<b>第二章 糖靶向及酸敏感的微束用于肿瘤的定位研究</b> .....	<b>28</b>
<b>2.1 引言</b> .....	<b>28</b>

<b>2.2 材料与方法</b> .....	<b>29</b>
2.2.1 材料.....	29
2.2.2 罗丹明 B 磺内酰胺衍生物 (RST) 的合成.....	30
2.2.3 糖微束的合成与表征.....	31
2.2.4 RST 和糖微束的 pH 滴定.....	31
2.2.5 糖微束中 RST 含量的测定.....	33
2.2.6 糖微束在不同 pH 条件下的稳定性.....	34
2.2.7 RST 和糖微束染色溶酶体.....	34
2.2.8 细胞摄取糖微束的流式细胞分析.....	35
2.2.9 RST 及糖微束在溶酶体内保留时间.....	35
2.2.10 糖微束用于成像小鼠皮下肿瘤.....	37
2.2.11 糖微束用于成像小鼠体内肝脏肿瘤.....	38
2.2.12 糖微束的细胞毒性.....	39
<b>2.3 结果与讨论</b> .....	<b>39</b>
2.3.1 罗丹明磺内酰胺衍生物 (RST) 用于溶酶体酸度的成像.....	40
2.3.2 构建和表征 pH 响应的糖微束.....	43
2.3.3 溶酶体酸度介导糖微束荧光的活化.....	45
2.3.4 凝集素介导的细胞摄取糖微束.....	48
2.3.5 RST@P-Man 和 RST@P-Gal 用于成像皮下肿瘤.....	49
2.3.6 RST@P-Gal 用于成像肝脏肿瘤.....	51
2.3.7 糖微束的细胞毒性.....	53
<b>2.4 小结</b> .....	<b>54</b>
<b>参考文献</b> .....	<b>54</b>
<b>第三章 荧光素标记的唾液酸用于肿瘤的定位研究</b> .....	<b>59</b>
<b>3.1 引言</b> .....	<b>59</b>
<b>3.2 材料与方法</b> .....	<b>60</b>
3.2.1 材料.....	60
3.2.2 制备 BA@M 及 BA@M-P.....	61
3.2.3 BA@M 及 BA@M-P 负载 FITC-SA.....	62

3.2.4 表征 FITC-SA 负载的 MSN.....	62
3.2.5 pH 介导 FITC-SA 负载的 MSN 中 FITC-SA 的释放.....	62
3.2.6 细胞吸收 FITC-SA 及 FITC-SA 装载的 MSN.....	62
3.2.7 FITC-SA 的亚细胞定位.....	63
3.2.8 FITC-SA 用于细胞共价标记.....	63
3.2.9 FITC-SA 及 FITC-SA 负载的 MSN 的细胞毒性.....	63
3.2.10 FITC-SA 用于成像小鼠皮下肿瘤.....	63
3.2.11 FITC-SA 在小鼠体内的生物分布.....	63
3.2.12 FITC-SA 负载的 MSM 用于成像小鼠皮下肿瘤.....	64
3.2.13 FITC-SA 用于成像小鼠肝脏肿瘤.....	64
<b>3.3 结果与讨论.....</b>	<b>64</b>
3.3.1 FITC-SA 在哺乳动物细胞表达.....	64
3.3.2 FITC-SA 用于成像小鼠体内皮下肿瘤.....	69
3.3.3 FITC-SA 用于成像小鼠体内肝脏肿瘤.....	70
3.3.4 构建和表征 FITC-SA 负载的 MSN.....	72
3.3.5 FITC-SA 负载的 MSN 用于肿瘤检测.....	76
3.3.6 FITC-SA 及 FITC-SA 负载的 MSN 的细胞毒性.....	77
<b>3.4 小结.....</b>	<b>78</b>
<b>参考文献.....</b>	<b>79</b>
<b>第四章 酸敏感近红外荧光团标记的唾液酸用于肿瘤的定位研究 ...</b>	<b>83</b>
<b>4.1 引言.....</b>	<b>83</b>
<b>4.2 材料与方法.....</b>	<b>84</b>
4.2.1 材料.....	84
4.2.2 合成 pNIR (Compound 1).....	85
4.2.3 合成 SA-pNIR.....	85
4.2.4 合成 Glu-pNIR.....	87
4.2.5 SA-pNIR 及 Glu-pNIR 的 pH 滴定.....	87
4.2.6 pH 调节的 SA-pNIR 及 pNIR 的光热特性.....	88
4.2.7 近红外光对 SA-pNIR 处理的细胞的光热效应.....	88

