肿瘤乏氧检测研究新进展

孙伶俐^{1,2}, 计亮年¹, 巢晖^{1*}

1. 生物无机与合成化学教育部重点实验室; 中山大学化学与化学工程学院, 广州 510275

2. 广东省茶树资源创新利用重点实验室, 广东省农业科学院茶叶研究所, 广州 510640

*通讯作者, E-mail: ceschh@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2016-06-29; 接受日期: 2016-09-30; 网络版发表日期: 2016-11-30

国家自然科学基金项目(编号: 21171177, 21471164, 21525105)、科技部973计划项目(编号: 2015CB856301)和中央高校基本科研业务费专项资金资助项目

摘要 在肿瘤内部存在乏氧区域, 肿瘤的乏氧与肿瘤的抗化疗、放疗及恶性程度等密切相关. 对肿瘤内部的乏氧区域进行成像可能有助于研发新的癌症诊断与治疗的方法, 此领域越来越受到广泛的关注. 本文主要针对近年来对肿瘤乏氧成像中乏氧探针的设计、合成及应用研究的最新进展进行综述, 主要包括对肿瘤乏氧还原环境响应探针及氧气淬灭乏氧探针的介绍等.

关键词 肿瘤乏氧, 探针, 生物成像

1 引言

快速生长的肿瘤细胞需要从周围血管网络中吸收更多的氧气及营养物质以满足其生长繁殖的需要. 然而, 在实体肿瘤内部, 肿瘤细胞的生长速度远大于其内部血管的产生速度, 这样在实体肿瘤中就产生了无血管的缺氧区域, 即乏氧(图1). 导致肿瘤乏氧形成的因素主要包括: 实体瘤内部血管结构和功能异常^[1], 血管间物质输送距离增加(有些血管甚至不运载氧合红细胞), 快速增殖的肿瘤细胞间争夺氧气, 疾病或者治疗引发的贫血导致血液运载氧气能力下降. 因此, 肿瘤乏氧主要有3种类型^[2]: (1) 灌注型(急性)乏氧, 肿瘤内部血流不足引起的, 一般认为是肿瘤内部新生血管结构和功能异常的结果. 这种乏氧是短暂的, 由组织间隙压力短暂的降低或升高引起的, 会影响到所有细胞与血管壁的作用; (2) 扩散型(慢性)乏氧, 实体

肿瘤内部氧气输送距离增加引起的, 主要是位于距离血管超过100 μm 区域的细胞, 细胞是否乏氧取决于离它最近的动脉或静脉毛细血管的位置; (3) 贫血型乏氧, 与肿瘤内部血液运载氧气的能力有关, 可能是肿瘤本身或治疗引起的.

图1 实体肿瘤内部乏氧区域分布(网络版彩图)

引用格式: 孙伶俐, 计亮年, 巢晖. 肿瘤乏氧检测研究新进展. 中国科学: 化学, 2017, 47: 133-143
Sun L, Ji L, Chao H. Recent advances in hypoxic tumor detection. *Sci Sin Chim*, 2017, 47: 133-143, doi: 10.1360/N032016-00137

2 肿瘤与乏氧

位于乏氧区域的细胞会通过减少整个细胞内部蛋白质等物质的合成来适应乏氧的环境, 减缓甚至完全抑制细胞的增殖. 相对静息的细胞状态可以改变细胞对外部辐射及药物的响应, 使肿瘤细胞对放疗及化疗药物不敏感, 对药物的耐受程度与乏氧程度有关. 另外, 在肿瘤细胞内, 乏氧程度的发生发展过程可能会促进细胞侵入到别的部位重新生长, 引起肿瘤细胞向周围扩散, 肿瘤的转移导致不良预后^[3]. 越来越多的证据表明, 在50%~60%的中晚期实体肿瘤内部存在乏氧/无氧区域. 在临床上用实体肿瘤内部的乏氧程度对肿瘤进行评估, 肿瘤乏氧成为肿瘤不良预后预测的一个重要指标.

2.1 乏氧诱导因子

乏氧诱导因子(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)是一个异源二聚体, 包括HIF-1 α 和HIF-1 β 两个亚基^[4]. β 亚基(HIF-1 β)又称芳香烃受体核转运蛋白(Arnt1), 在细胞内稳定表达. α 亚基(HIF-1 α)的翻译水平严格受到翻译后修饰的调控. HIF-1 α 共含有826个氨基酸, 其两端是感受乏氧信号的调控区域, C末端具有富含脯氨酸-丝氨酸-苏氨酸(Pro/Ser/Thr)的氧降解结构域和反式激活结构域(TAD), N末端也含有反式激活结构域, 这些结构域都是乏氧诱导蛋白稳定和转录激活的结构域. 因此, HIF-1 α 的表达受到乏氧的调控并调控HIF-1的活性^[5,6]. 对HIF-1 α 的翻译后修饰主要依靠氧依赖性的脯氨酸羟化酶(PHD)进行(图2). 在有氧的情况下, 脯氨酸羟化酶可以氧分子为底物将HIF-1 α 中 α 亚单元的脯氨酸羟基化, 使其迅速降解. 而在乏氧组织中, HIF-1 α 可以稳定存在并转移到细胞核, 与HIF-1 β 通过形成Per-Arnt-Sim (PAS)结构域的蛋白质之间的相互作用形成异源二聚体, 并与乏氧响应的目标基因原件结合, 完成乏氧信号的转录过程, 调控一系列肿瘤的生长代谢行为, 使细胞适应乏氧的环境^[7-9].

