

一种解聚金属-A β 聚集体的硫磺素 T 类荧光螯合剂

张 勇^{1,2} 张 哲¹ 董雄伟¹ 尹文星¹ 章 丹¹ 刘长林^{*,1}

(¹ 华中师范大学化学学院, 武汉 430079)

(² 湖北理工学院化学与化工学院, 黄石 435003)

摘要: 以硫磺素 T 为母体, 合成和表征了一种解聚金属-A β 聚集体的荧光螯合剂 5-氨基-2-(苯并[d]噻唑-2-基)苯酚(FC-9), 研究了它与金属-A β 聚集体的相互作用以及由此导致的 A β 聚集体的构象、形貌和毒性变化。结果表明, FC-9 不仅能识别各种 A β 40/A β 42 聚集体, 而且还能使金属-A β 40/42 聚集体解聚。FC-9 与金属-A β 聚集体相互作用后, 聚集体的形貌由纤维状转化为无定形状, 其 β -折叠构象也减少了。FC-9 还能够跨过细胞膜, 符合严格的 Lipinski 类药标准, 在一定程度上可抑制由 Cu-A β 40 聚集体产生的毒性, 这使得 FC-9 在螯合治疗老年痴呆症方面可能具有潜在的应用前景。

关键词: A β 聚集体; 硫磺素 T; 荧光螯合剂; 解聚

中图分类号: O626.25 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-4861(2015)08-1495-10

DOI: 10.11862/CJIC.2015.233

A Thioflavin T-Based Fluorescent Chelator Disaggregated Metal-A β Aggregates

ZHANG Yong^{1,2} ZHANG Zhe¹ DONG Xiong-Wei¹ YIN Wen-Xing¹ ZHANG Dan¹ LIU Chang-Lin^{*,1}

(¹ College of Chemistry, Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

(² College of Chemistry and Chemical Engineering, Hubei Polytechnic University, Huangshi, Hubei 435003, China)

Abstract: A thioflavin T-based fluorescent chelator 5-amino-2-(benzo[d]thiazol-2-yl)phenol (FC-9) was synthesized and characterized. Its interaction with metal-A β aggregates and the change of morphology, conformation, cytotoxicity of the resulting A β aggregates were investigated. The results showed that FC-9 can not only recognize different A β 40/A β 42 aggregates but also disaggregate metal-A β 40/A β 42 aggregates. After the interaction between FC-9 and metal-A β 40/A β 42 aggregates, the morphology of aggregates changed from fibril to amorphousness, and their β -sheet conformation was also reduced. Moreover, the cell membrane penetration of FC-9 fulfilled common drug-like criteria, and it can inhibit cytotoxicity of the Cu-A β 40 aggregates, indicating that it could have potential prospect in the treatment of Alzheimer disease. CCDC: 960540.

Key words: A β aggregates; thioflavin T; fluorescent chelators; disaggregation

老年痴呆症(Alzheimer's disease, AD)是发生在老年人身上的一种神经退行性疾病, 目前还未找出 AD 的确切病因和研究出有特效治疗或逆转疾病进展的药物和预防方法, 因此它被列入了 21 世纪的疑难杂症。 β -淀粉样蛋白 (amyloid β protein, A β) 是 AD 发病机制的分子标志物之一, 它容易聚集形成

不溶的高分子量的淀粉样纤维。A β 聚集被公认为是 AD 的主要病理学特征之一, 而且其聚集与 Cu²⁺、Zn²⁺等金属离子相关^[1-3]。这些金属离子与 A β 的结合能调节 A β 聚集的行为、毒性和活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生^[4-5]。在实验中已观察到金属离子包括 Cu²⁺和 Zn²⁺诱导的 A β 聚集是可逆

收稿日期: 2014-10-31。收修改稿日期: 2015-05-05。

国家自然科学基金(No.21302059, 21271079, 21072074)和湖北省教育厅青年人才(No.Q20134402)资助项目。

*通讯联系人。E-mail: liuchl@mail.ccnu.edu.cn

的, $A\beta$ 聚集体的产生和解聚能被金属螯合剂所调控; 对 $A\beta$ 聚集体中的金属离子有较高亲和力的螯合剂, 可夺取 $A\beta$ 聚集体中的金属离子而形成配合物, 并使其解聚, 可期达到减缓或者治疗 AD 的目的^[6-7]。因此, 应用螯合剂使 AD 病人大脑内的金属离子达到稳态平衡而不扰乱体内其它有益性质的螯合治疗方法是治疗 AD 的合理选择之一^[8-9]。

目前, 报道了很多诸如喹啉和大环多胺等能螯合金属- $A\beta$ 聚集体中金属离子的螯合剂^[10-17]。除了一种类似氯碘羟喹(clioquinol, CQ)的 8-羟基喹啉类螯合剂 PBT2 正处于 AD 的二期临床研究之外, 至今还没有用于治疗 AD 的螯合药物上市, 这主要是因为这类螯合剂有很多的限制性因素, 如适中的螯合 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 的能力, 对人体无毒副作用等等^[18-20]。因此, 此类螯合剂需要进行合理化的设计, 对于应用于治疗 AD 的多功能螯合剂的开发与研究也成了许多科学家感兴趣的课题。硫磺素 T(Thioflavin T, ThT) 是临床尸检用的荧光染料, 它能够嵌合到 $A\beta$ 的 β 片层折叠之中, 是一种识别 $A\beta$ 聚集体的荧光探针^[21]。通过设计集整合金属离子和与 $A\beta$ 聚集体特异结合于一体的这样一类螯合剂, 可以作为识别 $A\beta$ 聚集体的荧光探针, 能实时通过荧光变化等方法来监测 $A\beta$ 聚集体及其解聚的过程。基于此, 本文以硫磺素 T 为母体, 将其与氯碘羟喹类似的螯合基团组合在一起, 设计合成了一种荧光螯合剂 5-氨基-2-(苯并[d]噻唑-2-基)苯酚(FC-9), 并用紫外吸收光谱、荧光光谱和圆二色光谱等研究了它对金属- $A\beta$ 40/42 聚集体的解聚程度、构象、形貌和毒性等(图 1)。

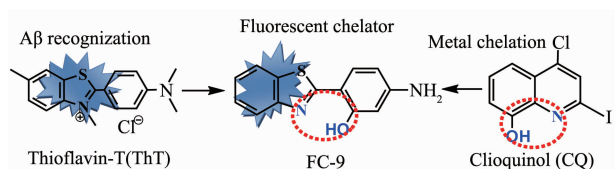


图 1 以 ThT 为母体的荧光螯合剂 FC-9 的设计

Fig.1 Design of fluorescent chelator FC-9 based on thioflavin T

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

实验所用化学试剂均为市售分析纯。 $A\beta$ 40/42 购自吉尔生化(上海)有限公司, 胎牛血清和 DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) 培养基均购自美国 Gibco 公司。所用仪器为 Perkin-Elmer 2400 元素

