

# 基于 FLIM-FRET 技术揭示 OVCAR-3 细胞膜和 BSA-DOX 纳米颗粒的相互作用

李慧娴, 林方睿, 徐云剑, 李艳萍, 王柯欣, 王诗琪, 邹炎华, 胡睿, 屈军乐, 刘丽炜\*

深圳大学物理与光电工程学院教育部/广东省光电子器件与系统重点实验室, 广东 深圳 518060

**摘要** 荧光寿命显微成像 (FLIM) 常用来检测活细胞内荧光基团的寿命信息, 以实现微观定量分析。荧光共振能量转移 (FRET) 可用来表征能量从供体荧光分子到受体荧光分子的传递过程。将 FLIM 技术与 FRET 结合 (FLIM-FRET), 可以监测活细胞中蛋白质的相互作用、亚细胞器的动态过程等。构建了以细胞膜上转染的绿色荧光蛋白 (sfGFP) 为供体、以阿霉素 (DOX) 为受体的 FRET 纳米体系, 利用双光子激发荧光寿命显微成像 (TP-FLIM) 系统, 通过监测 FRET 纳米体系中供体荧光寿命的变化, 研究了药物 DOX 在细胞中的递送机制和运输效率。此外, 进一步采用四种内吞途径抑制剂, 对纳米药物的内吞途径进行了评估。结果证明, 牛血清白蛋白 (BSA) 包裹的 DOX (BSA-DOX) 纳米颗粒通过网格蛋白介导的内吞作用进入细胞。揭示了 BSA-DOX 纳米颗粒通过网格蛋白介导的内吞作用进入细胞的动态过程。研究表明, FLIM-FRET 技术结合定量分析方法可用于区分小分子药物和纳米颗粒与细胞作用的异同。

**关键词** 生物光学; 荧光共振能量转移; 荧光寿命; 细胞膜

**中图分类号** Q-334 **文献标志码** A

**DOI:** 10.3788/CJL221388

## 1 引言

在正常的肿瘤治疗过程中, 在不会对正常细胞产生毒副作用的前提下, 药物通过血管到达肿瘤部位, 在识别膜上受体、离子通道、酶等作用靶点后, 靶向到肿瘤细胞的细胞膜, 以特定的方式进入肿瘤细胞并释放<sup>[1]</sup>。由于细胞膜上有众多膜蛋白和受体可以作为药物载体设计中的靶点, 因此针对药物与细胞膜相互作用的研究就尤为重要。传统方法采用免疫印迹<sup>[2]</sup>和流式细胞仪<sup>[3]</sup>等生化手段, 辅以荧光共染成像<sup>[4-5]</sup>, 实现药物与细胞膜相互作用过程的研究与分析。然而, 基于强度的荧光成像仍有局限性, 既无法区分小分子药物与纳米药物, 也不能对活细胞的内吞过程进行实时监测。

荧光寿命显微成像 (FLIM) 是一种利用时域法或频域法测量荧光寿命的技术。荧光寿命是荧光分子的一种固有属性,<sup>[6]</sup> 它不受浓度效应、光谱串扰以及光漂白的影响, 被广泛用于生物体微环境的研究<sup>[7-9]</sup>。荧光共振能量转移 (FRET) 是当供体的发射光谱与受体的激发光谱重叠且两个荧光分子的距离小于 10 nm 时发生的非辐射能量转移过程<sup>[10-13]</sup>。FRET 具有纳米级的

空间分辨率, 常被用于收集活细胞中蛋白质分子之间的时空分布信息。FRET 的测量方式也在不断发展, 如传统基于强度的敏化发射、受体光漂白<sup>[14-15]</sup>、光谱成像方法<sup>[16-17]</sup>, 以及荧光寿命显微成像<sup>[18-19]</sup>和偏振各向异性成像<sup>[20-22]</sup>。传统的方法具有破坏性, 难以量化, 且受限于染料浓度。偏振各向异性测量虽然在检测 FRET 时具有极高的灵敏度, 但由于受到光学系统中偏振伪影的影响, 难以给出 FRET 的定量信息。利用荧光寿命显微成像对 FRET 效应进行监测的 FLIM-FRET 技术具有非侵入性、高灵敏度和定量监测的显著优势, 被用于研究细胞内分子相互作用、细胞通信途径以及病理和药物开发<sup>[23-24]</sup>。近年来, FLIM-FRET 技术被广泛用于研究新型纳米药物的药代动力学, 如研究纳米药物的靶点<sup>[25]</sup>、稳定性<sup>[26-27]</sup>、细胞内转运<sup>[28]</sup>、给药剂量<sup>[29]</sup>和体内代谢<sup>[30]</sup>等。除了纳米药物的安全性外, 人们特别关注药物与细胞和组织的作用、细胞内转运机制及药物的释放和消除。Barroso 团队在 2020 年报道了使用近红外 (NIR) 显微镜荧光寿命共振能量转移 (FLI-FRET) 量化人表皮生长因子受体 2 (HER2) 与曲妥珠单抗 (TzM) 结合的方法, 证实了 TzM-HER2 复合物在乳腺癌细胞中的

收稿日期: 2022-11-03; 修回日期: 2022-11-30; 录用日期: 2022-12-02; 网络首发日期: 2022-12-12

基金项目: 国家自然科学基金 (62175163, 62225505, 61935012)、深圳市杰青项目 (RCJC20210706091949022)、深圳市重点项目 (JCYJ20200109105404067)

通信作者: \*liulw@szu.edu.cn

结合和内化<sup>[25]</sup>。Hunziker 小组设计了一种负载染料的纳米胶束 IR-780-PDMS 以构成 FRET 体系,证明了胶束在细胞内被溶酶体分解,供体寿命变化是 FRET 效应引起的,与溶酶体内 pH 值变化无关<sup>[26]</sup>。Sahai 小组利用活体荧光内窥镜,通过 FRET 量化药物靶标结合的方法,揭示了不同肿瘤结节之间药物靶向参与的异质性<sup>[31]</sup>。卵巢癌是一种致死率较高的妇科疾病。在临床治疗中,患者对铂类药剂的耐药性是肿瘤复发的一个主要诱因。据文献报道,使用脂质体阿霉素等药物治疗的患者存活率更高、预后情况更好<sup>[32]</sup>。阿霉素(DOX)是一种常见的抗肿瘤药物,作用于拓扑异构酶以抑制 DNA 的合成,<sup>[33]</sup>其自身带有荧光,不需要额外的标记即可用于荧光成像,常用于药物作用机理研究。

本文首先合成了牛血清白蛋白(BSA)包裹的 DOX 纳米粒子(BSA-DOX),白蛋白纳米粒子在生物

体内有较好的生物相容性和天然的被动靶向性,并且作为药物载体可以缓释和降低毒副作用<sup>[34]</sup>。DOX 属于两亲性分子,不会被完全包埋于纳米粒子内部,纳米粒子表面也会附有 DOX。实验中在细胞膜上转染超折叠绿色荧光蛋白(sfGFP)作为供体,与作为受体的 BSA-DOX 纳米粒子构成 FRET 纳米体系(图 1)。在细胞通过内吞作用摄取纳米药物的过程中,细胞膜与纳米药物之间的距离满足 FRET 发生的条件,在该过程中供体的荧光寿命会缩短;而当内吞囊泡在胞内将药物释放后,细胞膜与纳米药物距离发生变化,FRET 效应减弱或消失。本文利用双光子激发荧光寿命显微成像系统(TP-FLIM)对该过程中的 FRET 效应进行监测,对通过内吞作用进入细胞的纳米粒子和小分子药物的扩散运动进行了区分,实现了对细胞内吞过程的实时监测,并用此方法验证了细胞在饥饿条件下会上调内吞运动。

