

# 光交联技术的生物应用研究进展

孙 瑞,高银佳,史海斌\*

(苏州大学 医学部放射医学与防护学院 放射医学与辐射防护国家重点实验室  
江苏省高校放射医学协同创新中心,江苏 苏州 215123)

**摘要:**光交联反应作为一种快速、简单和时空可控的交联工具广泛地应用于化学、生物、医学和材料等不同研究领域。本文详细介绍了常用的小分子光交联基团的结构、分类及反应机理,重点综述了光交联技术在生物医学领域的应用研究,并对其应用前景进行了展望。目前大多光交联基团仅对紫外和可见光具有敏感性,紫外和可见光穿透力弱、组织吸收强和散射等问题严重限制了该技术在生物体内的应用研究。因此,进一步研究光交联技术在生物体系的应用和开发长波长光(如近红外或远红外光)介导的新交联技术对于药物研发和疾病诊疗具有重要的科学意义。

**关键词:**光交联技术;光交联基团;药物靶标鉴别;光亲和标记

**中图分类号:** O621.37 **文献标识码:** A **doi:** 10.3788/CO.20181103.0444

## Advances in biological application of photo-crosslinking technique

SUN Rui, GAO Yin-jia, SHI Hai-bin\*

(State Key Laboratory of Radiation Medicine and Protection, School of Radiation Medicine and Protection, Medical College of Soochow University, Collaborative Innovation Center of Radiological Medicine of Jiangsu Higher Education Institutions, Suzhou 215123, China)

\* Corresponding author, E-mail: hbshi@suda.edu.cn

**Abstract:** Photo-crosslinking technique is widely used in different research fields such as chemistry, biology, medicine and materials as a fast, simple and space-time controlled cross-linking tool. In this paper, the structure, classification and reaction mechanism of commonly used small-molecule photo-crosslinking groups are introduced in detail. The application of photo-crosslinking technique in biomedical fields is reviewed in detail, and the prospects for its application are assessed. Currently, most of the photo-crosslinking groups are only sensitive to ultraviolet and visible light, and have weak UV and visible light penetrating power, strong tissue absorption and scattering, which seriously limit the application of this technology in living system. Therefore,

收稿日期:2018-01-19;修订日期:2018-02-13

基金项目:国家重点研发计划(No. 2016YFC0101200);国家自然科学基金(No. 21572153);江苏省高校自然科学研究重大项目(No. 15KJA310004);苏州市科技计划(No. SYG201520)

Supported by National Program on Key Basic Research Projects of China(No. 2016YFC0101200); National Natural Science Foundation of China(No. 21572153); Major projects of Natural Science Research in Universities in Jiangsu Province(No. 15KJA310004); Science and Technology Plan of Suzhou City(No. SYG201520)

further research on the application of photo-crosslinking technology in biological systems and the development of new long-wavelength light-mediated crosslinking (such as near-infrared or far-infrared light) have important scientific significance for drug development and disease theranostics.

**Key words:** photo-crosslinking technique; photo-crosslink group; identification of drug targets; photoaffinity labeling

## 1 引言

光化学反应又称光化作用,一般是指物质在可见光或紫外线照射下,物质分子吸收光子后所引发的化学反应。目前能激活物质分子的光源种类繁多,如红外光、可见光、紫外光、激光等。紫外光一般对光化学反应最为有效;红外光由于能量低,只能引起分子化学键的振动扰动,很难引发化学反应的发生;而可见光常常被用作光化学反应的引发剂,通常是以光敏剂作为媒介,间接地将光能转移到一些可见光不敏感的反应中去,进而引起光化学反应的发生。总之,光介导的化学反应具有操作简单、反应速度快、副产物少等优点,符合绿色化学的要求,受到光化学研究者的广泛青睐<sup>[1]</sup>。

光交联是光化学反应中目前应用最为广泛的一种反应。光交联反应(也称作光亲和标记,Photoaffinity labeling, PAL)是指将合成的光敏小分子化合物作为工具探针,在特定波长的光照射下,产生高活性的中间体,与其受体活性部位形成特异性的不可逆共价键结合的化学反应。早在1962年,Westheimer等人<sup>[2]</sup>首先提出光亲和标记技术,至今该技术已取得令人瞩目的发展<sup>[3-5]</sup>。由于光交联反应具有速度快、条件简单、适合于原位反应等优点,最早主要应用于蛋白质的化学修饰和药物靶标蛋白甄别。之后,光交联反应逐渐被应用于研究蛋白与小分子、生物大分子、蛋白或受体间的相互作用。目前该技术已经成为生物化学家和分子生物学家研究生物体系中空间相邻组分及生物大分子间相互作用的一个重要工具。近年来,随着光学技术与生物医学的不断发展,光交联技术被广泛地应用于化学、生物、材料和医学等领域<sup>[6-11]</sup>。

## 2 光交联反应基团及其作用机制

常见的光交联基团根据其在光照射下生成活性中间体的不同,大致分为四类:氮宾(Nitrenes)类、卡宾(Carbenes)类、碳正离子(Carbocations)和自由基(Radicals)类(如图1)<sup>[12]</sup>。目前应用最为广泛的光交联基团有苯甲酮、叠氮苯和3-三氟甲基-3-苯基二𠝹丙啶(3-trifluoromethyl-3-phenyldiazirine, TFMD)。通常理想的光交联基团应具备以下几个特征:(1)具有一定的化学稳定性,耐受普通的化学反应;(2)在自然光中具有合理的稳定性;(3)黑暗中稳定,在不对样品造成损伤(>300 nm)的紫外光照下很容易光解;(4)光解后的活性中间体既能与亲核的X-H(X=N,S,O)官能团反应,也能与C-H官能团反应;(5)光解中间体与受体作用得到的产物应该比较稳定,能够耐受分离、纯化和分析等操作。

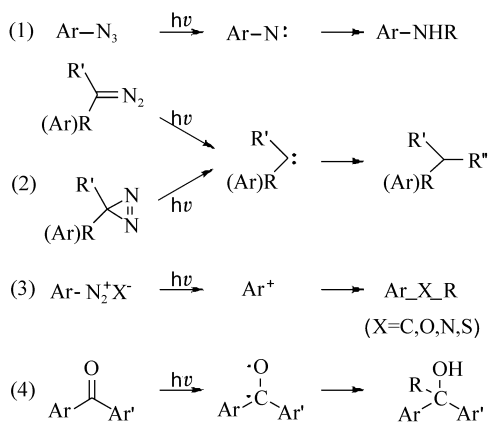


图1 光交联反应基团分类<sup>[12]</sup>

Fig. 1 Commonly used photolabeling reactive species<sup>[12]</sup>

### 2.1 氮宾(Nitrenes)类

芳香叠氮化合物是最常见的产生氮宾(Nitrenes)类前体的化合物,也是较常用的光交联基

团。它的光化学反应机理为:分子在外来光照射下,芳环上的叠氮基团会首先形成单线激发态,然后释放出氮气生成氮宾。氮宾可以是单线态的中间体,也可以经系间窜越形成三线态中间体。单线态氮宾可以对 C-H 键或者 X-H 键( $X = O, N, S$ )进行插入反应形成共价键结合的产物,也可以重排为 1-氮杂-2-4-6-环庚四烯(didehydrozaepine)或者通过系间窜越形成三线态中间体。三线态中间体以自由基形式吸收质子氢生成氨基化合物或形成偶联产物<sup>[13]</sup>。因此,单线态氮宾具有亲电子活性,是发挥交联作用的主要形式。但是,单线态氮宾只能稳定存在约 100  $\mu\text{s}$ ,随后将迅速重排生成比较稳定的烯亚胺,这种烯亚胺分子的反应活性较弱,只能与亲核性官能团反应(如 O-H、N-H、S-H 等)<sup>[14]</sup>。如果活性位点部分没有亲核性官能团,那就可能迁移到离活性位点较远区域交联,产生非特异性交联。

## 2.2 卡宾(Carbenes)类

卡宾类分为重氮化合物和双吡丙啶类化合物。重氮化合物与叠氮化合物类似,在紫外光的照射下,重氮基团释放一个  $N_2$  分子,形成卡宾中间体,随后进攻邻近的 C-H 键,生成一个新的共价键。该卡宾中间体也会进行 Wolff 重排,形成烯酮,烯酮再与亲核试剂反应,产生非特异性交联。双吡丙啶基团在黑暗中具有较好的稳定性,同时具有较好的光交联活性。其反应机理:在 350 nm 或 365 nm 紫外光的照射下,双吡丙啶基团首先发生共价键断裂,释放出一分子  $N_2$ ,随后键电子重排,形成活性的卡宾中间体,插入到邻近的 C-H 键或者其他杂原子与 H 的共价键中,生成新的共价键。这里形成的卡宾中间体半衰期一般在 ns 级,交联反应非常迅速<sup>[15]</sup>。

