中国科学: 化学 2020 年 第 50 卷 第 8 期: 924 ~ 935
SCIENTIA SINICA Chimica chemcn.scichina.com
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS

论 文

γ-谷氨酰转移酶近红外比率型荧光探针的设计与成像

张鹏[1], 李沙沙[1], 张倩[1], 刘兵建[1], 丁彩凤[1*], 江云宝[2]

1. 光电传感与生命分析教育部重点实验室, 山东省生化分析重点实验室, 山东省生命分析高校重点实验室, 青岛科技大学化学与分子工程学院, 青岛 266042
2. 谱学分析与仪器教育部重点实验室, 能源材料化学协同创新中心, 厦门大学化学化工学院, 厦门 361005
*通讯作者, E-mail: dingcaifeng@qust.edu.cn

收稿日期: 2020-03-30; 接受日期: 2020-05-12; 网络版发表日期: 2020-05-25
国家自然科学基金(编号: 21904077)、山东省自然科学基金(编号: ZR2019BB055)和厦门大学谱学分析与仪器教育部重点实验室(编号: SCAI1702, SCAI1703)资助项目

摘要 γ-谷氨酰转肽酶(GGT)在诸多肿瘤组织中高表达, 是一种重要的肿瘤标志物, 对其活性的准确检测有助于相关疾病的早期诊断与治疗. 本文将谷胱甘肽(GSH)共价修饰于七甲川花菁染料上作为GGT的酶切位点, 研制了一例可用于GGT活性检测的近红外比率型荧光探针(Cy-GGT). 该探针具有良好的水溶性, 向其溶液中加入GGT, 荧光发射波长由808 nm蓝移至616 nm (蓝移192 nm). 较大的发射位移可避免两个信号之间的串扰, 提高检测的准确性. 实验表明, 探针Cy-GGT可特异性检测GGT活性, 检测限为0.02 mU/mL, 并可用于活细胞和动物体中GGT的活性检测和荧光成像, 能够区分肿瘤细胞与正常细胞, 有望在相关疾病的早期诊断与治疗中发挥积极作用.

关键词 γ-谷氨酰转移酶, 比率型荧光探针, 近红外荧光, 大发射峰位移, 花菁

1 引言

癌症是威胁人类健康最为严重的疾病之一. 世界卫生组织2018年统计数据显示, 全球新增2450万例癌症病例, 死亡人数高达960万[1~3]. 在与癌症相关的死亡中, 如能实现早期诊断, 约30%的患者可免于死亡. 显然, 癌症的早期诊断和治疗对提高治愈率和生存率具有重要意义[4,5]. 要实现恶性肿瘤的早期诊断和准确定位, 需对肿瘤标志物进行高灵敏、选择性地检测和成像[6,7]. 在众多潜在的肿瘤标志物中, 酶因其在癌症中的活性大幅上升而引起了研究者的广泛关注[8~10]. 因此, 简便、快捷地实时监测生命体内生物酶的活性水平至关重要, 是诸多疾病早期筛查的一项重要指标和依据, 可有效提高疾病治愈率和患者存活率.

γ-谷氨酰转肽酶(GGT)是一种广泛存在于哺乳动物细胞表面的酶, 可催化谷胱甘肽(GSH)或其他γ-谷氨酰化合物中谷氨酰胺键的水解, 其活性与诸多重要的生理过程密切相关[11~13]. 研究发现, GGT活性在许多疾病患者中显著升高, 如肝癌、卵巢癌、结直肠癌等[14,15]. 因此, GGT高表达与肿瘤的发生密切相关, 被

引用格式: Zhang P, Li S, Zhang Q, Liu B, Ding C, Jiang Y. Design and real-time biologic imaging of an NIR ratiometric fluorescent probe for γ-glutamyltransferase activity. *Sci Sin Chim*, 2020, 50: 924–935, doi: 10.1360/SSC-2020-0042

© 2020 《中国科学》杂志社

认为是一种潜在的癌症生物标志物. 准确检测肿瘤细胞/组织内GGT的活性对疾病的早期诊断和预测治疗效果极为重要. 目前, GGT活性的检测方法有放射性同位素标记法[16,17]、比色法[17,18]、高效液相色谱法(HPLC)[19]和荧光法[20~25], 每种方法各具特色. 然而, 放射性同位素标记法产生的残留物会对人体造成一定的损害, 比色分析法和高效液相色谱法对仪器设备要求较高, 且不适合用于生物样品的实时成像. 相对地, 荧光分析法具有检测灵敏度高、样品前处理简单、无创性好、实时成像监测等优势, 可以准确、特异地检测活细胞和病理组织中GGT的活性. 此外, GGT特异性荧光探针在手术过程中能够指示肿瘤与正常组织之间的边界, 或对外科手术有所裨益.

迄今, 已有几例检测GGT活性的荧光探针相继报道, 并表现出良好的传感性能. 其设计思路多是将含有GGT可裂解底物的荧光淬灭基团修饰于萘酰亚胺、二氰基亚甲基-4*H*-吡喃、甲酚紫、半花菁等荧光团上, GGT催化探针中γ-谷氨酰胺键水解时, 探针荧光恢复, 从而反映GGT活性[26~29]. 相较而言, 七甲川菁类染料具有较大的摩尔消光系数和优良的近红外发光性能, 对生物样品的光损伤小、组织的穿透性好、受复杂生命系统的自身荧光干扰弱, 因而常被用于生物成像及荧光探针的设计中[30]. 若将七甲川菁染料中位的氯原子以氧原子取代, 借助其互变异构过程调控花菁的π-电子共轭体系, 可实现具有两个发射信号的比率型荧光分析, 能够为定量分析提供内置校正, 可用于复杂生命环境中的目标分析物的准确检测[31,32]. 另外, 互变异构引发的花菁共轭体系的改变亦可获得较大的发射峰位移(通常大于150 nm), 能够有效地避免两个发射信号之间的光谱串扰, 有利于细胞/组织的精准分析与成像[33,34].

鉴于此, 我们在前期研究基础上[35~37], 设计合成了一例具有较大发射位移的比率型近红外荧光探针(Cy-GGT), 用于GGT活性的检测. 选取七甲川菁染料作为近红外荧光团, 修饰以α,β-不饱和羰基结构, 通过巯基的亲核加成反应引入GSH作为酶切位点. 探针Cy-GGT具有良好的水溶性, 于808 nm处有近红外荧光发射. 向含有Cy-GGT的磷酸盐(PBS)缓冲溶液中加入GGT, 催化γ-谷氨酰键水解, 产生的游离氨基进一步进攻羰基, 随后环化离去, 可使花菁骨架共轭重组形成具有红色荧光的Cy-O, 荧光发射由808 nm转变为616 nm. 这种具有较大发射位移(约192 nm)的比率型荧光探针避免了光谱串扰, 更加有利于生物样品中GGT活性的检测与成像. 因此, 探针Cy-GGT不仅在溶液中表现出对GGT活性检测的优越光谱性能, 且能用于活细胞和动物体内GGT活性的荧光成像.

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

有机合成所用试剂均为分析纯, 除特别注明外, 均未经纯化处理. 光谱测试所用溶剂为经离子交换柱处理后的二次蒸馏水. 薄层色谱检测使用薄层色谱硅胶板, 柱色谱分离以200~300目硅胶(青岛海洋化工厂生产)作为固定相. GGT和细胞核染试剂(DAPI)购自于生工生物工程(上海)股份有限公司. Hep G2、HeLa、MCF-7和HUVEC细胞系购自普诺赛生命科技有限公司(武汉).