分析仪, PHS-3C 型 pH 计, XT4A 型显微熔点测定仪(未校正), Analytik jena Specord 210 紫外光谱仪, Varian Mercury 400 MHz 核磁共振仪, Applied Biosystems API 2000 LC/MS/MS 电喷雾质谱仪, Bruker Smart-2000 CCD 单晶衍射仪, VARIAN-CARY 荧光光谱仪, Leica DMI 3000B 倒置荧光显微镜, SpectraMax Plus384 型酶标仪, Chirascan™ 圆二色光谱仪, TECNAI G² 20 透射电镜。

1.2 5-氨基-2-(苯并[d]噻唑-2-基)苯酚(FC-9)的合成

以多聚磷酸为溶剂, 将邻氨基苯硫酚(1.25 g, 10 mmol)和对氨基水杨酸(1.53 g, 10 mmol)一起加入到 100 mL 圆底烧瓶中, 在氩气的保护下于 220 °C 反应 4 h。当反应液冷却至室温后, 再将其倒入 10% K_2CO_3 水溶液中, 过滤, 将残渣溶于二氯甲烷中, 然后加入无水硫酸镁干燥, 再过滤, 滤液旋转蒸发, 可得浅黄色的固体。将粗产品用二氯甲烷重结晶可得浅黄色晶状粉末。产率 85%。熔点: 213~215 °C。¹H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 5.95(s, 2H), 6.16(d, J =7.6 Hz, 1H), 6.24(d, J =8.6 Hz, 1H), 7.34~7.46(m, 2H), 7.62~7.88 (m, 2H), 8.02 (d, J =8.0 Hz, 1H), 11.73(s, 1H)。ESI-MS: m/z 242(M^+)。元素分析: 实验值(计算值, %): C 64.02(64.44), H 4.15(4.16), N 11.98(11.56)。

1.3 晶体的测定

选取大小为 0.3 mm×0.2 mm×0.10 mm 的浅黄色方形晶体 FC-9 置于单晶衍射仪上, 采用石墨单色化的 $Mo K\alpha$ 射线(λ =0.071 073 nm), 于 298(2) K, 以 $\omega/2\theta$ 方式扫描, 在 2.55°< θ <28.25° 范围内共收集到衍射点 7 662 个, 其中独立衍射点 2 791(R_{int} =0.068 8), $I>2\sigma(I)$ 的可观测的衍射点 2 642 个, $-7\leq h\leq 7$, $-11\leq k\leq 10$, $-30\leq l\leq 22$ 。全部衍射数据经 L_p 因子和经验吸收校正。晶体结构由直接法解出, 非氢原子坐标是在以后的数轮差值 Fourier 合成中陆续确定的。对全部氢原子的坐标及各向异性参数用 SHELXS-97 程序, 以最小二乘法对结构进行精修^[22-23]。表 1 给出标题配合物的晶体学数据, 键长和键角数据见表 2, 氢键数据见表 3。

CCDC: 960540。

1.4 FC-9 与金属- $A\beta$ 40/42 聚集体的相互作用

在 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl/150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 缓冲体系中 (Tris=tris(hydroxymethyl)aminomethane, pH 7.4), 加入浓度为 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的新鲜 $A\beta$ 40/42, 再加入(或不加入)浓度为 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu^{2+} (或 Zn^{2+})溶

表 1 FC-9 的晶体学数据和精修参数

Table 1 Crystal data and structure refinements of FC-9

Formula	C ₁₃ H ₁₀ N ₂ OS	<i>Z</i>	4
Formula weight	242.29	<i>D_c</i> / (g·cm ⁻³)	1.410
Temperature / K	298(2)	<i>F</i> (000)	504
Crystal size / mm	0.30×0.20×0.10	Reflections collected / unique	7 662 / 2 642
Crystal system	Orthorhombic	<i>R</i> _{int}	0.068 8
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	Data / restraints / parameters	2 791 / 3 / 163
<i>a</i> / nm	0.590 34(6)	Final <i>R</i> indices [<i>I</i> >2σ(<i>I</i>)]	<i>R</i> ₁ =0.042 7, <i>wR</i> ₂ =0.100 9
<i>b</i> / nm	0.852 22(9)	<i>R</i> indices (all data)	<i>R</i> ₁ =0.045 1, <i>wR</i> ₂ =0.102 4
<i>c</i> / nm	2.268 1(2)	GOF on <i>F</i> ²	1.075
<i>V</i> / nm ³	1.141 1(2)		

表 2 FC-9 的部分键长和键角

Table 2 Selected bond lengths (nm) and bond angles (°) of FC-9

C(6)-N(1)	0.137 9(2)	C(7)-N(1)	0.131 0(2)	C(11)-N(2)	0.136 5(3)
C(9)-O(1)	0.135 1(2)	C(1)-S(1)	0.173 8(2)	C(7)-S(1)	0.175 11(17)
C(2)-C(1)-S(1)	128.99(15)	N(1)-C(6)-C(5)	125.56(18)	C(6)-C(1)-S(1)	109.69(14)
O(1)-C(9)-C(10)	117.81(16)				

表 3 FC-9 的氢键键长和键角

Table 3 Bond lengths (nm) and bond angles (°) for the hydrogen bond of FC-9

D-H···A	<i>d</i> (D-H)	<i>d</i> (H···A)	<i>d</i> (D···A)	∠(DHA)
N(2)-H(2A)···O(1)#1	0.085 7(10)	0.226 6(16)	0.301 5(2)	146(2)
O(1)-H(1A)···N(1)	0.082 5(10)	0.182 5(16)	0.259 2(2)	154(3)

Symmetry codes: #1: -*x*+2, *y*+1/2, -*z*+3/2.

液,置于 37 ℃恒温水浴锅中培养 2 d,并间歇搅拌,使其形成 A β 40/42 聚集体、Cu²⁺-A β 40/42 和 Zn²⁺-A β 40/42 聚集体。然后在不同的金属-A β 40/42 聚集体的样品中加入 FC-9 于 37 ℃恒温水浴槽中分别培养 2 d,使得最终测试的 A β 40/42 样品的浓度为 5 μmol·L⁻¹(*c*_{A β 40/42}:*c*_{Cu²⁺/Zn²⁺}:*c*_{FC-9}=1:1:2),所有的测试都平行测定 3 次,数据处理以平均值和标准偏差形式表示。

1.5 BCA(bicinchoninic acid)蛋白分析法

参照文献的方法进行 BCA 蛋白分析^[11-13]。加入 FC-9 到金属-A β 40/42 聚集体中于 37 ℃培养 2 d 后,每个样品再加入 20 μmol·L⁻¹ Tris-HCl/150 μmol·L⁻¹ NaCl 缓冲溶液(pH 7.4)15 μL,用离心机以 14 000 r·min⁻¹ 的速度离心 20 min 后,取样品的上清液 25 μL,再加入 BCA 溶液 200 μL,混合混匀后,放在 37 ℃水浴锅再温育 30 min。当溶液的颜色由浅绿色变为紫色,再在紫外-可见光谱仪上测 562 nm 处的吸光度,新鲜制备的 A β 40/42 样品作为对