## 2.3 碳正离子(Carbocations)

除了氮宾类和卡宾类基团外,碳正离子也是具有高活性的光交联基团<sup>[16]</sup>。芳香重氮盐化合物就是常用的碳正离子前体。首先,芳香重氮盐化合物在紫外光照射下,释放  $N_2$  形成高活性的芳香正离子中间体,随后插入到邻近的 C-H 键或者其他杂原子与 H 的共价键中,形成新的共价键。由于芳香重氮盐化合物上重氮的吸电子性使其在通常条件下非常不稳定,一些研究中通过在芳香

环上引入供电子基团来改善化合物的稳定性<sup>[17]</sup>。

## 2.4 自由基(Radicals)类

自由基是光交联反应中另一类非常重要的高活性中间体。苯甲酮类化合物是生成自由基的一类常用的、高效的光交联反应化合物。在紫外光的照射下,苯甲酮基团能够产生活性三线态双自由基,自由基分子不发生重排反应,会与周围的 C-H 键发生反应。如果其周围没有适当的 C-H 键存在,双自由基能够稳定存在 120  $\mu\text{s}$ ,最后回复到初始状态,等待再次被激活<sup>[18]</sup>。此外,苯甲酮产生的活性三线态双自由基在质子性溶剂中稳定<sup>[19]</sup>,几乎不与水反应,其标记效率较高,对于光交联标记实验非常有用。

## 3 应用

### 3.1 药物靶标鉴别

蛋白质是细胞功能的主要执行者,药物靶标的发现过程大多归结为筛选与药物分子相互作用的蛋白质,并以此为线索对相关的信号通路进行分析。此外,正常生理代谢的中间体或细胞内的其它生物大分子也可能是药物潜在的作用靶标,可能参与了药物的代谢过程或应急信号的传导。因此,从广义上讲,药物靶标不仅包括直接与药物作用的蛋白质,还包括药物分子引发的细胞内信号响应分子<sup>[20]</sup>,这些药物分子靶标的甄别不但有利于临床观察药物代谢过程,而且也为相关疾病治疗开拓出广阔的研究空间。近年来,光交联分子探针捕获目标蛋白方法在药物靶标甄别和信号通路研究方面得到不断发展<sup>[21-22]</sup>,在很多重大疾病相关的基础研究领域被广泛应用。通常是将小分子药物与光交联基团连接,或者直接通过一定长度的连接剂固定到树脂基质上构成具有纯化标签的探针。该光交联探针一般包含活性部位、光交联基团、连接部位及报告基团。最常见的光交联基团有苯甲酮、叠氮苯和 3-三氟甲基-3-苯基二吡丙啶等。常用的报告基团也可称为标签(tag)如荧光素(fluorescence)和生物素(Biotin)等。荧光素由于其高灵敏性,可用于定量检测标记蛋白,生物素可以用来富集、纯化或鉴别被标记蛋白,该方法可称为一步标记法(如图 2)。近年来,无报

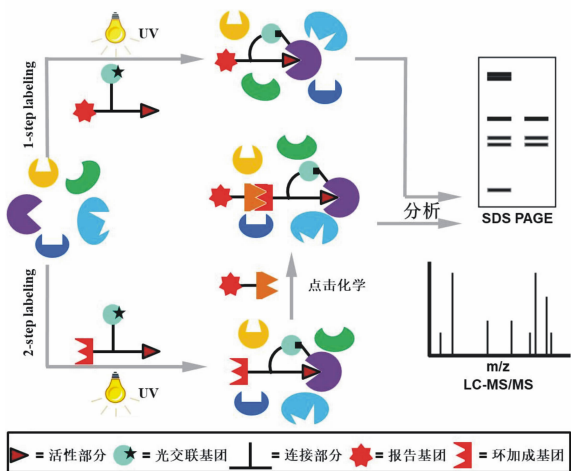
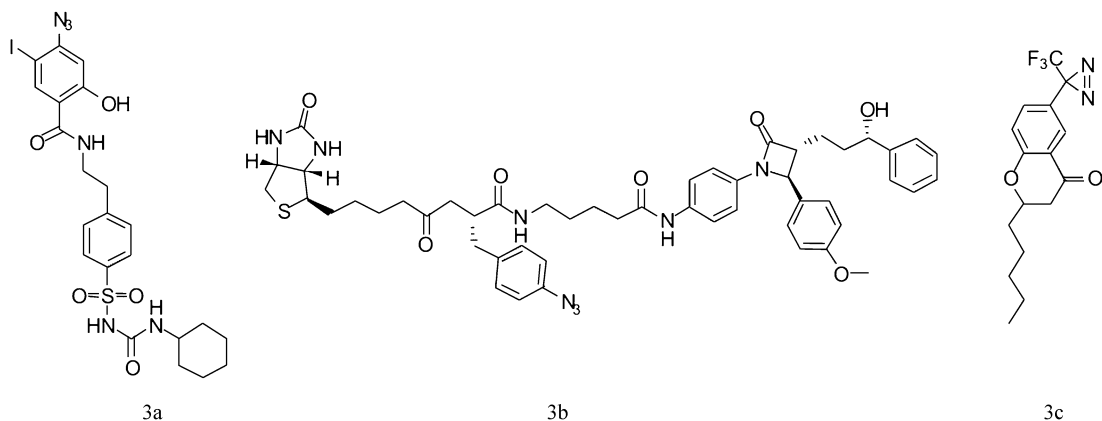


图2 光交联探针标记蛋白质示意图

Fig. 2 Schematic diagram of protein labeling by photo-crosslinking probes

告基团光交联分子探针被报道用于药物靶标的两步标记<sup>[23]</sup>。报告基团(荧光素或生物素)是在探针分子共价标记了靶蛋白之后,通过点击化环加成反应连接到分子探针上(如图2),这样可以使光交联分子探针尽可能的小,有利于保持分子探针针对靶蛋白的标记能力和生物活性<sup>[24]</sup>。

光交联技术作为一种高效的工具被广泛地应用于药物靶标甄别。1994年, Schwanstecher等<sup>[25]</sup>以降糖药物氯磺环己脲(Glibenclamide)为模板化合物,设计合成了一种光交联分子探针3a(如图3),通过光标记实验,发现其受体是一个38 kD大小的蛋白,且还与一个160~175 kD的蛋白紧密作用。依替米贝(Ezetimibe)是一种有效的胆固醇吸收抑制剂,主要用来降低胆固醇。Frick等人<sup>[26]</sup>基于依替米贝结构母体,设计和合成了含生物素报告基团的光交联分子探针3b。通过光标记和质谱鉴定实验,发现受体蛋白是一个145 kD的膜蛋白。通过对蛋白进行提纯、测序和克隆,进一步研究了其对肠道胆固醇的吸收机制。此外,SIRT2属于Sirtuins蛋白-依赖NAD<sup>+</sup>的去乙酰化酶家族,其异常的酶活性与很多疾病如癌症和神经退行性疾病息息相关<sup>[27]</sup>。Seifert等<sup>[28]</sup>构建了一种光敏感的SIRT2抑制剂衍生物3c,通过光交联反应研究了其与SIRT2的结合位点,利用质谱技术分析确定了被标记的多肽片段I175-K210序列,运用MS-MS技术对多肽片段进一步确认,同时证实其标记的是H-187氨基酸残基。

图3 3种光交联分子探针:3a<sup>[25]</sup>、3b<sup>[26]</sup>和3c<sup>[28]</sup>Fig. 3 Three kinds of photo-crosslinking probes:3a<sup>[25]</sup>, 3b<sup>[26]</sup> and 3c<sup>[28]</sup>

近年来,Yao课题组利用光交联技术在药物筛选和靶标蛋白甄别方面开展了大量的开创性研究工作。Liu等人<sup>[29]</sup>设计和合成了一系列Plasmeprins(PMs)特异性识别和结合的小分子荧光探针。通过光交联技术,他们利用该探针不但能够对PMs进行体外特异性标记,而且还可以在疟

原虫体内筛选PMs的高效抑制剂,发现了一个对PM-I、PM-II、PM-IV和HAP均显示出较好抑制作用的抑制剂G16。该策略首次实现了疟原虫内PMs抑制剂的快速、高效筛选,为抗疟疾药物研发提供了重要的筛选手段(如图4)。在阿尔兹海默症(Alzheimer's disease,AD)治疗药物筛选和靶点

