中国科学: 化学 2017 年 第 47 卷 第 8 期: 1029 ~ 1034
SCIENTIA SINICA Chimica chemcn.scichina.com
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS
论 文 分子荧光探针专刊

溶酶体靶向的生物硫醇荧光探针的合成及应用研究

李玲玲, 吴明雨, 张宏, 李坤*, 余孝其*

绿色化学与技术教育部重点实验室; 四川大学化学学院, 成都 610064
*通讯作者, E-mail: kli@scu.edu.cn; xqyu@scu.edu.cn

收稿日期: 2017-03-22; 接受日期: 2017-05-02; 网络版发表日期: 2017-07-14
国家自然科学基金(编号: 21572147, 21232005)资助项目

摘要 生物硫醇是一类非常重要的活性物质, 在细胞的生长或凋亡过程中发挥着重要的作用. 本文以香豆素为荧光团, 吗啉为溶酶体靶向基团, 成功设计并合成了生物硫醇的荧光识别探针**Lyso-thiol**. 该探针可在磷酸盐缓冲溶液(PBS)体系中(pH 7.40)特异性地对生物硫醇产生"off-on"的荧光信号变化, 具有高选择性与灵敏度, 并可在较大浓度范围内对生物硫醇进行线性检测. 在生物硫醇的饱和浓度下, 探针最高可实现745倍的荧光强度增强. 该探针还具有良好的生物相容性、溶酶体靶向能力及细胞成像能力.

关键词 溶酶体靶向, 荧光探针, 硫醇检测, 细胞成像

1 引言

生物硫醇如半胱氨酸(Cys)、高半胱氨酸(Hcy)及谷胱甘肽(GSH)对细胞的生长、代谢、维持细胞内氧化还原的稳定等具有不可或缺的作用[1], 它的不正常表达与多种疾病息息相关. 例如, 生物体内过高浓度的Cys可导致神经中毒, 而过低浓度的Cys可导致嗜睡、头发脱色、肝损伤等疾病[2,3]; 人体血液内Hcy的过高表达已被证实与心血管疾病及阿尔兹海默症有关[4,5]; 而作为人体内含量最高的含巯基的三肽氨基酸, GSH的不正常生理浓度与艾滋病、白细胞损失、癌症等有重要关系[6~8]. 因此, 对生物硫醇的浓度监测对相关疾病的诊断具有重要意义.

在过去的几十年中, 研究者研究开发了许多生物硫醇的分析检测方法, 如高效液相色谱法(HPLC)[9]、毛细管电泳法[10]、分光光度法[11]、电化学法[12]、质谱法[13]和高效液相色谱-质谱联用法[14]等. 其中大多数方法都需要昂贵的仪器及复杂繁琐的制样过程, 并且在细胞等生物样品检测方面具有较大的局限性. 与它们相比, 荧光分析法具有高灵敏度、经济、实时检测、无损检测及生物相容性好等优点[15]. 因此, 开发生物硫醇荧光探针已经成为广泛关注的焦点. 近几年, 研究者在探针的选择性、灵敏性、检测限生物相容性等方面做出了不断的改进[16~31]. 同时, 为了更为深入地研究生物硫醇在不同细胞器的分布情况, 一些研究者合成并研究了线粒体靶向的生物硫醇探针[32~34], 而溶酶体靶向的生物硫醇探针还未被报道. 吗啉是应用较广的溶酶体靶向基团, 将其与*N*,*N*-二乙基香豆素相连, 以醛基作为生物硫醇反应活性基团合成并研究了图1所示探针**Lyso-thiol**的光学及生物学性质.

引用格式: 李玲玲, 吴明雨, 张宏, 李坤, 余孝其. 溶酶体靶向的生物硫醇荧光探针的合成及应用研究. 中国科学: 化学, 2017, 47: 1029–1034
Li L, Wu M, Zhang H, Li K, Yu X. The synthesis and application of a lysosome-targeted-fluorescent probe for the detection of biothiols. *Sci Sin Chim*, 2017, 47: 1029–1034, doi: 10.1360/N032017-00059