乏氧诱导因子调控的众多下游信号蛋白质中, 多数被认为与糖酵解过程相关, 包括葡萄糖转运蛋白1 (GLUT1)和3 (GLUT3)^[10,11]、己糖激酶(HK2)^[12]、乳酸脱氢酶(LDHA)^[13]、单羧酸转运蛋白(MCT4)^[14]等. 乏氧诱导因子通过调控这些蛋白质的表达进而促进肿瘤细胞的糖酵解过程. 另外, 乏氧诱导因子还会通过调控3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶(PDK1)和MXI1等蛋

图2 乏氧诱导因子(HIF-1)表达的调控作用(网络版彩图)

白质, 抑制细胞线粒体氧化磷酸化的速率^[15-17]. 这样, 在乏氧条件下, 肿瘤细胞将通过消耗氧气产生能量的代谢方式转变成通过消耗葡萄糖来获得能量, 使细胞更加适应乏氧的生存环境, 把氧气的消耗降到最低^[18]. 乏氧诱导因子还可以通过调控表皮生长因子受体(EGFR)和血小板衍生生长受体(PDGFR)促进肿瘤内部血管的生成, 以便获得更多的氧气及营养成分供给^[19-21].

2.2 乏氧与肿瘤放疗抗性

对于乏氧肿瘤细胞来说, 对其进行放射治疗时可能会遇到很大的问题, 因为在氧气的浓度低于25~30 mm Hg时细胞对射线的敏感性显著下降(图3). 乏氧引起的肿瘤放疗耐受性的确切机制目前尚无定论. 在有氧的情况下细胞受到辐射, 射线通过与细胞内的水发生相互作用, 产生能够损伤DNA的超氧自由基, 而这一过程中氧气的存在, 不仅保证了氧气依赖性的自由基的产生, 而且能够防止损伤DNA的自我修复. 因此, 这一过程被称为“氧气增强效应”(oxygen enhancement effect, OER), 在乏氧的情况下需要2.8~3倍的辐射剂量才能够达到与常氧情况下相同的治疗效果^[22]. 有证据表明, 通过增加细胞内热休克蛋白的水平, 乏氧诱导细胞内蛋白质和基因的变化也可能影响细胞对放射治疗的抗性(表1)^[23].

2.3 乏氧与癌症化疗抗性

体内及体外的实验表明, 目前临床上应用的多种化疗药物(环磷酰胺、卡铂及阿霉素)对肿瘤细胞杀伤作用都具有氧气依赖性, 这主要有两方面的原因: 一方面由肿瘤内部贫血造成的药物交付限制及分布不

图3 肿瘤组织的氧气浓度(p_{O_2})与其放射敏感度的关系^[24]

均, 另一方面是由于药物输送距离远而引起的输送限制^[25-27]. 乏氧可能直接或间接地通过多个机制来诱发肿瘤细胞对化疗药物的抗性. 包括减少自由基的产生(博来霉素、阿霉素), 增加亲核物质的产生如谷胱甘肽, 可以与目标DNA竞争烷基化试剂(获得性耐药的烷基化药物), 增加DNA自我修复酶的活性(烷基化药物、铂类化合物)^[28], 抑制细胞增殖及组织酸中毒(存在于糖酵解率较高的肿瘤细胞中)^[29,30]. 另外, 乏氧应激蛋白及凋亡蛋白的减少能够在一定程度上影响肿瘤细胞对化疗药物的抗性^[31,32].

3 肿瘤乏氧成像

目前临床上常用氧电极测定肿瘤内部的乏氧情况, 其测定结果能够直观地反映出肿瘤内部的含氧情况^[33,34]. 需多点测定, 工作量大, 电极通过基质和纤维组织时会对电极产生压力, 使测定数据有偏差. 另外由于测定需要将氧电极插入肿瘤内, 不仅会给患者造成痛苦, 还有可能增加肿瘤转移的机会^[35]. 分子影像技术结合适当的造影剂能够实现对肿瘤内部乏氧成像, 获得整个肿瘤组织内部的乏氧信息. 乏氧显像能够克服氧电极测定中的不足, 准确地探测组织内乏氧的位置, 由于肿瘤内部乏氧与肿瘤的恶性、抗药性等密切相关, 利用分子影像对乏氧进行无损伤地成像, 可以为肿瘤治疗的预后提供关键信息, 更好地指导临床检测, 提高治疗成功率. 目前可用于肿瘤乏氧成像的分子影像手段有多种, 包括电子断层扫描成像、磁共振成像、光学成像及光声成像等.

光学成像是利用光学的探测手段, 基于光学探测分子对细胞或组织进行成像的方法. 由于其检测仪器

发展成熟、灵敏度高、对比度高、分辨率高、成像直观和无损伤等优点被广泛应用. 在肿瘤乏氧检测中光学成像也是应用最为普遍的方法, 有关肿瘤乏氧光学成像的探针研究一直是肿瘤乏氧检测研究的热点. 肿瘤乏氧探针的设计主要基于两方面的原理: 依靠肿瘤乏氧区域的强还原性及探针荧光的氧气依赖性.