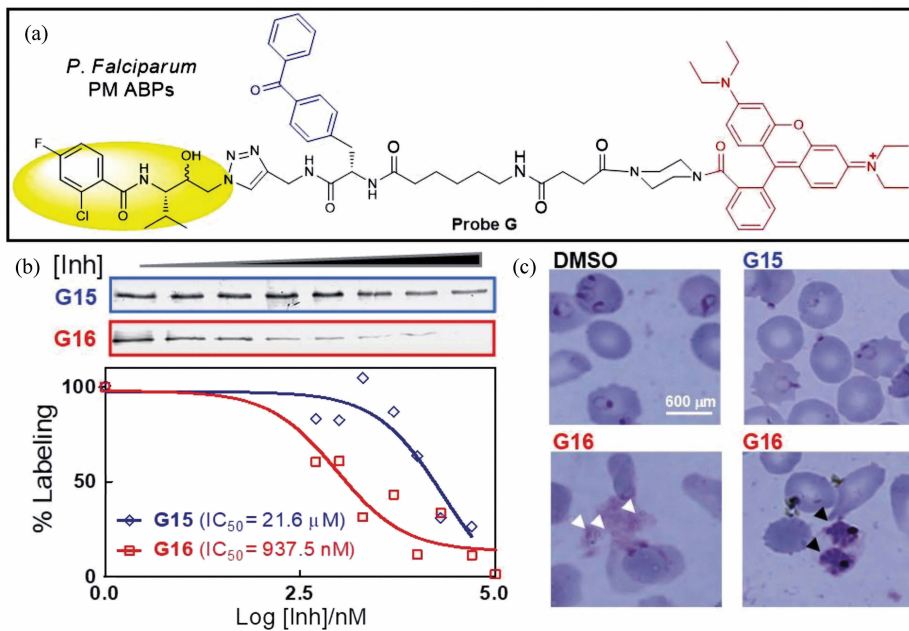


图 4 (a) 光交联分子探针 G 的分子结构; (b) 筛选分析和确定 G15 和 G16 的  $IC_{50}$  值; (c) 寄生感染血红细胞与抑制剂 G15 和 G16 共孵育后细胞成像图片<sup>[29]</sup>

Fig. 4 (a) Structure of the probe G. (b) In situ screening assay and determination of the  $IC_{50}$  values of G15 and G16. (c) Representative images of parasite-infected RBCs treated with G15 and G16<sup>[29]</sup>

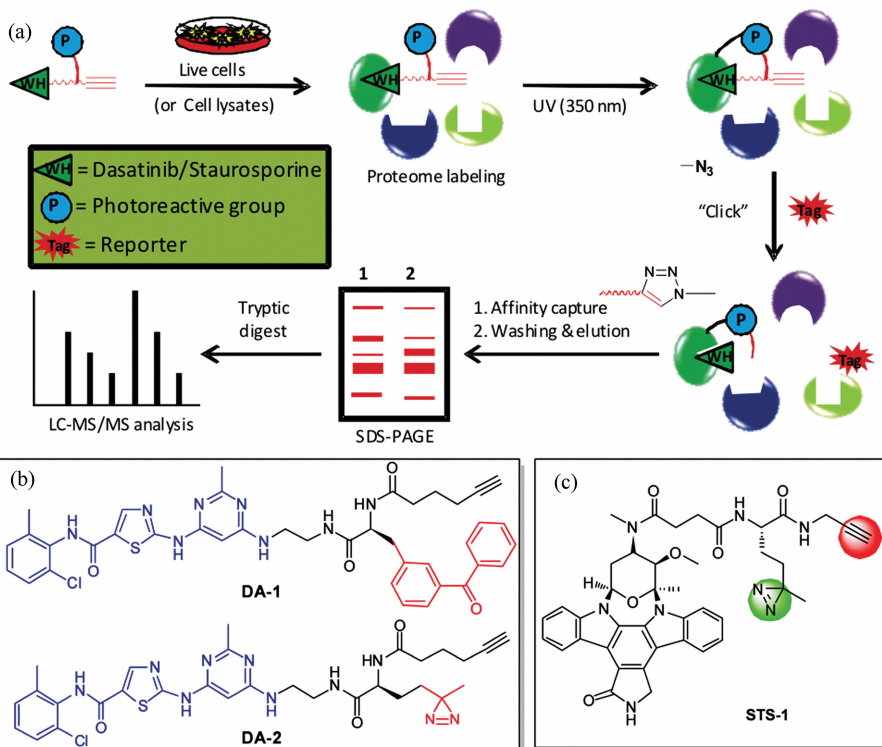


图 5 (a) 利用光交联分子探针研究达沙替尼和星形孢菌素的靶蛋白示意图; (b) 光交联分子探针 DA-1 和 DA-2 的分子结构<sup>[31]</sup>; (c) 光交联分子探针 STS-1 的分子结构<sup>[32]</sup>

Fig. 5 (a) Overall strategy of proteome profiling of potential cellular targets of dasatinib and staurosporine using photo-crosslinking probes. Structure of the probe (b) DA-1, DA-2<sup>[31]</sup> and (c) STS-1<sup>[32]</sup>

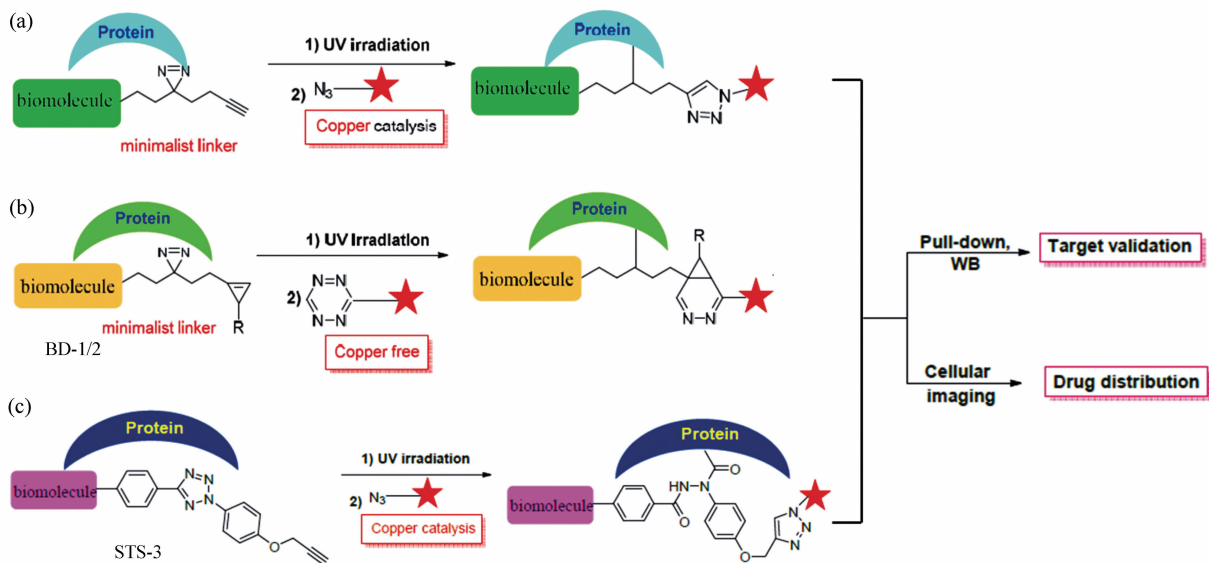


图6 利用光交联技术和生物正交反应标记蛋白质示意图<sup>[33-35]</sup>

Fig. 6 Photo-crosslinking probe labeling strategies using photo-crosslinkers and bioorthogonal handles<sup>[33-35]</sup>

分析方面, Shi 等人<sup>[30]</sup>策略性设计并合成了 198 个  $\gamma$ -分泌酶小分子抑制剂, 利用微阵列技术对这些化合物进行了快速筛选, 发现数个  $\gamma$ -分泌酶抑制剂。经过对抑制剂 F5 和 F24 的结构进一步改造成为光交联型分子探针, 成功开展了中国仓鼠卵巢细胞裂解液中  $\gamma$ -分泌酶的标记和鉴别。此外, 2012 年, Shi 等人<sup>[31-32]</sup>通过对白血病药物达沙替尼 (Dasatinib) 和星形孢菌素 (Staurosporine) 药物主体进行策略性修饰, 构建了包含光交联剂和末端炔烃的分子探针 DA-1、DA-2 和 STS-1 (如图 5)。利用光交联技术和点击化学反应开展了细胞内药物靶标蛋白的成像、分离与鉴别研究。一些传统手段无法鉴别到的新激酶靶标蛋白被首次鉴别为这些药物的潜在靶标, 为临床药物的毒副作用研究及新药研发提供了重要的参考手段。然而, 前述探针由于尺寸较大, 一定程度上影响靶标蛋白与探针的相互作用。Yao 课题组最近研发了一系列集光交联基团与生物正交基团于一体的小型光交联剂, 利用光交联技术和生物正交反应开展了大量抑制剂-蛋白和蛋白-蛋白间相互作用研究, 大大提高了药物靶标蛋白甄别的准确性 (如图 6)<sup>[33-35]</sup>。