核磁共振(^{1}H NMR和^{13}C NMR)谱使用Bruker AV500 NMR和AV850 NMR核磁共振波谱仪(德国)测得, 样品溶解于氘代二甲亚砜(DMSO-d_6)或氘代甲醇(MeOD-d_4)中, 四甲基硅烷(TMS)作为内标. 高分辨质谱数据在Bruker En Apex ultra 7.0 TFT-MS质谱仪上记录, 电喷雾离子化, 正离子模式. 紫外-可见吸收光谱使用UH 5300紫外-可见分光光度计(1 cm石英池)测定; 使用Hitachi F-4600荧光光谱仪(日本)测定荧光光谱, 所选测试狭缝为5 nm×5 nm, 光谱测试均在室温下进行. 细胞内荧光图像在Leica SP5激光共聚焦荧光显微镜上拍摄.

2.2 探针的合成与表征

探针Cy-GGT的合成步骤示于图1. Cy-Cl和Cy-O的合成步骤见我们前期工作[38,39].

2.2.1 Cy-A的合成

将Cy-O (49.3 mg, 0.10 mmol)和三乙胺(95 μL, 0.6 mmol)溶于10 mL干燥的二氯甲烷中, 冰浴下滴加丙烯酰氯(18.4 mg, 0.20 mmol)的二氯甲烷(5 mL)溶液, 于室温下搅拌过夜. 随后向反应液中加入30 mL二氯甲烷, 去离子水洗涤3次(3×20 mL), 饱和NaCl溶液洗涤1次, 有机相经无水Na_2SO_4干燥后, 减压蒸馏除去溶剂后通过200~300目硅胶柱层析分离, 以二氯甲烷:甲

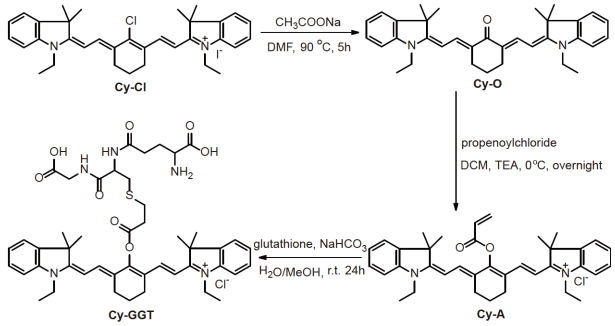


图 1 探针Cy-GGT的合成路线
Figure 1 The synthetic route of probe Cy-GGT.

醇=50:1为洗脱剂，得到墨绿色固体Cy-A (48.0 mg, 0.08 mmol)，产率为82.5%. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) 7.60 (t, J=11.2 Hz, 4H), 7.42 (d, J=3.9 Hz, 4H), 7.26 (m, 2H), 6.83 (d, J=17.2 Hz, 1H), 6.74 (dd, J=17.2, 10.4 Hz, 1H), 6.44 (d, J=10.5 Hz, 1H), 6.23 (d, J=14.2 Hz, 2H), 4.21 (t, J=7.1 Hz, 4H), 2.64 (s, 4H), 1.84 (s, 2H), 1.53 (s, 12H), 1.29 (t, 7.4 Hz, 6H). ^{13}C NMR (214 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm) 171.62, 163.80, 158.77, 142.12, 141.54, 139.79, 136.53, 131.18, 129.97, 129.11, 127.10, 125.47, 123.02, 121.34, 111.64, 100.95, 49.25, 27.82, 24.17, 20.96, 12.65. ESI-MS *m/z*: $[M]^+$ Calcd. for $C_{37}H_{42}N_2O_2^+$ 547.3319; Found 547.3319.

2.2.2 探针Cy-GGT的合成

将谷胱甘肽(61.5 mg, 0.20 mmol)和$NaHCO_3$ (50.4 mg, 0.60 mmol)溶于10 mL去离子水中，在N_2保护下逐滴滴加Cy-A (49.3 mg, 0.10 mmol)的甲醇溶液(5 mL)，室温下搅拌反应24 h. 反应结束后，将反应液倾入30 mL去离子水中，用二氯甲烷萃取3次(3×20 mL)，水相中加入NaCl至饱和，静置4 h析出绿色固体，干燥后通过硅胶柱层析纯化，以二氯甲烷:甲醇=10:1为洗脱剂，得到绿色固体Cy-GGT (48.0 mg, 0.08 mmol)，产率为43.5%. ^{1}H NMR (500 MHz, MeOD-d_4) δ (ppm) 7.78 (d, J=14.1 Hz, 2H), 7.54 (d, J=7.4 Hz, 2H), 7.41 (t, J=7.6 Hz, 2H), 7.28 (dd, J=14.8, 7.6 Hz, 4H), 6.20 (d, J=14.1 Hz, 2H), 4.65 (dd, J=8.9, 4.9 Hz, 2H), 4.19 (q, J=7.1 Hz, 4H), 3.79 (d, J=3.7 Hz, 2H), 3.63 (t, J=6.2 Hz, 1H), 3.22 (d, J=6.9 Hz, 2H), 3.01 (dd, J=13.7, 7.8 Hz, 2H), 2.90 (dd, J=14.0, 9.0 Hz, 1H), 2.70 (s, 4H), 2.60~2.52 (m, 2H), 2.16~2.11 (m, 2H), 1.97 (s, 2H), 1.67 (d, J=2.5 Hz, 12H), 1.39 (t, J=7.2 Hz, 6H). ESI-MS *m/z*: $[M]^+$ Calcd. for $C_{47}H_{60}N_5O_8S^+$ 854.4157, Found 854.4164; $[M^+{+}H]^{2+}/2$ Calcd. for $C_{47}H_{61}N_5O_8S^{2+}$ 427.7117, Found 427.7110.

2.3 吸收光谱和荧光光谱的测定

将探针Cy-GGT溶于光谱纯的甲醇中，配制成5 mM的母液. 吸收光谱和荧光光谱测试时，取适量的母液用PBS缓冲液(10 mM, pH 7.0)稀释至所需浓度, 加入适量的GGT或其他分析物在37℃下孵育相应时间后转入1 cm的石英比色皿进行测试. 所有光谱测试均在25℃下进行.

2.4 细胞毒性和细胞内荧光成像

实验用细胞株用高糖DMEM、10%胎牛血清、1%青霉素和1%链霉素配制的培养基培养24 h. 使用CCK-8法测定探针的细胞毒性: 将Hep G2细胞接种于96孔板中培养1天, 用不同浓度(2~30 μM)的Cy-GGT处理Hep G2细胞1~6 h, 经DPBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline)洗涤3次后, 用CCK-8法测其细胞毒性.

细胞内GGT活性的荧光成像实验中，用Cy-GGT (3 μM)处理Hep G2细胞40 min; 对照实验中，首先将细胞用抑制剂重氮氧代正亮氨酸(DON) (1 mM)预处理30 min, 经DPBS洗涤3次后, 再用Cy-GGT (3 μM)处理Hep G2细胞40 min. 在Leica SP5激光扫描共聚焦显微镜上拍摄荧光图像，红色通道激发波长设定为514 nm，发射波长设定为600~680 nm; 近红外通道激发波长设定为700 nm, 发射波长设定为740~800 nm.

