

基于香豆素荧光团的新型极性检测荧光探针的开发及其成像应用

宋思睿^a 唐永和^a 孙良广^b 郭锐^a 姜冠帆^a 林伟英^{*,a}

(^a广西电化学能源材料重点实验室 广西大学光功能材料与化学生物学研究院 广西大学化学化工学院 南宁 530004)

(^b广西农业职业技术大学 南宁 530007)

摘要 极性是生物微环境的重要参数之一,在很大程度上,生物体内许多生命活动都受到极性变化的影响,本工作通过改变香豆素母体上的推-拉电子基团,设计并合成了一种具有较大斯托克斯位移的新型极性荧光探针 **COM-PO**,该探针的荧光强度和波长会随着测试体系的极性变化而发生改变.当极性增加时,**COM-PO** 的激发态能量会通过偶极-偶极的相互作用散失在溶剂中,荧光发射强度降低,而在低极性溶剂中荧光发射强度增强,利用这种特性实现了对极性的检测.本工作通过荧光光谱、荧光成像实验表明 **COM-PO** 能够在样品中实现极性检测,该探针有望实现与极性相关的疾病的早期诊断.

关键词 极性;香豆素;荧光探针;荧光成像

Development of a Novel Fluorescent Probe Based on Coumarin Fluorophore for Polarity Detection and Its Imaging Applications

Song, Sirui^a Tang, Yonghe^a Sun, Liangguang^b Guo, Rui^a Jiang, Guanfan^a Lin, Weiying^{*,a}

(^a Guangxi Key Laboratory of Electrochemical Energy Materials, Institute of Optical Materials and Chemical Biology, School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004, China)

(^b Guangxi Agricultural Vocational University, Nanning 530007, China)

Abstract Polarity is one of the important factors in cell microenvironment. Polarity, to a large extent, is involved in various physiological activities and has an important influence on many life activities of organisms. Studies show that many metabolic diseases in the body can cause polarity changes, such as diabetes, fatty liver, atherosclerosis, and so on. Therefore, it is important to detect polarity changes in living organisms. In this paper, a novel polar fluorescent probe **COM-PO** with large Stokes-shift was designed and synthesized by altering the push and pull electron groups on coumarin to alter the intramolecular charge transfer (ICT). The fluorescence intensity and wavelength of the probe changed with the polarity of the test system. In polar solvents, the excited state energy of **COM-PO** dissipates in the solvent through dipole-dipole interaction, and its fluorescence emission intensity decreases. On the contrary, the fluorescence emission intensity of the probe increases significantly in low polar solvents. Since the probe has a large Stokes shift, it can avoid the relatively high signal-to-noise ratio and the serious fluorescence self-extinguishing in the imaging process. Therefore, we applied the probe to cell diagnosis and *in vivo* disease diagnosis. It is well known that cancer cells are less polar than normal cells, and when the probe enters cancer cells, their fluorescence intensity increases by two to three times compared to normal cells. The fluorescence intensity of the probe **COM-PO** was also twice as high as that of the normal mice. The **COM-PO** probe was tested by solution spectroscopy, cell imaging, tissue imaging and mouse *in vivo* imaging. The experimental results show that the probe **COM-PO** has the advantages of high polarity sensitivity, high selectivity, strong pH adaptability and good biocompatibility, and can detect the polarity changes of abnormal states of cells, tissues and even livers, which is expected to realize the early diagnosis of polarity related diseases.

Keywords polarity; coumarin; fluorescent probe; fluorescence imaging

1 引言

极性是描述生物体内微环境变化的重要参数之一.生物体内的各项生命活动与极性的变化有着密不可分的关系,如细胞分裂^[1]、膜的融合、蛋白质堆积和脂肪

组织的形成^[2],同时极性的变化还会影响到某些生物酶的活性,进而促使一系列的生理或病理的发生.人体内极性的异常与许多代谢性疾病密切相关,如糖尿病、脂肪肝、动脉粥样硬化等^[3-4].所以,实时准确检测极性的变化在由极性变化导致的疾病的早期诊断研究中具有

* E-mail: weiyinglin2013@163.com

Received June 13, 2022; published August 24, 2022.

Supporting information for this article is available free of charge via the Internet at <http://sioc-journal.cn>.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21672083, 21877048, 22077048, 22104019), the Natural Science Foundation of Guangxi Province (Nos. 2021GXNSFDA075003, AD21220061, 2019GXNSFBA245068) and the Startup Fund of Guangxi University (No. A3040051003).