### 3.2 生物分子标记

光交联技术应用于生物大分子之间的相互作

用研究已近 50 年, 被认为是目前最有效且多样化的技术之一。由于光交联反应迅速, 条件简单, 适合于原位反应等特点, 已经成为生物化学家和分子生物学家研究生物体系中空间邻近组分及生物大分子之间相互作用的重要工具。利用生物体自身的生物合成作用有效地将具备光交联活性的底物类似物同化到生物大分子中, 从而研究生物大分子之间的作用模式和作用机制。目前报道的底物类似物主要包括氨基酸、糖类和核苷等类似物<sup>[36-38]</sup>, 显示出广阔的应用前景。

Kohler 课题组应用光交联糖类似物在聚糖介导作用机制方面开展了大量研究。他们用双吡丙啶基团对 N-乙酰氨基甘露糖 (ManNAc) 和唾液酸的 C5 位进行修饰, 合成得到相应的光交联糖类化合物 ManNDaz 和 SiaDAz<sup>[39]</sup> (如图 7)。这两种光交联糖类似物都能被细胞正常吸收, 对细胞表面的糖蛋白进行标记, 获得具备光交联活性的糖蛋白。当这些具有光交联活性的糖蛋白与其他生物大分子相互作用后, 经紫外光照射, 即可将相互作用的生物大分子捕获。此外, 他们还应用 SiaDAz 成功地对神经节苷脂 1 (Ganglioside 1, GM1) 上的唾液酸残基进行了标记<sup>[40]</sup>。GM1 能够在包内识别并结合霍乱毒素 B 亚基 (Cholera toxin B subunit, CTxB), 在紫外光照射下, 捕获 GM1-CTxB



复合物。

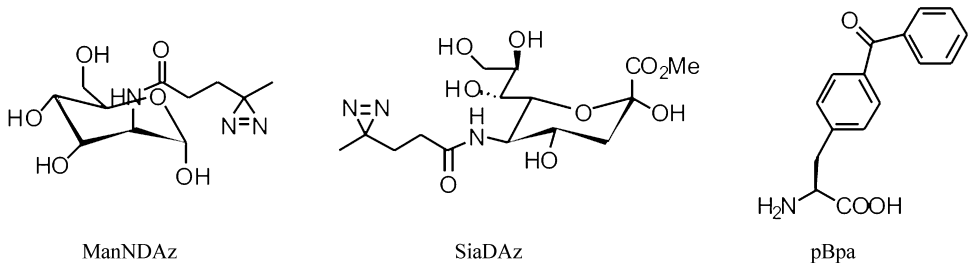


图 7 3 种光交联底物类似物:ManNDaz, SiaDAz<sup>[39]</sup> 和 pBpa<sup>[41]</sup>

Fig. 7 Three types of photo-crosslinking substrate analogue:ManNDaz, SiaDAz<sup>[39]</sup> and pBpa<sup>[41]</sup>

光交联苯丙氨酸类似物也可用于蛋白质间相互作用的界面研究。Yu 等人<sup>[41]</sup>利用生物自身合成作用,将光交联苯丙氨酸类似物 pBpa(如图 7)引入到大肠杆菌蛋白位移酶亚基(SecA)中,以研究它的二聚化现象。结果发现 SecA N 端的 2-11 位氨基酸、263 位的苯丙氨酸、794 位的酪氨酸以及 805 位的精氨酸均位于二聚体的界面上。

Chen 课题组基于光交联基团双吡丙啶,相继开发了三代用于鉴定活细胞内蛋白-蛋白相互作用的光交联探针。2011 年,他们开发了第一代光

交联探针 DiZPK,并用其鉴定了极酸环境下大肠杆菌抗酸伴侣蛋白 HdeA 的“客户”蛋白<sup>[42]</sup>。由于第一代光交联探针的下游处理步骤采用了传统的“亲和”纯化方法,不可避免地引入了非特异性吸附蛋白和非直接相互作用的蛋白,另外,利用 DiZPK 获得的交联肽段难以通过传统的质谱分析方法进行解析,常常会丢失蛋白质相互作用的界面信息。2014 年,他们开发出第二代可切割的光交联探针 DiZSeK<sup>[43]</sup>。该探针在光交联后实现底物蛋白与诱饵蛋白的分离(如图 8),在一定程度

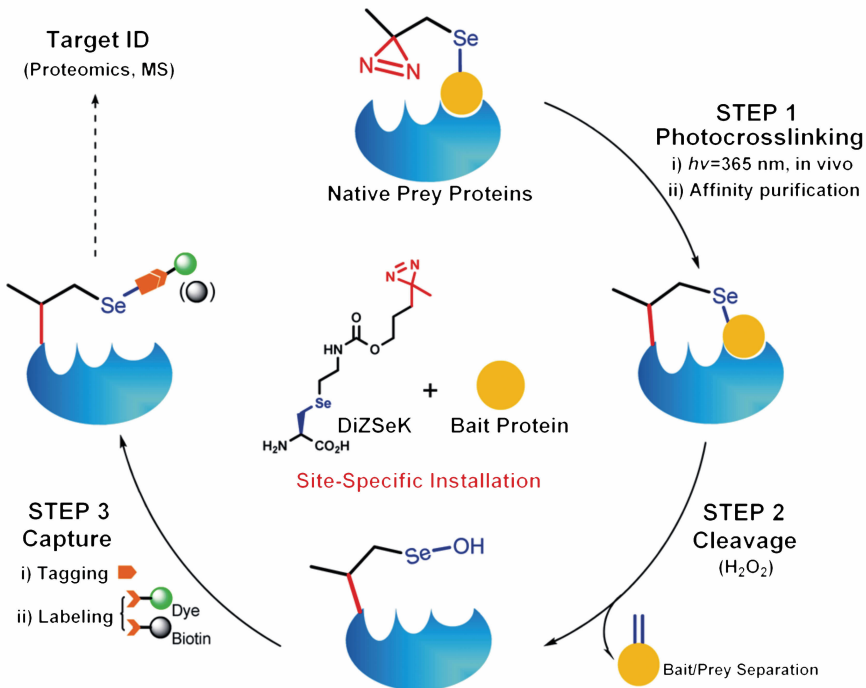


图 8 光交联分子探针 DiZSeK 标记策略<sup>[43]</sup>

Fig. 8 Scheme of bait and prey protein via DiZSeK<sup>[43]</sup>

上降低了鉴定背景。但该探针仍无法解决交联肽段和交联位点的鉴定问题。2016年,他们又开发了一种基因编码并具有“质谱标签”转移功能的第三代光交联探针 DiZHSeC<sup>[44]</sup>。该探针不仅可以实现交联后底物蛋白与诱饵蛋白的分离,同时通过“质谱标签”,可以很容易地在质谱结果中区分底物与非特异性吸附以及非直接相互作用的多肽片段。此外,通过使用常规的质谱分析软件对交联位点进行鉴定,很容易获得蛋白质相互作用界面的信息。

光交联技术也为鉴定一些难以俘获的受体提供了一个方便可行的解决方案。Yan 等人<sup>[45]</sup>通过在乙型肝炎病毒包膜蛋白的前导肽中引入带有光交联基团 diazirine 的亮氨酸,经交联反应和纯化后,发现钠-牛磺胆酸共转运多肽能够与该段前导肽发生相互作用。后续的研究也进一步证实了钠-牛磺胆酸共转运多肽是乙型肝炎病毒与丁型肝炎病毒的功能性受体。光交联技术也被用于研究 DNA/RNA-蛋白质及核酸分子间的相互作用。He 课题组以光交联基团双吡丙啶为基础,构建了一系列针对 DNA 鉴定的探针(如图9(a))。他们将这此探针应用在 DNA 结合蛋白 EcoDam (E. coli DNA adenine methyltransferase) 和一种由 207

个氨基酸组成的 DNA 修复蛋白酶(Human O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase, hAGT)上,光交联后,通过 SDS-PAGE 分析,发现这些 DNA 探针具有良好的交联反应效率,可以很好地应用于 DNA-蛋白质之间的相互作用研究,尤其适合于有一定位阻的底物<sup>[46]</sup>。该方法对 DNA/RNA-蛋白质相互作用网络的构建研究和鉴定有着重要的意义。在 DNA-DNA 相互作用研究方面,他们使用光交联基团 3-三氟甲基-3-苯基二吡丙啶,设计合成了光交联核苷类似物 DBN(如图9(b))。通过寡核苷酸固相合成法,将光交联核苷类似物引入到相应的 DNA 序列中,随后与单链 DNA 链间配对后紫外光照射,形成光交联产物,经过 PAGE 提纯和 MALDI-TOF MS 的鉴定,发现光交联核苷类似物与胞嘧啶(Cytosine, C) 配对交联反应产率最高<sup>[47]</sup>。同样策略, Nakamoto 和 Ueno 使用类似光交联核苷类似物,构建了 micro-RNA 探针,通过 micro-RNA 碱基互补配对的方式,在紫外光照射下,可以识别捕获潜在的靶基因<sup>[48]</sup>。可见,光交联核苷类似物的设计为研究核酸分子间的相互作用提供了技术支持,对研究 DNA/RNA 参与的剪切、运转、编辑、包内定位及翻译调控等过程具有重大意义。