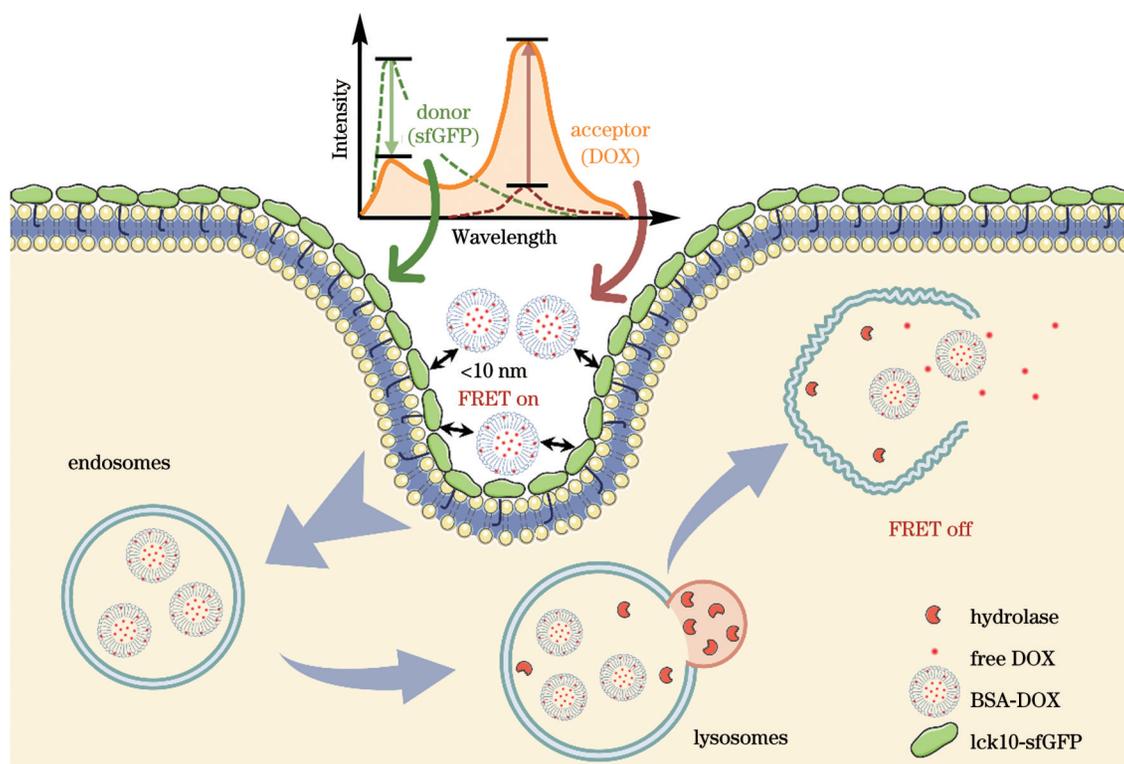


图 1 在内吞过程中,BSA-DOX 纳米颗粒与细胞膜上标记的 sfGFP 的 FRET 反应

Fig. 1 FRET reaction of BSA-DOX nanoparticles (acceptor) with sfGFP fluorescent protein (donor) labeled on cell membranes during endocytosis

## 2 材料与方 法

### 2.1 试剂和仪器

实验过程中使用的试剂如下:牛血清白蛋白、氯丙嗪、甲基- $\beta$ -环糊精、染料木黄酮、渥曼青霉素、胎牛血清、DMEM 培养基、磷酸盐缓冲液、胰蛋白酶溶液(EDTA)、青霉素-链霉素、盐酸多柔比星、pH 9.18 校正缓冲液、丙酮、Lck10-sfGFP 基因表达载体。使用的仪器如下:细胞增殖/毒性检测试剂盒、分光光度计、电

位及粒度分析仪、飞秒脉冲激光、流式细胞仪、光谱仪、镜载活细胞培养系统。

### 2.2 BSA-DOX 纳米颗粒的制备

在 0.5 mL 牛血清白蛋白(质量分数为 20%)水溶液中加入 8 mL 的 DOX(质量浓度为  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )水溶液。在磁力搅拌下,缓慢滴加 1.5 mL 的 pH 为 9.18 的缓冲液将混合液体系调节为弱碱性。然后以  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  匀速滴入 40 mL 丙酮,继而缓慢匀速滴加 0.06 mL 的 25%(质量分数)戊二醛溶液。在 600 r/min 磁力搅拌

下,混合液固化 12 h 以上。在低压条件下,去除丙酮。利用针式过滤装置(0.45  $\mu\text{m}$ )去除大颗粒纳米粒子。对混合液进行离心处理(11000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 30 min),丢弃上清液,并用蒸馏水洗涤两次,以去除自由分子和小尺寸的纳米颗粒。最终,将固体分散在蒸馏水中备用。

### 2.3 细胞培养

人卵巢癌细胞 OVCAR-3,在含有 10% (体积分数)胎牛血清(FBS)和 1% (体积分数)抗生素抗真菌溶液的 DMEM 培养基中培养,并在恒温恒湿含有 5% (体积分数)二氧化碳的加湿培养箱中储存。

### 2.4 质粒转染

细胞以  $1\times 10^5$  cell/well 的密度被播种在玻璃底的培养皿中,将 4  $\mu\text{L}$  Lipofectamine 3000 试剂与 3  $\mu\text{L}$  Lck10-sfGFP DNA 分别稀释在两份 100  $\mu\text{L}$  MEM 培养基中。然后将 6  $\mu\text{L}$  P3000 试剂加入到 DNA 稀释液中混合均匀,两个稀释液按体积比 1:1 混合,在室温下孵育 25 min。加入到含有完全培养基的细胞中孵育 13 h,用磷酸盐缓冲液(PBS)轻轻地洗 3 次以去除多余的质粒。

### 2.5 细胞毒性实验

将细胞接种在 96 孔板上培养 24 h,分别用相同浓度的 DOX 溶液和 BSA-DOX 纳米颗粒在培养箱中孵育 24 h 和 48 h。用细胞计数试剂盒对培养细胞的细胞活力进行定量测量,用微型平板阅读器测量 450 nm 处的吸光度,以计算细胞活力。

### 2.6 流式细胞实验

将细胞接种在 6 孔板上培养 24 h,分别用完全培养基 DMEM 和 Earle 平衡盐溶液(EBSS)处理细胞 4 h,然后加入 BSA-DOX 孵育细胞 4、8、14、20 h 后,制成细胞悬液,用流式细胞仪测量细胞胞内荧光强度。

### 2.7 成像分析

将细胞接种在玻璃底培养皿上,进行质粒转染后,加入药物孵育不同的时间,成像前用 PBS 洗 3 次以去除未被吸收的药物。利用双光子荧光寿命显微成像系统进行成像,采用飞秒激光作为激发光源,其脉冲宽度为 100 fs,重复频率为 80 MHz。在 820 nm 处激发样品,在 500~550 nm 和 570~620 nm 通道分别收集 sfGFP 和 DOX 的双光子荧光信号。在 960 nm 处激发样品,通过高速时间分辨光电倍增管转换为电子信号,与时间相关单光子计数(TCSPC)模块同步连接以实现荧光寿命信号的采集。扫描模块使用共振扫描模式完成高速扫描。细胞实验中使用 60 倍油浸物镜进行成像,获得 1024 pixel $\times$ 1024 pixel 的双光子荧光图像和 512 pixel $\times$ 512 pixel 的荧光寿命图像。

### 2.8 数据处理

使用 SPC Image 软件分析荧光寿命衰减数据并拟

合寿命衰减曲线;使用 GraphPad Prism 7.0 软件分析数据。

## 3 结果和讨论

### 3.1 FRET 纳米体系的构建

FRET 过程是一个能量转移的过程,当受体荧光团和供体荧光团距离小于 10 nm 时,处于激发态的供体荧光分子将能量以非辐射形式传递给受体分子,两者距离的负 6 次幂决定了 FRET 效率的高低:

$$E = 1/[1 + (r/R_0)^6], \quad (1)$$

式中: $E$  为 FRET 效率; $r$  为供体和受体之间的距离; $R_0$  为福氏半径。

荧光寿命指荧光分子被激发跃迁至激发态后,在激发态所停留的时间。荧光寿命  $\tau$  可以表示为荧光强度  $I(t)$  从初始强度  $I_0$  衰减到  $I_0/e$  的时间,双指数的荧光强度衰减可以描述为

$$I(t) = I_0(\alpha_1 e^{-t/\tau_1} + \alpha_2 e^{-t/\tau_2}), \quad (2)$$

式中: $\tau_1$ 、 $\tau_2$  代表两个组分的荧光寿命; $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$  代表寿命组分占比。因此平均荧光寿命( $\tau_m$ )可以表示为

$$\tau_m = (\alpha_1 \tau_1 + \alpha_2 \tau_2) / (\alpha_1 + \alpha_2). \quad (3)$$

