

# $\beta$ -淀粉样蛋白斑块的无标记成像及光动力降解

黄燕霞<sup>1</sup>, 许皓<sup>1\*</sup>, 栾萍<sup>2</sup>, Ohulchanskyy Tymish Y<sup>1</sup>, 屈军乐<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup>深圳大学物理与光电工程学院光电子器件与系统(教育部/广东省)重点实验室, 深圳 518060;

<sup>2</sup>深圳大学医学部, 深圳 518060

**摘要** 由  $\beta$ -淀粉样蛋白(A $\beta$ )生成的 A $\beta$  斑块是阿尔兹海默症(AD)产生的重要病理特征之一。在阿尔兹海默症治疗的相关研究中,实现对 A $\beta$  斑块的有效检测和降解是需要解决的重要科学问题。由于 A $\beta$  单体聚集成斑块后具有较强的自体荧光,因此本研究利用非线性光学成像方法实现对 A $\beta$  斑块的无标记成像,同时利用光敏剂的光动力效应对 A $\beta$  斑块进行降解。比较了不同浓度下光敏剂对 A $\beta$  斑块的降解效果,制备了相应的脂质体并成功地将其用于对 A $\beta$  斑块的降解。探讨了无标记光学成像及光动力疗法在阿尔兹海默症研究中的潜在应用价值,为优化阿尔兹海默症的诊断和治疗提供了新的途径。

**关键词** 医用光学; 无标记成像; 非线性光学成像; 光动力治疗; 阿尔兹海默症; 纳米脂质体

中图分类号 R454.2

文献标志码 A

doi: 10.3788/CJL202047.0207029

## Label-Free Imaging of $\beta$ -Amyloid Plaques and Photodynamic Degradation

Huang Yanxia<sup>1</sup>, Xu Hao<sup>1\*</sup>, Luan Ping<sup>2</sup>, Ohulchanskyy Tymish Y<sup>1</sup>, Qu Junle<sup>1\*\*</sup>

<sup>1</sup>Guangdong Province Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems, Ministry of Education, College of Physics and Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China;

<sup>2</sup>Health Science Center, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China

**Abstract** Formation of  $\beta$ -Amyloid (A $\beta$ ) plaques is one of the most significant pathological features of Alzheimer's disease (AD). Detection and degradation of A $\beta$  plaques are crucial in AD treatment. When A $\beta$  monomers aggregate to form plaques, they produce strong autofluorescence. In this study, we investigate label-free imaging of A $\beta$  plaques by using the nonlinear optical imaging method and study their degradation via photodynamic effect of the photosensitizer. Moreover, we study the relationship between photosensitizers with different concentrations and degradation effect of A $\beta$  plaques. Corresponding liposomes are prepared and they are applied to the degradation of A $\beta$  plaques. The potential applications of label-free optical imaging and photodynamic therapy in AD research are discussed, and a new way for optimizing AD diagnosis and treatment is provided.

**Key words** medical optics; label-free imaging; nonlinear optical imaging; photodynamic therapy; Alzheimer's disease; nanoliposomes

**OCIS codes** 170.0110; 170.5180; 170.2520

## 1 引 言

阿尔兹海默症(AD)是一种典型的中枢神经系统退行性疾病,在我国现有约 1000 万痴呆患者中,AD 占全部患者总数的 50%~70%,其在全世界范围内的患病率也在逐渐增加<sup>[1]</sup>。在晚期 AD

患者的脑部中可以检测到大量的以  $\beta$ -淀粉样蛋白(A $\beta$ )沉积为核心的神经炎型斑块状聚集体及神经纤维缠结。目前对 AD 发病机制的解释仍在探索中,但大多数研究主要支持淀粉样蛋白级联假设(ACH),即认为沉积的斑块会引起神经细胞的损伤和死亡,最终导致痴呆<sup>[2]</sup>。研究表明,在 AD 患

收稿日期: 2019-10-08; 修回日期: 2019-11-07; 录用日期: 2019-11-19

基金项目: 国家自然科学基金(61525503,61620106016,61835009,61705139)、广东省高等学校科技创新(重点)项目(2015KGJHZ002,2016KCXTD007)、广东省自然科学基金(2014A030312008)、深圳市基础科研项目(JCYJ2017041210500352090620324,JCYJ20170817094735945)

\* E-mail: hxuhao@qq.com; \*\* E-mail: jlqu@szu.edu.cn

者中,淀粉样蛋白前体(APP)会过度表达,随后通过先后切割 $\beta$ 分泌酶和 $\gamma$ 分泌酶,再进一步自发聚集形成低聚物或淀粉样纤维及聚集斑块,从而产生神经毒性作用。因此,有效地检测并抑制 $A\beta$ 聚集体的形成或对其进行降解有可能达到预防或治疗AD的效果<sup>[3]</sup>。除了传统的免疫荧光标记之外,目前已有较多研究利用 $A\beta$ 斑块的光学性质对其进行无标记成像,如利用多光子成像可以在近红外波段对 $A\beta$ 斑块实现活体的无标记成像<sup>[4]</sup>,复旦大学季敏标教授课题组<sup>[5]</sup>通过研究 $A\beta$ 斑块的非线性光学性质,利用受激拉曼散射对斑块实现了无标记成像。

光动力治疗(PDT)是一种联合光、光敏剂和组织中的氧分子,通过光动力学反应选择性地破坏病变组织的全新治疗技术<sup>[6]</sup>。光敏剂只有在特定波长的光照下才会被激发并与周围物质反应产生活性氧(ROS),达到使细胞凋亡及组织坏死等作用,故其具有良好的安全性、选择性和微创性,被广泛地应用于眼底黄褐斑病变、鲜红斑痣、恶性肿瘤等疾病中,具有广阔的医疗前景<sup>[7-8]</sup>。目前应用较多的光敏剂主要是单体化合物,大多为四吡咯类化合物的衍生物,包括卟啉、卟吩、二氢卟吩、内源性卟啉前体等,其他还有金属酞菁、稠环醌类化合物等。为了提高对病灶的选择性,并提高其在体内的传递效率,通常在光敏剂原有基础上进行修饰和纳米包载,如糖偶联光敏剂、脂质体包载光敏剂等<sup>[9]</sup>。光敏剂被激发产生的ROS也能破坏碳骨架,使得蛋白质被降解,因此近年来PDT也被应用于 $A\beta$ 斑块的降解中,并已通过原子力显微镜、电泳、圆二色性分析等方法证实<sup>[10-11]</sup>。除此之外,研究人员对多种光敏剂进行修饰并将其与纳米粒子相结合,使之具有较高的选择性、特异性和生物相容性,这在 $A\beta$ 抑制剂的研究中有重要意义<sup>[12]</sup>。