4.2.8 SA-pNIR 成像溶酶体.....	88
4.2.9 溶酶体酸度激活 SA-pNIR.....	90
4.2.10 SA-pNIR 通过代谢途径连接在细胞内蛋白质上.....	90
4.2.11 SA-pNIR 用于成像小鼠体内皮下肿瘤.....	92
4.2.12 SA-pNIR 在接种皮下肿瘤的小鼠体内各器官分布.....	92
4.2.13 SA-pNIR 的细胞毒性.....	94
<b>4.3 结果与讨论.....</b>	<b>94</b>
4.3.1 酸度激活 SA-pNIR 产生荧光.....	94
4.3.2 SA-pNIR 成像活细胞酸性溶酶体.....	96
4.3.3 SA-pNIR 用于成像小鼠皮下肿瘤.....	99
4.3.4 SA-pNIR 的细胞毒性.....	102
4.3.5 酸度调节 SA-pNIR 的光热特性.....	103
4.3.6 SA-pNIR 介导细胞光热毒性.....	104
4.3 小结.....	105
<b>参考文献.....</b>	<b>105</b>
<b>第五章 唾液酸靶向及酸敏感的囊泡用于肿瘤双模式定位研究.....</b>	<b>109</b>
<b>5.1 引言.....</b>	<b>109</b>
<b>5.2 材料与方法.....</b>	<b>111</b>
5.2.1 材料.....	111
5.2.2 制备和表征 pNIR@P@SA 及 pNIR@P.....	112
5.2.3 制备和表征 pNIR@P@SA 及 pNIR@P.....	114
5.2.4 pNIR@P@SA 和 pNIR@P 成像溶酶体.....	115
5.2.5 pNIR@P@SA 和 pNIR@P 的细胞毒性.....	115
5.2.6 pNIR@P@SA 用于靶向小鼠体内皮下肿瘤的荧光成像.....	115
5.2.7 pNIR@P@SA 靶向小鼠体内皮下肿瘤的时间动力学.....	116
5.2.8 pNIR@P@SA 用于靶向小鼠体内肝脏肿瘤荧光成像.....	116
5.2.9 pNIR@P@SA 的光热特性.....	116
5.2.10 pNIR@P@SA 光声信号的 pH 滴定.....	117
5.2.11 pNIR@P@SA 用于靶向小鼠体内皮下肿瘤的光声成像.....	118



---

5.2.12 pNIR@P@SA 的系统毒性.....	118
<b>5.3 结果与讨论.....</b>	<b>119</b>
5.3.1 制备和表征 pNIR@P@SA.....	119
5.3.2 酸性 pH 介导的 pNIR@P@SA 荧光活化.....	120
5.3.3 pNIR@P@SA 成像溶酶体.....	121
5.3.4 pNIR@P@SA 用于靶向小鼠皮下肿瘤的荧光成像.....	124
5.3.5 pNIR@P@SA 用于靶向小鼠肝脏肿瘤的荧光成像.....	126
5.3.6 酸度激活 pNIR@P@SA 的光声特性.....	129
5.3.7 pNIR@P@SA 用于小鼠肿瘤光声成像.....	130
5.3.8 pNIR@P@SA 的细胞毒性.....	131
<b>5.4 小结.....</b>	<b>132</b>
<b>参考文献.....</b>	<b>133</b>
<b>第六章 结语与展望.....</b>	<b>138</b>
<b>附录 博士期间科研成果.....</b>	<b>140</b>
<b>致谢.....</b>	<b>142</b>