根据已有文献报道,荧光能量可以在绿色荧光蛋白(GFP)和 DOX 的自发荧光之间发生共振转移<sup>[35]</sup>。由此我们构建了以 sfGFP 为供体、以 BSA-DOX 纳米颗粒为受体的 FRET 体系,其中 sfGFP 的发射光谱与 DOX 的吸收光谱相重叠,在供受体之间的距离小于 10 nm 的情况下可以产生 FRET 效应。在细胞摄取 BSA-DOX 纳米颗粒发生 FRET 过程中,被激发的供体 sfGFP 将荧光能量转移到受体 BSA-DOX 上,可观察到供体荧光强度的降低和受体荧光强度的增强以及供体荧光寿命的衰减。因此,本文通过观察 sfGFP 的寿命变化来监测纳米粒子-细胞膜相互作用的微观过程。游离的 DOX 通过扩散运动进入细胞的过程很快,与细胞膜上的蛋白接触时间很短,并且大部分穿过磷脂双分子层进入细胞,难以用 FRET 效应观察其微观生理过程。因此,本文用牛血清白蛋白将 DOX 包裹成可以被内吞进入细胞的纳米粒子,最终得到粒径在 100 nm 以下 BSA-DOX 纳米颗粒。细胞通过内吞作用摄取纳米颗粒的过程时间较长,有利于微观生理过程的深入研究。

### 3.2 BSA-DOX 纳米颗粒的合成与表征

羧基和氨基是细胞膜的重要组成部分。纳米颗粒表面的羧基和氨基有助于纳米颗粒与细胞膜作用在一起,拉近 sfGFP 与 BSA-DOX 纳米颗粒之间的距离,促进它们之间的 FRET 过程。本文采用去溶剂化法制备了 BSA-DOX 纳米颗粒。在此方法中,丙酮是牛血清白蛋白的抗溶剂,随着丙酮浓度的增加,牛血清白蛋白的溶解度降低,最终形成纳米颗粒。然后加入交联剂

(戊二醛),使纳米粒子表面的牛血清白蛋白之间发生交联反应,从而增加 DOX 在纳米粒子结构中的稳定性。根据 DOX 在 DMSO 溶液中的浓度依赖性标准曲线,合成所得 BSA-DOX 纳米颗粒的原液浓度为  $555 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  [图 2(a)]。BSA-DOX 纳米颗粒的吸收光谱和荧光发射光谱与游离 DOX 几乎相同 [图 2(b)]。

根据 TEM 测试结果 [图 2(c)],可以看出 BSA-DOX 纳米颗粒表现为球形状态,平均尺寸为 55 nm,动态光散射(DLS)分析实验测得水合粒径结果比 55 nm 略大,且均一性较好 [图 2(c)]。从细胞毒性实验可以看出,BSA-DOX 纳米颗粒的细胞毒性略低于 DOX 溶液,48 h 细胞存活率明显低于 24 h [图 2(d)]。

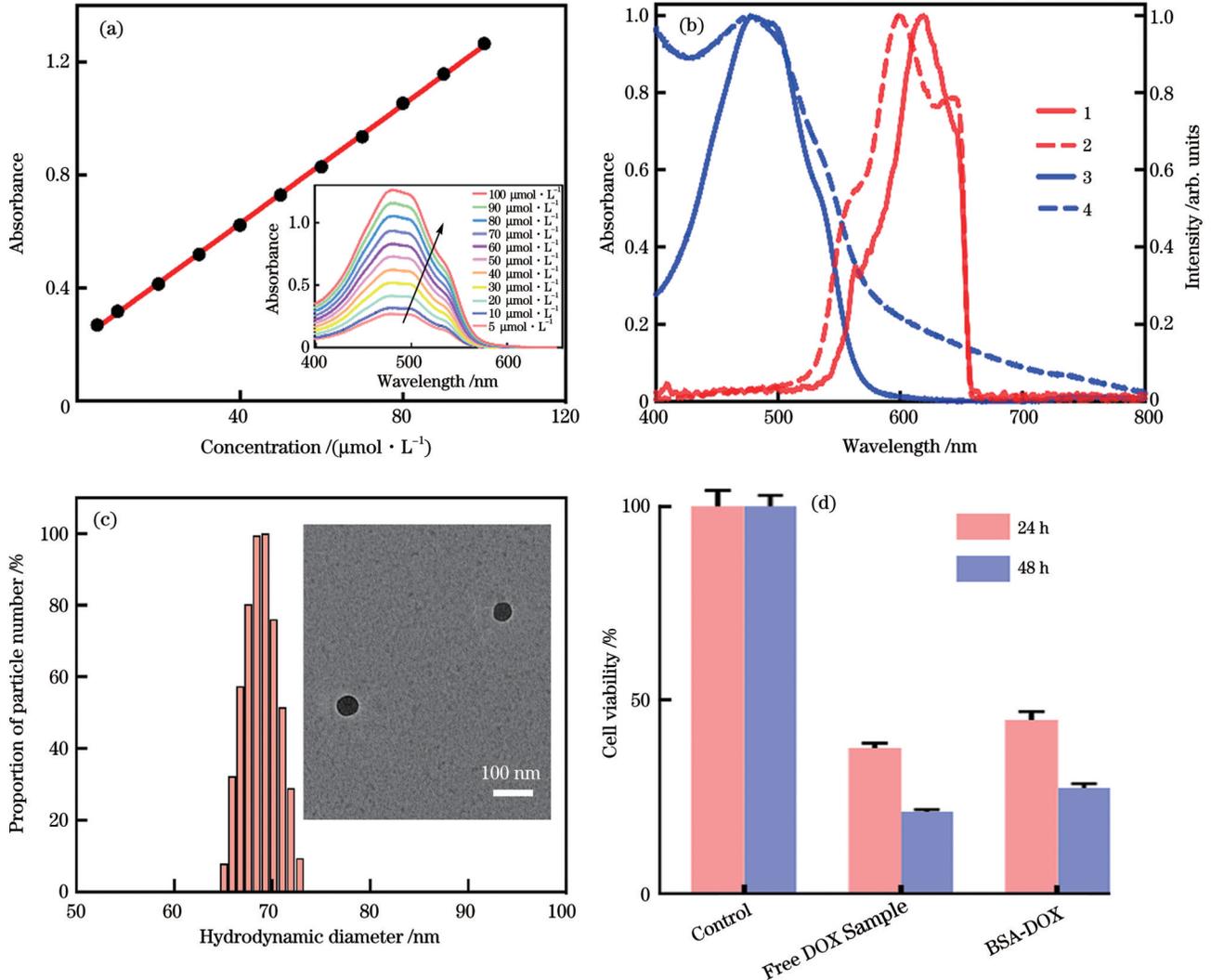


图 2 BSA-DOX 纳米颗粒的特性。(a) DOX 溶液的标准浓度曲线;(b) DOX 溶液(曲线 1、3)和 BSA-DOX 纳米颗粒(曲线 2、4)的吸收光谱和发射光谱;(c) BSA-DOX 纳米颗粒的水合粒径和透射电子显微镜(TEM)图;(d) CCK-8 细胞毒性实验结果  
Fig. 2 Characteristics of BSA-DOX nanoparticles. (a) Standard concentration curves of DOX solutions; (b) absorption and emission spectra of DOX solutions (lines 1 and 3) and BSA-DOX nanoparticles (lines 2 and 4); (c) hydrodynamic particle size and TEM image of BSA-DOX nanoparticles; (d) CCK-8 cytotoxicity assay result

### 3.3 OVCAR-3 细胞摄取 BSA-DOX 纳米颗粒的途径

为了确定 BSA-DOX 纳米颗粒被运输到细胞中的途径,本文采用 OVCAR-3 人卵巢癌细胞系,加入 4 种不同的内吞抑制剂处理细胞:氯丙嗪,作为网状蛋白介导的内吞抑制剂;渥曼青霉素,一种肌动蛋白依赖的内吞抑制剂;甲基- $\beta$ -环糊精(M $\beta$ CD),用于破坏脂筏介导的内吞途径;染料木黄酮,一种小窝介导的内吞抑制剂<sup>[4,36]</sup>。将细胞与四种内吞抑制剂在无血清培养基中各培养 1 h,然后加入 BSA-DOX 纳米颗粒孵育 3 h,使用共聚焦成像系统对细胞内 BSA-

DOX 的荧光强度进行成像。将细胞消化后反复离心、重悬以去除未被内吞的 BSA-DOX 纳米粒子,然后进行流式细胞实验,结果如图 3 所示。从共聚焦荧光图可以看出,氯丙嗪作用后的细胞内荧光强度较对照组稍低,甲基- $\beta$ -环糊精和渥曼青霉素作用后的细胞内荧光强度比对照组稍高,染料木黄酮作用后的细胞内荧光强度与对照组持平。利用流式细胞仪检测了细胞内的相对荧光强度,我们将 P2 门设置为荧光强度为  $10^4 \sim 10^{4.3}$ ,氯丙嗪作用后的细胞落在 P2 的数量最多(88.11%),随后是甲基- $\beta$ -环糊精