© 2017 《中国科学》杂志社

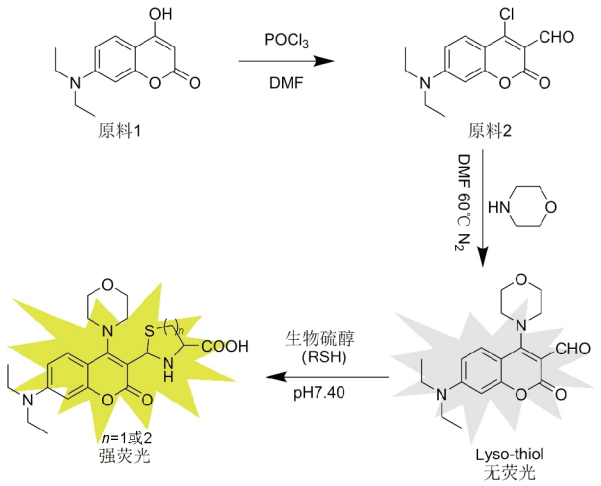


图 1 探针**Lyso-thiol**的合成及生物硫醇可能的识别机理(网络版彩图)

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

LCMS-IT-TOF型质谱仪(岛津, 日本); Bruker AV-400核磁共振仪(^{1}H: 400 MHz, ^{13}C: 100 MHz, 0.5%TMS为内标, 德国); FluoroMax-4 (JONIN-YVON, HORIBA, 德国)荧光光谱仪; U-1900 (HITACHI, 日本)紫外光谱仪; ZEISS LSM 780激光共聚焦荧光成像仪(德国).

所用试剂和药品除特别注明外, 未经进一步处理; 溶剂使用前都通过标准的方法进行纯化和干燥; 荧光实验过程中均使用3次超纯水, 色谱纯有机溶剂购自Rowe Scentific Inc. (澳大利亚)或Dikma Technologies Inc. (美国); 市售线粒体染料购自Invitrogen (美国). 薄层色谱(TLC)监测通过薄层硅胶板进行, 柱色谱分离采用青岛海洋化工厂生产的硅胶H (未加活化, 300~400目).

2.2 探针合成与表征

原料**2**的合成: 氮气保护, 20~50℃下, 向2.8 mL新蒸的二甲基甲酰胺(DMF)中逐滴加入2.8 mL $POCl_3$中, 搅拌30 min后, 溶液逐渐变红. 然后将溶于13.2 mL DMF中的原料**1** (2.33 g, 10 mmol)逐滴加入红色溶液中得到深红色悬浮液, 60℃下搅拌12 h. 用100 mL冰水淬灭反应, 20% NaOH溶液调节pH至大量沉淀产生, 过滤、干燥、乙醇重结晶后所得的粗产品直接用于下一步反应.

探针**Lyso-thiol**的合成: 氮气保护下, 向50 mL圆底烧瓶中加入原料**2** (100 mg, 0.36 mmol)和吗啉(157 mg, 1.8 mmol)于10 mL 重蒸DMF中, 60℃下反应30 min后, 用30 mL水淬灭反应, 用50 mL二氯甲烷萃取, 无水硫酸钠干燥后, 除去溶剂, 柱层析纯化(乙酸乙酯:石油醚=10:1), 得到产物**Lyso-thiol** (111 mg, 93%). 核磁共振氢谱(^{1}H NMR) (400 MHz, $CDCl_3$) δ 10.01 (s, 1H), 7.60 (d, J=9.2 Hz, 1H), 6.53 (d, J=9.2 Hz, 1H), 6.41 (s, 1H), 3.94 (s, 4H), 3.60 (s, 4H), 3.41 (q, J=6.8 Hz, 4H), 1.21 (t, J=6.7 Hz, 6H); 核磁共振碳谱(^{13}C NMR) (101 MHz, $CDCl_3$) δ 187.3, 165.2, 160.3, 157.4, 151.7, 128.6, 108.6, 104.8, 102.0, 97.9, 67.1, 54.1, 44.9, 12.5; m/z (HRMS)$[M+H]^+$: calculated, 331.1658; found, 331.1648.

3 结果与讨论

3.1 选择性实验

作为生物硫醇探针, 其对生物硫醇的特异性识别能力是评价其性能的重要参数. 因此, 我们首先研究了探针**Lyso-thiol**与生物硫醇(Cys、Hcy、GSH)、几种典型氨基酸(Met、Ala、Asp、Glu、Gly、His、Lys)、以及SO_2、HS^-分别作用14 h后的荧光变化情况. 如图2(a)及图S4 (见网络版补充材料)所示, 在pH 7.40的PBS缓冲溶液中, 探针**Lyso-thiol**与Cys, Hcy ([Cys]=500 μM, [Hcy]=600 μM, [GSH]=1 mM)分别作用后, 荧光强度约有190倍的增强, 而加入50倍当量的其他测试底物后, 荧光强度没有明显的变化, 说明探针对生物硫醇具有很好的选择识别性能.