在本研究中,利用化学名为苯并卟啉衍生物一元酸环-A(BPD)的光敏剂维替泊芬实现对体外 $A\beta$ 斑块的光动力降解,并通过酶联免疫吸附测定(ELISA)定量检测降解效率。由于 $A\beta$ 斑块具有明显的自体荧光,利用双光子和谐波等非线性光学成像方法对其降解过程进行实时成像记录,同时探讨了不同BPD浓度对斑块的降解效率,并利用ELISA检测方法进行了定量分析。为了更好地应用到活体中,将BPD包载于脂质体中,为未来在体的低细胞毒性 $A\beta$ 斑块降解和实时检测提供了新的途径。

## 2 方 法

### 2.1 $A\beta$ 斑块的制备

称取1 mg的 $A\beta_{1-42}$ 冻干粉溶于200  $\mu\text{L}$ 预冷的六氟异丙醇(HFIP)中,密封并涡旋混匀后,室温下静置60 min,直到液体澄清,得到 $A\beta$ -HFIP溶液。取4支无菌的1.5 mL的EP管,每支分装50  $\mu\text{L}$ 的 $A\beta$ -HFIP溶液,使用真空冷冻干燥仪挥干HFIP,得到无色透明的 $A\beta$ 肽膜,并将其置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存。每次临用前,取一支分装管,向肽膜内加入10  $\mu\text{L}$ 的二甲基亚砜(DMSO),水浴超声(功率为300 W,频率为35 Hz)处理10 min,得到 $A\beta$ -DMSO溶液;向 $A\beta$ -DMSO溶液中加入预冷的440  $\mu\text{L}$ 的磷酸盐缓冲液(PBS),得到0.5 mg/mL的 $A\beta$ 溶液;将得到的溶液置于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱内孵育1 d,使用高速冷冻离心机于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 温度、13000 r/min的离心速度离心10 min以去除杂质;最后将得到的溶液置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 环境下孵育2周,取样滴于共焦皿中进行实验。

### 2.2 BPD 溶液和脂质体的制备

称取1 mg BPD粉末溶于1 mL DMSO溶剂中配制成1 mg/mL的BPD溶液,将其放于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中保存。每次实验前将其常温融化后吸取适量配制成所需浓度的溶液。对于脂质体的制备:先将脂质体合成试剂1,2-二棕榈酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱(DPPC)、1,2-二油酰基-三甲胺丙烷甲基氯盐(DOTAP)、二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺-聚乙二醇2000铵盐(DSPE-PEG2000)和胆固醇(cholesterol)在氯仿中按10:1:1:5的物质的量比在玻璃试管中混合,再在混合液中加入100 mmol/L溶于丙酮的BPD,并混合均匀;利用氮气作为保护气在避光的条件下用旋转蒸发仪将溶液中的氯仿和丙酮等有机溶剂去除,使混合的物质在试管壁上形成脂质薄膜;将试管壁上的脂质层振荡溶解于溶液中,并进行10次 $45\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴和 $0\text{ }^\circ\text{C}$ 冰浴各10 min的交替循环,通过在不同温度相变下打开和闭合脂质体层,使BPD包装在脂质体中;利用美国Avanti Polar Lipids公司的脂质体挤压装置将脂质体溶液透过孔径为0.1  $\mu\text{m}$ 的聚碳酸酯膜过滤10次以上,使其成为粒径均一的含BPD的脂质体;再利用300 KD透析系统在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下将未包装在脂质体中的游离BPD以1:1000的体积比放入磷酸盐缓冲液中进行过夜透析,去除未包载在脂质体中的游离BPD。制成的脂质体如图1所示。

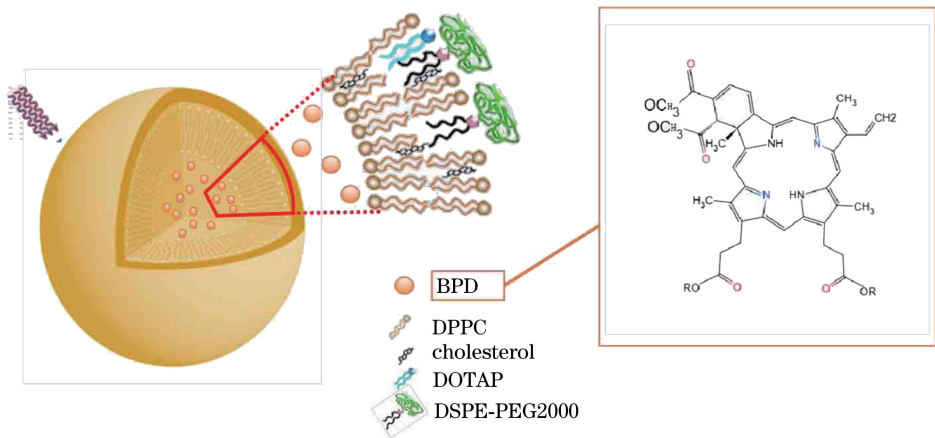


图 1 脂质体 BPD 结构组成图

Fig. 1 Diagram of BPD structure of liposome

### 2.3 BPD 吸收曲线及荧光发射曲线的测量

研究中,分别使用 GBC Cintra 2020 紫外-可见分光光度计和 HORIBA 320 荧光光谱仪来测量 BPD 的紫外吸收曲线及荧光发射曲线。配制的 BPD 质量浓度分别为 0.35, 0.70, 1.40, 2.10, 2.80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