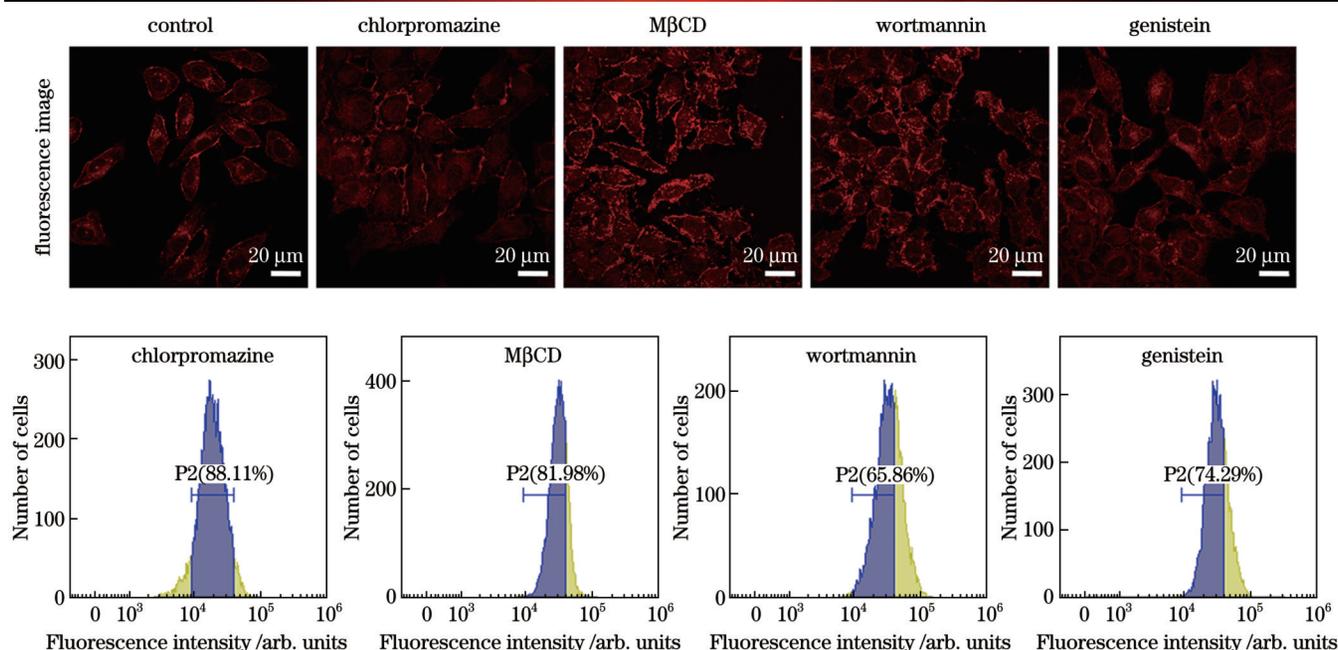


图3 在4种内吞作用抑制剂存在的情况下细胞对BSA-DOX纳米颗粒吸收的荧光图像和流式细胞仪结果

Fig. 3 Fluorescence images and flow cytometry results of cellular uptake of BSA-DOX nanoparticles in presence of four endocytosis inhibitors

(81.98%)、染料木黄酮(74.29%)和渥曼青霉素(74.29%),且这三组在P2门以外的细胞分布在荧光强度更高的区间。因此,氯丙嗪的相对荧光强度最低,氯丙嗪阻碍了细胞对纳米颗粒的摄取,网状蛋白介导的内吞途径是BSA-DOX纳米颗粒的主要内吞途径。

### 3.4 利用TP-FLIM监测卵巢癌细胞内吞BSA-DOX纳米药物过程

本文利用共聚焦显微镜对小分子DOX和BSA-DOX纳米粒子的细胞摄入进行荧光成像。细胞被接种在玻璃底的培养皿中,在细胞培养皿中加入DOX溶液后,游离的DOX通过浓度差产生的渗透作用进入细胞,因此其与细胞膜的接触在给药1h以内最为频繁;而在细胞培养皿中加入BSA-DOX纳米颗粒的8h后可以观察到内吞囊泡,20h有更多的内吞小泡和已经释放的药物。该实验初步获得了细胞内吞的一个时间范围,然而不能从荧光强度成像中得到定量信息。

进一步地,利用TP-FLIM系统进行FRET成像,通过荧光寿命信息实现药物进入细胞的内吞过程的定量检测。具体地,系统激发光源为820nm时,分别采用500~550nm和570~620nm的带通滤光片收集sfGFP和DOX的荧光信号;系统激发光源为960nm时,使用475~495nm的滤光片采集荧光寿命信号,能够有效滤除DOX的荧光信号(附录图A1)。实验中首先用Lck10-sfGFP质粒(激发波长为489nm,发射波长为510nm)转染细胞膜,Lck10是Lck蛋白的前10个氨基酸<sup>[37]</sup>。被成功转染的细胞的膜结构被标记上

sfGFP荧光,测量得到其平均荧光寿命为2266ps。然后,在细胞培养皿中加入DOX溶液( $20\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )孵育细胞1h,用BSA-DOX( $20\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )孵育细胞8h、20h,未被吸收的药物用PBS清洗3次后加入细胞外液进行成像,以防在图像采集过程中细胞继续摄取药物影响实验结果。我们进行了5组独立实验,采集了60张荧光寿命图像进行统计分析。

由FRET的基本原理可知,在未发生FRET的情况下,单独供体的寿命应该呈现单一的指数衰减;在发生FRET的情况下,部分供体的附近没有受体,因此具有长寿命,而发生FRET的供体具有短寿命 $\tau_2$ ,此时会呈现双指数衰减。此时在只有供体荧光寿命信号的情况下,FRET效率可以表示为

$$E_{\text{m}} = 1 - \frac{\tau_1}{\tau_2} \quad (4)$$

在进行数据分析时,使用了双指数拟合,在SPC Image软件中将长寿命分量固定为所测对照组(转染sfGFP的细胞)的平均寿命2266ps,即未发生FRET时sfGFP的寿命。经过软件拟合发现,与对照组相比,在加入BSA-DOX纳米粒子的细胞寿命分布图[图4(c)、(f)]中,存在一部分短 $\tau_{\text{m}}$ 、高振幅比 $\alpha_1/\alpha_2$ 以及 $\tau_{\text{m}}$ 和 $\alpha_1/\alpha_2$ 之间有线性相关的像素。选取这些区域进行分析发现,其寿命衰减曲线呈现出明显的双组分衰减特征[图4(g)、(h)],这些区域的荧光图表明BSA-DOX与细胞膜荧光共定位[图4(d)、(e)],而其他区域表现为单指数衰减,没有与BSA-DOX共定位[图4(i)、(j)]。验证了该FRET体系的可行性,并且可以利用TP-FLIM进行成像分析。