其次, 研究了**Lyso-thiol**与生物硫醇作用前后的紫外光谱变化情况, 图2(b)为**Lyso-thiol**与Cys作用前后的紫外光谱图, 探针与Hcy和GSH作用后的紫外光谱图如图S1所示. 由图2(b)可以看出, 二者作用后紫外光谱发生了明显的蓝移(由413 nm移至370 nm), 说明此探针与生物硫醇发生了相互作用, 与Cys及Hcy发生了环化反应[35,36], 生成了如图1所示的强荧光物质.

3.2 探针对生物硫醇浓度的荧光响应

我们测试了**Lyso-thiol**的荧光强度随着生物硫醇浓度增加的变化. 从图3中的滴定实验结果可以发现, 随着Cys浓度的逐渐增加, 探针在455 nm处的荧光逐渐增强. 且Cys浓度在0~500 μM时, **Lyso-thiol**的荧光强度与Cys的浓度呈线性关系(R^2=0.99765). 同时, Hcy浓度

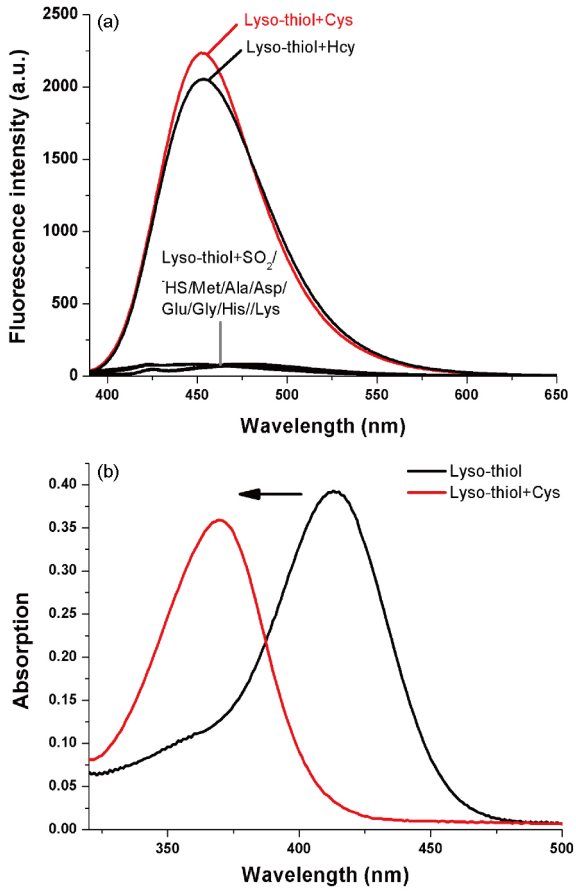


图 2　(a) 探针**Lyso-thiol**与活性硫醇Cys、Hcy、GSH及SO_2、HS^-、Met、Ala、Asp、Glu、Gly、His、Lys作用后荧光光谱图(λ_{ex}=370 nm); (b)探针**Lyso-thiol**与Cys作用前后紫外光谱图(探针浓度10 μM, [Cys]=500 μM,10 mM PBS缓冲液, pH 7.40) (网络版彩图)