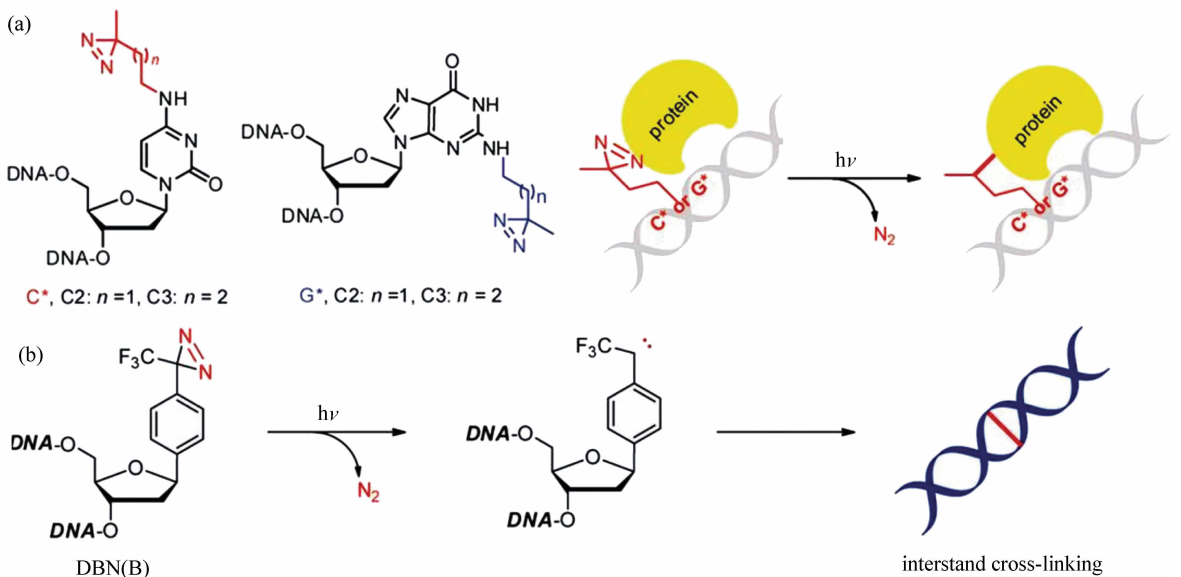


图9 (a)光交联 DNA 分子探针构建及其蛋白标记<sup>[46]</sup>; (b)光交联核苷类似物 DBN 标记<sup>[47]</sup>

Fig. 9 (a) Development of DNA probe with diazirine and the diazirine-modified DNA to bind proteins<sup>[46]</sup>; (b) Diazirine-based nucleoside analogue (DBN, B) can form a DNA interstrand cross-link upon UV irradiation<sup>[47]</sup>



### 3.3 材料修饰与功能化

随着材料科学的飞速发展,光交联反应由于具有简单、方便、环境友好等特点,近年来被广泛地应用于材料的表面修饰与功能化研究。无机纳米材料具有独特的表面性质,要提高其稳定性,一般需要对纳米颗粒表面进行修饰,同时纳米颗粒表面修饰还能赋予材料新的特殊功能。

2004年,Yan课题组利用全氟叠氮苯光交联基团,在硅片表面通过N-H/C-H插入反应修饰上了聚合物薄膜,增加了硅片的韧性、可加工性、介

电性等性能<sup>[49]</sup>。2006年,他们在此基础上,通过进一步控制硅片表面全氟叠氮苯光交联基团的数量和表面修饰聚合物的种类,研究了其对硅片表面性质产生的不同影响,为其它材料光交联表面修饰提供了新的思路与参考<sup>[50]</sup>。2011年,该课题组设计并制备了一系列不同脂肪链修饰的全氟叠氮苯光交联化合物,并用之对石墨稀进行了表面修饰,获得了不同表面性能的石墨烯,使其具有更为广泛的用途<sup>[51]</sup>。2015年,他们将二氧化硅纳米颗粒和金纳米颗粒表面先引入全氟叠氮苯光

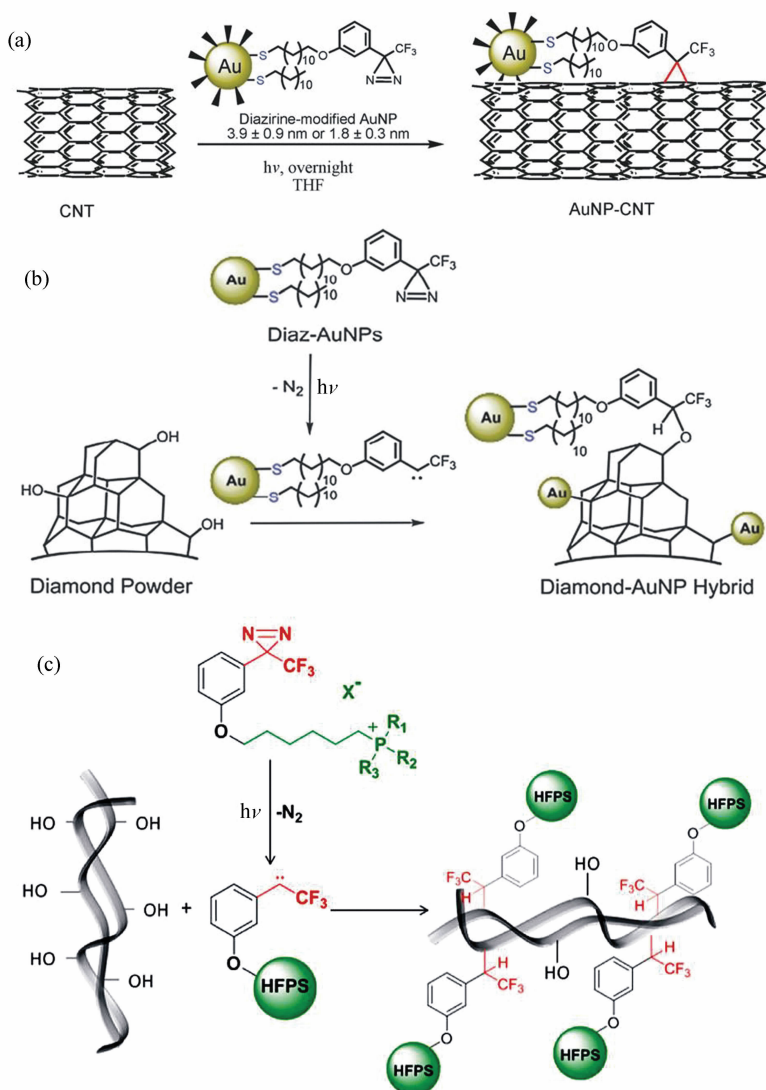


图 10 (a) 利用 3-三氟甲基-3-苯基二吡丙啉功能化修饰碳纳米管<sup>[54]</sup> 和(b) 金刚石<sup>[55]</sup>; (c) 光交联磷盐分子构建疏水性涂料<sup>[56]</sup>

Fig. 10 (a) Functionalization of carbon nanotubes<sup>[54]</sup> and (b) micro-diamond using 3-trifluoromethyl-3-phenyldiazirine<sup>[55]</sup>; (c) diazirine modified specific phosphonium salts to prepare robust hydrophobic coatings<sup>[56]</sup>

交联基团,然后与石墨烯进行光交联作用,分别形成石墨烯/二氧化硅和石墨烯/金的复合材料,发展了制备复合材料的一种新的便捷方法<sup>[52]</sup>。

Workentin 课题组将光交联基团 3-三氟甲基-3-苯基二吡丙啶引入到金纳米颗粒表面<sup>[53]</sup>,通过光交联反应,对金纳米颗粒进行了简单、快速的表面修饰。利用相同的方法,还对碳纳米管和金刚石进行了表面光交联修饰,制备了碳纳米管/金和金刚石/金复合材料(如图 10(a)和 10(b))<sup>[54-55]</sup>。2012 年,他们将 3-三氟甲基-3-苯基二吡丙啶与氟化盐结合,设计了一个新的疏水性光交联分子,利用光交联反应,将之共价键修饰到棉布和纸的表面,大大改善了棉布和纸的疏水性(如图 10(c))<sup>[56]</sup>。2015 年,他们将 3-三氟甲基-3-苯基二吡丙啶与端基为巯基的三甘醇结合,设计并合成了两亲性的光交联分子,利用巯基的置换反