### 2.4 成像参数

本实验采用自行搭建的多模态光学成像系统对  $\text{A}\beta$  聚集体进行非线性光学成像,系统包括明场成像通道、共聚焦成像通道、双光子荧光成像通道以及二次谐波成像通道。明场成像采用汞灯进行照明,共聚焦成像的激发波长为 488 nm,收集通道中心波长为 470 nm,二次谐波成像及双光子荧光成像的光源采用飞秒激光器,激发波长为 900 nm,收集通道中心波长分别为 450 nm 和 550 nm。使用 60 $\times$ 油镜进行成像。

### 2.5 光照实验

将形成斑块聚集的  $\text{A}\beta$  溶液滴于共聚焦皿里,随后加入不同浓度的 BPD 溶液充分混匀。先对光照前的斑块进行成像,随后将 690 nm 耦合二极管激光器(MRL-III-690,长春新产业光电技术有限公司提供)通过光纤固定于载物台上,保持样品不动,以 50  $\text{mW}/\text{cm}^2$  激光功率密度进行照射。

### 2.6 ELISA 定量检测

配制质量浓度为 60  $\text{ng}/\text{mL}$  的  $\text{A}\beta$  溶液,并分为实验组和对照组,其中实验组加入浓度为 1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  的 BPD 溶液并以 50  $\text{mW}/\text{cm}^2$  的激光功率密度分别照射 0, 0.5, 1, 1.5 h, 对照组不加入 BPD 溶液并以相同功率密度的激光照射 1.5 h, 随后采用  $\text{A}\beta$  ELISA 试剂盒(购于江莱生物)进行检测,通过测量其在

450 nm 处的吸光度来评估溶液中  $\text{A}\beta$  的含量。

## 3 实验结果与讨论

### 3.1 $\text{A}\beta$ 斑块的形成

许多蛋白质在合适的环境下会发生轻度变性,并经错误折叠重组形成淀粉样纤维聚集的结构,如升高相应的温度就能使得胰岛素和  $\beta$ -乳球蛋白聚集形成球晶<sup>[13]</sup>。不同蛋白形成的聚集结构形状各异,受蛋白种类及聚集环境的影响,这些聚集结构的纤维轴骨架大部分由  $\beta$  键构成,并且在结构及化学性质方面具有较好的稳定性<sup>[14]</sup>。对于  $\text{A}\beta$ ,其在模拟的体外生理环境下( $\text{pH}=7, 37^\circ\text{C}$ )也能自发形成聚集体。目前普遍认为  $\text{A}\beta$  的聚集过程为一种成核的聚集过程,但其具体过程十分复杂,人们希望用一些聚集机理如“dock-lock 机理”<sup>[15]</sup>、“stop and go 机理”<sup>[16]</sup>等对该过程进行解释归纳。已有文章报道  $\text{A}\beta$  的聚集与其质量浓度密切相关<sup>[17]</sup>,根据预实验选取了质量浓度为 0.5  $\text{mg}/\text{mL}$  的  $\text{A}\beta$  溶液,将配制的  $\text{A}\beta$  溶液置于  $37^\circ\text{C}$  的孵育箱中进行孵育并对其进行观察。实验观察到,  $\text{A}\beta$  斑块的形成具有明显的时间过程,在溶液孵育 3 d 时,便能观察到  $\text{A}\beta$  已经从单体逐渐生长成聚集核心,有的核心已经聚集生长出细小的纤维状,如图 2(a)所示。  $\text{A}\beta$  的 C 端不仅可以调节  $\text{A}\beta$  的插膜,还能导致自身的聚集<sup>[18]</sup>,因此,实验配制的  $\text{A}\beta_{1-42}$  溶液在孵育的过程中,可能会通过蛋白质的 C 端相互作用来增强分子间的相互作用,从而形成寡聚体及纤维。除此之外,研究报道  $\text{A}\beta$  在形成聚集过程中,其内部分子电荷离域也会发生改变,所以形成聚集核心之间的静电作用也会进一步诱导蛋白三级结构的改变,从而促进  $\text{A}\beta$  的聚集<sup>[19]</sup>。在孵育时间达到

7 d时,观察到溶液中出现了 A $\beta$  蛋白的球晶结构,并显现出了典型的马耳他交叉形状,如图 2(b)所示,在 AD 患者的脑组织切片中也有过类似的发现<sup>[17]</sup>。在

孵育时间达到 14 d时,可发现斑块状的聚集,同时溶液透明度发生了改变,逐渐变浑浊,这可能是由底部的聚集物沉积造成的,如图 2(c)所示。

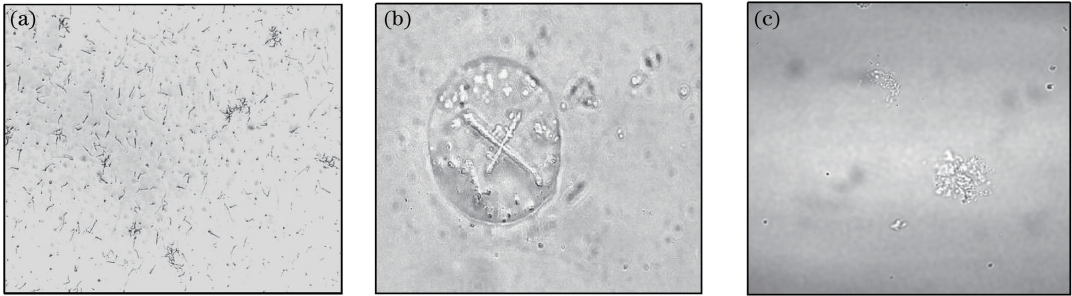


图 2 A $\beta$  溶液的不同聚集状态。(a) A $\beta$  纤维;(b) A $\beta$  球晶;(c) A $\beta$  斑块

Fig. 2 Different aggregation states of A $\beta$  solution. (a) A $\beta$  fibers; (b) A $\beta$  spherulites; (c) A $\beta$  plaques