照,通过 BSA 标准工作曲线,来计算可溶的 A β 40/42 含量。每个样品平行测定 3 次,数据处理以平均值和标准偏差形式表示。

1.6 圆二色实验

在 10 μmol·L⁻¹ PBS 的缓冲体系中(pH=7.4),向 50 μmol·L⁻¹ A β 42 溶液中加入 (或不加入)50 μmol·L⁻¹ CuSO₄(或 Zn(OAc)₂),于 37 ℃下培养 2 d,然后向其中加入 FC-9(100 μmol·L⁻¹),于 37 ℃培养 2 d 并间歇搅拌,测试时以相同浓度新鲜的 A β 42 作对照。使用圆二色光谱仪测试每个样品在 190~260 nm 范围内的光谱,样品池的宽度为 1 mm,测试温度为 25 ℃,每次测试的样品的基线校正都减去了缓冲液或金属离子的吸收,并且取 5 次校正后的平均值。

1.7 浊度测试

各种聚集体制备同 BCA 蛋白分析法,并用 20 μmol·L⁻¹ Tris-HCl/150 μmol·L⁻¹ NaCl 缓冲溶液(pH 7.4) 稀释,最终测试时 A β 40/42 样品的浓度为 10 μmol·L⁻¹ (*c*_{A β 40/42}:*c*_{Cu²⁺/Zn²⁺}:*c*_{FC-9}=1:1:2),每个样品用紫

外-可见光谱仪测其在 405 nm 处的吸收。测试时配制相同浓度的新鲜 A β 40/42 做对照,每个样品平行测定 3 次,数据处理以平均值和标准偏差形式表示。

1.8 透射电镜实验

参照文献的方法进行透射电镜实验^[11-12]。用移液枪吸取各种 A β 40/42 聚集体样品(100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 5 μL),并依次放置于 300 目的铜网上,在室温下保持 3~5 min 后,用滤纸将过量的样品溶液吸去,待铜网干后,用双蒸水洗涤 2 次,再将醋酸铀酰(1%, 3 μL)加到铜网上染色 1 min。用滤纸吸干多余的醋酸铀酰,让铜网在室温下自然晾干 15 min。将制得的各种 A β 40/42 聚集体样品用透射电镜观察,测试时所使用的电压为 200 kV,放大倍数为 75 000~250 000 倍。

1.9 细胞跨膜实验

HeLa 细胞在 DMEM 培养基中培养,并加入 10% 胚胎牛血清,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中进行培养,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中进行培养。每天细胞换液,每隔两天传代一次。收集对数期细胞,调整细胞悬液浓度,以合适的密度接种细胞分别至 24 孔培养板进行培养(边缘孔用无菌 PBS 填充),当细胞培养到有大约 80% 融合时,再换入无血清培养基(每孔 400 μL)培养 24 h,然后进行分组培养。在进行细胞成像的前一天,事先将 HeLa 细胞植入 24 孔板,第二天将 FC-9 加入到细胞体系中(细胞单层铺满孔底 50%),使得最终测试浓度为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中进行培养 3 h。测试时,吸去孔内的培养液,HeLa 细胞用磷酸盐缓冲液洗涤 3 次,然后将其放在倒置荧光显微镜下,用绿光激发来观察细胞的荧光成像,放大倍数为 400 倍。相对于细胞内 FC-9 的荧光强度,对细胞的明亮视野也进行了成像。

1.10 细胞毒性实验

向新鲜的 A β 40 中加入(或不加入) Cu^{2+} ,并于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d,然后加入 FC-9 反应 2 d(A β 40 的浓度为 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $c_{\text{A}\beta 40}:c_{\text{Cu}^{2+}}:c_{\text{FC-9}}=1:1:2$)。细胞的毒性实验采用 MTT 法进行测定。将 HeLa 细胞种植于 96 孔板中,保证细胞密度约为 $1\times 10^5 \text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。细胞培养 24 h 后,使得加入到 HeLa 细胞中各种 A β 40 样品的浓度为 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,单独的 A β 40、 Cu^{2+} 和 FC-9 也分别作为对照组。然后每孔加入 20 μL MTT 溶液(5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),继续培养 4 h。终止培养,小心吸去孔

内培养液。每孔加入 150 μL DMSO,置摇床上低速振荡 10 min。最后通过酶标仪在 OD 490 nm 处测量各孔的吸光值,评价探针的细胞毒性。

2 结果与讨论

2.1 FC-9 的晶体结构

双功能荧光螯合剂 FC-9 通过对氨基水杨酸与邻氨基苯硫酚经环合反应制备得到(图 2),将其在乙醇中溶解,室温下静置 5 d 后可得到适合 X-射线单晶测试的浅黄色晶体。在 FC-9 的晶体结构中(图 3),苯并噻唑环和与之相连的苯环构成了它的荧光部分,但二者并不完全共平面,它们之间的二面角为 6.86° ,这和 FC-9 结构类似的螯合剂 2-(苯并[d]噻唑-2-基)-4-碘苯酚(HBXI)一样,且它的二面角比 FC-9 要小 1.76° ^[10]。FC-9 的苯并噻唑环的两个 C-N 键长并不相等[C(6)-N(1) 0.137 9(2) nm; C(7)-N(1) 0.131 0(2) nm],而与苯环相连的氨基氮的 C-N 键长[C(11)-N(2) 0.136 5(3) nm]处于它们之间,它比与酚羟基相连的 C-O 键长[C(9)-O(1) 0.1351(2) nm]稍长(表 2)。此外,和 HBXI 相比,FC-9 除了含有分子内的 O-H $\cdots$ N 氢键之外,还存在苯环上氨基与羟基形

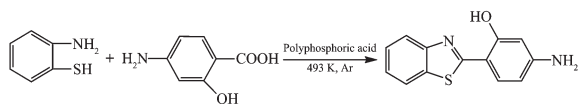
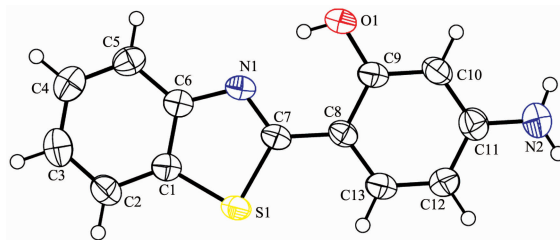