应,将两亲性的光交联分子引入到金纳米颗粒上,构建了可以在水相和有机相进行金纳米颗粒表面修饰的模板<sup>[57]</sup>,通过在水相或者有机相对金纳米颗粒表面修饰不同的化合物,来改善金纳米颗粒在催化、生物、传感器等领域的应用。

2017 年,Shi 课题组首次在异硫氰酸荧光素分子上引入光交联基团双吡丙啶,构建了一个发绿色荧光的光交联探针。将该探针与粒径约为 80 nm 的二氧化硅纳米颗粒混合,经紫外光(365 nm)照射,快速制备得到了发绿光的二氧化硅纳米颗粒(见图 11)<sup>[58]</sup>。该荧光二氧化硅纳米颗粒具有良好的荧光稳定性,不但能够用于小鼠乳腺癌细胞成像,而且可以示踪二氧化硅纳米颗粒在小鼠乳腺癌细胞内的内吞行为。该策略为快速、便捷制备发光纳米颗粒或纳米功能化提供了一种有效的新手段。

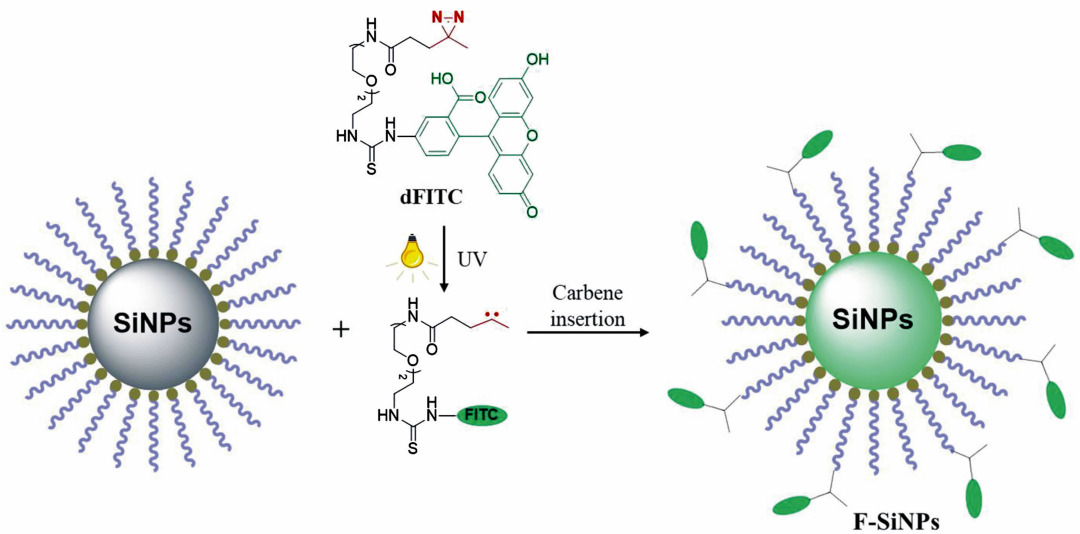


图 11 光交联荧光分子探针标记二氧化硅纳米颗粒<sup>[58]</sup>

Fig.1 Schematic illustration of light-triggered fluorescent labeling of silica nanoparticles<sup>[58]</sup>

### 3.4 肿瘤诊疗研究

光热治疗作为一种局部高温热杀死肿瘤细胞的新疗法,与传统治疗手段相比具有微创、副作用小、辅助杀菌等优势<sup>[59]</sup>。目前金纳米材料是最具临床应用潜力的材料之一<sup>[60-61]</sup>。研究发现纳米颗粒一般主要通过 EPR (Enhanced Permeability and Retention)效应在肿瘤部位富集,即使修饰了靶向分子或配体,其肿瘤富集效果仍然不佳,原因主要有:第一,纳米颗粒容易被网状上皮系统俘

获;第二,纳米颗粒在体内被快速代谢或清除出肿瘤。因此,实现纳米材料在肿瘤部位高效聚集,是提高肿瘤诊疗效果的主要途径之一。Shi 课题组最近报道了一种光介导金纳米颗粒在体可控聚集技术<sup>[62]</sup>。通过将光交联基团双吡丙啶(Diazirine)修饰于金纳米颗粒( $\sim 20.5$  nm)表面,在 405 nm 激光的照射下,金纳米颗粒可以在肿瘤部位发生光交联自组装,同时,由于聚集后的金纳米颗粒尺寸较大,极大地延长了金纳米颗粒在肿瘤

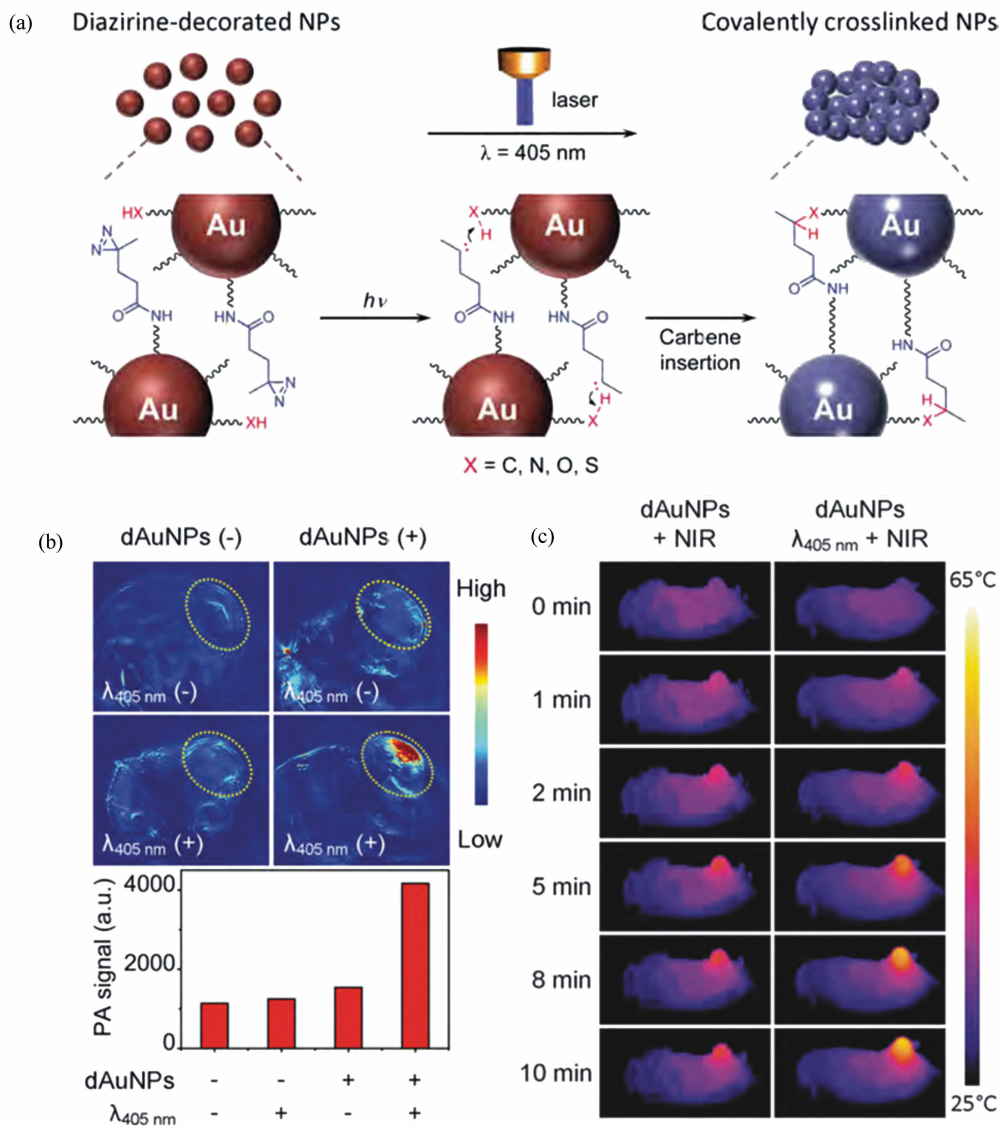


图 12 (a) 光诱导金纳米颗粒自组装; (b) 老鼠肿瘤部位光声成像及对应光声信号值; (c) 光热治疗图片<sup>[62]</sup>

Fig. 12 (a) Schematic illustration of light-triggered assembly of gold nanoparticles; (b) photoacoustic imaging and quantified photoacoustic signal and (c) photothermal therapy of the tumorous sites of mice<sup>[62]</sup>