## Contents

<b>Abstract in Chinese</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract in English</b> .....	<b>III</b>
<b>Chapter 1 Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Fluorescence guided cancer surgery</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Summary of fluorescence guided cancer surgery .....	1
1.1.2 Progress on fluorescence guided cancer surgery .....	1
1.1.3 Difficulties and solutions of imaging of hepatocellular carcinoma .....	4
<b>1.2 Acidic activatable fluorescence probes for intracellular imaging of lysosome or in vivo imaging of tissue</b> .....	<b>5</b>
1.2.1 Commercial lysosomal fluorescence probes for biological application and it's disadvantages .....	5
1.2.2 Progress on acidic activatable fluorescence probes for intracellular imaging of lysosome or in vivo imaging of tissue.....	6
<b>1.3 Signal activation based photoacoustic probes for in vivo tissue imaging</b> ....	<b>10</b>
1.3.1 Summary of photoacoustic imaging.....	10
1.3.2 Progress on signal activation based photoacoustic probes for in vivo tissue imaging.....	11
<b>1.4 Sialic acids and cell immune</b> .....	<b>13</b>
1.4.1 Sialic acids on glycocalyx .....	13
1.4.2 Sialic acids on glycocalyx mediate cell recognition and immune response .....	15
1.4.3 Metabolic labeling and biorthogonal reaction for glycocalyx imaging studies.....	16
<b>1.5 The aim of this work and the main content</b> .....	<b>17</b>
1.5.1 Sugar targeted acid-responsive micelles for research on localization of tumors.....	18
1.5.2 A fluorescently labelled sialic acid for research on localization of tumors	

.....	18
1.5.3 A near-infrared profluorophore labelled sialic acid for research on localization of tumors .....	18
1.5.4 Sialic acid targeted acid-responsive vesicles for research on dual modality localization of tumors.....	19
<b>References .....</b>	<b>19</b>
<b>Chapter 2 Sugar targeted acid-responsive micellar system for research on localization of tumors .....</b>	<b>28</b>
<b>2.1 Introduction .....</b>	<b>28</b>
<b>2.2 Material and methods .....</b>	<b>29</b>
2.2.1 Material.....	29
2.2.2 Synthesis of Rhodamine-sultam (RST).....	30
2.2.3 Construction and characterization of glyco-micelles.....	31
2.2.4 pH titration of RST and the micelles.....	31
2.2.5 Levels of RST at glycol-micelles.....	33
2.2.6 The stability of the micelles at different pH condition.....	34
2.2.7 Staining of lysosomes with RST and glyco-micelles.....	34
2.2.8 Flow cytometric analysis of cellular uptake of glyco-micelles .....	35
2.2.9 Lysosomal retention of RST and glyco-micelles .....	35
2.2.10 Imaging of subcutaneous tumors with glyco-micelles .....	37
2.2.11 Imaging of liver tumor foci with glyco-micelles .....	38
2.2.12 Cytotoxicity of glyco-micelles.....	39
<b>2.3 Results and discussion.....</b>	<b>39</b>
2.3.1 Rhodamine-sultam for imaging of lysosomal acidity .....	40
2.3.2 Construction and characterization of glyco-micelles.....	43
2.3.3 Lysosomal acidity mediated fluorescence activation of glyco-micelle	45
2.3.4 Lectin-mediated cellular uptake of glyco-micelles.....	48
2.3.5 Imaging of subcutaneous tumors with RST@P-Man and RST@P-Gal .....	49