项目受国家自然科学基金(Nos. 21672083, 21877048, 22077048, 22104019)、广西省自然科学基金(Nos. 2021GXNSFDA075003, AD21220061, 2019GXNSFBA245068)和广西大学启动基金(No. A3040051003)资助.

重大的意义。

尽管电化学分析、光谱分析和色谱分析等几种分析方法在极性检测中发展迅速,但是这些极性检测方法在检测生物内原位微环境的极性仍然存在诸多困难,如检测样品制备和操作的复杂性。相比之下,荧光探针技术具有高的灵敏性、优异的选择性和简单的操作性等优点^[5-21],可以通过荧光信号的改变实现对微环境的监测,适用于原位追踪检测微环境中温度、极性、pH 和粘度的变化。

基于香豆素荧光团,本工作设计合成了一种极性敏感型荧光探针 **COM-PO**。该探针具有极性灵敏性、高选择性、优良的 pH 适应性以及杰出的生物相容性。利用构建的荧光探针,我们实现了对肝脏疾病的极性检测。

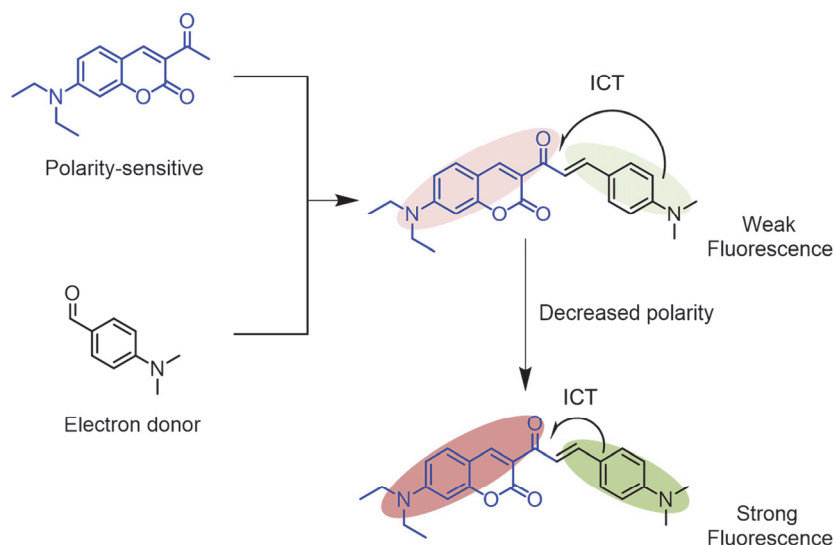
2 结果与讨论

2.1 探针 COM-PO 的设计与合成

香豆素化合物具有光物理性质好,如荧光量子产率高等特点^[22-23]受到广大研究人员的关注,本工作基于香

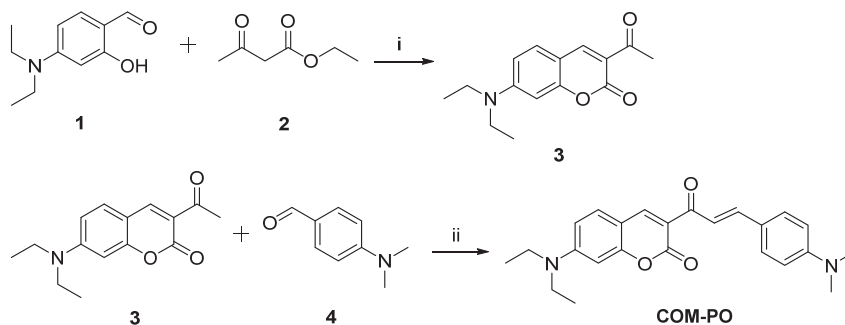
豆素荧光团设计并合成一种新型极性荧光探针 **COM-PO** 并探究其性能和应用。如图式 1 所示,香豆素荧光团作为一个极性敏感基团,在经历电子跃迁时显示出偶极矩的实质性变化,这对极性响应至关重要^[24-25]。对二甲氨基苯甲醛作为电子供体,它的引入可能会使整个分子形成较大的共轭体系,使探针相较于普通香豆素具有更大的共轭系统而可能发生红移,有利于器官和体内成像。当 **COM-PO** 处于低极性的环境时,会因为电离较小而与周围溶剂相互作用较弱,从而发出较强的荧光^[26]。当其处于极性较高的环境时,会由于偶极矩的增强,探针的激发态能量快速消散,分子内电荷转移(ICT)效应也相应增强,从而荧光大大减弱^[27]。同时 **COM-PO** 较大的斯托克斯位移,避免了成像过程中相对较高的信噪比和成像过程中严重的荧光自猝灭。本工作提出的荧光探针可用于肝类疾病的检测。