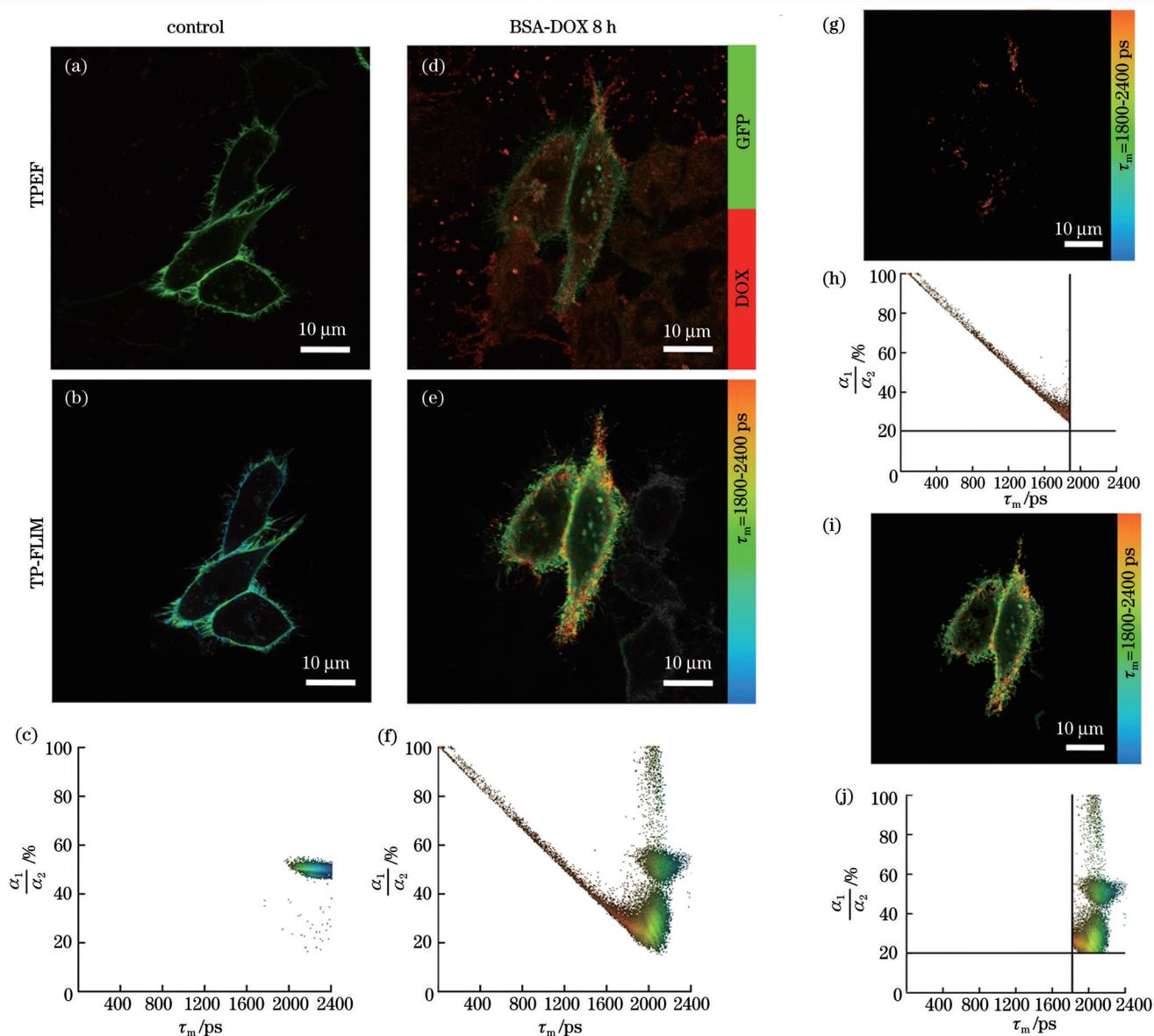


图4 荧光寿命数据分析。对照组和加入 BSA-DOX 纳米粒子 8 h 的 (a)(d) 双光子荧光图、(b)(e) 荧光寿命伪彩图和 (c)(f) 二维寿命直方图; FRET 区域和非 FRET 区域的 (g)(i) 荧光寿命伪彩图和 (h)(j) 二维寿命直方图

Fig. 4 Analysis of fluorescence lifetime data. (a)(d) Two-photon fluorescence maps, (b)(e) fluorescence lifetime pseudo-color maps and (c)(f) two-dimensional lifetime histograms for control and BSA-DOX 8 h; (g)(i) fluorescence lifetime pseudo-color images and (h)(j) two-dimensional lifetime histograms for FRET region and non-FRET region

本文在数据统计中使用相同的内置参数来拟合所有获得的对照组的寿命数据, 在 FLIM 分析软件 SPCImage 中 bin 值调整为 3, 并将“阈值”调整为 25, 以确保可以从每张图中去除噪声。用 BSA-DOX 培养细胞 8 h 后, 从荧光图像 [图 5(a)] 中可以看出, 有大量的 BSA-DOX 聚集在细胞周围, 但只有少数分散的点与细胞膜接触, 这些点与荧光寿命伪彩中寿命明显下降的区域相同。20 h 后, 低寿命的区域减少, FRET 效率下降, 有更多的 BSA-DOX 从囊泡中被释放到细胞内。而只加入 DOX 溶液的细胞, 由于小分子 DOX 与细胞膜的接触时间很短, 没有观察到明显的 FRET 效应。对于所有的实验组, 在去除背景噪声后, 提取了所有像

素的平均 FRET 效率 [图 5(d)], 用来评估 BSA-DOX 与细胞膜的相互作用程度, 根据显著性检验得到概率  $P$  值。并按照上述方法, 在二维寿命分布图中筛选出发生 FRET 的像素点, 并得到它们的平均寿命 [图 5(c)]。显而易见, 用 BSA-DOX 处理的细胞 FRET 效率高于 Free DOX 处理的细胞 (22.2%), 用 BSA-DOX 处理 8 h 的细胞 (34%) 略高于处理 20 h 的细胞 (26.4%)。结合图 5(a) 证明此 FRET 体系可以区分细胞摄取小分子药物和纳米药物细胞的异同, 并能对细胞内吞过程实现实时定量监测, 进一步说明 BSA-DOX 纳米粒子具有良好的生物相容性, 能够被细胞主动摄取, 并具有药物缓释的效果。

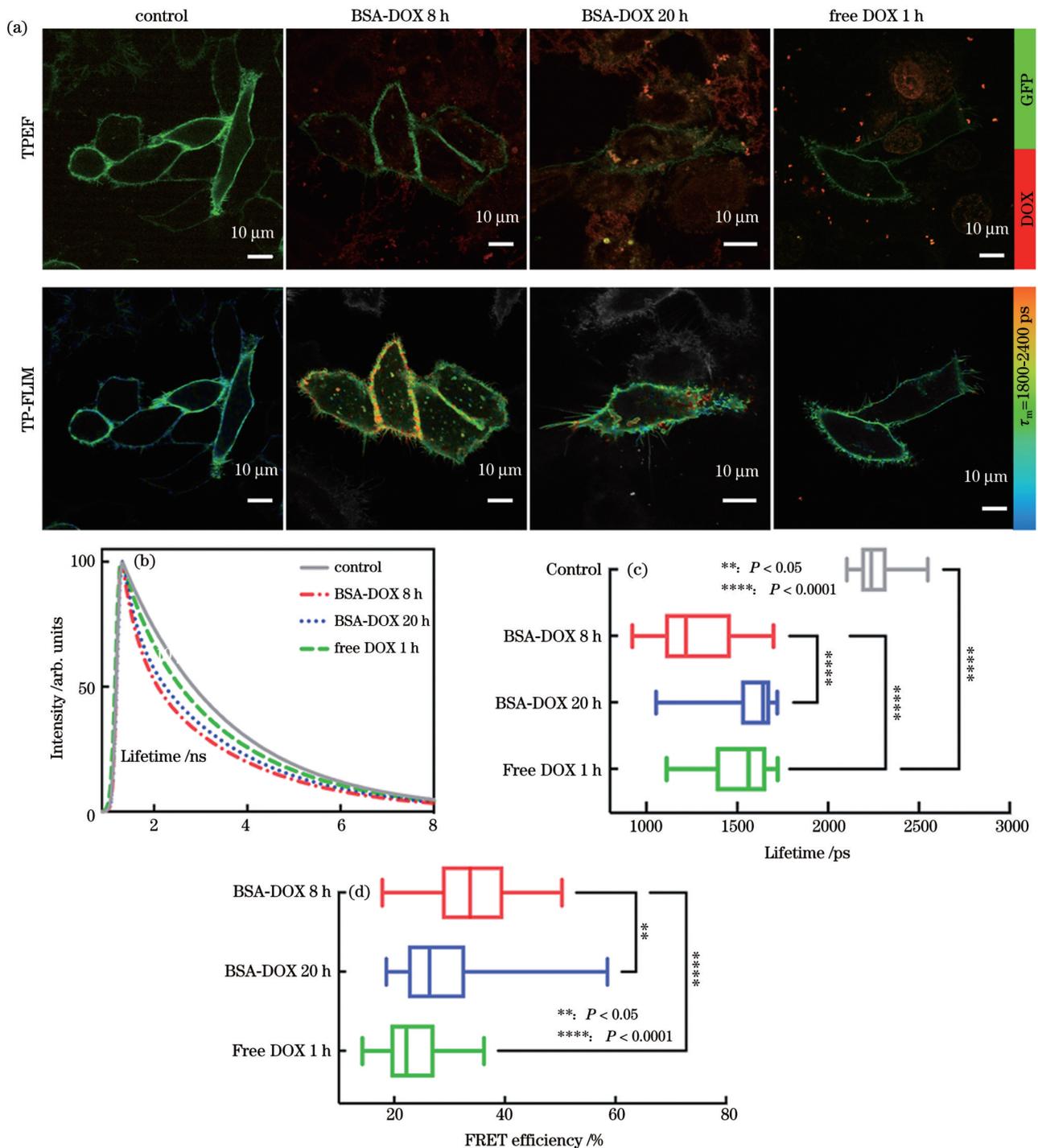


图 5 细胞内吞过程与 FRET 效应间的关系。细胞与 BSA-DOX 培养 0、8、20 h，细胞与 DOX 溶液培养 1 h 得到的 (a) 双光子荧光图和荧光寿命伪彩图以及 (b) 寿命衰减曲线；(c) FRET 区域的平均寿命；(d) FRET 效率