3.1 还原依赖性乏氧成像

还原酶高表达是肿瘤乏氧细胞的一个重要特征, 主要包括硝基还原酶、醌还原酶、偶氮还原酶等. 20世纪60年代早期就有人设计具有乏氧靶向性的前药, 在还原的环境中释放出具有细胞毒性的活性物质, 达到杀死肿瘤乏氧区域细胞的作用^[36]. 这也是乏氧探针设计的一个重要思路, 还原性依赖的乏氧探针主要是依靠探针在乏氧区域的还原酶作用下被还原, 荧光发生改变. 用于还原依赖乏氧探针的乏氧感应基团主要包括硝基、醌及偶氮等.

3.1.1 硝基

以硝基为乏氧感应基团的乏氧探针的响应机理与2-硝基咪唑正电子断层扫描成像(PET)乏氧成像类似, 即硝基淬灭了芳环体系的荧光, 在乏氧细胞的生物还原下硝基被还原淬灭作用消失, 化合物的荧光恢复^[37]. 依据硝基的乏氧还原特征, 近年来发展出多种有机小分子乏氧检测荧光探针^[38-46].

Qian等以2-硝基咪唑^[47]及硝基杂环^[48,49]为乏氧感应基团合成出了一系列能够检测细胞乏氧的探针. 以尼罗蓝染料分子为基础, 将硝基卞基基团连接到尼罗蓝染料分子上淬灭染料原有的荧光, 在乏氧细胞还原酶的作用下硝基还原, 还原后的化合物在658 nm处发出近红外荧光. 实现对乏氧细胞硝基还原酶及乏氧环境的双重检测(图4)^[50].

Ma等^[43]以硝基咪唑为乏氧感应基团, 设计合成出能够与硝基还原酶相应, 对肿瘤乏氧进行检测的荧光探针. 硝基咪唑通过甲氧基与异吩噻唑酮相连, 化合物几乎没有荧光, 当在乏氧条件下被硝基还原酶还原后, 硝基被还原成氨基并通过1,6-原子重排和消除作用释放出异吩噻唑酮分子, 具有强烈的红色荧光. 该探针对于硝基还原酶的检出限达0.27 ng/mL, 具有很高的灵敏度(图5).

Tang等^[51]以花菁7染料为基础设计合成了近红外肿瘤乏氧探针(Cy-NO₂), 将硝基咪唑连接到花菁7染

图4 以硝基、卞基为反应位点的乏氧近红外荧光探针(网络版彩图)

图5 以5-硝基咪唑为反应位点的乏氧荧光探针(网络版彩图)

料上淬灭其原有的荧光,在硝基还原酶及乏氧的作用下还原硝基,化合物在750 nm发出近红外的荧光,在内源性硝基还原酶的作用下对HepG2细胞进行乏氧检测。另外, Cy-NO₂还能够检测肿瘤细胞上皮-间充质转变与乏氧程度之间的关系,该实验结果显示,肿瘤的乏氧在下调钙黏蛋白E表达的同时可以上调肌动蛋白- α 的表达(图6)。

3.1.2 醌

醌是另一个可以在乏氧下被还原的基团。醌是一类完全共轭的化合物,在自然界中广泛存在。它可以以电子传递链为电子载体经过1电子或者2电子还原并发生质子化,最后分别形成半醌或对苯二酚^[52]。在生物体中,在辅酶NAD(P)H存在下醌可以被各种生物还原剂还原,其中包括NADH泛醌氧化还原酶、NADH细胞色素b₅、NADPH细胞色素P450还原酶^[53]。除了能够被各种生物还原酶还原外,醌还是一种优秀的荧光淬灭基团,与荧光基团连接可以有效地淬灭化合物

图6 以硝基咪唑为反应位点的乏氧近红外荧光探针(网络版彩图)

原有的荧光^[54]。因此,在肿瘤乏氧探针的设计中,醌被广泛用来作为乏氧感应基团。

Nishimoto等^[55]将吡啶酮与荧光基团相连发现,在乏氧情况下,吡啶酮基团会发生1个电子还原作用。于是将吡啶酮与对甲氨基酚荧光团相连合成出乏氧探针(IQ-R)^[56],由于吡啶酮的淬灭作用该化合物没有荧光,在乏氧条件下,通过还原酶细胞色素P450还原酶的还原作用,吡啶酮发生1电子的还原作用,释放出自由的荧光基团而荧光恢复。该探针在A549乏氧细胞中表现出良好的乏氧检测效果(图7)。

除有机小分子外,含有特异性靶向乏氧感应基团的金属配合物也是进行乏氧探针设计的重要思路。Chao等^[57]以铈(III)配合物为荧光基团,蒽醌基团为乏氧感应基团设计合成了一系列对乏氧肿瘤细胞中线粒体具有特异响应性的双光子磷光成像试剂(图8)。由于蒽醌基团的磷光淬灭作用,合成的铈(III)配合物没有磷光,在乏氧条件下,蒽醌基团发生双电子还原过程,还原产物为具有强烈磷光的羟醌衍生物。在体外溶液及贴壁A549细胞中显示出良好的乏氧响应效果。另外,配合物在细胞中能够特异性靶向肿瘤细胞内线粒体细胞器,可以对肿瘤细胞乏氧线粒体进行特异性成像并能够长时间示踪活细胞内线粒体形态变化。在贴壁细胞、3D肿瘤细胞球及斑马鱼乏氧模型中都显示出乏氧线粒体良好的特异响应性,为首例乏氧线粒