2.5 活体荧光成像

动物实验经南京大学医学伦理学委员会批准. 动物程序按照南京大学实验动物护理和使用指南进行. 5~6周龄的雌性BABLc裸鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司. 在江苏凯基生物技术股份有限公司使用IVIS®Lumina LT Series III Perkin Elmer系统进行活体成像实验. 2只裸鼠大腿后侧接种Hep G2肿瘤, 待肿瘤长至直径为8~10 mm时进行实验. 荧光活体成像时，将探针Cy-GGT (10 μL, 3 mM溶液)注射到荷瘤小鼠大腿后侧的肿瘤部位, 分别于5、20、60、90 min后做荧光成像. 另一只小鼠用抑制剂DON (20 μL, 100 mM水溶液)预处理30 min，然后注射相同剂量的

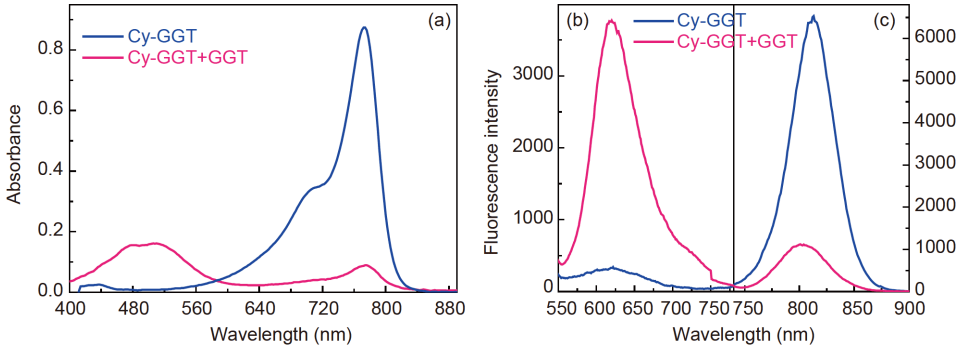


图 2　PBS缓冲溶液(10 mM, pH 8.0)中, 探针Cy-GGT与GGT作用前后的吸收光谱(a)和荧光光谱图(b, c). 蓝色线为不含GGT的光谱, 红色线为探针与100 mU/mL的GGT孵育60 min后的光谱. 探针浓度6 μM. 激发波长为516 nm (b)和700 nm (c) (网络版彩图)

Figure 2　Absorption (a) and fluorescence (b, c) spectra of Cy-GGT before (blue line) and after (red line) treated with 100 mU/mL GGT for 60 min in 10 mM PBS buffer of pH 8.0. [Cy-GGT]=6 μM, λ_{ex} is 516 nm (b) or 700 nm (c) (color online).

Cy-GGT, 拍摄相同时间的小鼠荧光强度. 向1只健康小鼠相同部位注射等剂量的Cy-GGT作为对照实验. 记录小鼠荧光强度随时间的变化(5、20、60、90 min). 红色通道的激发波长设置为506 nm, 发射波长设置为616 nm; 近红外通道的激发波长设置为700 nm, 发射波长设置为808 nm.

3　结果与讨论

3.1　探针的设计合成及其对GGT的光谱响应

选取近红外染料七甲川菁作为荧光信号基团, 修饰以丙烯酸酯连接基团, 通过巯基与α,β-不饱和羰基化合物的亲核加成将GSH单元引入作为GGT的酶切位点, 制备了具有近红外发光性能的荧光探针Cy-GGT (图1). 合成的中间体及产物的结构经^{1}H NMR, ^{13}C NMR和高分辨质谱鉴定, 具体谱图列于补充材料(图S1~S5, 网络版补充材料).

首先考察了pH 8.0的PBS缓冲液中探针的吸收和荧光光谱. 由图2可以看出, 探针Cy-GGT的最大吸收波长位于766 nm (ε=1.436×10^{5} L/(mol cm), 源自花菁染料单体的π-π*跃迁), 并于705 nm处有一个肩峰(溶液中花菁染料二聚体的吸收峰), 在808 nm处有近红外荧光发射峰. 将6 μM的探针Cy-GGT与100 mU/mL的GGT在37℃下孵育60 min后, 766 nm的吸光度显著降低, 在485和516 nm附近出现两个新的吸收峰(分别源自菁类染料的激发态分子内电荷转移(ICT)和羰基共轭体系的n-π*跃迁)[40], 溶液颜色由绿色变为红色. 对应的荧光光谱中, Cy-GGT于808 nm处发射减弱, 同时于616 nm处出现新的荧光峰, 溶液呈现亮红色荧光(图S6). 上述结果表明探针Cy-GGT可用于GGT的检测.

3.2　探针对GGT的检测机理

探针Cy-GGT在谷氨酰胺转移酶作用下发生的光谱变化是由于酶催化谷氨酰胺键水解, 进而引发分子内消去过程所致(图3). 为了证实该作用机理, 我们首先将酶催化反应溶液(Cy-GGT/GGT混合溶液)与可能的荧光产物Cy-O的光谱比较, 发现Cy-GGT/GGT混合溶液的吸收光谱和荧光光谱与合成所得Cy-O的光谱基本一致(图S7). 另外, HR-MS数据也证实了GGT催化水解的作用原理, 即在Cy-GGT/GGT的PBS混合溶液的质谱中观察到Cy-O ($[C_{34}H_{41}N_2O]^+$)的分子离子峰 (m/z=493.3221) (理论计算值为: 493.3213) (图S8).

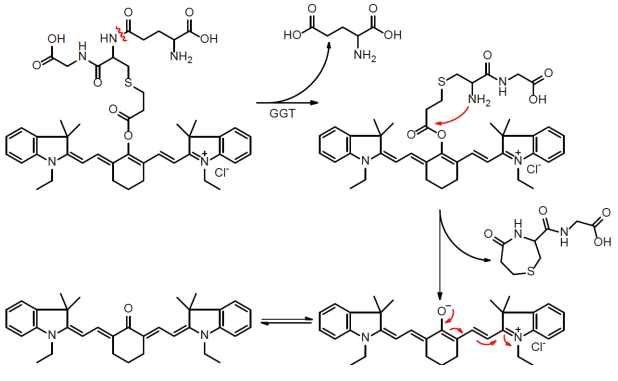


图 3　探针Cy-GGT检测GGT的作用机理(网络版彩图)

Figure 3　Proposed response mechanism of Cy-GGT for GGT (color online).

3.3 探针对GGT检测的条件优化

构建一例具有良好传感性能的荧光探针，需对其传感条件进行优化. 为了优化Cy-GGT的最佳测试浓度, 首先考察了不同浓度的Cy-GGT在PBS缓冲液中的吸收光谱和荧光光谱. 如图S9(a)所示, 探针Cy-GGT浓度在0~6 μM范围内增大时, 766 nm的吸光度线性增加, 说明在此浓度范围内探针具有良好的水溶性，以单体形式分散于溶液中. 浓度超过6 μM时，766 nm的吸光度偏离线性，此时探针在溶液中开始聚集. 对应的荧光光谱(图S9(b))也可以看出探针浓度在6 μM以下时808 nm的发射峰逐渐增强，当其浓度大于6 μM时, 808 nm发射略有降低，这是由于荧光染料发生聚集的自淬灭作用引起. 因此, 我们选取6 μM的Cy-GGT进行后续光谱传感研究.

随后考察了pH对6 μM Cy-GGT与100 mU/mL GGT的混合液荧光强度的影响. 由图S10可看出, 仅对Cy-GGT而言，pH值为5.0~8.5的系列PBS缓冲液中, $I_{616\ nm}/I_{808\ nm}$比值随溶液pH变化很小，表明Cy-GGT在该pH范围内相对稳定. 探针与GGT孵育60 min后，在pH≤6.0的酸性溶液中荧光变化较小；溶液pH>6.5时, 荧光强度比值($I_{616\ nm}/I_{808\ nm}$)变化较大. 可见，溶液pH值在6.5~8.5范围内探针Cy-GGT均可用于GGT的荧光检测.

酶催化反应与温度有极大的关系. 为了解温度对GGT检测的影响，研究了20~45℃ (20、25、30、37、45℃)下的GGT催化水解反应. 如图S11所示，较低温度(25℃以下)下$I_{616\ nm}/I_{808\ nm}$变化较小，可能是由于低温时酶的催化活性较弱. 当反应温度为37℃时, $I_{616\ nm}/I_{808\ nm}$值最大；温度高于37℃，例如45℃时, $I_{616\ nm}/I_{808\ nm}$反而降低, 因为在高温下GGT已有部分失活. 因此, 选取最佳反应温度为37℃.

最后优化了探针Cy-GGT经酶解产生Cy-O的孵育时间. 在含有6 μM Cy-GGT的PBS (10 mM, pH 8.0)溶液中, 加入100 mU/mL GGT, 于37℃下每隔2 min测定一次荧光光谱, 结果示于图S12, 加入GGT前，溶液呈亮绿色, 808 nm处有很强的荧光发射. 加入GGT后, 随着反应时间延长808 nm发射峰逐渐降低，于616 nm出现新的发射峰. 反应进行到60 min时616 nm发射峰达到最大值，此时808 nm的荧光强度降低缓慢. 因此选取60 min作为酶催化反应的最优孵育时间.