Fig. 5 Relationship between cellular endocytosis process and FRET effect. (a) Two-photon fluorescence maps and fluorescence lifetime pseudo-color images and (b) lifetime decay curves of cells incubated with BSA-DOX for 0, 8, 20 h and with DOX solution for 1 h; (c) average lifetime of FRET regions; (d) FRET efficiency

### 3.5 饥饿处理对卵巢癌细胞内吞纳米颗粒的影响

最后,本文利用该 FRET 纳米体系对饥饿条件下的细胞内吞作用进行了研究。当细胞所在的微环境中的营养条件发生变化时,它们将启动一系列复杂的途径来维持其代谢平衡<sup>[38-39]</sup>。细胞将通过激活自噬来保障重要的细胞结构不受损害,介导内吞作用,降解细胞质内的可溶性大分子和细胞器,并通过内吞作用,参与

细胞外基质和细胞膜蛋白的资源循环。饥饿刺激可以上调内吞作用,促进质膜上氨基酸的细胞内循环,避免细胞死亡<sup>[39-40]</sup>。

将 OVCAR-3 细胞用 EBSS 缓冲液进行 4 h 的饥饿处理后,加入含有 BSA-DOX 纳米粒子(20 μmol·L<sup>-1</sup>)的完全培养基,孵育细胞 8 h 后利用 TP-FLIM 进行成像,结果如图 6 所示。从双光子荧光成像[图 6(a)]可以看

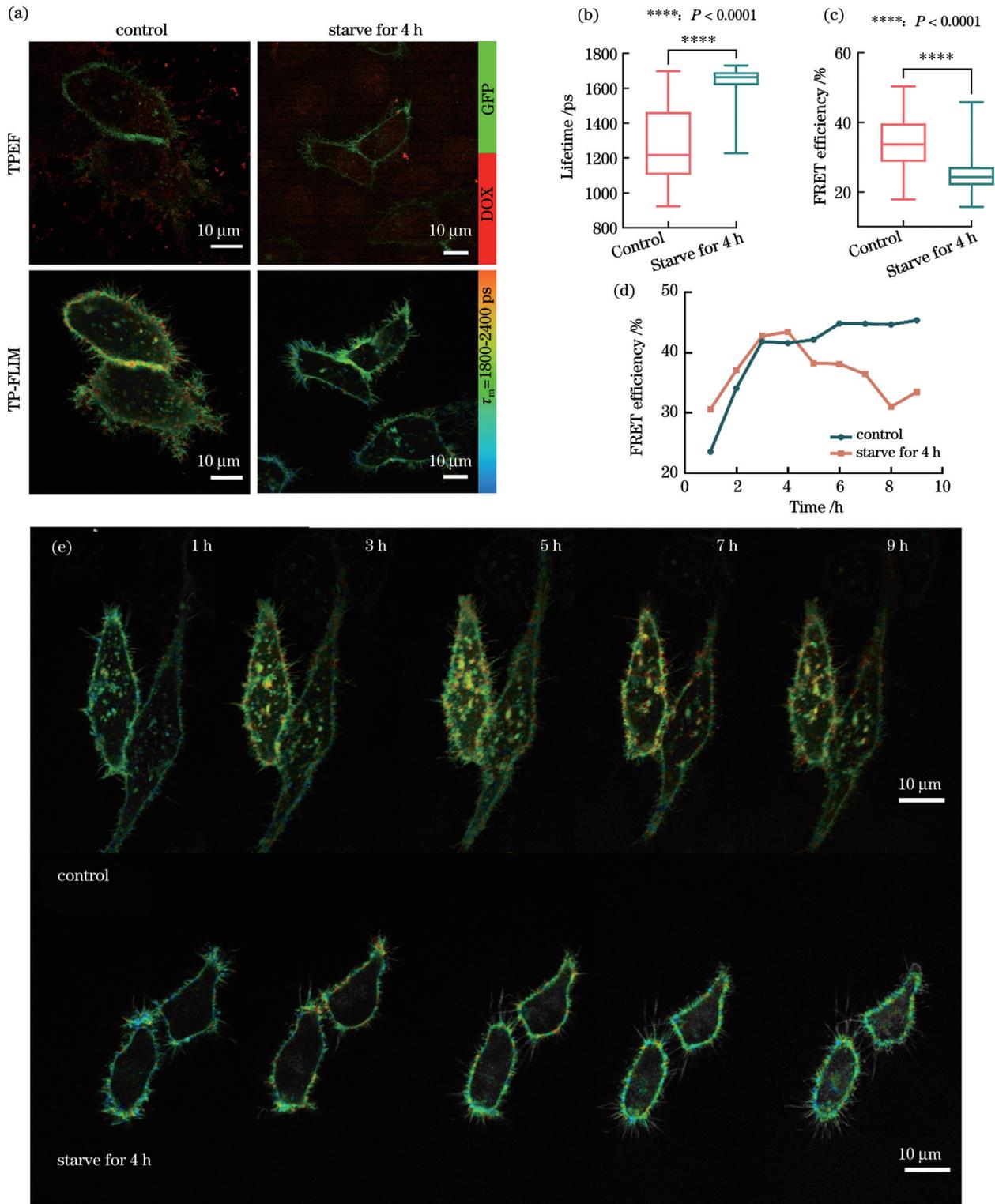


图6 饥饿处理与细胞内吞作用间的关系。(a)双光子荧光图和荧光寿命伪彩图;(b)FRET区域的平均寿命;(c)FRET效率;(d)FRET效率统计折线图;(e)正常和饥饿细胞摄取BSA-DOX纳米粒子的时间序列TP-FLIM图像  
 Fig. 6 Relationship between starvation treatment and cellular endocytosis. (a) Two-photon fluorescence map and fluorescence lifetime pseudo-color images; (b) average lifetime of FRET regions; (c) FRET efficiency; (d) line graph of FRET efficiency; (e) time serie TP-FLIM images of BSA-DOX nanoparticles uptake by normal and starved cells

出,饥饿处理的细胞比未进行饥饿处理的细胞会摄取更多的纳米药物,这些药物进入细胞核。从荧光寿命伪彩图可以看出,不同于对照组细胞,饥饿处理的细胞周围几乎没有纳米粒子聚集,而细胞内的DOX荧光却比对

照组细胞强。统计得到饥饿组的荧光寿命比对照组高,FRET区域的平均荧光寿命分别为1220 ps和1664 ps [图6(b)],饥饿处理组的FRET效率较对照组有明显的下降,分别为33.7%和24.1% [图6(c)],说明饥饿处理

后的细胞内吞运动增加,细胞膜运动加速,从周围环境中摄取了更多的物质以缓解饥饿情况下的营养缺失。

为了进一步研究饥饿细胞的内吞作用,本文利用 TP-FLIM 系统对同一细胞进行了 9 h 的长时间监测 [图 6(e)], FRET 效率表征纳米粒子与细胞膜的相互作用 [图 6(d)]。利用流式细胞实验分析了细胞内荧光强度直方图,表征了细胞内吞及内化的情况和速率 (附录图 A2)。FLIM 的数据显示,前 3 h 饥饿处理的细胞 FRET 效率的增速高于正常细胞,第 4 h 之后,饥饿处理的细胞 FRET 效率逐渐降低,正常细胞 FRET 效率稳定在 40% 上下。流式数据显示,饥饿处理的细胞在加入 BSA-DOX 纳米粒子 4 h 后,细胞内的相对荧光强度比对照组略高,在 8 h 后胞内荧光强度显著高于对照组,而在 14 h 和 20 h 后明显低于对照组。这表明饥饿处理的细胞在前 4 h 的内吞速率较快,并且细胞膜流动性较强,加速了纳米粒子的内化。正常细胞的内吞速率较慢,虽然在后 4 h FRET 效率没有明显的变化,但是胞内荧光强度的增速比饥饿细胞低。