### 3.2 BPD 吸收和荧光曲线

对于光敏剂而言,吸光度是其最重要的光学特征。为了确定本研究使用的光敏剂 BPD 的光学性质,用分光光度计测量了其不同质量浓度下对应的吸收光谱和荧光发射光谱,如图 3 所示。在图 3(a)、(b)中可以看到,不同质量浓度下的 BPD 在 400~500 nm 带宽内有最高的吸收峰,这与基于卟啉类的其他光敏剂性质相似,BPD 的次吸收峰在 690 nm 附近。由于 400~500 nm 的吸收峰接近紫外区域,此波段的光在组织中的透过性较差,同时对细胞及人体伤害较大,通常情况下都将

此波长作为观察 BPD 荧光时的激发波长。而在 PDT 中,光毒性为重要的考虑因素,故选择接近红外区的次吸收峰对应的波长作为 PDT 的治疗波长,该波段既能避免体内内源性色素团的干扰,同时又能维持 PDT 过程中产生单态氧所需的能量。图 3(c)、(d)为 430 nm 波长激发下不同质量浓度 BPD 对应的荧光发射谱及其荧光强度随质量浓度变化的线性曲线,可以发现 BPD 荧光发射峰在 690 nm 附近,很好地避开了 A $\beta$  斑块的荧光收集通道,故在该实验中 BPD 可作为良好的光敏剂进行使用。

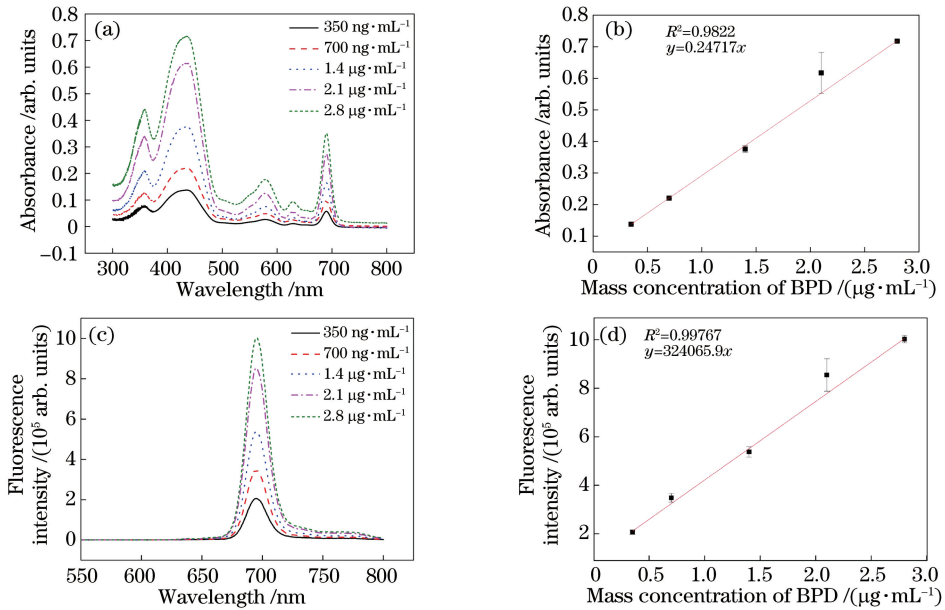


图 3 不同质量浓度下 BPD 溶液的紫外吸收及荧光发射谱。(a) BPD 紫外吸收谱;

(b) BPD 吸光度随质量浓度变化的标准曲线;(c) BPD 荧光发射谱;(d) BPD 荧光发射强度随质量浓度变化的标准曲线

Fig. 3 Absorption and fluorescence emission spectra of BPD solution with different mass concentrations. (a) BPD ultraviolet absorption spectra; (b) standard curve of BPD absorbance varying with mass concentration; (c) BPD fluorescence emission spectra; (d) standard curve of BPD fluorescence intensity varying with mass concentration

### 3.3 不同浓度 BPD 对斑块的降解作用

研究中将终值浓度为 1, 10, 100  $\mu\text{mol/L}$  的 BPD 加入已形成斑块聚集的  $\text{A}\beta$  溶液中, 并设置未

加 BPD 的  $\text{A}\beta$  溶液作为对照组, 研究不同浓度 BPD 对  $\text{A}\beta$  斑块的降解作用。实验原理如图 4 所示。

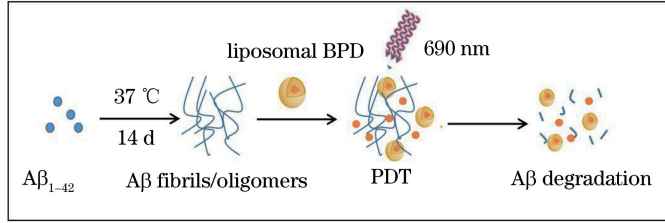


图 4 BPD 及其脂质体对  $\text{A}\beta$  聚集体的降解机理

Fig. 4 Degradation mechanism of  $\text{A}\beta$  aggregates by BPD and its liposomes

实验结果显示, 在没有加 BPD 的对照组中, 经过 1.5 h 的光照, 斑块没有出现减小或消失的趋势, 这也排除了  $\text{A}\beta$  斑块自发荧光漂白的可能性, 如图 5 所示。从图中也可以看到, 相比于共聚焦成像, 利用双光子及二次谐波对  $\text{A}\beta$  斑块进行成像时其荧光强度更强, 更能突出斑块细节, 这可能是由于  $\text{A}\beta$  斑块有很强的双光子吸收截面<sup>[20]</sup>, 同时, 由于具有反演