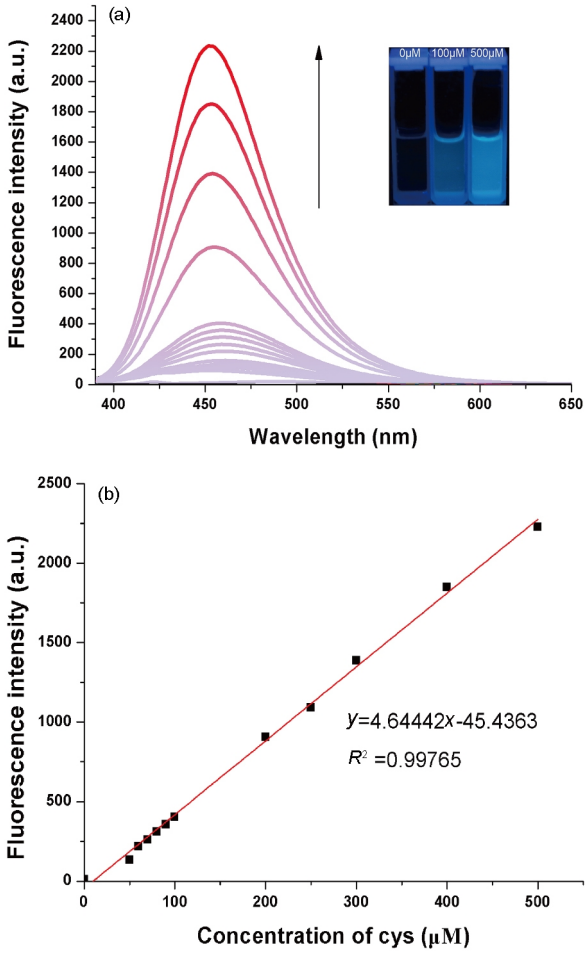


图 3　(a) 探针**Lyso-thiol**与不同浓度的Cys作用后的荧光光谱图, 插图为探针**Lyso-thiol**与Cys作用前后365 nm紫外灯下荧光颜色变化图; (b) 探针**Lyso-thiol**随着Cys浓度增加荧光强度变化情况. (λ_{ex}=370 nm, λ_{em}=455 nm, 探针浓度为10 μM, 10 mM PBS缓冲液, [Cys]=0~500 μM, pH 7.40) (网络版彩图)

在0~3 mM (图S2), GSH浓度在0~6 mM (图S3)时, **Lyso-thiol**的荧光强度也分别与相应的硫醇浓度呈线性增强. 由此可知, 探针可以定量检测较大浓度区间内的生物硫醇浓度. 饱和生物硫醇浓度下, 荧光强度最高可增强745倍(图S4). 根据滴定曲线还可以分别计算得到**Lyso-thiol**对Cys、Hcy、GSH的检测限分别为0.12、0.076、0.37 μM, 说明探针具有较高的灵敏度. 而探针与Cys作用后量子产率由0.23%增强到4.5% (图S5).

3.3　反应动力学研究

为了研究探针与生物硫醇的作用时间, 我们进行了荧光动力学研究. 如图S6所示, **Lyso-thiol**与200 μM Cys作用后, 反应体系的荧光强度起初随时间的增加而增强, 后逐渐趋于平稳, 约13.4 h后达到平衡. 探针与Hcy、GSH的饱和作用时间分别为13.7和12 h (图S7, S8), 荧光增强倍数皆为100倍以上. 而且探针与Hcy作用时间达30 min时, 荧光增强倍数也达到了3倍以上, 说明探针也可以满足短时间内检测生物硫醇的需要.

3.4　细胞毒性与荧光成像

我们考察了**Lyso-thiol**在人宫颈癌细胞系(HeLa)中的毒性(图S9). 结果表明, 在探针浓度为32 μM时, 仍有超过95%的细胞是存活的, 表明**Lyso-thiol**的细胞毒性是比较小的.

为了验证**Lyso-thiol**的溶酶体靶向性, 将探针和市

售溶酶体染料Lysotracker Deep Red在人肝肿瘤细胞(HepG 2)和HeLa细胞中进行了共染实验. HepG 2和HeLa细胞皆采用DMEM培养基培养. 培养基中含有10% (*v*/*v*)的胎牛血清(FBS)、1% (*v*/*v*)的双抗(青霉素-链霉素, 100 kU/L). 将细胞置于37℃, 5% CO_2的培养箱中培养. 在进行荧光成像实验之前, 细胞用PBS清洗3次, 然后加入5 μM **Lyso-thiol**和1 μM Lysotracker Deep Red, 37℃下培养30 min. 培养完毕后, 取出培养皿, 再用PBS清洗3次, 然后在激光共聚焦荧光成像仪下成像. 从图4中可以看到, Lysotracker的红色荧光和**Lyso-thiol**的绿色荧光具有很好的匹配度, 皮尔逊相关系数可分别达到0.94和0.93, 说明吗啉修饰的**Lyso-thiol**确实具有很好的溶酶体靶向性. 同时, 虽然探针在pH 7.40的PBS缓冲溶液中与生物硫醇达到稳定的作用时间需要12 h以上, 但共定位实验表明, 探针与细胞共同培养30 min也可以有很好的成像效果.