图7 以吡咯酮为反应位点的乏氧荧光探针(网络版彩图)

图8 以蒽醌为反应位点的乏氧线粒体双光子成像试剂(网络版彩图)

体成像试剂。

肿瘤的急性乏氧, 或称间歇性乏氧引起了越来越多的关注, 这种乏氧包括了缺氧-有氧过程的反复循环。周期性乏氧引起了乏氧诱导因子HIF-1表达水平的增加, 并减弱了放疗及化疗的疗效。然而, 多数已发表的乏氧感应荧光探针都是不可逆的, 无法显示周期性乏氧-常氧的动态变化。Chao等^[58]合成了含有蒽醌结构的Ru(II)金属配合物, 在蒽醌基团的淬灭作用下, Ru(II)配合物相连化合物几乎没有荧光, 在乏氧条件下通过还原酶的还原作用蒽醌基团发生2电子的还原, 成为羟醌结构配合物发出强烈的荧光。此还原过程是可逆的。该探针能够在体外溶液、A549贴壁细胞及3D细胞球中表现出良好的乏氧检测效果。另外, 该配合物还表现出优异的双光子荧光特征, 能够通过双光

子荧光显微镜对贴壁细胞、3D细胞球及斑马鱼模型中进行乏氧荧光实时动态成像, 是一个很有潜力的肿瘤乏氧探针(图9)。

3.1.3 偶氮

偶氮基团在生物体系中会发生生物还原过程。在生物体系中偶氮还原酶是一种重要的还原酶家族, 广泛存在于各种厌氧细菌及人体的肠道等器官^[59]。偶氮基团在偶氮还原酶的作用下会经过分步的还原过程, 最终形成氨基衍生物。由于偶氮还原酶的活性会受到环境中氧气浓度的影响, 在氧分压较高的情况下偶氮的还原过程会受到氧气的抑制, 因此, 偶氮基团的还原要在乏氧的环境中才能够顺利完成。另外偶氮还是有效的荧光淬灭基团^[60]。偶氮的这些生物还原的机理, 使其成为乏氧荧光探针设计中良好的乏氧感应基团。

Nagano等^[61]设计合成了以Cy-5染料为荧光团, 以BHQ-3为淬灭剂的乏氧荧光探针。由于分子内的荧光共振能量转移(FRET)作用, 该探针没有荧光。在乏氧条件下, 经过偶氮还原酶的还原作用, BHQ-3内的偶氮键还原断裂成氨基, Cy-5染料与BHQ-3分离, FRET作用消失, 荧光基团的荧光恢复。用探针处理不同氧气浓度的细胞发现, 乏氧程度越深, 荧光越强。该探针组织内部的急性缺氧也有很好的检测效果(图10)。

Hanaoka等^[62]以2M罗丹明绿(2Me RG)和2Me Si罗丹明600 (2Me SiR 600)为荧光基团, 对二甲氨基偶氮苯为荧光淬灭基团, 合成出两个乏氧荧光探针MAR和MASR。在偶氮基团的淬灭作用下, 探针没有荧光, 乏氧还原条件下, 偶氮基团发生还原作用断裂, 释放出罗丹明染料分子, 产生强烈的荧光。用A549细胞检测探针对于乏氧的检测效果发现, 两个探针对乏氧的敏感程度不同, MASR在氧气浓度0.1%时才能观察到荧光信号, 而MAR在5%的氧气浓度下已经有荧光产生。通过玻片覆盖模拟肿瘤内氧气的渗透梯度, 发现两种探针能够很好地感应细胞氧气浓度梯度。另外, 这两种探针在小鼠视网膜乏氧模型中也显示出良好的乏氧检测效果(图11)。

Chao等^[63]将偶氮基团与Ir(III)配合物相连, 设计合成一系列含偶氮基团的Ir(III)配合物乏氧磷光探针。在偶氮基团的淬灭作用下, Ir(III)配合物没有磷光, 乏氧环境中, 在偶氮还原酶的作用下还原产生相应的氨基衍生物, 发出很强的磷光信号。通过更换Ir(III)配合物的辅助配体, 还原后的磷光的颜色不同, 有绿色、

图9 以蒽醌为反应位点的乏氧双光子可逆荧光探针(网络版彩图)

图10 以偶氮为反应位点的乏氧荧光探针(网络版彩图)

图11 以偶氮为反应位点的乏氧荧光探针(网络版彩图)

黄色、橙色和红色。这些Ir(III)配合物在体外溶液、贴壁细胞及3D多细胞球模型中都表现出良好的乏氧

检测效果,是非常有潜力的多色乏氧磷光探针(图12)。

3.2 氧气淬灭乏氧成像

乏氧探针设计的另外一个重要的思路是依靠探针特异性的感应环境中的氧气浓度,即氧气传感器,荧光会受到环境中氧浓度的影响而发生变化(氧气引发磷光淬灭),依据这一原理近年来报道了多种肿瘤乏氧探针。