如图式 2 所示,探针 **COM-PO** 的合成经过了两步有机合成,详细实验过程与表征数据见实验部分。



图式 1 **COM-PO** 的反应机理

Scheme 1 The mechanism of **COM-PO**



图式 2 **COM-PO** 的合成路线

Scheme 2 Synthetic route of **COM-PO**

Reagents and conditions: (i) Compound 1, compound 2, ethanol, 85 °C, 4 h. (ii) Compound 3, compound 4, ethanol, 85 °C, 8 h

2.2 探针 COM-PO 的光谱性质

取 1.56 mg 的 COM-PO 将其溶于 4 mL 的二甲基亚砜中配制为探针测试母液. 本工作选用六种极性不同的溶剂(1,4-二氧六环、四氢呋喃、甲醇、乙腈、二甲基亚砜、磷酸盐缓冲溶液(PBS))用于探究 COM-PO 在不同极性溶剂中的光学性质. 结果如图 1(A)所示, 在实验中的六种不同极性体系, 随着实验所用溶剂的极性增加, 该探针的最大吸收波长逐渐发生红移现象. 随后我们对该探针进行了相应的荧光光谱测试. 如图 1(B)以及表 1 所示, 在六种不同极性溶剂中, 随着溶剂的极性增加,

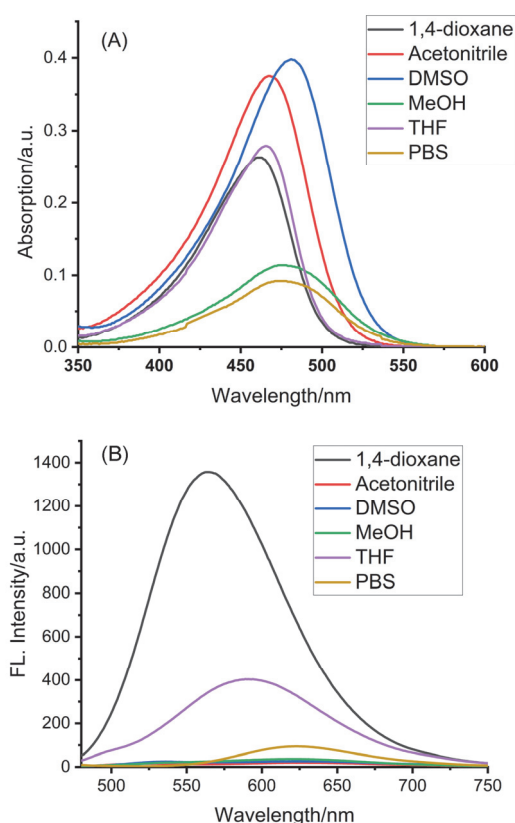


图 1 (A) COM-PO ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)在不同极性溶剂中的紫外可见吸收光谱. (B) COM-PO ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)在不同极性溶剂中的荧光发射光谱
Figure 1 (A) UV absorption spectra of COM-PO ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in different polarity solvents. (B) Fluorescence emission spectra of COM-PO ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in different polarity solvents

表 1 探针 COM-PO 在不同溶剂中的光谱特性

Table 1 The spectroscopic characteristics of the probe COM-PO in different solvents

Solvent	$\varepsilon/(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1})$	λ_b/λ_a (nm)	$\Delta\lambda_s$ (斯托克斯位移)/nm
1,4-Dioxane	5.45×10^3	460/564	96
THF	2.36×10^3	465/590	125
MeOH	5.78×10^4	475/620	145
DMSO	8.25×10^4	480/625	145
Acetonitrile	7.77×10^3	468/580	112
PBS	6.73×10^3	479/627	148

ε : Molar extinction coefficient; λ_a : extinction maximum; λ_b : emission maximum.

COM-PO 的最大发射峰波长发生了 64 nm 红移, 同时探针的发射强度显著下降近 900 倍. 这是因为在极性增加的状态下, COM-PO 的激发态能量会通过偶极-偶极的相互作用散失在溶剂中^[28], 从而降低其荧光发射强度, 实验结果表明该探针可以在不同极性状态下展示出不同的吸收及荧光性质, 具有良好的极性敏感性.