非对称中心的纤维材料具有明显的二次谐波效应, 故实验中  $\text{A}\beta$  斑块的谐波信号也能较为灵敏地反映出  $\text{A}\beta$  斑块的变化。通过对比不同质量浓度的 BPD 对  $\text{A}\beta$  斑块的降解作用可以发现, 当浓度为 1  $\mu\text{mol/L}$  时, 以 600 nm 波长、50  $\text{mW}/\text{cm}^2$  光功率密度辐射 1.5 h 时, 斑块荧光强度仍旧没有发生明显变化, 如图 6 所示。

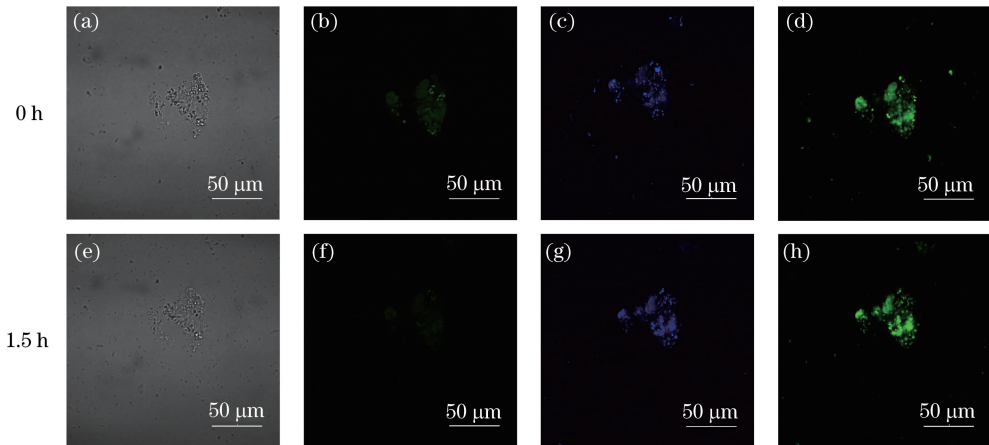


图 5  $\text{A}\beta$  斑块在仅光照情况下的降解结果。(a)(e)明场图;(b)(f)共聚焦成像图;  
(c)(g)二次谐波成像图;(d)(h)双光子荧光成像图

Fig. 5 Degradation results of  $\text{A}\beta$  plaques with only irradiation. (a)(e) Bright field images; (b)(f) confocal images;  
(c)(g) second harmonic generation images; (d)(h) two photon excited fluorescence images

当 BPD 的浓度提高到 10  $\mu\text{mol/L}$  时, 光照 0.5 h 斑块已被明显降解, 当光照时间持续到 1.5 h 时, 区域内几乎观察不到荧光, 证明大部分斑块已被降解, 如图 7 所示, 其荧光强度随光照时间的变化如图 8 所示。继续将 BPD 浓度提高到 100  $\mu\text{mol/L}$  时, 发现斑块也能被顺利降解, 如图 9 所示。实验证明, BPD 对斑块的降解作用是有一定的剂量效应的, 其降解效率与浓度的关系如图 10 所示。由于分子 BPD 无法直接靶向到  $\text{A}\beta$  斑块上, 而是散乱地分布在溶液中, 所以当溶液中的 BPD 浓度过低时, 结合在  $\text{A}\beta$  斑块附近的 BPD 由

于光照产生的单态氧太少, 对斑块稳定的结构无法造成明显的破坏, 所以斑块的自发荧光强度几乎没有改变。当 BPD 浓度提高时, 单态氧的产量也相应提高, 因此足以破坏  $\text{A}\beta$  的蛋白结构, 使之被降解。然而, 在实验中, BPD 浓度也不能无限提高, 一方面过高的 BPD 浓度在被光激发时, BPD 产生的单态氧也会破坏 BPD 分子本身的结构, 降低对  $\text{A}\beta$  斑块的降解效率; 另一方面, BPD 浓度过高也会对细胞产生一定的毒性作用, 因此实验中应该选取能使  $\text{A}\beta$  斑块降解的最低 BPD 浓度进行 PDT。

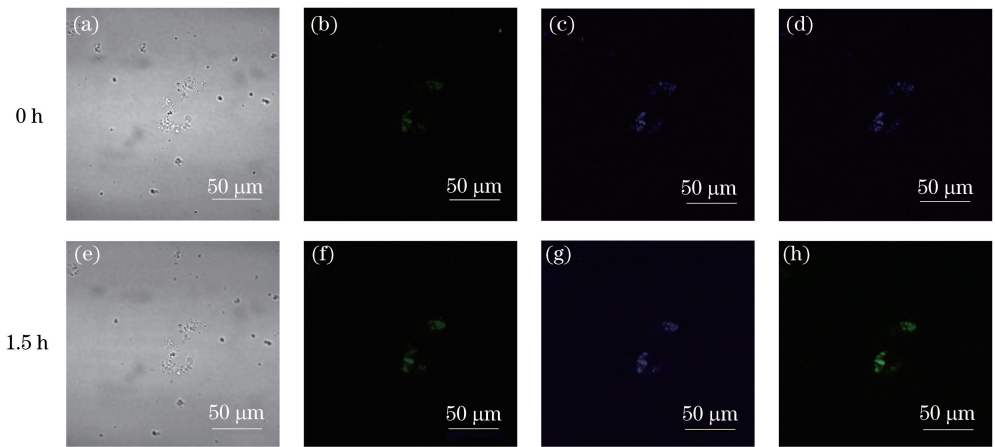


图 6 BPD 浓度为  $1 \mu\text{mol/L}$  情况下光照  $\text{A}\beta$  斑块的降解结果。

(a)(e)明场图;(b)(f)共聚焦成像图;(c)(g)二次谐波成像图;(d)(h)双光子荧光成像图

Fig. 6 Degradation results of  $\text{A}\beta$  plaques after irradiation when the concentration of BPD is  $1 \mu\text{mol/L}$ . (a)(e) Bright field images; (b)(f) confocal images; (c)(g) second harmonic generation images; (d)(h) two photon excited fluorescence images