3.2.1 氧气淬灭磷光机理

氧气依赖磷光淬灭是一种直接的、可逆的检测氧气浓度的方法。氧气依赖磷光淬灭是通过氧气分子与激发态的染料分子碰撞而淬灭其荧光的光化学过程,通过检测荧光淬灭的程度可以检测出氧气浓度(图13)^[64]。在光激发的作用下,染料分子吸收光子后通过分子内部及系统间的转变过程,而迅速变为三重激发态。三重激发态的发射过程通常是缓慢地。结果,有一部分处于激发态的染料分子通过与氧气的碰撞相互作用而发生淬灭,使得染料的磷光量子产率和寿命降低,降低的程度依赖于氧气的浓度。有人认为,在此过程中处于基态的氧气分子接受了处于激发态的能量,而产生了寿命非常短的单线态氧^[64]。单线态氧是磷光淬灭的主要产物,寿命非常短暂,产生后会与溶剂分子发生作用,迅速失活^[65]。

3.2.2 氧气淬灭磷光探针

氧气敏感的化合物通常是具有重金属的大环配合物,通常为磷光或延时荧光,荧光寿命为微秒级。目前应用最为广泛的是金属配合物磷光染料分子(图14)具有氧气敏感度高、成本低、分析性能好及生物相容性高等优点^[66]。对于许多实验研究来说,特别是针对细胞等生物组织样本,探针的发射波长最好在可见光范围(550~700 nm)。Ru(dpp)₃²⁺、Ir(Cs)₂(acac)、PtCP及PtPFPP等染料发射荧光容易测量,能够检测并示踪氧气浓度的变化,并能够用荧光寿命成像系统检测氧气的变化,因此成为肿瘤乏氧模型中氧气浓度检测探针设计首选^[67-69]。

Takeuchi等^[70]合成出能够直接感应氧气浓度的Ir(III)配合物BTP。在常氧情况下,该配合物的磷光会被氧气淬灭,乏氧状态下荧光保持,从而对肿瘤细胞进行乏氧检测。对Ir(III)配合物的配体进行修饰可以改变配合物磷光的发射波长,使其发生红移,渗透深度更深。另外,我们对配合物进细胞后在亚细胞器中

图 12 以偶氮为反应位点的乏氧磷光探针(网络版彩图)

图 13 氧气淬灭磷光过程中主要的能量转换^[64] (网络版彩图)

图 14 部分氧气敏感的染料分子结构式

的分布进行分析,结果显示,配合物进细胞后主要分布在内质网(图15). 另外,部分Ru(II)配合物也有相似的氧气淬灭的性质,用于乏氧探针的设计中,并得到良好的乏氧响应效果^[71,72].

除了单独的金属配合物用做氧气传感器进行乏氧检测外,利用金属配合物的氧依赖性磷光淬灭的性质,并对其进行改造,可以使探针的性能更加优良,包括生物相容性更高、对生物体的毒性更小、探针渗

透组织深度更深等^[73~75]. Tobita等^[76]以磷光会被氧气淬灭的Ir(III)作为氧气感应基团,与一个对氧气浓度不敏感的荧光基团相连,得到的化合物显示出荧光、磷光双发射的性质,适用于作为测定氧气浓度的比例型氧气探针. 修饰后的化合物细胞摄取的效率更高,在细胞中显示出良好的检测乏氧的效果,并可以进行双通道细胞成像(图16).

Shi等^[77]合成出能够用来检测乏氧的氧气纳米传感器,该纳米颗粒由两部分组成:作为氧气感应基团的 $[\text{Ru}(\text{dpp})_3]^{2+}\text{Cl}_2$ 及稀土土转换发光材料. 作为可逆的氧气传感器检测环境中的乏氧环境. 与单纯的Ru(II)相比,该纳米传感器对氧气浓度显示出更高的灵敏度,准确地检测肿瘤细胞乏氧,并具有比近红外荧光发射更高的组织穿透力. 另外,在斑马鱼脑部缺氧模型中,也显示出很好的“常氧-乏氧”循环检测效果(图17).

图 15 以Ir(III)配合物为氧气敏感剂的乏氧磷光探针(网络版彩图)

图 16 以Ir(III)配合物为氧气敏感剂的乏氧比例型磷光探针(网络版彩图)

图 17 Ru(II)配合物为基础的纳米颗粒乏氧探针(网络版彩图)

3.3 其他乏氧探针

除根据肿瘤乏氧的还原特征及氧气依赖的磷光淬灭为机理设计乏氧探针外, 乏氧肿瘤细胞特异性表达的蛋白质及酶类, 如碳酸酐酶IX等, 是进行肿瘤乏氧探针及药物设计的另外一个思路。