部位的滞留时间(如图 12)。由于聚集后的金纳米颗粒在近红外区域表现出较强的吸收,利用该特性成功地开展了肿瘤的光声成像与光热治疗研究,为提高肿瘤诊疗效果提供了一个新的策略和手段。Coyne 等人<sup>[63]</sup>通过在抗肿瘤药物表柔比星上引入光交联基团双吡啶,在紫外光照射下,将药物与乳腺癌 HER2 抗体(Human epidermal growth factor receptor-2)共价键交联,改善了表柔比星载体的生物相容性、血药浓度维持时间及肿瘤靶向效果,进一步提高了药物的治疗效果。

## 4 结束语

光交联技术由于其简便、快捷、高效和时空可控等优势目前被广泛地应用于药物筛选、靶标蛋白甄别和生物大分子间作用等研究。随着纳米材料和技术的飞速发展,光交联技术近年来从分子生物学领域逐渐拓展到了纳米材料和医学等领域。然而,由于目前光交联反应源主要以紫外光为主,其穿透力浅,组织损害等问题一定程度上限

制了该技术在生物医学领域的深入应用。如何克服前述问题,使用近红外或远红外触发交联反应将是一种新的思路,但由于目前对近红外或远红外光敏感的化学交联反应报道较少,发掘该类化

学反应对于合成化学家将是一大挑战。总之,相信不久的将来光交联技术一定会在化学、生物、材料和医学等各个领域有着更为广泛的应用前景。

### 参考文献:

- [1] 刑其毅,徐瑞秋,裴伟伟,等. 基础有机化学(第三版,下册)[M]. 北京:高等教育出版社,2005:712-746.  
XING Q Y, WU R Q, PEI W W, *et al.*. *Basic Organic Chemistry*[M]. Beijing: Higher Education Press, 2005: 712-746. (in Chinese)
- [2] SINGH A, THORNTON E R, WESTHEIMER F H. The photolysis of diazoacetylchymotrypsin[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1962, 237(9): 3006-3008.
- [3] SUMRANJIT J, CHUNG S J. Recent advances in target characterization and identification by photoaffinity probes[J]. *Molecules*, 2013, 18(9): 10425-40451.
- [4] XIA Y, PENG L. Photoactivatable lipid probes for studying biomembranes by photoaffinity labeling[J]. *Chemical Reviews*, 2013, 113(10): 7880-7929.
- [5] HATANAKA Y. Development and leading-edge application of innovative photoaffinity labeling[J]. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2015, 46(1): 1-12.
- [6] DAS J. Aliphatic diazirines as photoaffinity probes for proteins: recent developments[J]. *Chemical Reviews*, 2011, 111(8): 4405-4417.
- [7] ITO Y. Photoimmobilization for microarrays[J]. *Biotechnology Progress*, 2006, 22(4): 924-932.
- [8] ZHAO C W, ZHANG Z D, YANG W T. A remote photochemical reaction for surface modification of polymeric substrate[J]. *Journal of Polymer Science Part A-polymer Chemistry*, 2012, 50(18): 3698-3702.
- [9] LAWRENCE E J, WILDGOOSE G G, ALDOUS L, *et al.*. 3-aryl-3-(trifluoromethyl) diazirines as versatile photoactivated "linker" molecules for the improved covalent modification of graphitic and carbon nanotube surfaces[J]. *Chemistry of Materials*, 2011, 23(16): 3740-3751.
- [10] 孟想,杨蕊竹,刘东旭,等. 紫外固化型聚合物水凝胶的周期图案形成及其调控[J]. 中国光学, 2012, 5(4): 436-443.  
MENG X, YANG R ZH, LIU D X, *et al.*. Formation and adjustment of cycle pattern of UV-curable polymeric hydrogel[J]. *Chinese Optics*, 2012, 5(4): 436-443. (in Chinese)
- [11] 刘东旭,夏虹,孙允陆,等. 飞秒激光直写生物凝胶模板原位合成纳米粒子[J]. 中国光学, 2014, 7(4): 608-615.  
LIU D X, XIA H, SUN Y L, *et al.*. Femtosecond laser direct writing bio-gel template for in situ synthesis of nanoparticles[J]. *Chinese Optics*, 2014, 7(4): 608-615. (in Chinese)
- [12] FLEMING S A. Chemical reagents in photoaffinity labeling[J]. *Tetrahedron*, 1995, 51(46): 12479-12520.
- [13] BORDEN W T, GRITSAN N P, HADAD C M, *et al.*. The interplay of theory and experiment in the study of phenylnitrene[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2000, 33(11): 765-771.
- [14] PLATZ M S. Comparison of phenylcarbene and phenylnitrene[J]. *Accounts of Chemical Research*, 1995, 28(12): 487-492.
- [15] BLENCOWE A, HAYES W. Development and application of diazirine in biological and synthetic macromolecular systems[J]. *Soft Matter*, 2005, 1(3): 178-205.
- [16] AMBROZ H B, KEMP T J. Aryl cation-new light on old intermediates[J]. *Chemical Society Reviews*, 1979, 8(3): 353-365.
- [17] KOTZYBA-HIBERT F, KAPFER I, GOELDNER M. Recent trends in photoaffinity labeling[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 1995, 34(12): 1296-1312.
- [18] DORMAN G, PRESTWICH G D. Benzophenone photophores in biochemistry[J]. *Biochemistry*, 1994, 33(19): 5661-5673.

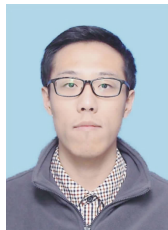
- [19] DORMAN G, PRESTWICH G D, ELLIOTT J T, *et al.*. Benzophenone photoprobes for phosphoinositides, peptides and drugs[J]. *Photochem Photobiol*, 1997, 65(22):222-234.
- [20] AGARWAL S, BELL C M, ROTHBART S B, *et al.*. AMP-activated Protein Kinase (AMPK) Control of mTORC1 Is p53- and TSC2-independent in pemetrexed-treated carcinoma cells[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(46):27473-27486.
- [21] BRODIE N I, MAKEPEACE K A T, PETROTCHENKO E V, *et al.*. Isotopically-coded short-range hetero-bifunctional photo-reactive crosslinkers for studying protein structure[J]. *Journal of Proteomics*, 2015, 118:12-20.
- [22] YABE T, HOSODA-YABE R, SAKAI H, *et al.*. Development of a photoreactive probe-based system for detecting heparin[J]. *Analytical Biochemistry*, 2015, 472:1-6.
- [23] GUO H J, LI Z Q. Developments of bioorthogonal handle-containing photo-crosslinkers for photoaffinity labeling[J]. *Med. Chem. Commun.*, 2017, 8(8):1585-1591.
- [24] FUNG S K, ZOU T T, CAO B, *et al.*. Cyclometalated gold(III) complexes containing N-Heterocyclic carbene ligands engage multiple anti-cancer molecular targets[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(14):3892-3896.
- [25] SCHWANSTECHE M, LÖSER S, CHUDZIAK F, *et al.*. Identification of a 38-kDa high affinity sulfonylurea-binding peptide in insulin-secreting cells and cerebral cortex[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(27):17768-17771.
- [26] FRICK W, BAUERSCH FER A, BAUER J, *et al.*. Synthesis of a biotin-tagged photoaffinity probe of 2-azetidinone cholesterol absorption inhibitors[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2003, 11(8):1639-1642.
- [27] ROTH M, CHEN W Y. Sorting out functions of sirtuins in cancer[J]. *Oncogene*, 2014, 33(13):1609-1620.
- [28] SEIFERT T, MALO M, LENGQVIST J, *et al.*. Identification of the binding site of chroman-4-one-based sirtuin 2-selective inhibitors using photoaffinity labeling in combination with tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2016, 59(23):10794-10799.
- [29] LIU K, SHI H B, XIAO H G, *et al.*. Functional profiling, identification and inhibition of plasmepsins in intraerythrocytic malaria parasites[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2009, 48(44):8293-8297.
- [30] SHI H B, LIU K, XU A, *et al.*. Small molecule microarray-facilitated screening of affinity-based probes (AFBs) for  $\gamma$ -secretase[J]. *Chemical Communications*, 2009, 33(33):5030-5032.
- [31] SHI H B, ZHANG C J, CHEN G Y, *et al.*. Cell-based proteome profiling of potential dasatinib targets by use of affinity-based probes[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(6):3001-3014.
- [32] SHI H B, CHENG X M, YAO S Q, *et al.*. Proteome profiling reveals potential cellular targets of staurosporine using a clickable cell-permeable probe[J]. *Chemical Communications*, 2011, 47(40):11306-11308.
- [33] LI Z Q, HAO P L, LI L, *et al.*. Design and synthesis of minimalist terminal alkyne-containing diazirine photo-crosslinkers and their incorporation into kinase inhibitors for cell- and tissue-based proteome profiling[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, 52(33):8551-8556.
- [34] LI Z Q, WANG D Y, LI L, *et al.*. "Minimalist" cyclopropene-containing photo-cross-linkers suitable for live-cell imaging and affinity-based protein labeling[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(28):9990-9998.
- [35] LI Z Q, QIAN L H, YAO S Q, *et al.*. Tetrazole photoclick chemistry: reinvestigating its suitability as a bioorthogonal reaction and potential applications[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2016, 55(6):2002-2006.
- [36] YU S H, BOYCE M, WANDS A M, *et al.*. Metabolic labeling enables selective photocrosslinking of O-GlcNAc-modified proteins to their binding partners[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(13):4834-4839.
- [37] KRISHNAMURTHY M, DUGAN A, NWOKOYE A, *et al.*. Caught in the act: covalent crosslinking captures activator-coactivator interactions in vivo[J]. *ACS Chemical Biology*, 2016, 6(12):1321-1326.
- [38] SONG C X, HE C. Bioorthogonal labeling of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA and diazirine-based DNA photo-cross-linking probes[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2011, 44(9):709-717.
- [39] AND Y T, KOHLER J J. Photoactivatable crosslinking sugars for capturing glycoprotein interactions[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(11):3278-3279.