3.4 探针对GGT的检测性能研究

于优化的测试条件下，考察了探针Cy-GGT对GGT的检测性能. 首先, 测试了Cy-GGT荧光强度随着GGT浓度的变化趋势. 图4表明, 10 mM PBS缓冲溶液(pH 8.0)中GGT浓度增加时，探针Cy-GGT在808 nm处的荧光强度逐渐降低, 616 nm处的发射峰逐渐升高, 溶液出现亮红色荧光. GGT浓度超过150 mU/mL时, 荧光强度变化趋于缓慢. 616和808 nm处荧光强度的比值, $I_{616\ nm}/I_{808\ nm}$与GGT浓度在0~140 mU/mL范围内呈现良好的线性关系(y=0.014x+0.02，线性相关系数R^2为0.998), 依据LOD=3.3σ/k计算得到探针Cy-GGT对GGT的最低检测限为0.02 mU/mL，较以往报道的单波长GGT探针更为灵敏[32,34]. 这种较高的检测灵敏度主要归功于比率型检测模式，通过测量两个波段的荧光信号，取其比值从而降低一些干扰因素并将输出信号放大[41,42].

为了确定探针Cy-GGT的荧光变化源于GGT的催化作用而非其他因素, 设计了GGT活性抑制实验. 重氮氧代正亮氨酸(DON)是一种常见的谷氨酰胺转移酶抑制剂[43], 首先将不同浓度的DON与100 mU/mL GGT在37℃下孵育30 min，随后加入6 μM Cy-GGT继续孵育60 min, 测绘荧光光谱. 图5(a)表明, 随着抑制剂浓度增大，616 nm处发射峰逐渐降低，808 nm处荧光逐渐增强, 其比值($I_{616\ nm}/I_{808\ nm}$)也依次降低, 说明DON产生了明显的抑制作用. 此外, 随着抑制剂浓度增大, 抑制效率逐渐增强，DON浓度超过2 mM时趋于缓慢(图5(d)). 根据DON浓度与抑制效率的关系曲线，得到当GGT浓度为100 μM/mL时，DON的半抑制浓度IC_{50}为0.48 mM.

随后考察了探针Cy-GGT对GGT检测的选择性. 如图S13所示, 向含有6 μM Cy-GGT的PBS溶液中加入其他可能共存的潜在干扰物种，包括生命体中常见的无机盐类(100 μM Na_2S、KCl、$Al(NO_3)_3$、$MgCl_2$、$CaCl_2$、$Fe(NO_3)_3$和$ZnCl_2$)、氨基酸(100 μM Glu、Gly、Phe、Leu、Arg、Lys、Try、His、Cys和GSH)和一些生物分子(100 μM ATP, 100 mU/mL的酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、酪氨酸酶、乙酰胆碱酯酶、端粒酶、β-糖苷酶、无机焦磷酸酶)，孵育60 min后测其荧光光谱. 实验结果表明, 仅GGT可以引起探针Cy-GGT光谱明显变化，其他物种的加入几乎不影响探针的光

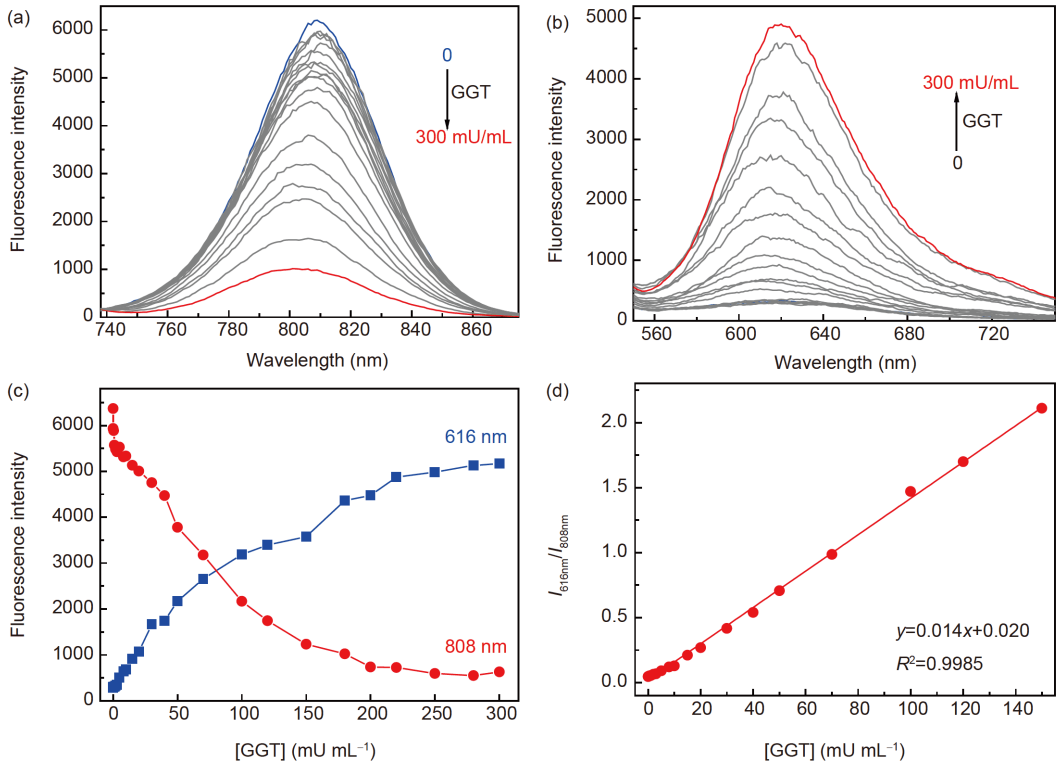


图 4　(a, b) 10 mM, pH 8.0 PBS缓冲溶液中, Cy-GGT与不同浓度(0~300 mU/mL) GGT在37℃下孵育60 min后的荧光光谱. (c) 616 nm (蓝线)和808 nm (红线)的荧光强度随GGT浓度变化的散点图. (d) 616和808 nm荧光强度比值随GGT浓度(0~150 mU/mL)变化的线性关系. 探针浓度为6 μM. 激发波长为516 nm (a)和700 nm (b) (网络版彩图)

Figure 4　Fluorescence spectra of Cy-GGT incubated with GGT of increasing concentration from 0 to 300 mU/mL for 60 min in 10 mM PBS buffer of pH 8.0 upon excitation at 516 nm (a) or 700 nm (b). (c) Plots of intensity at 616 nm (blue squares) and 808 nm (red dots) versus GGT concentration. (d) Plots of $I_{616\ nm}/I_{808\ nm}$ of Cy-GGT against concentration of GGT from 0 to 150 mU/mL. [Cy-GGT]=6 μM (color online).

谱. 可见, 探针Cy-GGT对GGT的检测具有较高的选择性, 适合于复杂生理环境中GGT的分析.

3.5　细胞毒性以及活细胞中GGT的荧光成像

上述光谱实验表明探针Cy-GGT对溶液中GGT活性表现出优异的检测性能. 为了考察其于活细胞内检测GGT活性的应用前景, 需要研究其细胞毒性. 选取肝癌细胞(Hep G2)为模型, 用CCK-8方法评估了探针Cy-GGT的细胞毒性. 图S14显示, 2~30 μM的Cy-GGT与Hep G2细胞孵育1~6 h后, 细胞存活率均保持在90%以上, 表明探针的细胞毒性低.

肝细胞内GGT含量较高, 尤其在肝癌细胞中过度表达. 因此, 选用Hep G2细胞进一步探索探针Cy-GGT在活细胞中的荧光成像性能. 首先用不同浓度(1.5、3、6 μM)的Cy-GGT与Hep G2细胞孵育40 min后, DPBS冲洗3次, 用于共聚焦成像. 实验发现, Hep G2细胞与1.5 μM的Cy-GGT孵育后便可看到红色荧光, 与3 μM的Cy-GGT孵育后红色荧光非常明显(图S15). 因此, 后续实验选用3 μM的Cy-GGT用于活细胞内荧光成像.