碳酸酐酶(carbonic anhydrases, CAs)是一种在原核及真核生物中广泛存在的酶类, 在生物体中参与的主要生理反应是催化二氧化碳和水转化成碳酸氢盐和质子^[78]。研究表明, 碳酸酐酶与肥胖、癌症等多种疾病有密切的联系。近年来, 以CAs为靶点设计研发出多种治疗肥胖、肿瘤等疾病的药物^[79,80]。人的碳酸酐酶IX的表达受到乏氧诱导因子(HIF-1)的调控^[81], 在肿瘤乏氧细胞中特异性高表达。最近的研究表明, 碳酸酐酶IX通过调控细胞增殖、细胞黏附、细胞入侵及pH调节等来控制肿瘤的发生及恶化^[82]。因此, 碳酸酐酶IX是一个被公认的十分有价值的肿瘤诊断和治疗的靶点^[83]。

有研究表明, 邻磺苯甲酰亚胺能够特异性识别碳酸酐酶IX, 是进行碳酸酐酶IX靶向药物设计的一个重要的靶向基团^[84]。Qian等^[85]以邻磺苯甲酰亚胺为靶向基团合成出能够靶向碳酸酐酶IX荧光的探针Z1。邻磺苯甲酰亚胺基团通过电子供体哌嗪衍生物与2',7'-二氯荧光素(DCF)相连, 在邻磺苯甲酰亚胺处于自由状态时, 哌嗪环处于封闭导致荧光基团淬灭, 而当邻磺苯甲酰亚胺与碳酸酐酶IX结合时, 哌嗪环处于开放构

图 18 以碳酸酐酶IX为靶点的乏氧荧光探针(网络版彩图)

象, 荧光淬灭作用消失, 化合物的荧光恢复。由于碳酸酐酶IX在乏氧肿瘤细胞内的高表达, 该探针可以有效识别乏氧肿瘤细胞(图18)。

4 肿瘤乏氧检测面临的挑战

尽管光学成像技术具有独到的优势, 但其并没有在临床上得到广泛应用。其中一个重要原因是缺乏适用于活体组织中的乏氧探针。在进行乏氧探针研究时主要用贴壁细胞进行检测。而贴壁细胞与三维活体组织有很大的区别, 在贴壁细胞中有良好乏氧检测效果的探针, 可能由于组织渗透性等问题不能渗透到肿瘤乏氧中心, 因而得不到理想的检测效果。据前面介绍, 适用于组织乏氧成像的探针分子主要有两种: 磷光发射的金属配合物和有机小分子荧光探针。这两类探针分子由于溶解性、生物相容性等方面的不足, 难以实现直接对活体进行成像。另外, 由于它们的发射波长大多在紫外可见区域, 组织穿透能力较差。双光子荧光成像技术采用可见光或近红外光作为激发源, 对活体的光损伤小、分辨率高、穿透能力强, 可达1000 μm , 而单光子共聚焦成像的成像深度只有50 μm 。因此双光子荧光成像可以对组织中深层物质进行长时间的层析成像, 非常适合于对活体内分析物的长时间监测。目前, 利用双光子荧光成像技术探究肿瘤乏氧微环境, 表征肿瘤转移, 实现肿瘤乏氧的实时无损定量的测量等开始受到人们的关注。

肿瘤乏氧是恶性实体瘤发展过程中形成的一个重要的微环境, 处于乏氧环境中的肿瘤细胞对传统的化疗、放疗及光动力治疗等具有明显的抗性, 并成为肿瘤恶化、转移等不良预后的重要指标。肿瘤内乏氧成像可以为临床判断肿瘤预后和采用干预措施提供依据, 靶向乏氧肿瘤治疗可以克服传统肿瘤治疗中遇到的抗性问题, 对临床防治乏氧、增强机体代偿适应能力都有重要意义。