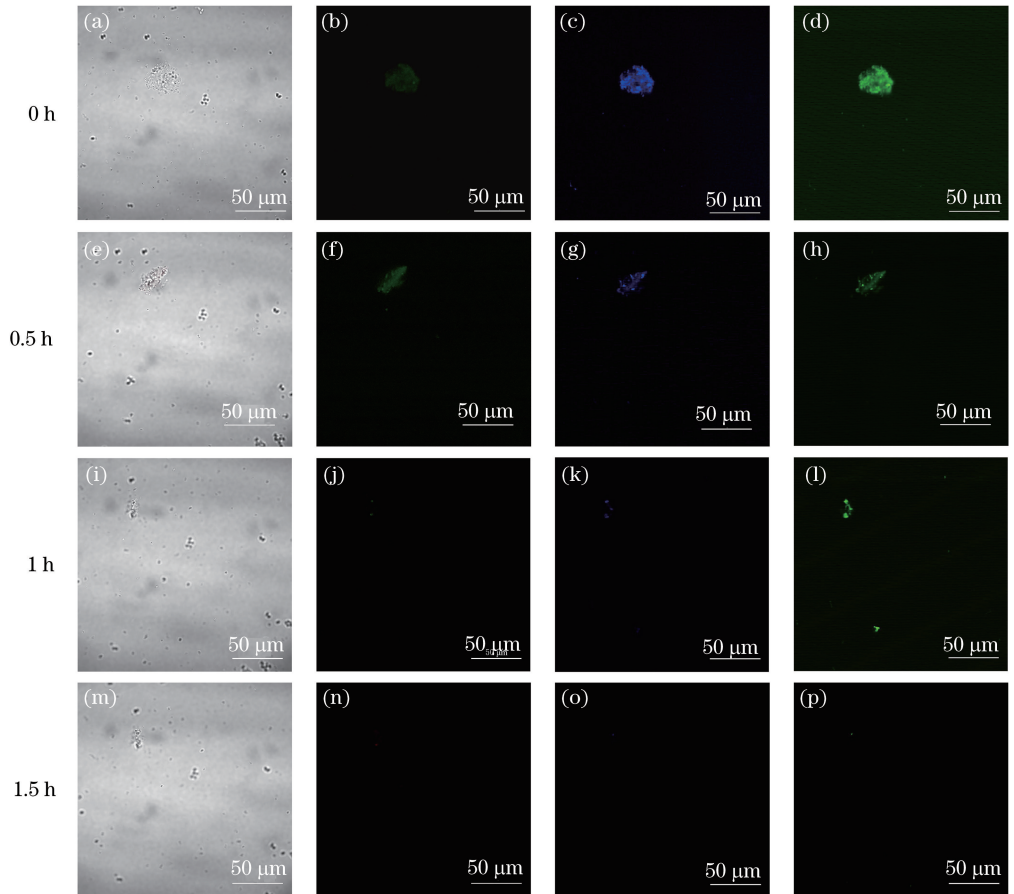


图 7 BPD 浓度为  $10 \mu\text{mol/L}$  情况下光照  $\text{A}\beta$  斑块的降解结果。(a)(e)(i)(m)明场图;

(b)(f)(j)(n)共聚焦成像图;(c)(g)(k)(o)二次谐波成像图;(d)(h)(l)(p)双光子荧光成像图

Fig. 7 Degradation results of  $\text{A}\beta$  plaques after irradiation when the concentration of BPD is  $10 \mu\text{mol/L}$ .

(a)(e)(i)(m) Bright field images; (b)(f)(j)(n) confocal images; (c)(g)(k)(o) second harmonic generation images; (d)(h)(l)(p) two photon excited fluorescence images

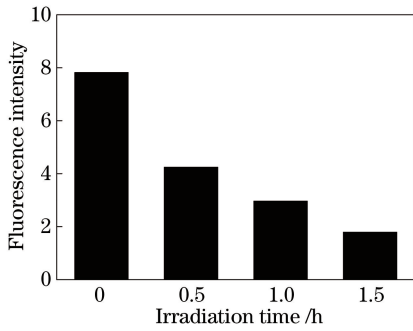


图 8 Aβ 斑块荧光强度随光照时间的变化图

Fig. 8 Relationship between fluorescence intensity of Aβ plaques and irradiation time

### 3.4 ELISA 检测

在使用 ELISA 试剂盒检测光照前后的 Aβ 含量的实验中发现,在未加 BPD 的 Aβ 溶液中,即便以 50 mW/cm<sup>2</sup> 的激光功率密度照射 1.5 h 后,实验结果的吸光度与光照 0 h 的相差无几,证明 Aβ 的含量几乎没有发生变化。随后加入 BPD 进行光照,在相同的激光功率密度下,光照 0.5 h 后其吸光度明显降低,证明溶液中 Aβ 含量已经明显减少,如图 11 所示,这与上文利用 Aβ 斑块的光学特征进行非线性成像所观察到的结果一致,证明了 PDT 对 Aβ 结构产生了破坏并使其降解,而利用非线性光学成像方法无需标记且可直观地观察到其整个降解过程。