图 2 荧光螯合剂 FC-9 的合成路线

Fig.2 Synthetic route of fluorescent chelator FC-9



Ellipsoids are at the probability level of 30%

图 3 荧光螯合剂 FC-9 的晶体结构

Fig.3 Crystal structure of fluorescent chelator FC-9

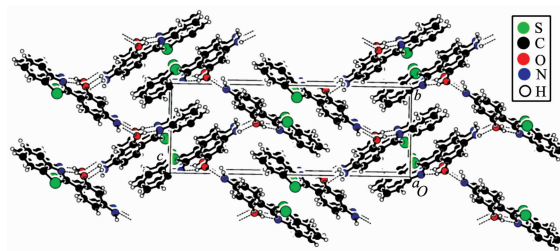


图 4 FC-9 的晶胞堆积图

Fig.4 Packing of FC-9 in unit cell

成的分子间 $N-H\cdots O$ 氢键,这两种氢键使得整个螯合剂分子形成了二维网络结构(图 4 和表 3)。

2.2 荧光性质

在 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲体系中 ($\text{pH}=7.4$), $\text{FC-9}(10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$ 在室温和自然透光的条件下,5 d 内其荧光强度几乎没有变化(图 5A)。这表明 FC-9 的荧光是很稳定的,基本不受时间和光照的影响,这方面它要优于 ThT(ThT 对光敏感)^[24]。在室温和 pH 值在 3.0~8.0 的范围内,FC-9 的荧光强度也几乎保持不变,这使得在近生理的条件下它能够适应生命体中某种生理刺激所引起的 pH 值的变化(图 5A 插图)。不同的溶剂对 FC-9 的荧光强度影响很大(图

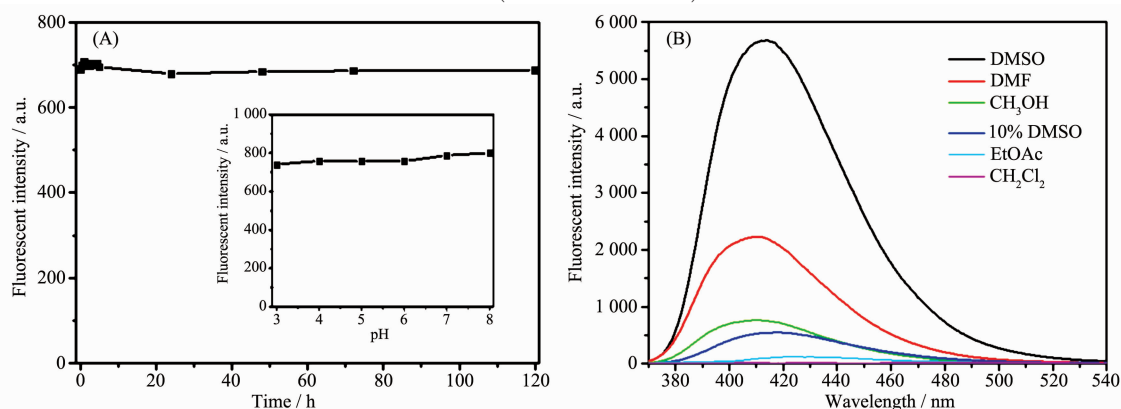


图 5 时间、pH 值(A)和不同溶剂(B)对 FC-9($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的荧光光谱的影响

Fig.5 Effect of time, pH values (A) and different solvents(B) on the fluorescence of FC-9 ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

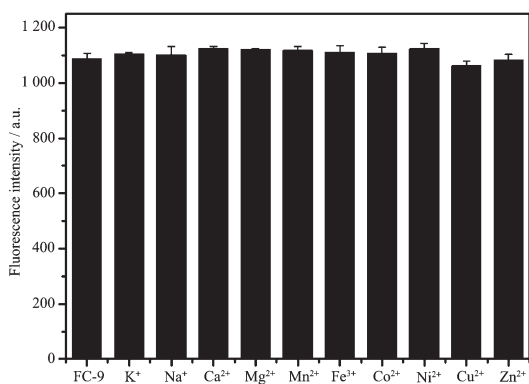


图 6 在 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲溶液中($\text{pH}=7.4$, $V_{\text{H}_2\text{O}}/V_{\text{DMSO}}=9$), $\text{FC-9}(10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$ 对不同的金属离子($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的荧光响应

Fig.6 Fluorescent response of FC-9 ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) to different metal ions($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl buffer ($\text{pH}=7.4$, $V_{\text{H}_2\text{O}}/V_{\text{DMSO}}=9$)

2.3 FC-9 与金属- $A\beta$ 聚集体的相互作用

$A\beta$ 是 AD 患者脑中老年斑的核心蛋白,其中 $A\beta_{40}$ 和 $A\beta_{42}$ 是主要的组分。我们发现 FC-9 与

5B)。实验结果表明,FC-9 在 DMSO 中荧光强度最大,在 DMF、 CH_3OH 、 $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ 中都有不同程度的荧光猝灭,而在 CH_2Cl_2 中基本完全猝灭。为尽可能减少有机溶剂对生物体系的影响并保证 FC-9 的溶解,在后续实验中将 FC-9 配制成含 10% DMSO 的水溶液。FC-9 在 10% DMSO 的水溶液中的最大吸收波长为 350 nm,最大激发波长(λ_{ex})和最大发射波长(λ_{em})分别为 350 nm 和 414 nm。FC-9 对各种常见的金属离子几乎都没有什么荧光响应。如图 6 所示,等物质的量的 FC-9($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)与各种常见的金属离子 (K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+})作用后,其荧光强度基本没有太大的变化。

$A\beta_{40}$ 或 $A\beta_{42}$ 聚集体相互作用随时间的变化是不同的。FC-9 与 $A\beta_{40}$ 聚集体相互作用在 0.5 h 时后荧光增强最多(图 7A),而其与 $A\beta_{42}$ 聚集体在 10 min 时荧光增强最多(图 7B),这主要是由于 FC-9 具有与 ThT 类似的苯并噻唑环状平面结构,因此它能识别 $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ 聚集体,这也印证了我们对 FC-9 分子的设计思想。因为 $A\beta_{42}$ 比 $A\beta_{40}$ 更容易聚集,所以 FC-9 与两种不同的 $A\beta$ 聚集体作用后荧光增强到最大值的时间是不同的。随着反应时间的延长,两种反应体系的荧光强度都会下降到低于其配体的荧光,这可能是 FC-9 对 $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ 聚集体有抑制作用所导致的。在加入 Cu^{2+} 或 Zn^{2+} 到 $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ 中反应 2 d 后,再将 FC-9 加入上述体系中反应 2 d,我们发现金属- $A\beta_{40}/42$ 聚集体的反应体系荧光强度比 $A\beta_{40}/42$ 聚集体的反应体系明显降低(图 8)。作为一种螯合剂,FC-9 此时发挥了螯合的功能。在较长的反应时间中,FC-9 能螯合金属- $A\beta_{40}/42$ 中的 Cu^{2+} 或 Zn^{2+} ,使得金属- $A\beta_{40}/42$ 聚集体解聚,识别金属- $A\beta_{40}/42$ 聚集体的 FC-9 的减少导致