由于GGT主要存在于肝细胞膜和细胞质内微粒体中, 我们将Hep G2细胞用3 μM探针Cy-GGT和市售的细胞核染试剂(DAPI, 300 nM)共孵育30 min后, 用荧光共聚焦显微镜拍摄红色通道Cy-O的荧光和蓝色通道DAPI的荧光(图6), 可以明显看出红色通道的发射主要集中在细胞质中, 蓝色通道发射主要分布在细胞核, 将其叠加可以看出两个通道的发射几乎没有重叠(重叠系数为0.26, Pearson系数为0.16), 说明红色通道荧光物质Cy-O产生在细胞质中, 进一步证实红色荧光是由GGT催化Cy-GGT分解产生.

为进一步确证细胞内红色荧光源自GGT对探针Cy-GGT的催化水解作用, 我们考察了抑制剂DON在

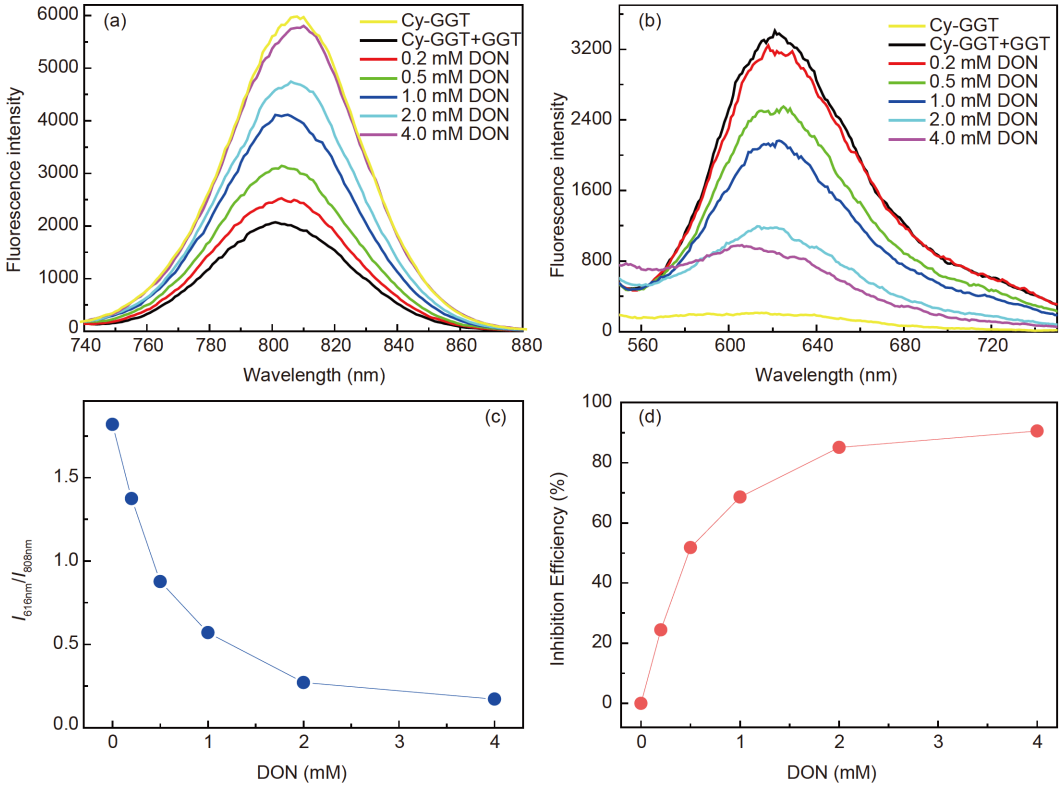


图 5 (a, b) 10 mM, pH 8.0 PBS缓冲溶液中GGT与不同浓度(0、0.2、0.5、1.0、2.0以及4.0 mM) DON在37℃下孵育30 min后, 加入6 μM Cy-GGT继续孵育60 min后的荧光光谱. (c) $I_{616\ nm}/I_{808\ nm}$随DON浓度变化的散点图. (d) 抑制效率随DON浓度变化的散点图. 探针浓度为6 μM, 激发波长为516 nm (a)和700 nm (b) (网络版彩图)

Figure 5 Fluorescence spectra of Cy-GGT with 100 mU/mL GGT pretreated with different concentration of DON from 0 to 4 mM in 10 mM PBS buffer of pH 8.0 under excitation at 516 nm (a) or 700 nm (b). GGT was incubated with DON for 30 min at 37 °C. (c) Plots of $I_{616\ nm}/I_{808\ nm}$ of Cy-GGT versus concentration of DON. (d) Inhibition efficiency of GGT versus concentration of DON. [Cy-GGT]=6 μM (color online).

细胞内对GGT的抑制作用. 将Hep G2细胞用1 mM的DON孵育30 min后, 经DPBS洗涤三次, 继续用3.0 μM Cy-GGT孵育40 min, 采用激光共聚焦扫描显微镜观察肿瘤细胞的荧光变化. 从图7可以看出, GGT活性受到抑制的细胞近红外通道的荧光比未经抑制剂处理的更为明亮, 而红色通道的荧光强度反而更弱, 说明Hep G2细胞红色通道荧光增强是由于GGT催化Cy-GGT水解产生, Cy-GGT能够在细胞内特异性地检测GGT活性.

在上述研究的基础上, 我们考察了Cy-GGT与Hep G2细胞孵育不同时间的荧光变化, 以进一步评估细胞内检测GGT活性的准确响应时间. 用3 μM的Cy-GGT孵育Hep G2细胞, 每隔10 min捕获其于红色通道和近红外通道的荧光图像, 如图8所示, 可以看出10 min内即可出现明显的红色荧光, 表明探针Cy-GGT扩散进入Hep G2细胞后, 细胞内GGT能快速地催化探针水解释放红色荧光物质Cy-O. 随着孵育时间延长, 红色通道荧光逐渐增强, 近红外通道荧光减弱, 两个通道荧光强度的比值逐渐变大. 当Cy-GGT与Hep G2孵育40 min后, 红色通道荧光增强15倍, 近红外通道荧光强度降低为原来的1/4. 表明探针Cy-GGT可实现细胞内GGT活性的可视化实时检测.

随后, 我们考察了探针Cy-GGT与不同细胞系孵育后的荧光成像, 选取GGT高表达的Hep G2细胞和两种肿瘤细胞系(HeLa和MCF-7)为研究对象, 以正常细胞HUVEC为对照. 将上述4种细胞与3 μM的Cy-GGT在37℃孵育40 min后观察其于红色通道和近红外通道的荧光强度(图9), 可以看出肿瘤细胞中的红色荧光显著强于正常细胞, 红色通道与近红外通道荧光强度的比值也可看出HUVEC细胞明显低于其他三种肿瘤细胞. 将Hep G2细胞和HUVEC细胞在含有Cy-GGT的培养基中共同孵育后, 也可看出Hep G2细胞红色通道荧光

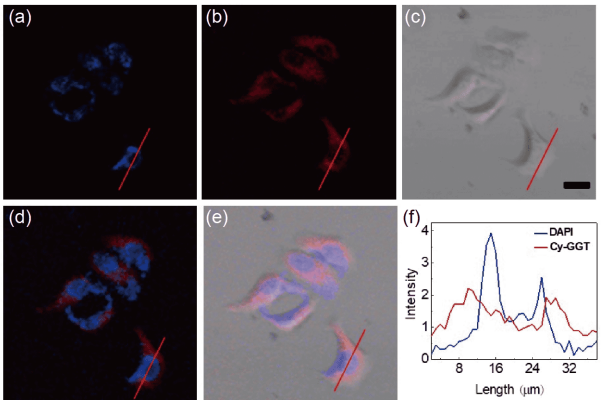


图 6　Cy-GGT (3.0 μM)与核染试剂DAPI (300 nM)在Hep G2细胞中共孵育30 min后的荧光成像. (a) 蓝色通道DAPI的荧光成像(λ_{ex}: 405 nm, λ_{em}: 440~460 nm); (b) 红色通道Cy-GGT与细胞内GGT作用后的荧光成像(λ_{ex}: 514 nm, λ_{em}: 600~680 nm); (c) 明场细胞成像; (d) 蓝色通道和红色通道的叠加; (e) 明场与荧光场的叠加; (f) 划线区域蓝色荧光和红色荧光相对强度. 图中标尺为20 μm (网络版彩图)