为了更深入地了解探针对细胞内生物硫醇的检测

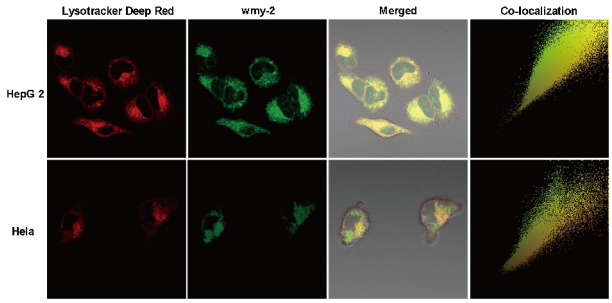


图 4 探针**Lyso-thiol**分别在HepG 2细胞与HeLa细胞中溶酶体共定位成像(皮尔逊相关系数分别为0.94和0.93, 探针浓度为5 μM) (网络版彩图)

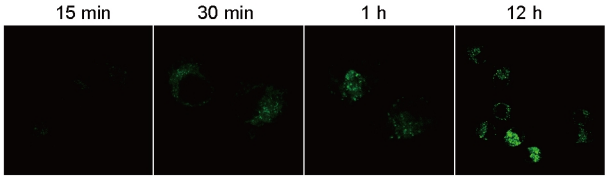


图 5 探针**Lyso-thiol**在HeLa细胞中的荧光强度随着时间(探针与HeLa细胞分别作用15、30 min、1 h和12 h)的变化情况(网络版彩图)

性能, 我们进一步探索了探针在细胞内荧光强度随培养时间的变化情况(图5). 将探针与HeLa细胞分别作用15、30 min、1 h和12 h后, 用PBS洗3次, 再用多聚甲醛固定后用于共聚焦成像. 预计与探针共同培养了12 h的细胞样品将具有最强的荧光强度, 为确保该组细胞的共聚焦图片不过分曝光, 我们把本次实验中的共聚焦参数以该样品为基准进行了设置, 以确保各组样品的实验参数一致. 可以看出, 随着时间进行, 细胞内荧光强度与时间成正比, 在12 h时达到最亮, 说明探针**Lyso-thiol**可以用于细胞内源性活性硫醇的检测.

4 结论

我们设计合成了基于*N*,*N*-二乙基香豆素的溶酶体靶向生物硫醇探针**Lyso-thiol**. 实验结果表明, **Lyso-thiol**可以选择性地对生物硫醇产生“off-on”的荧光信号响应, 能够在较宽的浓度范围内实现对生物硫醇的检测. 细胞实验结果表明, **Lyso-thiol**具有较低的毒性和很好的溶酶体靶向性, 能够实现活细胞内对生物硫醇的选择性检测, 为研究细胞内溶酶体的生物硫醇提供了一个可行的新方法.

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 Peng H, Chen W, Cheng Y, Hakuna L, Strongin R, Wang B. *Sensors*, 2012, 12: 15907–15946
2 Deng L, Wu W, Guo H, Zhao J, Ji S, Zhang X, Yuan X, Zhang C. *J Org Chem*, 2011, 76: 9294–9304
3 Shao N, Jin JY, Cheung SM, Yang RH, Chan WH, Mo T. *Angew Chem Int Ed*, 2006, 45: 4944–4948
4 Pushpakumar S, Kundu S, Sen U. *Curr Med Chem*, 2014, 21: 3662–3672
5 Lee HY, Choi YP, Kim S, Yoon T, Guo Z, Lee S, Swamy KMK, Kim G, Lee JY, Shin I, Yoon J. *Chem Commun*, 2014, 50: 6967–6969
6 Yin C, Huo F, Zhang J, Martínez-Máñez R, Yang Y, Lv H, Li S. *Chem Soc Rev*, 2013, 42: 6032–6059
7 Yang Y, Huo F, Yin C, Zheng A, Chao J, Li Y, Nie Z, Martínez-Máñez R, Liu D. *Biosens Bioelectron*, 2013, 47: 300–306