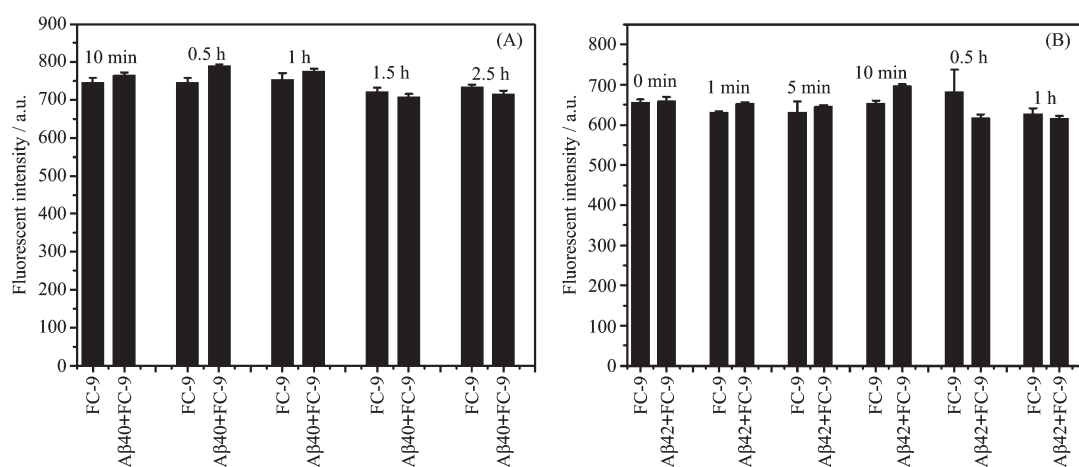


图 7 FC-9 与 Aβ40 (A)或 Aβ42 (B)聚集体相互作用随时间的变化

Fig.7 Interaction of FC-9 and Aβ40 (A) or Aβ42 (B) aggregates as a function of time

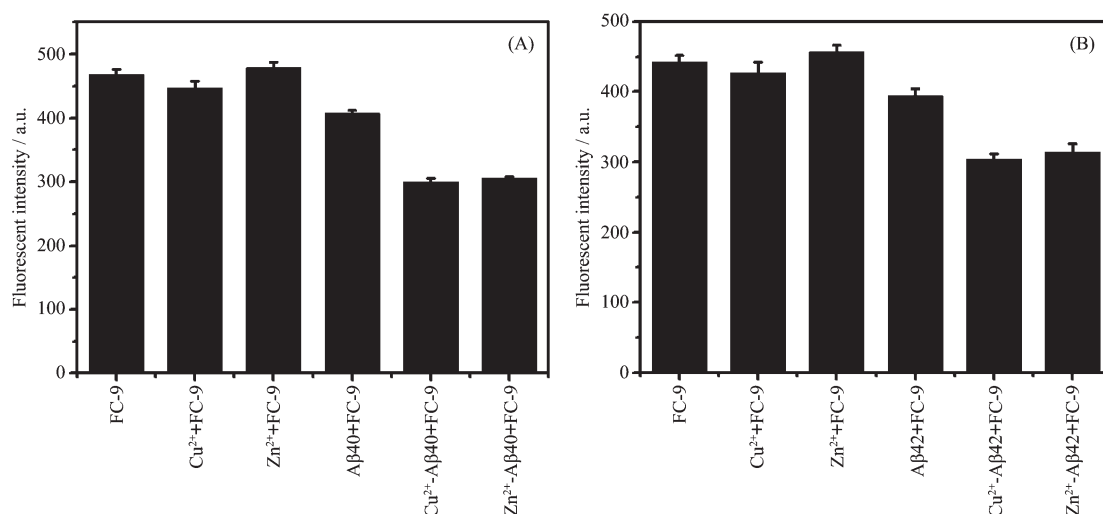


图 8 FC-9 与金属-Aβ40 (A)和金属-Aβ42 (B)聚集体反应 2 d 后的荧光变化

Fig.8 Fluorescence change of FC-9 and Aβ40 (A) (or Aβ42 (B)) aggregates reacted for 2 days

了反应体系的荧光减小。我们尝试用电位滴定法测试 FC-9 与 Cu²⁺、Zn²⁺的结合常数,由于 FC-9 的溶解性不好,采用了含有 10% DMSO 的水溶液体系。但是,向 FC-9 中加入 Cu²⁺或 Zn²⁺进行滴定,即使是微摩尔数量级,反应过程中就逐渐产生了沉淀物,从而导致测不出 FC-9 与 Cu²⁺、Zn²⁺的结合常数。参照文献,和 FC-9 结构类似的螯合剂 2-(苯并[d]噻唑-2-基)-4-碘苯酚(HBXI)与 Cu²⁺、Zn²⁺的稳定常数 β 分别为 10^{20.29}、10^{19.68}, 因此相对于金属-Aβ40/42 而言 ($\lg K_{\text{Cu-A}\beta 40/42}=5\sim 10$, $\lg K_{\text{Zn-A}\beta 40/42}=3\sim 9$), FC-9 容易螯合金属-Aβ40/42 中的金属离子^[10,25-27]。

为了证实 FC-9 使金属-Aβ40/42 聚集体解聚,我们又通过可溶性蛋白含量测定和浊度实验进行

了验证。BCA 蛋白分析法表明, Cu²⁺-Aβ40/42 和 Zn²⁺-Aβ40/42 聚集体中可溶性的 Aβ40/42 含量比 Aβ40/42 聚集体少,说明 Cu²⁺、Zn²⁺促进了 Aβ40/42 的聚集(图 9)。加入 FC-9 到金属-Aβ40/42 聚集体中后, Cu²⁺-Aβ40/42 聚集体和 Zn²⁺-Aβ40/42 聚集体中可溶性的 Aβ40/42 含量都增加了,但可溶的 Aβ40/42 增加的程度都有限,说明 FC-9 的加入可能使得金属-Aβ40/42 聚集体解聚了。浊度实验结果如图 10 所示,相对于新鲜的 Aβ40/42,反应 2 d 后的 Aβ40/42 溶液的吸光度值变大,说明 2 d 后 Aβ40/42 形成了聚集体。加入 Cu²⁺或 Zn²⁺到新鲜的 Aβ40/42 中反应 2 d 后,溶液的吸光度值又明显增强,表明加入金属离子又使 Aβ40/42 的聚集程度增大。加