2.3.6 Imaging of liver tumor foci with RST@P-Gal .....	51
2.3.7 Cytotoxicity of glyco-micelle .....	53
<b>2.4 Conclusions.....</b>	<b>54</b>
<b>References .....</b>	<b>54</b>
<b>Chapter 3 A fluorescently labelled sialic acid for research on localization of tumors .....</b>	<b>59</b>
<b>3.1 Introduction .....</b>	<b>59</b>
<b>3.2 Material and methods .....</b>	<b>60</b>
3.2.1 Material.....	60
3.2.2 Preparation of BA@M and BA@M-P .....	61
3.2.3 Complexation of FITC-SA with B@M and B@M-P.....	62
3.2.4 Characterization of FITC-SA laden MSN .....	62
3.2.5 pH dependent release of FITC-SA from sugar-laden MSN.....	62
3.2.6 Cellular uptake of FITC-SA and FITC-SA laden MSN .....	62
3.2.7 Subcellular location of FITC-SA .....	63
3.2.8 FITC-SA for covalent cell labeling .....	63
3.2.9 Cytotoxicity of FITC-SA and FITC-SA laden MSN.....	63
3.2.10 Imaging of subcutaneous tumors in mice with FITC-SA.....	63
3.2.11 Intracellular distribution of FITC-SA in subcutaneous tumors.....	63
3.2.12 Imaging of subcutaneous tumors in mice with FITC-SA laden MSN	64
3.2.13 Imaging of liver tumors in mice with FITC-SA .....	64
<b>3.3 Results and discussion.....</b>	<b>64</b>
3.3.1 Incorporation of FITC-SA into mammalian cells .....	64
3.3.2 Imaging of subcutaneous tumors with FITC-SA .....	69
3.3.3 Imaging of liver tumor implants in mice with FITC-SA.....	70
3.3.4 Construction and characterization of FITC-SA loaded MSN.....	72
3.3.5 Tumor detection with FITC-SA-laden MSN .....	76
3.3.6 Cytotoxicity of FITC-MSN and FITC-SA-loaded MSN .....	77
<b>3.4 Conclusions.....</b>	<b>78</b>
<b>References .....</b>	<b>79</b>

---

<b>Chapter 4 A near-infrared profluorophore labelled sialic acid for research on localization of tumors .....</b>	<b>83</b>
<b>4.1 Introduction .....</b>	<b>83</b>
<b>4.2 Material and methods .....</b>	<b>84</b>
4.2.1 Material.....	84
4.2.2 Synthesis of pNIR (Compound 1) .....	85
4.2.3 Synthesis of SA-pNIR.....	85
4.2.4 Synthesis of Glu-pNIR .....	87
4.2.5 pH titration of SA-pNIR or Glu-pNIR .....	87
4.2.6 pH dependent photothermal effects of SA-pNIR or pNIR.....	88
4.2.7 NIR mediated photothermal effects in SA-pNIR treated cells .....	88
4.2.8 Imaging of lysosomes with SA-pNIR.....	88
4.2.9 Lysosomal activation of SA-pNIR.....	90
4.2.10 Incorporation of SA-pNIR into glycoprotein via metabolic sialylation .....	90
4.2.11 Imaging of subcutaneous tumors in mice with SA-pNIR.....	92
4.2.12 In vivo distribution of SA-pNIR in tumor-bearing mice.....	92
4.2.13 Cytotoxicity of SA-pNIR.....	94
<b>4.3 Results and discussion.....</b>	<b>94</b>
4.3.1 Acidic pH mediated fluorescence activation of SA-pNIR .....	94
4.3.2 Imaging of acidic lysosomes in cells by SA-pNIR.....	96
4.3.3 Imaging of subcutaneous tumors in mice with SA-pNIR .....	99
4.3.4 Cytotoxicity of SA-pNIR .....	102
4.3.5 Acidic pH dependent photothermal effects of SA-pNIR.....	103
4.3.6 SA-pNIR mediated photothermal killing of cells .....	104
4.3 Conclusions .....	105
<b>References .....</b>	<b>105</b>
<b>Chapter 5 Sialic acid targeted acidity-responsive vesicles for research on dual modality localization of tumors .....</b>	<b>109</b>