- [40] BOND M R, WHITMAN C M, KOHLER J J. Metabolically incorporated photocrosslinking sialic acid covalently captures a ganglioside-protein complex[J]. *Molecular Biosystems*, 2010, 6(10):1796-1799.
- [41] YU D, WOWOR A J, COLE J L, *et al.*. Defining the Escherichia coli SecA dimer interface residues through in vivo site-specific photo-cross-linking[J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(12):2817-2825.
- [42] ZHANG M, LIN S, SONG X, *et al.*. A genetically incorporated crosslinker reveals chaperone cooperation in acid resistance[J]. *Nature Chemical Biology*, 2011, 7(10):671-677.
- [43] LIN S, HE D, LONG T, *et al.*. Genetically encoded cleavable protein photo-cross-linker[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(34):11860-11863.
- [44] YANG Y, SONG H P, HE D, *et al.*. Genetically encoded protein photocrosslinker with a transferable mass spectrometry-identifiable label[J]. *Nature Communications*, 2016, DOI:10.1038/ncomms12299.
- [45] YAN H, ZHONG G, XU G, *et al.*. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus[J]. *Elife*, 2012, 1(1):e00049-e00049.
- [46] SHIGDEL U K, ZHANG J L, HE C. Diazirine-based DNA photo-cross-linking probes for the study of protein DNA interactions[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2008, 47(1):90-93.
- [47] QIU Z H, LU L H, JIAN X, HE C. A diazirine-based nucleoside analogue for efficient DNA interstrand photocross-linking [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(44):14398-14399.
- [48] NAKAMOTO K, UENO Y. Diazirine-containing RNA photo-cross-linking probes for capturing microRNA targets[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2014, 79(6):2463-2472.
- [49] YAN M D, REN J. Covalent immobilization of ultrathin polymer films by thermal activation of perfluorophenyl azide[J]. *Chemistry of Materials*, 2004, 16(9):1627-1632.
- [50] LIU L, ENGELHARD M H, YAN M D. Surface and interface control on photochemically initiated immobilization[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(43):14067-14072.
- [51] LIU L H, YAN M D. Functionalization of pristine graphene with perfluorophenyl azides[J]. *Journal of Materials Chemistry*, 2011, 21(10):3273-3276.
- [52] PARK J, JAYAWARDENA S N, CHEN X, *et al.*. A general method for the fabrication of graphene-nanoparticle hybrid material[J]. *Chemical Communications*, 2015, 51(14):2882-2885.
- [53] ISMAILI H, LEE S, WORKENTIN M S. Diazirine-modified gold nanoparticle: template for efficient photoinduced interfacial carbene insertion reactions[J]. *Langmuir*, 2010, 26(18):14958-14964.
- [54] ISMAILI H, LAGUGNE-LABARTHET F, WORKENTIN M S. Covalently assembled gold nanoparticle-carbon nanotube hybrids via a photoinitiated carbene addition reaction[J]. *Chemistry of Materials*, 2011, 23(6):1519-1525.
- [55] ISMAILI H, WORKENTIN M S. Covalent diamond gold nanojewel hybrids via photochemically generated carbenes[J]. *Chemical Communications*, 2011, 47(27):7788-7790.
- [56] GHIASSIAN S, ISMAILI H, LUBBOCK BRETT D W, *et al.*. Photoinduced carbene generation from diazirine modified task specific phosphonium salts to prepare robust hydrophobic coatings[J]. *Langmuir*, 2012, 28(33):12326-12333.
- [57] GHIASSIAN S, BIESINGER M C, WORKENTIN M S. Synthesis of small water-soluble diazirine-functionalized gold nanoparticles and their photochemical modification[J]. *Canadian Journal of Chemistry*, 2015, 93(1):98-105.
- [58] SUN R, YIN L, ZHANG S H, *et al.*. Simple light-triggered fluorescent labeling of silica nanoparticles for cellular imaging applications[J]. *Chemistry-A European Journal*, 2017, 23(56):13893-13896.
- [59] BAN Q F, BAI T, DUAN X, *et al.*. Noninvasive photothermal cancer therapy nanoplatfroms via integrating nanomaterials and functional polymers[J]. *Biomaterials Science*, 2017, 5(2):190-210.
- [60] MIESZAWSKA A J, MULDER W J M, FAYAD Z A, *et al.*. Multifunctional gold nanoparticles for diagnosis and therapy of disease[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2013, 10(3):831-847.
- [61] 李欣远, 纪穆为, 王虹智, 等. 近红外光热转换纳米晶研究进展[J]. *中国光学*, 2017, 10(5):541-554.
- LI X Y, JI M W, WANG H ZH, *et al.*. Research progress of near-infrared photothermal conversion nanocrystals[J]. *Chinese Optics*, 2017, 10(5):541-554. (in Chinese)



- [62] CHENG X J, SUN R, YIN L, *et al.*. Light-triggered assembly of gold nanoparticles for photothermal therapy and photoacoustic imaging of tumors in vivo[J]. *Advanced Materials*, 2017, DOI:10.1002/adma.201604894.
- [63] COYNE C P, JONES T, BEAR R. Synthesis of a covalent epirubicin-(C<sub>3</sub>-amide)-anti-HER2/neu immunochemotherapeutic utilizing a UV-photoactivated anthracycline intermediate[J]. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 2012, 27(1):41-55.

作者简介:



孙 瑞(1992—),男,江苏徐州人,硕士研究生,2015 年于南京工业大学获得学士学位,主要从事光响应型分子探针构建及在肿瘤诊疗方面的应用基础研究。  
E-mail:20154220015@stu.suda.edu.cn



史海斌(1978—),男,山西长治人,教授,博士(新加坡国立大学),博士后(美国斯坦福大学)。主要从事分子影像探针的构建及生物医学应用研究。E-mail:hbshi@stu.suda.edu.cn

## 向您推荐《液晶与显示》期刊

- 中文核心期刊
- 中国液晶学科和显示技术领域的综合性专业学术期刊
- 中国物理学会液晶分会会刊、中国光学光电子行业协会液晶分会会刊
- 英国《科学文摘》(INSPEC)、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、美国《剑桥科学文摘》(CSA)、“中国科技论文统计源期刊”等 20 余种国内外著名检索刊物和文献数据库来源期刊

《液晶与显示》以材料物理和化学、器件制备技术及器件物理、器件驱动与控制、成像技术与图像处理等栏目集中报道国内外液晶学科和显示技术领域中最新理论研究、科研成果和创新技术,及时反映国内外本学科领域及产业信息动态,是宣传、展示我国该学科领域和产业科技创新实力与硕果,进行国际交流的平台。其内容丰富,涵盖面广,信息量大,可读性强,是我国专业学术期刊发行量最大的刊物之一。

《液晶与显示》征集有关液晶聚合物、胶体等软物质材料和各类显示材料及制备方法、液晶物理、液晶非线性光学、生物液晶;液晶显示、等离子体显示、发光二极管显示、电致发光显示、场发射显示、3D 显示、微显示、真空荧光显示、电致变色显示及其他新型显示等各类显示器件物理和制作技术;各类显示新型模式和驱动技术、显示技术应用;显示材料和器件的测试方法与技术;各类显示器件的应用;与显示相关的成像技术与图像处理等研究论文。

《液晶与显示》热忱欢迎广大作者、读者广为利用,踊跃投稿和订阅。

地 址:长春市东南湖大路 3888 号

《液晶与显示》编辑部

邮 编:130033

电 话:(0431)6176059

E-mail:yjyxs@126.com

国内统一刊号:CN 22-1259/04

国际标准刊号:ISSN 1007-2780

国内邮发代号:12-203

国内定价:50 元/期

网 址:www.yjyxs.com