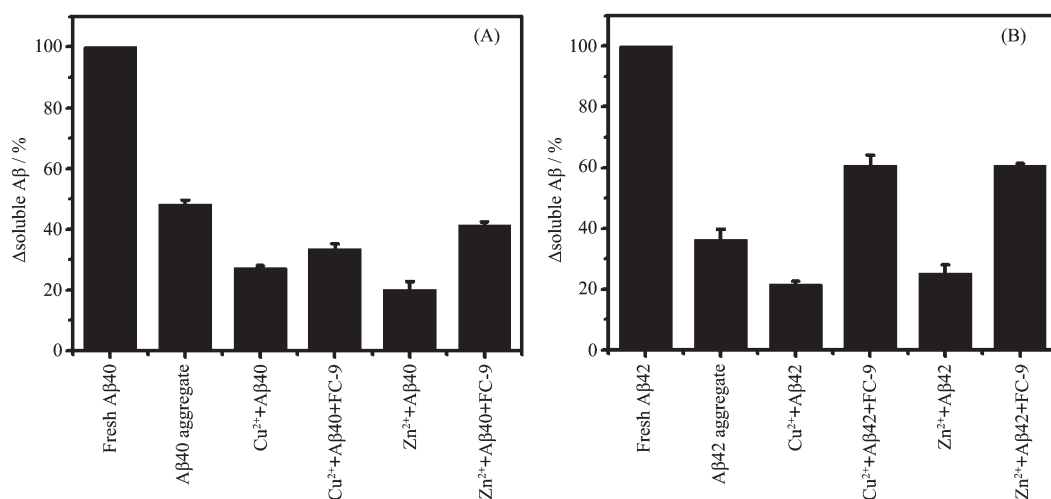


图 9 FC-9 与金属- $A\beta$ 40 (A)和金属- $A\beta$ 42 (B)聚集体反应 2 d 后,用 BCA 蛋白分析法测定可溶性 $A\beta$ 含量

Fig.9 BCA protein analysis of soluble $A\beta$ after FC-9 and metal- $A\beta$ 40 (A) (or metal- $A\beta$ 42 (B)) aggregates reacted for 2 days

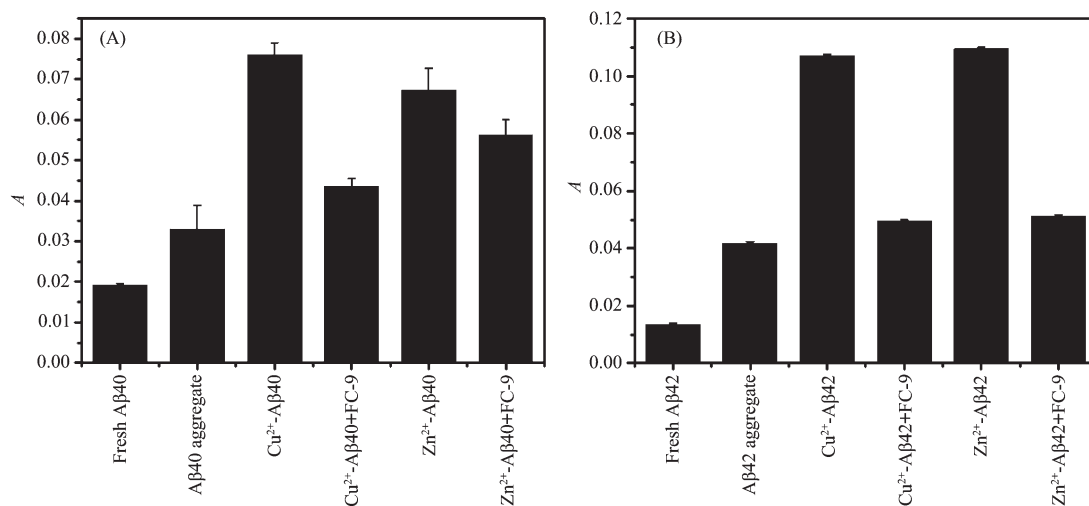


图 10 FC-9 与金属- $A\beta$ 40 (A)和金属- $A\beta$ 42 (B)聚集体反应 2 d 后的浊度实验

Fig.10 Turbidity test after FC-9 and metal- $A\beta$ 40 (A) (or metal- $A\beta$ 42 (B)) aggregates reacted for 2 days

入 FC-9 到金属- $A\beta$ 40/42 中后,溶液的吸光度值有所下降,但没有下降到低于培养 2 d 的 $A\beta$ 40/42 聚集体,也说明 FC-9 能够螯合金属- $A\beta$ 40/42 中的 Cu^{2+} 或 Zn^{2+} ,使得金属- $A\beta$ 40/42 聚集体解聚。

2.4 聚集体形态和构象

透射电镜 (transmission electron microscopy, TEM) 能用来直接观测 $A\beta$ 聚集体纳米级尺寸的聚集形态,可为分析它的各种形貌诸如无定形和纤维状等提供最为直观的证据。如图 11 所示,新鲜制备的 $A\beta$ 40 在 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 存在或不存在的条件下于 37 $^{\circ}C$ 反应 2 d 后,均能观测到有规则的线状纤维形貌(图 11A,B,C)。与 Cu^{2+} 诱导的 $A\beta$ 40 聚集体相比, Zn^{2+} 诱导的 $A\beta$ 40 聚集体还发现有成团结块的形貌,

这主要是因为 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 虽然都能诱导并加快 $A\beta$ 40 的聚集,但 Zn^{2+} 诱导 $A\beta$ 40 的聚集的能力要比 Cu^{2+} 大得多^[28]。在加入 FC-9 到金属- $A\beta$ 40 聚集体中反应 2 d 后,这些金属- $A\beta$ 40 聚集体变小了,而且是一种无定形的状态(图 11D,E),这应该是 FC-9 与金属- $A\beta$ 40 聚集体作用后,前者夺取了后者的金属离子,并使得后者解聚为 $A\beta$ 40 寡聚体或者单体,而且这可以从 FC-9 与金属- $A\beta$ 40 聚集体作用的荧光测试和 BCA 蛋白含量分析等多种检测方法得到证实。

不同 $A\beta$ 42 样品的透射电镜结果与 $A\beta$ 40 样品类似。单独的 $A\beta$ 42 样品在 37 $^{\circ}C$ 条件下反应两 d 后形成了纤维状的聚集体,随着 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的加入,