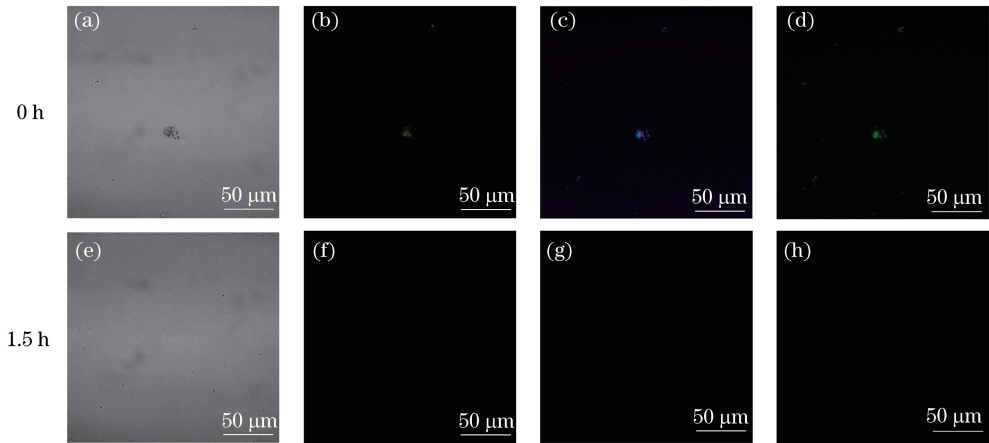


图 9 BPD 浓度为 100 μmol/L 情况下光照 Aβ 斑块的降解结果。

(a)(e) 明场图; (b)(f) 共聚焦成像图; (c)(g) 二次谐波成像图; (d)(h) 双光子荧光成像图

Fig. 9 Degradation results of Aβ plaques after irradiation when the concentration of BPD is 100 μmol/L. (a)(e) Bright field images; (b)(f) confocal images; (c)(g) second harmonic generation images; (d)(h) two photon excited fluorescence images

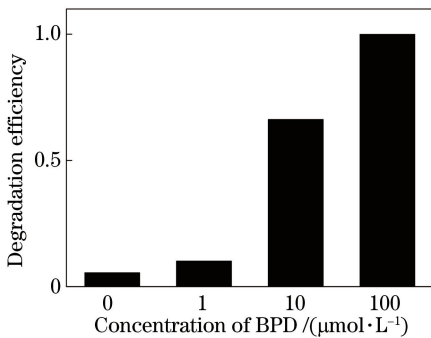


图 10 BPD 对 Aβ 斑块的降解效率随浓度的变化关系

Fig. 10 Relationship between degradation efficiency of Aβ plaques and concentration of BPD

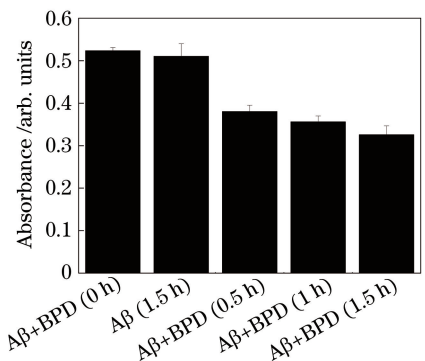


图 11 不同剂量光照后 Aβ 含量变化的 ELISA 检测结果

Fig. 11 ELISA detection results of Aβ content after irradiation with different doses

### 3.5 脂质体对斑块的降解作用

相比于 BPD 分子,脂质体的 BPD 在临床应用上具有更广阔的前景,应用纳米技术可以对脂质体进行各种修饰,使之适应于不同的治疗环境<sup>[21]</sup>。在本实验中,由于 BPD 属于疏水性药物分子,在水中

溶解性差且易发生聚集,因此需要在 DMSO 溶解后,再用水稀释。而 DMSO 具有一定毒性,不利于临床应用。而脂质体可在水溶性环境中稳定存在,并已在临床上广泛应用,所以将 BPD 分子包载到脂质体的磷脂双分子层中,可有效防止 BPD 聚集,提

高药物的运输效率和生物相容性。当脂质体与 A $\beta$  溶液共同孵育时, BPD 分子可在光照时通过光动力作用破坏脂质层, 并释放到溶液中与 A $\beta$  斑块相互作用。同时对 BPD 分子进行封装还可以保护它不受光漂白的影 响, 从而延长单线态氧的寿命, 提高对 A $\beta$  斑块的降解效率。如图 12 所示, 对加入脂质体的 A $\beta$  溶液进行照射, 发现斑块荧光完全消失, 证明脂质体能够顺

利地释放出包裹的 BPD 分子并产生单态氧, 成功降解 A $\beta$  斑块。此外, 在后续研究中还可以进一步对实验中使用的脂质体进行改进, 如通过对其表面修饰靶向配体, 使药物准确地靶向 A $\beta$  斑块, 该操作在活体应用中既能减小对其他非病变组织的伤害, 又能提高其降解效率; 同时还可在脂质体表面修饰穿膜肽等物质, 使之能更好地克服血脑屏障。

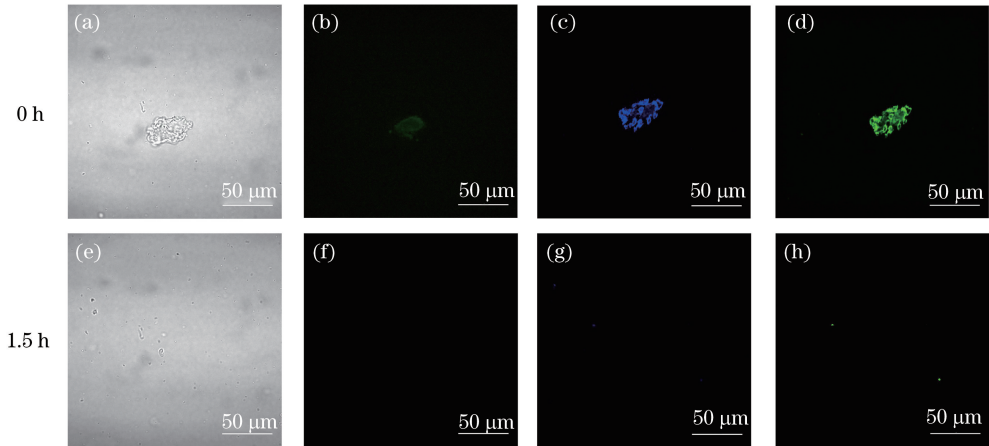


图 12 加入 BPD 脂质体情况下光照 A $\beta$  斑块的降解结果。

(a)(e)明场图;(b)(f)共聚焦成像图;(c)(g)二次谐波成像图;(d)(h)双光子荧光成像图

Fig. 12 Degradation results of A $\beta$  plaques after irradiation with BPD liposome. (a)(e) Bright field images;

(b)(f) confocal images; (c)(g) second harmonic generation images; (d)(h) two photon excited fluorescence images