参考文献

- 1 Brown JM. *Cancer Res*, 1999, 59: 5863–5870
- 2 Vaupel P. *Oncologist*, 2004, 9: 4–9
- 3 Vaupel P, Mayer A, Hockel M. *Methods Enzymol*, 2004, 381: 335–354
- 4 Semenza GL. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3: 721–732
- 5 Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL. *Genes Dev*, 1998, 12: 149–162
- 6 Semenza GL. *Annu Rev Pathol Mech Dis*, 2014, 9: 47–71
- 7 Harten SK, Ashcroft M, Maxwell PH. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 12: 459–480
- 8 Rabinowitz MH. *J Med Chem*, 2013, 56: 9369–9402
- 9 Ke Q, Costa M. *Mol Pharmacol*, 2006, 70: 1469–1480
- 10 Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A. *J Biol Chem*, 2001, 276: 9519–9525
- 11 Gleadle JM, Ratcliffe PJ. *Blood*, 1997, 89: 503–509
- 12 Mathupala SP, Rempel A, Pedersen PL. *J Biol Chem*, 2001, 276: 43407–43412
- 13 Firth JD, Ebert BL, Ratcliffe PJ. *J Biol Chem*, 1995, 270: 21021–21027
- 14 Ullah MS, Davies AJ, Halestrap AP. *J Biol Chem*, 2006, 281: 9030–9037
- 15 Kim J, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. *Cell Metabolism*, 2006, 3: 177–185
- 16 Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. *Cell Metabolism*, 2006, 3: 187–197
- 17 Zhang H, Gao P, Fukuda R, Kumar G, Krishnamachary B, Zeller KI, Dang CV, Semenza GL. *Cancer Cell*, 2007, 11: 407–420
- 18 Denko NC. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8: 705–713
- 19 Bos R, van Diest PJ, de Jong JS, van der Groep P, van der Valk P, van der Wall E. *Histopathology*, 2005, 46: 31–36
- 20 Pugh CW, Ratcliffe PJ. *Nat Med*, 2003, 9: 677–684
- 21 Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E, Keshet E. *Nature*, 1998, 394: 485–490
- 22 Gray LH, Conger AD, Ebert M, Hornsey S, Scott OCA. *Brit J Radiol*, 1953, 26: 638–648
- 23 Hockel M, Vaupel P. *J Natl Cancer Institute*, 2001, 93: 266–276
- 24 Vaupel P, Thews O, Hoeckel M. *Med Oncol*. 2001, 18: 243–259
- 25 Teicher BA. *Cancer Metast Rev*, 1994, 13: 139–168
- 26 Teicher BA. *Hematol Oncol Clin North Am*, 1995, 9: 475–506
- 27 Teicher BA, Holden SA, al-Achi A, Herman TS. *Cancer Res*, 1990, 50: 3339–3344
- 28 Walker LJ, Craig RB, Harris AL, Hickson ID. *Nucl Acids Res*, 1994, 22: 4884–4889
- 29 Durand RE. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1991, 20: 253–258
- 30 Durand RE. *In Vivo*, 1994, 8: 691–702
- 31 Sakata K, Kwok TT, Murphy B, Laderoute K, Gordon G, Sutherland R. *Br J Cancer*, 1991, 64: 809–814
- 32 Hickman JA, Potten CS, Merritt AJ, Fisher TC. *Philos Trans R Soc B-Biol Sci*, 1994, 345: 319–325
- 33 Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Bean JM, Prosnitz LR, Dewhirst MW. *Cancer Res*, 1996, 56: 941–943
- 34 Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ. *Nature*, 1996, 379: 88–91
- 35 Wong R KW, Fyles A, Milosevic M, Pintilie M, Hill RP. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1997, 39: 405–412
- 36 Schwartz HS, Sodergren JE, Philips FS. *Science*, 1963, 142: 1181–1183
- 37 Wardman P, Clarke ED. *Biochem Biophys Res Commun*, 1976, 69: 942–949
- 38 Rajapakse A, Gates KS. *J Org Chem*, 2012, 77: 3531–3537
- 39 Li Z, Gao X, Shi W, Li X, Ma H. *Chem Commun*, 2013, 49: 5859–5861
- 40 Rajapakse A, Linder C, Morrison RD, Sarkar U, Leigh ND, Barnes CL, Daniels JS, Gates KS. *Chem Res Toxicol*, 2013, 26: 555–563
- 41 Li Z, He X, Wang Z, Yang R, Shi W, Ma H. *Biosens Bioelectron*, 2015, 63: 112–116
- 42 Jiang Q, Zhang Z, Lu J, Huang Y, Lu Z, Tan Y, Jiang Q. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21: 7735–7741
- 43 Li Z, Li X, Gao X, Zhang Y, Shi W, Ma H. *Anal Chem*, 2013, 85: 3926–3932
- 44 Okuda K, Okabe Y, Kadonosono T, Ueno T, Youssif BGM, Kizaka-Kondoh S, Nagasawa H. *Bioconjugate Chem*, 2012, 23: 324–329
- 45 Youssif BGM, Okuda K, Kadonosono T, Salem OIAR, Hayallah AAM, Hussein MA, Kizaka-Kondoh S, Nagasawa H. *Chem Pharm Bull*, 2012, 60: 402–407