8 Yin J, Kwon Y, Kim D, Lee D, Kim G, Hu Y, Ryu JH, Yoon J. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 5351–5358
9 Ivanov AR, Nazimov IV, Baratova LA. *J Chromatogr A*, 2000, 870: 433–442
10 Inoue T, Kirchhoff JR. *Anal Chem*, 2002, 74: 1349–1354
11 Liang G, Ronald J, Chen Y, Ye D, Pandit P, Ma ML, Rutt B, Rao J. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 6283–6286
12 Wang W, Li L, Liu S, Ma C, Zhang S. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 10846–10847
13 Xu K, Zhang Y, Tang B, Laskin J, Roach PJ, Chen H. *Anal Chem*, 2010, 82: 6926–6932
14 Seiwert B, Karst U. *Anal Chem*, 2007, 79: 7131–7138
15 Long L, Zhou L, Wang L, Meng S, Gong A, Du F, Zhang C. *Org Biomol Chem*, 2013, 11: 8214–8220
16 Bu LL, Chen JQ, Wei XD, Li X, Agren H, Xie YS. *Dyes Pigment*, 2017, 136: 724-731
17 Song L, Ma LM, Sun Q, Zhang WB, Lan MB, Qian JH. *Chin Chem Lett*, 2016, 27: 330–334
18 Qi F, Liu X, Yang L, Yang L, Chen W, Song X. *Tetrahedron*, 2016, 72: 6909–6913
19 Chen C, Liu W, Xu C, Liu W. *Biosens Bioelectron*, 2016, 85: 46–52
20 Lee KS, Park J, Park HJ, Chung YK, Park SB, Kim HJ, Shin IS, Hong JI. *Sensors Actuat B-Chem*, 2016, 237: 256–261
21 Yin C, Zhang W, Liu T, Chao J, Huo F. *Sensors Actuat B-Chem*, 2017, 246: 988–993
22 Wang J, Zhou C, Zhang J, Zhu X, Liu X, Wang Q, Zhang H. *Spectrochim Acta Part A-Mol Biomol Sp*, 2016, 166: 31–37
23 Yang Y, Huo FJ, Yin C, Chao J, Zhang Y. *Dyes Pigments*, 2015, 114: 105–109
24 Xue S, Ding S, Zhai Q, Zhang H, Feng G. *Biosens Bioelectron*, 2015, 68: 316–321
25 Qu HR, Zhang ZY, Wang N, Sun Q, Liu SS, Zhang WB, Qian JH. *Chin Chem Lett*, 2015, 26: 1249–1254
26 Liu Y, Liu Y, Liu W, Liang S. *Spectrochim Acta Part A-Mol Biomol Sp*, 2015, 137: 509–515
27 A. AH, G. UR, Ali F, Taye N, Chattopadhyay S, Das A. *Chem Commun*, 2015, 51: 15592–15595
28 Ali F, H. A. A, Taye N, Gonnade RG, Chattopadhyay S, Das A. *Chem Commun*, 2015, 51: 16932–16935
29 Han X, Yu F, Song X, Chen L. *Chem Sci*, 2016, 7: 5098–5107
30 Yin K, Yu F, Zhang W, Chen L. *Biosens Bioelectron*, 2015, 74: 156–164
31 Yu F, Gao M, Li M, Chen L. *Biomaterials*, 2015, 63: 93–101
32 Lim CS, Masanta G, Kim HJ, Han JH, Kim HM, Cho BR. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 11132–11135
33 Zhang H, Wang C, Wang K, Xuan X, Lv Q, Jiang K. *Biosens Bioelectron*, 2016, 85: 96–102
34 Zhang J, Bao X, Zhou J, Peng F, Ren H, Dong X, Zhao W. *Biosens Bioelectron*, 2016, 85: 164–170
35 Kim TK, Lee DN, Kim HJ. *Tetrahedron Lett*, 2008, 49: 4879–4881
36 Liu X, Xi N, Liu S, Ma Y, Yang H, Li H, He J, Zhao Q, Li F, Huang W. *J Mater Chem*, 2012, 22: 7894–7901

The synthesis and application of a lysosome-targeted-fluorescent probe for the detection of biothiols

Lingling Li, Mingyu Wu, Hong Zhang, Kun Li*, Xiaoqi Yu*

Key Laboratory of Green Chemistry and Technology, Ministry of Education, College of Chemistry, Sichuan University, Chengdu 610064, China
**Corresponding authors (email: kli@scu.edu.cn; xqyu@scu.edu.cn)*

Abstract: As an important member of bio-active species, biological thiols have been proved to play pivotal roles in cellular growth in cells. In this paper, we have designed and synthesized a new coumarin-based off-on fluorescent probe **(Lyso-thiol**) for the selective detection of biothiols in aqueous solution and in living cells. **Lyso-thiol** has been prepared by a 2-step procedure using morpholine as the lysosome-targeting group. The probe has successfully realized the linear quantitative detection of biothiols in a relatively large concentration scope. Moreover, under the saturated concentration of the biological thiols, the fluorescence intensity of the probe can be enhanced by as much as 745 times. The intracellular experiments have also confirmed the low cytotoxity and exceptional biocompatibility of the probe. It is validated both in HeLa and HepG 2 cells that **Lyso-thiol** is capable of specifically targeting lysosome and vividly imaging biothiols in cellular level.

Keywords: lysosome-targeted, fluorescent probe, biothiols detection, intracellular imaging

doi: 10.1360/N032017-00059