## 4 结 论

基于 A $\beta$  斑块具有自体荧光的性质, 采用双光子荧光和二次谐波成像对其进行无标记成像观察, 实时观察斑块的变化, 并利用光动力作用实现对 A $\beta$  斑块的降解。之前的研究已验证光照激发后 BPD 能够对肿瘤细胞起到一定的杀伤作用, 并能通过光声进行成像。此次研究对之前的研究进行扩展, 通过制备不同浓度的 BPD 溶液, 研究 BPD 在斑块降解中的量效关系, 实验得到 BPD 浓度在 10  $\mu\text{mol/L}$  的情况下能够成功地降解 A $\beta$  斑块, 并通过 ELISA 实验得到了证实。除此之外, 还制备了包裹 BPD 的脂质体, 并验证了其对 A $\beta$  斑块同样具有降解作用。双光子荧光和二次谐波成像有利于活体检测, 能够对 A $\beta$  斑块实现无标记成像, 而光动力治疗只有在特定的激发波长条件下才能产生作用, 能够以较小的损伤实现对 A $\beta$  斑块的降解, 两者结合能够为阿尔兹海默症的检测和治疗提供一种重要的研究手段。

## 参 考 文 献

[1] Prince M. Progress on dementia: leaving no one

behind[J]. The Lancet, 2017, 390(10113): e51-e53.

[2] Adlard P A, Tran B A, Finkelstein D I, et al. A

review of  $\beta$ -amyloid neuroimaging in Alzheimer's disease[J]. Frontiers in Neuroscience, 2014, 8: 327.

[3] Schnabel J. Amyloid: little proteins, big clues [J].

Nature, 2011, 475(7355): S12-S14.

[4] Dong J H, Revilla-Sanchez R, Moss S, et al.

Multiphoton *in vivo* imaging of amyloid in animal models of Alzheimer's disease [J]. Neuropharmacology, 2010, 59(4/5): 268-275.

[5] Ji M B, Arbel M, Zhang L L, et al. Label-free

imaging of amyloid plaques in Alzheimer's disease with stimulated Raman scattering microscopy [J]. Science Advances, 2018, 4(11): eaat7715.

[6] Celli J P, Spring B Q, Rizvi I, et al. Imaging and

photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization [J]. Chemical Reviews, 2010, 110(5): 2795-2838.

[7] Cheng L, Wang C, Feng L Z, et al. Functional

nanomaterials for phototherapies of cancer [J]. Chemical Reviews, 2014, 114(21): 10869-10939.

[8] Lan S Y, Zhang D, Liu X L, et al. Tumor-

microenvironment activable smart nanocarrier system for photodynamic therapy of cancers [J]. Chinese Journal of Lasers, 2018, 45(2): 0207008.



- 蓝善优, 张达, 刘小龙, 等. 肿瘤微环境响应的智能纳米载体在肿瘤光动力治疗中的应用[J]. 中国激光, 2018, 45(2): 0207008.
- [9] Zhang J Y. Study on detection and aggregation inhibition of amyloid  $\beta$  based on nanomaterials[D]. Shanghai: East China Normal University, 2016.  
张君颖. 基于纳米材料的  $\beta$ -淀粉样蛋白聚集体的分析检测和抑制研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2016.
- [10] Ahn M, Lee B I, Chia S, et al. Chemical and mechanistic analysis of photodynamic inhibition of Alzheimer's  $\beta$ -amyloid aggregation [J]. Chemical Communications, 2019, 55(8): 1152-1155.
- [11] Lee B I, Suh Y S, Chung Y J, et al. Shedding light on Alzheimer's  $\beta$ -amyloidosis: photosensitized methylene blue inhibits self-assembly of  $\beta$ -amyloid peptides and disintegrates their aggregates [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 7523.
- [12] Zhao Y M, Liu C C, Wang J, et al. Research progress on photodynamic antimicrobial chemotherapy based on rare earth upconversion nanoplatfrom[J]. Chinese Journal of Lasers, 2018, 45(2): 0207013.  
赵一铭, 刘成程, 王晶, 等. 基于稀土上转换发光纳米平台的光动力抗菌疗法的研究进展[J]. 中国激光, 2018, 45(2): 0207013.
- [13] Johansson P K, Koelsch P. Label-free imaging of amyloids using their intrinsic linear and nonlinear optical properties [J]. Biomedical Optics Express, 2017, 8(2): 743-756.
- [14] Whittingham J L, Scott D J, Chance K, et al. Insulin at pH 2: structural analysis of the conditions promoting insulin fibre formation [J]. Journal of Molecular Biology, 2002, 318(2): 479-490.
- [15] Esler W P, Stimson E R, Jennings J M, et al. Alzheimer's disease amyloid propagation by a template-dependent dock-lock mechanism [J]. Biochemistry, 2000, 39(21): 6288-6295.
- [16] Andersen C B, Yagi H, Manno M, et al. Branching in amyloid fibril growth [J]. Biophysical Journal, 2009, 96(4): 1529-1536.
- [17] Exley C, House E, Collingwood J, et al. Spherulites of  $A\beta_{42}$  *in vitro* and in Alzheimer's disease [J]. Nature Precedings, 2009.
- [18] Zhang Y J, Shi J M, Bai C J, et al. Intra-membrane oligomerization and extra-membrane oligomerization of amyloid- $\beta$  peptide are competing processes as a result of distinct patterns of motif interplay [J]. Journal of Biological Chemistry, 2012, 287(1): 748-756.
- [19] del Mercato L L, Pompa P P, Maruccio G, et al. Charge transport and intrinsic fluorescence in amyloid-like fibrils [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, 104(46): 18019-18024.
- [20] Hanczyc P, Samoc M, Norden B. Multiphoton absorption in amyloid protein fibres [J]. Nature Photonics, 2013, 7(12): 969-972.
- [21] Zhang J, Liu J, Zhu Y, et al. Photodynamic micelles for amyloid  $\beta$  degradation and aggregation inhibition [J]. Chemical Communications, 2016, 52(81): 12044-12047.