## 4 结 论

提出了一种对 OVCAR-3 细胞中的纳米药物内吞作用进行定性和定量分析的方法。通过去溶剂化法合

成了 BSA-DOX 纳米颗粒,这种材料可以利用其自身的荧光与转染到细胞膜上的 sfGFP 形成 FRET 纳米体系。使用 TP-FLIM 对细胞内吞进行成像分析,并对 FRET 效应中的供体寿命进行无干扰监测和定量分析。结果表明,当纳米药物被细胞吞噬并在细胞内释放时,通过检测 FRET 效率可以准确表征细胞膜与纳米药物相互作用的过程,并利用本方法验证了饥饿处理的细胞会上调内吞运动。

## 附录 A

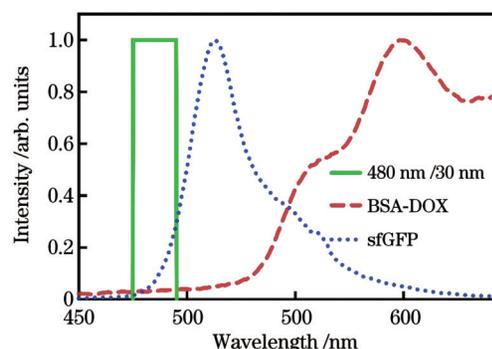


图 A1 sfGFP 和 BSA-DOX 的双光子发射谱和 480 nm/30 nm 滤光片的收集波段

Fig. A1 Two-photon emission spectra of sfGFP and BSA-DOX and collection bands of 480 nm/30 nm filters

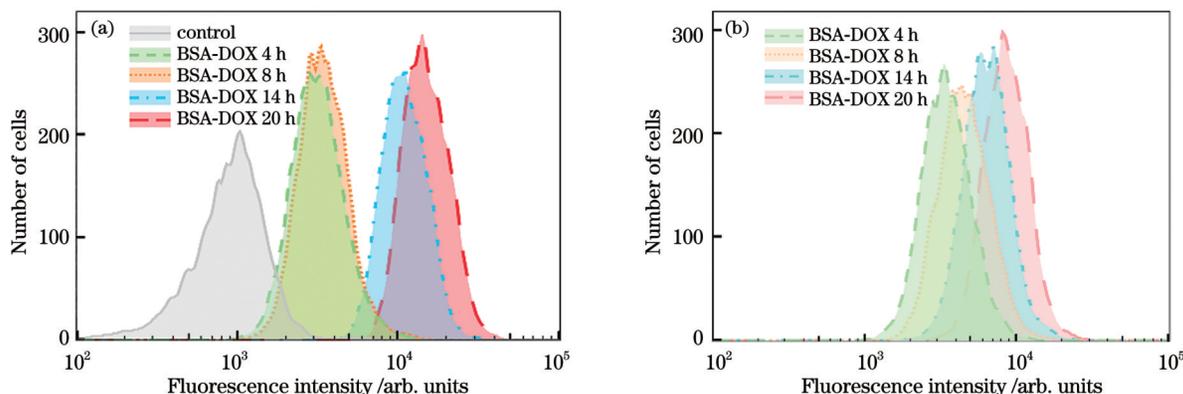


图 A2 流式细胞实验中的胞内荧光强度直方图。(a)正常细胞;(b)饥饿细胞

Fig. A2 Histograms of intracellular fluorescence intensity in flow cytometry. (a) Normal cells; (b) starved cells

## 参 考 文 献

- [1] Thanuja M Y S H, Anupama C, Ranganath S H. Bioengineered cellular and cell membrane-derived vehicles for actively targeted drug delivery: so near and yet so far[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2018, 132:57-80.
- [2] Ewaschuk J B, Newell M, Field C J. Docosahexanoic acid improves chemotherapy efficacy by inducing CD95 translocation to lipid rafts in ER<sup>-</sup> breast cancer cells[J]. *Lipids*, 2012, 47(11): 1019-1030.
- [3] Li Z, Li B, Wang M, et al. The role of endosome evasion bypass in the reversal of multidrug resistance by lipid/nanoparticle assemblies [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2013, 1(10): 1466-1474.
- [4] Yang H, Wang Q, Chen W et al. Hydrophilicity/hydrophobicity reversible and redox-sensitive nanogels for anticancer drug delivery [J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2015, 12(5): 1636-1647.
- [5] Flak D, Przywiecka Ł, Nowaczyk G, et al. QGDs-MSNs nanocomposite nanoparticles for simultaneous intracellular drug delivery and fluorescent imaging[J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 2018, 20(11),306.
- [6] 钟佳慧, 伍君鑫, 孔亚伟, 等. 酵母自体荧光寿命显微图像的自动分析方法[J]. *激光与光电子学进展*, 2022, 59(6): 0617019. Zhong J H, Wu J X, Kong Y W, et al. Automated analysis methods for autofluorescence lifetime microscopic images of yeast [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2022, 59(6),0617019.
- [7] 刘雄波, 林丹樱, 吴茜茜, 等. 荧光寿命显微成像技术及应用最新研究进展[J]. *物理学报*, 2018, 67(17): 178701. Liu X B, Lin D Y, Wu Q Q, et al. Recent progress in fluorescence lifetime imaging microscopy technology and its applications [J]. *Acta Physica Sinica*, 2018, 67(17):178701.
- [8] 刘立新, 齐美捷, 郜鹏, 等. 荧光寿命成像在癌症诊断研究中的应用(特邀)[J]. *光子学报*, 2021, 50(10): 1017001. Liu L X, Qi M J, Gao P, et al. Application of fluorescence lifetime imaging in cancer diagnosis(invited) [J]. *Acta Photonica Sinica* 2021, 50(10):1017001.