<b>5.1 Introduction .....</b>	<b>109</b>
<b>5.2 Material and methods .....</b>	<b>111</b>
5.2.1 Material.....	111
5.2.2 Preparation and characterization of pNIR@P@SA and pNIR@P.....	112
5.2.3 pH titration of pNIR@P@SA and pNIR@P .....	114
5.2.4 Imaging of lysosomes with pNIR@P@SA and pNIR@P.....	115
5.2.5 Cytotoxicity of pNIR@P@SA and pNIR@P .....	115
5.2.6 Fluorescence imaging of subcutaneous tumors in mice with pNIR@P@SA.....	115
5.2.7 Time course of fluorescence imaging of subcutaneous tumors in mice with pNIR@P@SA.....	116
5.2.8 Fluorescence imaging of liver tumors in mice with pNIR@P@SA ...	116
5.2.9 Photothermal effects of pNIR@P@SA.....	116
5.2.10 pH titration of photoacoustic response of pNIR@P@SA .....	117
5.2.11 Photoacoustic imaging of subcutaneous tumors with pNIR@P@SA .....	118
5.2.11 Cytotoxicity of pNIR@P@SA.....	118
<b>5.3 Results and discussion.....</b>	<b>119</b>
5.3.1 Construction and characterization of pNIR@P@SA .....	119
5.3.2 Acidic pH mediated fluorescence activation of pNIR@P@SA.....	120
5.3.3 Imaging of lysosomes with pNIR@P@SA .....	121
5.3.4 Fluorescence imaging of subcutaneous tumors in mice with pNIR@P@SA.....	124
5.3.5 Fluorescence imaging of liver tumor foci with pNIR@P@SA .....	126
5.3.6 Acid activatable photoacoustic property of pNIR@P@SA.....	129
5.3.7 Photoacoustic imaging of tumors in mice with pNIR@P@SA .....	130
5.3.8 Cytotoxicity of pNIR@P@SA.....	131
<b>5.4 Conclusions.....</b>	<b>132</b>
<b>References .....</b>	<b>133</b>
<b>Chapter 6 Conclusion and Prospect.....</b>	<b>138</b>

**Publications in Ph. D..... 140**

**Acknowledgement..... 142**

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 摘要

随着癌症发病率和死亡率的日益提高,发展一种辅助癌症治疗的技术具有重要的临床意义。手术切除是治疗癌症的首选方式之一。医生在进行手术切除时常因为无法精确定位肿瘤而造成肿瘤的多切或少切,继而导致肿瘤的复发。为此,人们积极探索光学探针来辅助医生分辨肿瘤。为了获得高的信噪比,光学探针需要与一些靶向基团连接,常用的靶向基团有抗体、叶酸、多肽及核酸适配体等。而糖分子作为一种靶向基团用于术中肿瘤的成像却不曾有研究。肝细胞癌往往形成4-8 cm时才能出现一定的特征,所以人们无法发现微小尺寸的肝癌病灶。目前临床上,医生能分辨肿瘤的最小尺寸是1 cm。为此,发展试剂来定位小于1 cm的肝癌病灶具有重要的临床价值。

第一章,首先介绍了荧光辅助的癌症手术及在此领域报道的一些荧光探针。其次,综述了近期用于溶酶体或肿瘤成像的酸敏感荧光探针及信号激活的光声探针。最后介绍了唾液酸及唾液酸相关免疫。

第二章,构建和评估了一组含糖的酸激活微束应用于肝癌微小病灶的定位。此类微束由对溶酶体酸度极其敏感的罗丹明磺内酰胺(RST)形成内核,由D-葡萄糖胺、D-半乳糖胺或D-甘露糖胺修饰的聚(苯乙烯-交替-马来酸)形成核壳。RST在酸性溶酶体中发出强烈的荧光,便于追踪肿瘤细胞吞噬微束的整个过程。半乳糖基化的微束(RST@P-Gal)成功实现了高效分辨皮下肿瘤和直径只有0.1-10 mm的肝脏肿瘤病灶。为此,RST@P-Gal有望用于临床辅助肿瘤的手术切除。

第三章,荧光素异硫氰酸酯标记的唾液酸(FITC-SA)实现了定位肝癌微小病灶。FITC-SA在成像皮下肿瘤和直径为0.2-5 mm的肝脏肿瘤病灶时获得了高的肿瘤-正常组织信号比。细胞外的FITC-SA会迅速地被血液所清除,而细胞内的FITC-SA则能够通过唾液化途径引入到细胞表面的糖萼上。与FITC-SA负载的纳米颗粒相比,小鼠肿瘤能迅速和优先吸收游离态的FITC-SA从而表现出高的信噪比,表明其有潜力用于进一步的辅助肿瘤切除研究。

第四章,一种近红外荧光团连接的唾液酸(SA-pNIR)实现了肿瘤的定位。SA-pNIR由具有靶向肿瘤功能的唾液酸和能在溶酶体中发光的荧光团组成。SA-



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](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.