Figure 6　Fluorescent images of Hep G2 cells coincubated with Cy-GGT (3 μM) and DAPI (300 nM) for 30 min. (a) Fluorescence emission of blue channel for DAPI (λ_{ex}: 405 nm, λ_{em}: 440~460 nm); (b) fluorescence emission of red channel for Cy-GGT (λ_{ex}: 514 nm, λ_{em}: 600~680 nm); (c) the image of brightfield; (d) merged emission from images (a) and (b); (e) merged emission from images (a), (b) and (c); (f) intensity of ROIs across the selected Hep G2 cell. Scale bar: 20 μm (color online).

较强而HUVEC细胞仍保持近红外发光(图S16). 由此可以证实, GGT在肿瘤细胞中的活性远高于正常细胞, 探针Cy-GGT可用于区分正常细胞和肿瘤细胞.

基于探针优良的光学特性和上述细胞内GGT成像, 我们将Cy-GGT进一步用于动物体内GGT活性的监测. 本实验以荷瘤BALB/c裸鼠为模型. 通过观察两个不同荧光通道的信号变化, 拍摄裸鼠的荧光图像. 在小鼠肿瘤部位注射30 μL Cy-GGT (溶于pH 7.4的DPBS缓冲液中, 浓度为2.5 mM), 观察到红色通道荧光显著增强, 近红外通道发射随之减弱(图S17(b)和10(b)). 而对用DON抑制肿瘤中GGT活性的荷瘤小鼠而言, 肿瘤区域用20 μL DON (5 mM的水溶液)预处理30 min后摄入等量探针, 红色通道荧光增强相对较弱, 而近红外通道的荧光反而较强(图S17(c)和10(c)). 其两个通道的荧光比(I_{red}/I_{NIR})明显小于未经抑制剂预处理的小鼠(图10(e)). 作为对照实验的健康小鼠, Cy-GGT在小鼠体内的荧光随时间变化微弱(图S17(a)). 总的来说, 与体外实验结果一致, 未经DON预处理的荷瘤小鼠的荧光强度比(I_{red}/I_{NIR})远大于DON抑制组和对照组(图10(e)). 结果表明, 探针Cy-GGT可用于监测活体动物内源性GGT活性.

4　结论

综上所述, 结合酶催化反应机理, 我们设计了一例新型的比率型近红外荧光探针Cy-GGT, 用于GGT活性

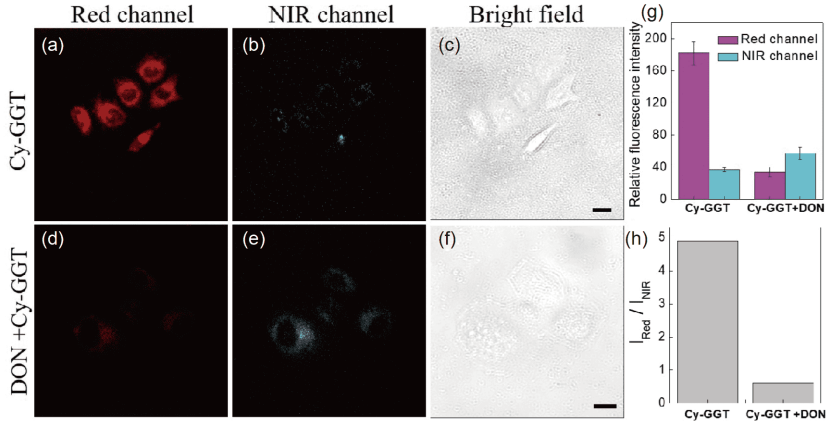


图 7　Hep G2细胞在3.0 μM Cy-GGT (a~c)以及Cy-GGT与1.0 mM抑制剂DON (d~f)中孵育40 min后的荧光成像. (a, d) 红色通道荧光场; (b, e) 近红外通道荧光场; (c, f) 明场. 红色通道: λ_{ex}: 514 nm, λ_{em}: 600~680 nm; 近红外通道: λ_{ex}: 633 nm, λ_{em}: 740~800 nm. 图中标尺为20 μm. (g) 红色通道和近红外通道的平均荧光强度. (h) 红色通道和近红外通道的荧光强度比值(网络版彩图)

Figure 7　Fluorescent images of Hep G2 cells. The cells were incubated with Cy-GGT (3 μM) for 40 min (a–c); the cells were pretreated with 1.0 mM DON for 30 min then incubated with Cy-GGT (3 μM) for 40 min (d–f). (a, d) Red channel; (b, e) NIR channel; (c, f) bright field. (g) Fluorescent intensity of red and NIR channels. (h) Fluorescence intensity ratios of red and NIR channels. For red channel: λ_{ex}: 514 nm, λ_{em}: 600–680 nm; for NIR channel: λ_{ex}: 633 nm, λ_{em}: 740–800 nm, scale bar: 20 μm (color online).

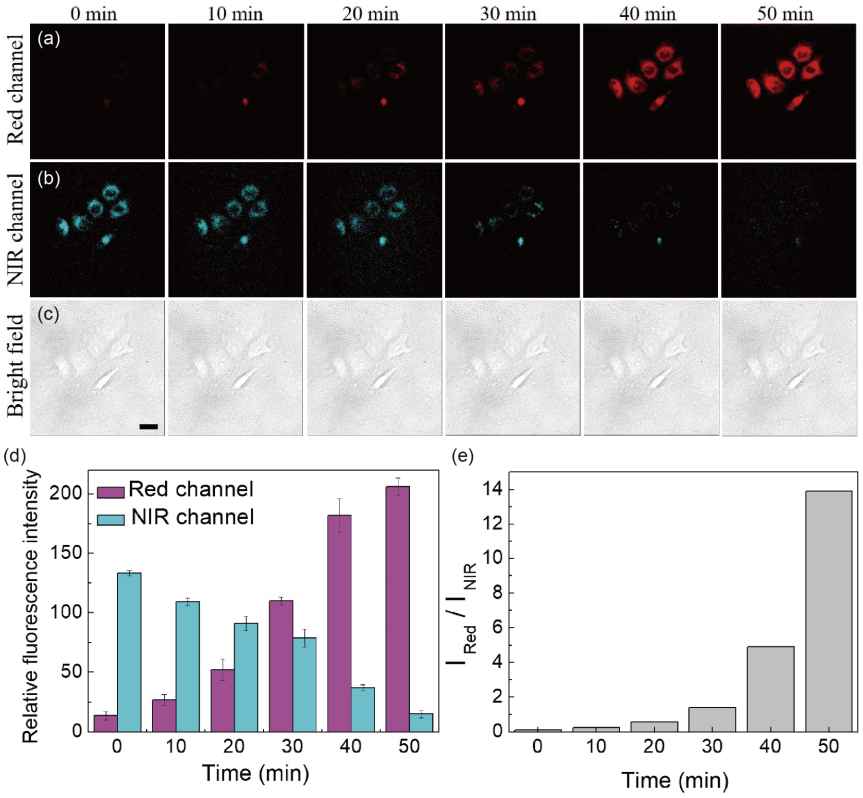


图 8 Cy-GGT (3 μM)与Hep G2细胞孵育不同时间(0~50 min)的荧光成像. (a) 红色通道荧光场; (b) 近红外通道荧光场; (c) 明场30 min. (d) 红色通道和近红外通道的平均荧光强度. (e) 红色通道和近红外通道的荧光强度比值. 红色通道: λ_{ex}: 514 nm, λ_{em}: 600~680 nm; 近红外通道: λ_{ex}: 633 nm, λ_{em}: 740~800 nm. 图中标尺为20 μm (网络版彩图)

Figure 8 Real-time imaging of Hep G2 cells incubated with Cy-GGT (3 μM) for 0 to 50 min. (a) Red channel; (b) NIR channel; (c) bright field. (d) Average intensity found in (a) and (b). (e) Intensity ratios of red and NIR channels. For red channel: λ_{ex}: 514 nm, λ_{em}: 600–680 nm; for NIR channel: λ_{ex}: 633 nm, λ_{em}: 740–800 nm, scale bar: 20 μm (color online).