- 46 Nakata E, Yukimachi Y, Kariyazono H, Im S, Abe C, Uto Y, Maezawa H, Hashimoto T, Okamoto Y, Hori H. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17: 6952–6958
- 47 Liu Y, Xu Y, Qian X, Liu J, Shen L, Li J, Zhang Y. *Bioorg Med Chem*, 2006, 14: 2935–2941
- 48 Dai M, Zhu W, Xu Y, Qian X, Liu Y, Xiao Y, You Y. *J Fluoresc*, 2008, 18: 591–597
- 49 Zhu W, Dai M, Xu Y, Qian X. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16: 3255–3260
- 50 Guo T, Cui L, Shen J, Zhu W, Xu Y, Qian X. *Chem Commun*, 2013, 49: 10820–10822
- 51 Xu K, Wang F, Pan X, Liu R, Ma J, Kong F, Tang B. *Chem Commun*, 2013, 49: 2554–2556
- 52 Soballe B, Poole RK. *Microbiol*, 1999, 145: 1817–1830
- 53 Matsushita K, Ohnishi T, Kaback HR. *Biochemistry*, 1987, 26: 7732–7737
- 54 Yuan YX, Chen Y, Wang YC, Su CY, Liang SM, Chao H, Ji LN. *Inorg Chem Commun*, 2008, 11: 1048–1050
- 55 Tanabe K, Hirata N, Harada H, Hiraoka M, Nishimoto SI. *ChemBioChem*, 2008, 9: 426–432
- 56 Komatsu H, Harada H, Tanabe K, Hiraoka M, Nishimoto S. *Med Chem Commun*, 2010, 1: 50–53
- 57 Sun L, Chen Y, Kuang S, Li G, Guan R, Liu J, Ji L, Chao H. *Chem Eur J*, 2016, 22: 8955–8965
- 58 Zhang P, Huang H, Chen Y, Wang J, Ji L, Chao H. *Biomaterials*, 2015, 53: 522–531
- 59 Chevalier A, Mercier C, Saurel L, Orensa S, Renard PY, Romieu A. *Chem Commun*, 2013, 49: 8815–8817
- 60 Chevalier A, Renard PY, Romieu A. *Org Lett*, 2014, 16: 3946–3949
- 61 Kiyose K, Hanaoka K, Oushiki D, Nakamura T, Kajimura M, Suematsu M, Nishimatsu H, Yamane T, Terai T, Hirata Y, Nagano T. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 15846–15848
- 62 Piao W, Tsuda S, Tanaka Y, Maeda S, Liu F, Takahashi S, Kushida Y, Komatsu T, Ueno T, Terai T, Nakazawa T, Uchiyama M, Morokuma K, Nagano T, Hanaoka K. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 13028–13032
- 63 Sun L, Li G, Chen X, Chen Y, Jin C, Ji L, Chao H. *Sci Rep*, 2015, 5: 14837
- 64 Quaranta M, Borisov S M, Klimant I. *Bioanal Rev*, 2012, 4: 115–157
- 65 Mitra S, Foster TH. *Biophysical J*, 2000, 78: 2597–2605
- 66 Papkovsky DB, Dmitriev RI. *Chem Soc Rev*, 2013, 42: 8700–8732
- 67 Kondrashina AV, Dmitriev RI, Borisov SM, Klimant I, O'Brien I, Nolan YM, Zhdanov AV, Papkovsky DB. *Adv Funct Mater*, 2012, 22: 4931–4939
- 68 Dmitriev RI, Kondrashina AV, Koren K, Klimant I, Zhdanov AV, Pakan JMP, McDermott KW, Papkovsky DB. *Biomater Sci*, 2014, 2: 853–866
- 69 Dmitriev RI, Zhdanov AV, Nolan YM, Papkovsky DB. *Biomaterials*, 2013, 34: 9307–9317
- 70 Zhang S, Hosaka M, Yoshihara T, Negishi K, Iida Y, Tobita S, Takeuchi T. *Cancer Res*, 2010, 70: 4490–4498
- 71 Komatsu H, Yoshihara K, Yamada H, Kimura Y, Son A, Nishimoto S, Tanabe K. *Chem Eur J*, 2013, 19: 1971–1977
- 72 Son A, Kawasaki A, Hara D, Ito T, Tanabe K. *Chem Eur J*, 2015, 21: 2527–2536
- 73 Nichols AJ, Roussakis E, Klein OJ, Evans CL. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 3671–3674
- 74 Wu C, Bull B, Christensen K, McNeill J. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48: 2741–2745
- 75 Zheng X, Wang X, Mao H, Wu W, Liu B, Jiang X. *Nat Commun*, 2015, 6: 5834
- 76 Yoshihara T, Yamaguchi Y, Hosaka M, Takeuchi T, Tobita S. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51: 4148–4151
- 77 Liu J, Liu Y, Bu W, Bu J, Sun Y, Du J, Shi J. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 9701–9709
- 78 Supuran CT. *Future Medicinal Chem*, 2011, 3: 1165–1180
- 79 Supuran CT. *Curr Pharm Des*, 2010, 16: 3233–3245
- 80 Zatovicova M, Jelenska L, Hulikova A, Csaderova L, Ditte Z, Ditte P, Goliasova T, Pastorek J, Pastorekova S. *CPD*, 2010, 16: 3255–3263
- 81 Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, Wilson GD, Turley H, Talks KL, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. *Cancer Res*, 2000, 60: 7075–7083
- 82 Swietach P, Wigfield S, Cobden P, Supuran CT, Harris AL, Vaughan-Jones RD. *J Biol Chem*, 2008, 283: 20473–20483
- 83 Supuran CT. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7: 168–181
- 84 Kohler K, Hillebrecht A, Schulze Wischeler J, Innocenti A, Heine A, Supuran CT, Klebe G. *Angew Chem Int Ed*, 2007, 46: 7697–7699
- 85 Zhang S, Yang C, Lu W, Huang J, Zhu W, Li H, Xu Y, Qian X. *Chem Commun*, 2011, 47: 8301–8303

Recent advances in hypoxic tumor detection

Lingli Sun^{1,2}, Liangnian Ji¹, Hui Chao^{1*}

¹ Key Laboratory of Bioinorganic and Synthetic Chemistry, Ministry of Education; School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China

² Guangdong Provincial Key Laboratory of Tea Plant Resources Innovation and Utilization, Tea Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China

*Corresponding author (email: ceschh@mail.sysu.edu.cn)

Abstract: Hypoxia is an important characteristic of malignant solid tumors and is considered as a possible causative factor for the resistance to chemo- and radiotherapy. The exploration of novel fluorescent probes capable of detecting hypoxia in solid tumors has attracted increasing attention. This review highlights some recent progress in the design, synthesis and application of fluorescent probes for hypoxia.

Keywords: hypoxic tumor, probe, bioimaging

doi: [10.1360/N032016-00137](https://doi.org/10.1360/N032016-00137)