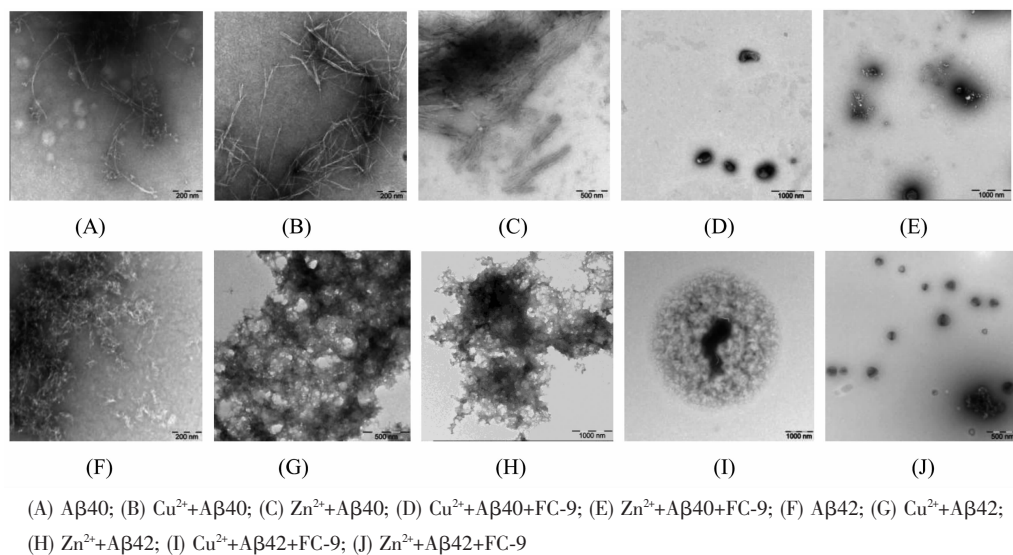


图 11 不同 Aβ40/42 样品于 37 °C 反应 2 d 后的透射电镜图片

Fig.11 TEM images of different Aβ40/42 samples after reacted for 2 days at 37°C

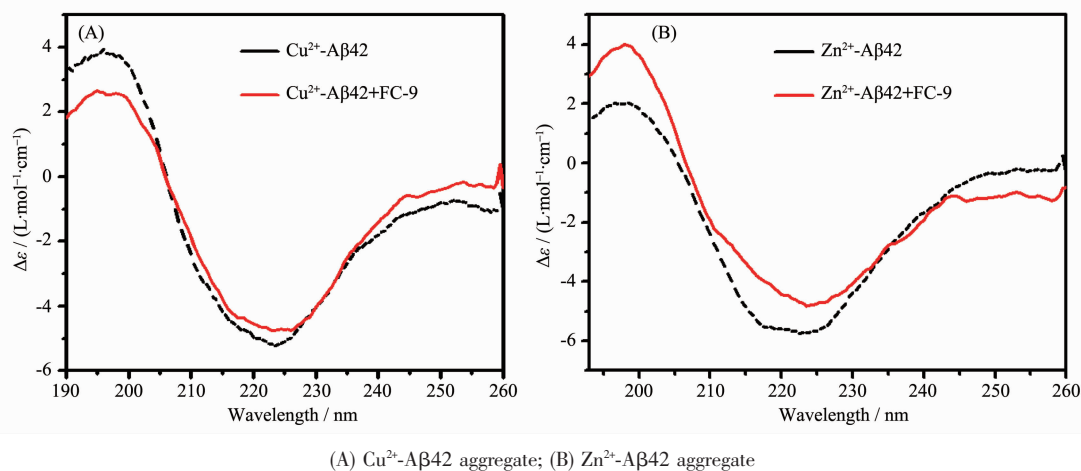


图 12 FC-9 加入或不加入金属-Aβ42 聚集体的圆二色谱

Fig.12 CD spectra of metal-Aβ42 aggregates systems in the presence and absence of FC-9

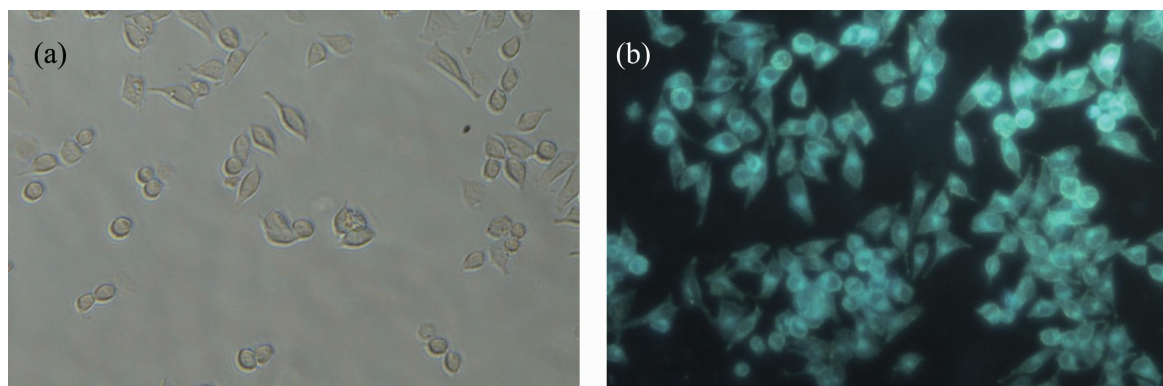
可观测到形成的金属-Aβ42 网状纤维聚集体都比单独的 Aβ42 聚集程度大, 说明 Cu²⁺、Zn²⁺促进了 Aβ42 的聚集 (图 11F,G,H)。和 Aβ40 样品对比, Aβ42 聚集体和金属-Aβ42 聚集体的聚集程度更大, 这又表明了 Aβ42 比 Aβ40 更易聚集。在加入 FC-9 到金属-Aβ42 聚集体中反应 2 d 后, 在 Cu²⁺-Aβ42 聚集体中观察到聚集体结构疏松了很多, 而在 Zn²⁺-Aβ42 聚集体中观察到了小的无定形颗粒状聚集体(图 11I,J), 这也表明了 FC-9 的加入使得金属-Aβ42 聚集体解聚。

圆二色(circular dichroism, CD)是研究稀溶液中蛋白质构象变化的一种快速、简单、较准确的方法。我们研究了将 FC-9 加入或不加入金属-Aβ42 聚集

体体系的圆二色光谱 (图 12)。测试的结果表明, 在 Zn²⁺和 Cu²⁺的存在下, Aβ42 在 225 nm 左右出现了其纤维特征的负吸收波段(β-折叠二级结构)^[29]。加入 FC-9 到金属-Aβ42 聚集体中后, 表示 β-折叠的特征的负吸收波段均上移, 表明 FC-9 的加入使得具有 β-折叠结构的 Cu²⁺-Aβ 聚集体和 Zn²⁺-Aβ 聚集体中的 β-折叠结构的蛋白减少, 这不但说明它们的构象都发生了改变, 还暗示 FC-9 的加入可能使得金属-Aβ 聚集体解聚了, 其结果也与上述浊度和 BCA 蛋白质含量分析的测试结果一致。

2.5 细胞实验研究

将 FC-9(10 μmol·L⁻¹)加入到 HeLa 细胞中并共培养一段时间后, 在紫外光下激发下(360~370 nm),



(A) Bright-field image of HeLa cells; (B) HeLa cells exposed to $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FC-9

图 13 向 HeLa 细胞中加入 FC-9 的倒置荧光显微镜图片

Fig.13 FM images of HeLa cells exposed to FC-9 (excited with UV light)

表 4 FC-9 和氯碘羟喹的 Lipinski 参数和 lgBB 数值

Table 4 Lipinski's parameters and lgBB Values of FC-9 and CQ

	MW	clgP	HBA	HBD	TPSA	lgBB
CQ	305	3.73	3	1	32.59	0.21
FC-9	242	2.38	4	3	58.61	-0.38

Lipinski's rules: $MW \leq 450$, $HBD \leq 5$, $HBA \leq 10$, $TPSA \leq 90$, $clgP \leq 5$. Here, MW: molecular weight; clgP: calculated logarithm of the octanol-water partition coefficient; HBD: hydrogen-bond donor atoms; HBA: hydrogen-bond acceptor atoms; TPSA: polar surface area. Formula of crossing the blood-brain barrier (BBB): $lgBB = -0.014 \cdot 8TPSA + 0.152clgP + 0.130$ ($lgBB > 0.3$, readily cross the BBB; $lgBB < -1.0$, only poorly distributed to the brain).