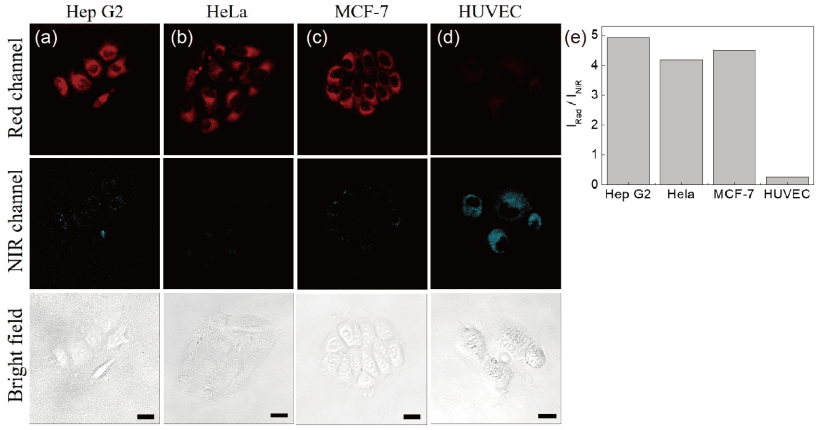


图 9 探针Cy-GGT (3 μM)与不同细胞系孵育40 min后的荧光成像. (a) Hep G2; (b) HeLa; (c) MCF-7; (d) HUVEC. 由上到下依次为: 红色通道荧光场、近红外通道荧光场以及明场. 红色通道: λ_{ex}: 514 nm, λ_{em}: 600~680 nm; 近红外通道: λ_{ex}: 633 nm, λ_{em}: 740~800 nm. 图中坐标为20 μm. (e) Cy-GGT与不同细胞系孵育后红色通道和近红外通道相对荧光强度比值(网络版彩图)

Figure 9 (a–d) Fluorescent images of different cell lines. The cell lines were incubated with Cy-GGT (3 μM) for 40 min. For red channel: λ_{ex}: 514 nm, λ_{em}: 600–680 nm; for NIR channel: λ_{ex}: 633 nm, λ_{em}: 740–800 nm, scale bar: 20 μm. (e) Fluorescence intensity ratios of red and NIR channels (color online).

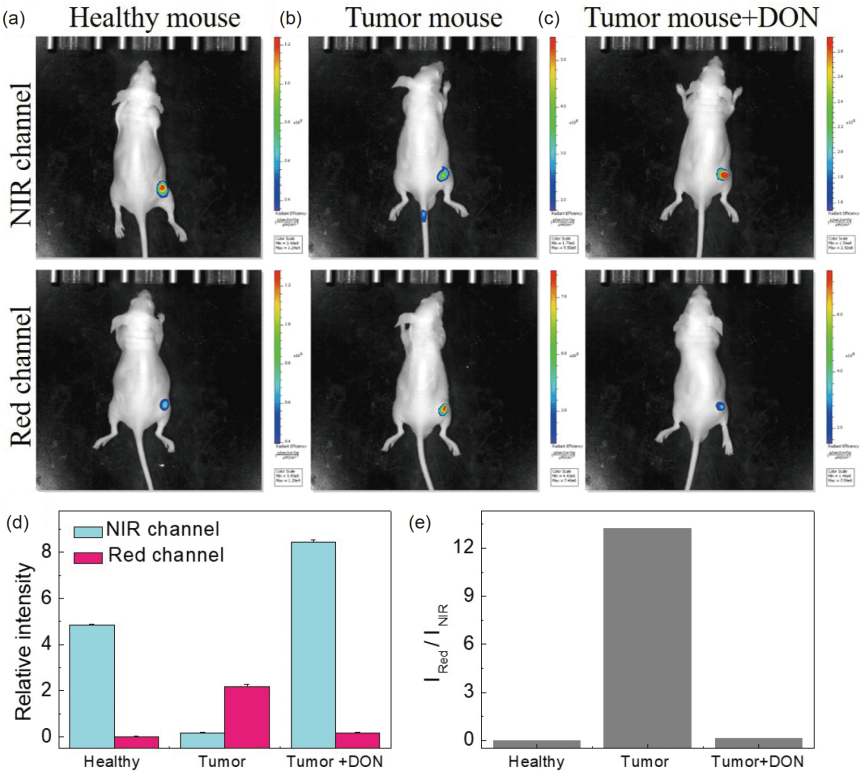


图 10　皮下肿瘤小鼠摄入探针5 min后的荧光成像. (a) 健康小鼠荧光成像; (b) 荷瘤小鼠荧光成像; (c) 荷瘤小鼠经GGT抑制剂DON预处理30 min后的荧光成像; (d) 近红外通道和红色通道的相对荧光强度; (e) 红色通道和近红外通道的荧光强度比值. 红色通道: λ_{ex}: 514 nm, λ_{em}: 600~680 nm; 近红外通道: λ_{ex}: 700 nm, λ_{em}: 740~800 nm (网络版彩图)

Figure 10　Fluorescence imaging of subcutaneous tumor mice treated with Cy-GGT for 5 min. (a) Fluorescence imaging of healthy mouse; (b) fluorescence imaging of tumor mouse; (c) fluorescence imaging of tumor mouse pretreated with DON. (d) Average intensity of (a), (b) and (c). (e) Intensity ratios of red and NIR channels. For red channel: λ_{ex}: 514 nm, λ_{em}: 600–680 nm; for NIR channel: λ_{ex}: 700 nm, λ_{em}: 740–800 nm (color online).

的检测与成像. 该探针具有良好的水溶性, 在生命体系中, 通过GGT催化的有机反应对七甲川菁染料共轭骨架π-电子体系的调控, 实现了对GGT活性的大发射位移(192 nm)比率型检测, 可避免检测过程中的荧光串扰. 该探针对GGT活性的检测具有较高灵敏度(检出限低至0.02 mU/mL)和选择性, 并成功用于细胞内和动物体内GGT活性的荧光成像, 能够区分肿瘤细胞和正常细胞, 有望对相关癌症的早期诊断与治疗发挥积极作用. 本文的设计思路为构建具有良好检测性能的生物酶活性比率型荧光探针提供了一个实例, 对开发新型高选择性、高灵敏性、更具实用前景的比率型近红外荧光探针具有一定的启发意义.