- [9] 杨碧玉, 徐跃. 一种基于 LSTM 神经网络的荧光寿命还原算法[J]. 光子学报, 2022, 51(6): 0618002.  
Yang B Y, Xu Y. Fluorescence lifetime retrieval algorithm based on LSTM neural network[J]. Acta Photonica Sinica 2022, 51(6), 0618002.
- [10] Clegg R M. Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids[M]// DNA structures part A: synthesis and physical analysis of DNA. Amsterdam: Elsevier, 1992: 353-388..
- [11] Förster T. Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz[J]. Annalen Der Physik, 1948, 437(1/2): 55-75.
- [12] Clegg R M. Fluorescence resonance energy transfer[J]. Chemical Analysis, 1996, 137: 179-252.
- [13] Scheibe G. Fluoreszenz organischer verbindungen, von theodor Förster. verlag vandenhoec u. ruprecht, göttingen, 1951, 1. aufl. 312 S., 81 abb., geh D M 29.50, gebd. D M 32.50[J]. Angewandte Chemie, 1954, 66(5): 164.
- [14] Wouters F S, Bastiaens P I, Wirtz K W, et al. FRET microscopy demonstrated the molecular association of a non-specific lipid transfer protein (nsL-TP) with fatty acid oxidation enzymes in peroxisomes[J]. The EMBO Journal, 1998, 17(24): 7179-7189.
- [15] Kenworthy A K, Edidin M. Distribution of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein at the apical surface of MDCK cells examined at a resolution of <100 Å using imaging fluorescence resonance energy transfer[J]. The Journal of Cell Biology, 1998, 142(1): 69-84.
- [16] Dickinson M E, Bearman G, Tille S, et al. Multispectral imaging and linear unmixing add a new dimension to laser scanning fluorescence microscopy[J]. BioTechniques, 2001, 31(6): 1272, 1274-1272, 1276, 1278.
- [17] Zimmermann T, Rietdorf J, Pepperkok R. Spectral imaging and its applications in live cell microscopy[J]. FEBS Letters, 2003, 546(1): 87-92.
- [18] Ng T, Squire A, GHansraet al. Imaging of protein kinase Ca activation in cells[J]. Science, 1999, 283(5410): 2085-2089.
- [19] Gadella T W J, Jr., Jovin T M, Clegg R M. Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM): spatial resolution of microstructures on the nanosecond time scale[J]. Biophysical Chemistry, 1993, 48(2): 221-239.
- [20] Mattheyses A L, Hoppe A D, Axelrod D. Polarized fluorescence resonance energy transfer microscopy[J]. Biophysical Journal, 2004, 87(4): 2787-2797.
- [21] Clayton A H A, Hanley Q S, Arndt-Jovin D J. Dynamic fluorescence anisotropy imaging microscopy in the frequency domain (rFLIM)[J]. Biophysical Journal, 2002, 83(3): 1631-1649.
- [22] Rizzo M A, Piston D W. High-contrast imaging of fluorescent protein FRET by fluorescence polarization microscopy[J]. Biophysical Journal, 2005, 88(2): L14-L16.
- [23] Wang S Q, Shen B L, Ren Set al. Implementation and application of FRET-FLIM technology[J]. Journal of Innovative Optical Health Sciences, 2019, 12(5), 1930010.
- [24] Wang K N, Qi G B, Chu H Yet al. Probing cell membrane damage using a molecular rotor probe with membrane-to-nucleus translocation[J]. Materials Horizons, 2020, 7(12): 3226-3233.
- [25] Rudkouskaya A, Smith J T, et al. Quantification of trastuzumab-HER2 engagement *in vitro* and *in vivo*[J]. Molecules, 2020, 25(24): 5976.
- [26] Wolf M P, Liu K G, Horn T F W, et al. FRET in polymeric nanocarriers: IR-780 and IR-780-PDMS[J]. Biomacromolecules, 2019, 20(11): 4065-4074.
- [27] Morton S W, Zhao X, Quadir M A, et al. FRET-enabled biological characterization of polymeric micelles[J]. Biomaterials, 2014, 35(11): 3489-3496.
- [28] Sahay G, Querbes W, Alabi C, et al. The efficiency of siRNA delivery by lipid nanoparticles is limited by endocytic recycling[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(7): 653-658.
- [29] Zhao Y M, Fay F, Hak S, et al. Augmenting drug-carrier compatibility improves tumor nanotherapy efficacy[J]. Nature Communications, 2016, 7: 11221.
- [30] Bouchaala R, Mercier L, Andreiuk B. Integrity of lipid nanocarriers in bloodstream and tumor quantified by near-infrared ratiometric FRET imaging in living mice[J]. Journal of Controlled Release, 2016, 236: 57-67.
- [31] Sparks H, Kondo H, SHooper et al. Heterogeneity in tumor chromatin-doxorubicin binding was revealed by *in vivo* fluorescence lifetime imaging confocal endomicroscopy[J]. Nature Communications, 2018, 9: 2662.
- [32] Pisano C, Cecere S C, di Napoli M, et al. Clinical trials with PEGylated liposomal doxorubicin in the treatment of ovarian cancer [J]. Journal of Drug Delivery, 2013, 2013: 898146.
- [33] Hortobágyi G N. Anthracyclines in the treatment of cancer. An overview[J]. Drugs, 1997, 54(Suppl 4): 1-7.
- [34] Qaddoumi M G, Ueda H, Yang J, et al. Characteristics and mechanisms of uptake of PLGA nanoparticles in rabbit conjunctival epithelial cell layers[J]. Pharmaceutical Research, 2004, 21(4): 641-648.
- [35] Heger Z, Kominkova M, et al. Fluorescence resonance energy transfer between green fluorescent protein and doxorubicin has been enabled by DNA nanotechnology[J]. ELECTROPHORESIS, 2014, 35(23): 3290-3301.
- [36] Panja P, Jana R. Lipid-raft-mediated direct cytosolic delivery of polymer-coated soft nanoparticles[J]. The Journal of Physical Chemistry. B, 2020, 124(25): 5323-5333.
- [37] Ma Y Q, Pandzic E, Nicovich P R, et al. Intermolecular FRET sensors detect the dynamics of T-cell receptor clustering[J]. Nature Communications, 2017, 8: 15100.
- [38] Müller M, Schmidt O, Angelova M, et al. The coordinated action of the MVB pathway and autophagy ensures cell survival during starvation[J]. eLife, 2015, 4: e07736.
- [39] Rainero E, Howe J D, Caswell P T, et al. Ligand-occupied integrin internalization links nutrient signaling to invasive migration [J]. Cell Reports, 2015, 10(3): 398-413.
- [40] Jones C B, Ott E M, Keener J M, et al. Regulation of membrane protein degradation via starvation-response pathways[J]. Traffic, 2012, 13(3): 468-482.

# Elucidation of Interaction Between OVCAR-3 Cell Membranes and BSA-DOX Nanoparticles Based on FLIM -FRET

Li Huixian, Lin Fangrui, Xu Yunjian, Li Yanping, Wang Kexin, Wang Shiqi, Zou Yanhua, Hu Rui, Qu Junle, Liu Liwei\*

*Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems of Guangdong Province and Ministry of Education, College of Physics and Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong, China*

## Abstract

**Objective** In typical tumor therapy, the drug must reach the tumor site via blood vessels and access the cell membrane of the tumor cells to act on a certain target. The drug recognizes the target molecules and then enters the tumor cells in a specific manner that facilitates the release of the drug without toxic side effects on normal cells. Numerous membrane proteins and receptors on the cell membrane can be considered targets during drug carrier design. Corresponding biochemical studies, such as immunoblotting and flow cytometry, are often conducted, supplemented by fluorescence co-staining imaging. However, intensity-based fluorescence imaging has considerable limitations, both in terms of its inability to distinguish small-molecule drugs from nanomedicine drugs and to monitor endocytosis in living cells in real time. Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) is commonly used to evaluate the lifetime of fluorescent moieties in living cells for quantitative microscopic analysis. Förster resonance energy transfer (FRET) can be used to characterize the transfer of energy from a donor fluorescent molecule to an acceptor fluorescent molecule. FLIM technology with FRET (FLIM-FRET) can monitor protein interactions and the dynamic processes of subcellular organelles in living cells.

**Methods** In this study, doxorubicin (DOX) nanoparticles encapsulated in bovine serum albumin (BSA) were synthesized. Albumin nanoparticles demonstrate good biocompatibility and inherent passive targeting in living organisms and can be effective drug carriers for slow release and reduced toxic side effects. DOX is an amphiphilic molecule that is not completely encapsulated in the nanoparticles and is attached to the nanoparticle surface. Superfolder GFP (sfGFP) was transfected into the cell membrane as a donor, and the BSA-DOX nanoparticles were used as acceptor molecules. Together, both molecules constituted the FRET nanosystem. During the uptake of nano drugs by cells via endocytosis, the distance between the cell membrane and nano drug meets the criteria for FRET induction, and the fluorescence lifetime of the donor is shortened during the process. When the endocytic vesicles release the drug intracellularly, the distance between the cell membrane and nano drug is altered, and the FRET effect diminishes or disappears. In this study, we used a two-photon excitation fluorescence lifetime microscopic imaging system (TP-FLIM) to monitor the FRET effect during this process, to distinguish between the diffusion movement of nanoparticles being endocytosed into cells and small-molecule drugs and to monitor the endocytosis process of cells in real time. We used this method to verify the upregulation of the endocytosis movement of cells under starvation conditions.

**Results and Discussions** In this study, BSA was used to wrap DOX into nanoparticles that could be endocytosed into cells, resulting in the formation of BSA-DOX nanoparticles with a particle size below 100 nm. The process of cellular uptake of nanoparticles by endocytosis is long, which enables a more in-depth study of microscopic physiological processes. In addition, the endocytosis pathway of the nanocarriers was evaluated using four endocytosis pathway inhibitors. BSA-DOX nanoparticles entered the cells via clathrin-mediated endocytosis. The associated dynamic process was elucidated. Our study shows that the FLIM-FRET technique combined with quantitative analysis methods can be used to study the similarities and differences between small-molecule drugs and nanoparticle-cell interactions.

**Conclusions** In this study, we present a new method for the qualitative and quantitative analysis of endocytosis of nanomedicine in OVCAR-3 cells. We synthesized BSA-DOX nanoparticles by desolvation using a material that allows us to use its own fluorescence to form FRET pairs with sfGFP proteins transfected onto the cell membrane. We used the TP-FLIM system for qualitative analysis of cellular endocytosis by two-photon fluorescence and interference-free monitoring of donor lifetime during FRET. Quantitative analysis was performed by FLIM. The experimental results show that the distance between the cell membrane and nano molecule can be accurately reflected by detecting FRET efficiency as the nanomedicine is endocytosed by the cells and released within the cells. We also used this method to verify that starvation-treated cells upregulated endocytosis motility.

**Key words** bio-optics; fluorescence resonance energy transfer; fluorescence lifetime; cell membrane