用倒置荧光显微镜可观察到细胞发浅黄绿色的荧光(图 13),这表明 FC-9 能够跨过细胞膜。事实上,和曾经进行了二期临床实验的螯合剂氯碘羟喹(CQ)一样,FC-9 在理论上也完全符合严格的 Lipinski 类药标准和跨越血脑屏障的计算方法(表 4)^[30-31]。

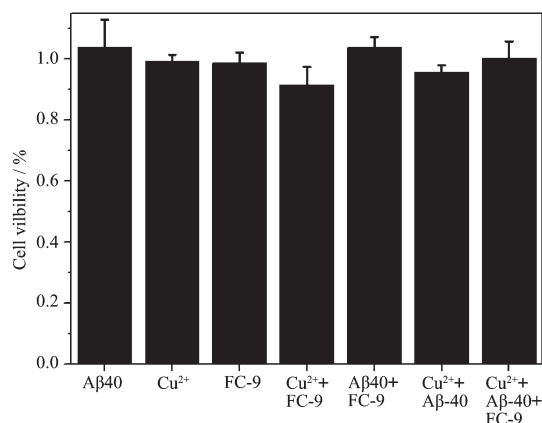


图 14 在 FC-9 存在或不存在的条件下, $A\beta 40$ 和 Cu^{2+} - $A\beta 40$ 聚集体在 HeLa 细胞体系中于 37°C 孵育 24 h 后的毒性

Fig.14 Cytotoxicity of $A\beta 40$ and Cu^{2+} - $A\beta 40$ aggregates with and without FC-9 toward HeLa cells after incubation for 24 h at 37°C

用 MTT 方法测试了 FC-9 与金属- $A\beta 40$ 聚集体在 HeLa 细胞体系中的毒性。结果如图 14 所示,在相同的条件下,单独的 $A\beta 40$ 、 Cu^{2+} 和 FC-9 对 HeLa 细胞只显示很小的毒性,细胞活力依然大于 90% (相对值为 100%)。含有 Cu^{2+} 的 $A\beta 40$ 毒性稍微高于 $A\beta 40$,细胞存活率下降。在有 FC-9 存在的情况下, Cu^{2+} - $A\beta 40$ 聚集体的毒性下降,细胞活力略有上升,这表明 FC-9 能在一定程度上抑制由 Cu - $A\beta 40$ 聚集体产生的毒性。

3 结 论

本文以硫磺素 T 为母体,将其与氯碘羟喹类似的螯合基团组合在一起,设计合成了一种识别和抑制 $A\beta$ 聚集体的荧光螯合剂 FC-9。在 pH 3.0~8.0 的范围内,它的荧光强度基本稳定,基本不受时间和光照的影响,而且与各种常见的金属离子作用其荧光强度也基本没有变化。FC-9 能识别和解聚金属- $A\beta 40/42$ 聚集体,它符合严格的 Lipinski 类药标准,能够跨过细胞膜,在一定程度上可抑制由 Cu - $A\beta 40$ 聚集体产生的毒性,这使得 FC-9 在检测细胞内的 $A\beta 40$ 聚集体和用于螯合治疗 AD 方面可能有潜在

的应用价值。

参考文献:

- [1] Adlard P A, Bush A I. *J. Alzheimer's Dis.*, **2006**,**10**:145-163
- [2] Hardy J A, Higgins G A. *Science*, **1992**,**256**:184-185
- [3] Karran E, Mercken M, Strooper B D. *Nature*, **2011**,**10**:698-712
- [4] Bush A I. *Trends Neurosci.*, **2003**,**26**:207-214
- [5] Lovell M A, Robertson J D, Teesdale W J, et al. *J. Neurol. Sci.*, **1998**,**158**:47-52
- [6] Bush A I, Tanzi R E. *Neurotherapeutics*, **2008**,**5**:421-432
- [7] Perez L R, Franz K J. *Dalton Trans.*, **2010**,**39**:2177-2187
- [8] Scott L E, Orvig C. *Chem. Rev.*, **2009**,**109**:4885-4910
- [9] Faller P, Hureau C, Penna G L. *Acc. Chem. Res.*, **2014**,**47**:2252-2259
- [10] Rodríguez-Rodríguez C, Sánchez de G N, Rimola A, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**,**131**:1436-1451
- [11] Chen T, Wang X, He Y, et al. *Inorg. Chem.*, **2009**,**48**:5801-5809
- [12] Zhang Y, Chen L Y, Yin W X, et al. *Dalton Trans.*, **2011**,**40**:4830-4833
- [13] Sharma A K, Pavlova S T, Kim J, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**,**134**:6625-6636
- [14] Savelieff M G, Liu Y Z, Senthamarai R R P, et al. *Chem. Commun.*, **2014**,**50**:5301-5303
- [15] Kochi A, Eckroat T J, Green K D, et al. *Chem. Sci.*, **2013**,**4**:4137-4145
- [16] Jones M R, Service E L, Thompson J R, et al. *Metallomics*, **2012**,**4**:910-920
- [17] Lee S, Zheng X, Krishnamoorthy J, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**,**136**:299-310
- [18] Nol S, Cadet S, Gras E, et al. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**,**42**:7747-7762
- [19] Savelie M G, DeToma A S, Derrick J S, et al. *Acc. Chem. Res.*, **2014**,**47**:2475-2482
- [20] Adlard P A, Sedjahtera A, Gunawan L, et al. *Aging Cell*, **2014**,**13**:351-359
- [21] Klunk W E, Wang Y, Huang G F, et al. *Life Sci.*, **2001**,**69**:1471-1484
- [22] Sheldrick G M. *SHELXS-97, A Program for the Solution of Crystal Structures*, University of Göttingen, Germany, **1997**.
- [23] Sheldrick G M. *SHELXL-97, A Program for the Refinement of Crystal Structures*, University of Göttingen, Germany, **1997**.
- [24] Harry L III. *Protein Sci.*, **1993**,**2**:404-410
- [25] Hatcher L Q, Hong L, Bush W D, et al. *J. Phys. Chem. B*, **2008**,**112**:8160-8164
- [26] Tugu V, Karafin A, Palumaa P. *J. Neurochem.*, **2008**,**104**:1249-1259
- [27] Faller P, Hureau C. *Dalton Trans.*, **2009**:1080-1094
- [28] Ha C, Ryu J, Park C B. *Biochemistry*, **2007**,**46**:6118-6125
- [29] Huang T H, Yang D S, Plaskos N P, et al. *J. Mol. Biol.*, **2000**,**297**:73-87
- [30] Lipinski C A, Lombardo F, Dominy B W, et al. *Adv. Drug Delivery Rev.*, **1997**,**23**:3-25
- [31] Clark D E, Pickett S D. *Drug Discov. Today*, **2000**,**5**:49-58