补充材料

本文的补充材料见网络版chemcn.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

参考文献

1　Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *CA-A Cancer J Clin*, 2018, 68: 7–30
2　Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. *CA-A Cancer J Clin*, 2018, 68: 394–424
3　Liu S, Yang L, Yuan Y, Li H, Tian J, Lu S, Wang N, Ji J. *Chin J Cancer Res*, 2018, 30: 13–20
4　Forouzanfar MH, Afshin A, Alexander LT, et al. *Lancet*, 2016, 388: 1659–1724

5 Plummer M, de Martel C, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Franceschi S. *Lancet glob Health*, 2016, 4: e609–e616
6 Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, et al. *Lancet*, 2018, 391: 1023–1075
7 Chen H, Gu Z, An H, Chen C, Chen J, Cui R, Chen S, Chen W, Chen X, Chen X, Chen Z, Ding B, Dong Q, Fan Q, Fu T, Hou D, Jiang Q, Ke H, Jiang X, Liu G, Li S, Li T, Liu Z, Nie G, Ovais M, Pang D, Qiu N, Shen Y, Tian H, Wang C, Wang H, Wang Z, Xu H, Xu JF, Yang X, Zhu S, Zheng X, Zhang X, Zhao Y, Tan W, Zhang X, Zhao Y. *Sci China Chem*, 2018, 61: 1503–1552
8 Liu HW, Chen L, Xu C, Li Z, Zhang H, Zhang XB, Tan W. *Chem Soc Rev*, 2018, 47: 7140–7180
9 Lozano-Torres B, Galiana I, Rovira M, Garrido E, Chaib S, Bernardos A, Muñoz-Espín D, Serrano M, Martínez-Máñez R, Sancenón F. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 8808–8811
10 Zhang J, Chai X, He XP, Kim HJ, Yoon J, Tian H. *Chem Soc Rev*, 2019, 48: 683–722
11 Castellano I, Merlino A. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69: 3381–3394
12 Terzyan SS, Burgett AWG, Heroux A, Smith CA, Mooers BHM, Hanigan MH. *J Biol Chem*, 2015, 290: 17576–17586
13 Grimm C, Hofstetter G, Aust S, Mutz-Dehbalaie I, Bruch M, Heinze G, Rahhal-Schupp J, Reinthaller A, Concin N, Polterauer S. *Br J Cancer*, 2013, 109: 610–614
14 Yao D, Jiang D, Huang Z, Lu J, Tao Q, Yu Z, Meng X. *Cancer*, 2000, 88: 761–769
15 Hanigan MH, Frierson HF, Brown JE, Lovell MA and Taylor PT. *Cancer Res*, 1994, 54: 286–290
16 Frielle T, Curthoys NP. *Biochemistry*, 1983, 22: 5709–5714
17 Wang S, Xiao C, Guo L, Ling L, Li M, Li H, Guo X. *Talanta*, 2019, 205: 120141
18 Tateishi N, Higashi T, Nomura T, Naruse A, Nakashima K. *Gan*, 1976, 67: 215–222
19 Del Corso A, Cappiello M, Buono F, Moschini R, Paolicchi A, Mura U. *J Biochem Biophys Methods*, 2006, 67: 123–130
20 Kiuchi K, Kiuchi K, Nagatsu T, Togari A, Kumagai H. *J Chromatogr A*, 1986, 357: 191–198
21 Wang F, Zhu Y, Zhou L, Pan L, Cui Z, Fei Q, Luo S, Pan D, Huang Q, Wang R, Zhao C, Tian H, Fan C. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 7349–7353
22 Luo Z, Huang Z, Li K, Sun Y, Lin J, Ye D, Chen HY. *Anal Chem*, 2018, 90: 2875–2883
23 Li H, Yao Q, Xu F, Xu N, Duan R, Long S, Fan J, Du J, Wang J, Peng X. *Biomaterials*, 2018, 179: 1–14
24 Ou-Yang J, Li YF, Wu P, Jiang WL, Liu HW, Li CY. *ACS Sens*, 2018, 3: 1354–1361
25 Luo Z, An R, Ye D. *ChemBioChem*, 2019, 20: 474–487
26 Zhang P, Jiang XF, Nie X, Huang Y, Zeng F, Xia X, Wu S. *Biomaterials*, 2015, 80: 46–56
27 Tong H, Zheng Y, Zhou L, Li X, Qian R, Wang R, Zhao J, Lou K, Wang W. *Anal Chem*, 2016, 88: 10816–10820
28 Li L, Shi W, Wu X, Gong Q, Li X, Ma H. *Biosens Bioelectron*, 2016, 81: 395–400
29 Li L, Shi W, Wang Z, Gong Q, Ma H. *Anal Chem*, 2015, 87: 8353–8359
30 Ou-Yang J, Li Y, Jiang WL, He SY, Liu HW, Li CY. *Anal Chem*, 2018, 91: 1056–1063
31 Zhou L, Wang Q, Zhang XB, Tan W. *Anal Chem*, 2015, 87: 4503–4507
32 Liu Y, Yu D, Ding S, Xiao Q, Guo J, Feng G. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2014, 6: 17543–17550
33 Hu C, Sun W, Cao J, Gao P, Wang J, Fan J, Song F, Sun S, Peng X. *Org Lett*, 2013, 15: 4022–4025
34 Wang X, Guo Z, Zhu S, Tian H, Zhu W. *Chem Commun*, 2014, 50: 13525–13528
35 Zhang P, Fu C, Zhang Q, Li S, Ding C. *Anal Chem*, 2019, 91: 12377–12383
36 Zhang Q, Li S, Fu C, Xiao Y, Zhang P, Ding C. *J Mater Chem B*, 2019, 7: 443–450
37 Zhang P, Xiao Y, Zhang Q, Zhang Z, Yu H, Ding C. *New J Chem*, 2019, 43: 7620–7627
38 Zhang P, Zhu MS, Luo H, Zhang Q, Guo LE, Li Z, Jiang YB. *Anal Chem*, 2017, 89: 6210–6215
39 Zhang P, Li S, Fu C, Zhang Q, Xiao Y, Ding C. *Analyst*, 2019, 144: 5472–5478
40 Peng X, Song F, Lu E, Wang Y, Zhou W, Fan J, Gao Y. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 4170–4171
41 Yang P, Zhao J, Wu W, Yu X, Liu Y. *J Org Chem*, 2012, 77: 6166–6178
42 Wu K, Zhang T, Wang Z, Wang L, Zhan L, Gong S, Zhong C, Lu ZH, Zhang S, Yang C. *J Am Chem Soc*, 2018, 140: 8877–8886
43 Liu F, Wang Z, Wang W, Luo JG, Kong L. *Anal Chem*, 2018, 90: 7467–7473

Design and real-time biologic imaging of an NIR ratiometric fluorescent probe for γ-glutamyltransferase activity

Peng Zhang[1], Shasha Li[1], Qian Zhang[1], Bingjian Liu[1], Caifeng Ding[1*], Yunbao Jiang[2]

[1] *Key Laboratory of Optic-electric Sensing and Analytical Chemistry for Life Science, MOE; Shandong Key Laboratory of Biochemical Analysis; Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Science in Universities of Shandong; College of Chemistry and Molecular Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China*

[2] *The MOE Key Laboratory of Spectrochemical Analysis and Instrumentation; Collaborative Innovation Center of Chemistry for Energy Materials (iChEM); Department of Chemistry, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China*

**Corresponding author (email: dingcaifeng@qust.edu.cn)*

Abstract: γ-Glutamyltranspeptidase (GGT) is considered as an important tumor marker, which is highly expressed in many human tumor tissues. Accurate detection of its activity is helpful for the early diagnosis and treatment of related diseases. In this work, a novel NIR ratiometric fluorescent probe (Cy-GGT) for GGT activity determination was developed by the judicious introduction of GSH, covalently bound to cyanine dye with a restriction site for GGT specifically. Upon the treatment with GGT in aqueous medium, by virtue of the excellent water solubility of Cy-GGT, the emission wavelength of Cy-GGT shifted from 808 to 616 nm, giving rise to an impressive emission displacement as far as 192 nm. The larger distance between the emission peaks can avoid the crosstalk between the two signals and improve the accuracy of detection. Cy-GGT shows a high selectivity for GGT activity with an LOD of 0.02 mU/mL. The ratiometric fluorescent probe was also workable for GGT activity determination and fluorescent imaging at cellular and *in vivo* levels, capable of distinguishing tumor cells from normal cells effectively. Encouraged by these pleasant performances, the application on early diagnosis and treatment of some certain cancers is expected and underway.

Keywords: γ-glutamyltranspeptidase, ratiometric fluorescent probe, near-infrared, large emission shift, cyanine

doi: 10.1360/SSC-2020-0042