为了进一步证明探针 COM-PO 的极性检测能力, 我们测试了探针在不同极性测试体系(1,4-二氧六环和 PBS 溶液混合测试体系, 1,4-二氧六环体积分数为 20%~100%)下的荧光光谱. 结果如图 2 所示, 在 1,4-二氧六环含量从 20%逐渐增加到 100%的过程中, 溶剂的极性不断降低, COM-PO 的最大荧光发射峰波长发生了约 26 nm 的蓝移现象, 这一变化规律与 COM-PO 在不同极性溶剂中的表现是一致的. 在蓝移现象发生的同时, 该探针的荧光强度也发生显著变化, COM-PO 的荧光强度增强了约 900 倍, 由此可知该探针的荧光强度与测试体系的极性大小密切相关. 综上所述, COM-PO 会因为环境中极性的变化而出现规律性的变化, 呈现出显著的极性递变检测能力, 表明该探针具有潜在的生物极性检测利用价值.

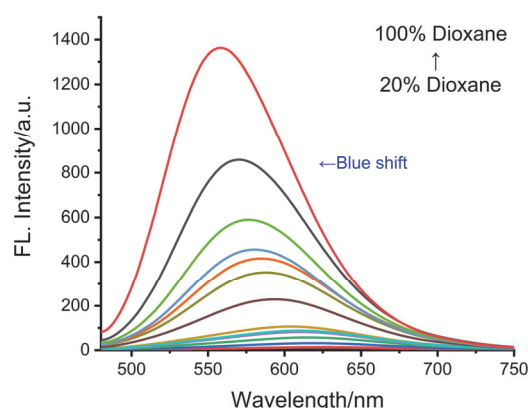


图 2 COM-PO ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)在 1,4-二氧六环-PBS 混合溶剂体系中的荧光发射光谱(百分数代表混合溶剂中 1,4-二氧六环的体积分数)
Figure 2 Fluorescence emission spectra of COM-PO ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in dioxane-water mixed solvent system (percentage represents volume fraction of dioxane content in mixed solvent)

作为潜在的生物极性检测试剂, 该探针应该具有优良的化学稳定性能. 其中 pH 作为影响微环境的重要因素之一^[29], 同时也是干扰荧光探针分子在生物体内应用的因素之一, 我们测试了 COM-PO 在不同 pH 下的荧光发射光谱. 如图 S1(见支持信息)所示, pH 由 4 增加至 10 的过程中, COM-PO 的荧光强度并没有发生较大的偏移, 没有随着 pH 的变化而变化. 由此可得, pH 对 COM-PO 的荧光强度影响很小, 不会因为 pH 的变化而出现很大的差异, 故该探针可以很好地应用于极性的检测而不受环境酸碱度的影响.

生物体内还存在许多复杂的成分(无机离子和氨基

酸等)也会影响探针极性检测的准确度. 因此我们测试了 **COM-PO** 在无机离子和氨基酸存在的情况下的不同极性下荧光发射光谱(黑色: $V_{\text{PBS}}:V_{1,4\text{-二氧六环}}=8:2$; 红色: $V_{\text{PBS}}:V_{1,4\text{-二氧六环}}=5:5$). 如图 3 所示, 在无机离子和氨基酸存在的情况下, 同一极性条件中加入不同的干扰物, 探针的荧光强度几乎不发生改变, 该实验结果表明 **COM-PO** 具有优良稳定性, 可以在生物体复杂的微环境中精准识别极性的变化.

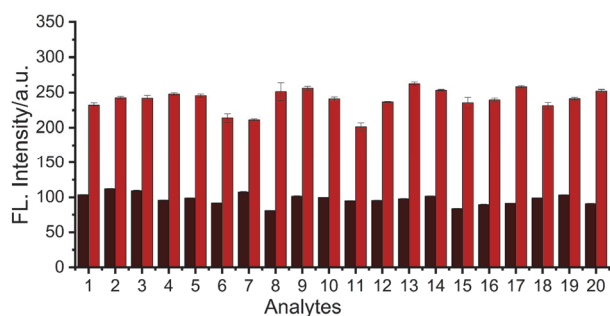


图 3 **COM-PO** ($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 在不同无机离子和氨基酸的荧光发射柱状图

Figure 3 Fluorescence emission histograms of **COM-PO** ($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in different inorganic ions and amino acids

The numbers represent: 1. CaCl_2 ; 2. NaClO ; 3. CuSO_4 ; 4. $L\text{-Cys}$; 5. NaF ; 6. GSH ; 7. H_2O_2 ; 8. $DL\text{-Hcy}$; 9. KI ; 10. MgCl_2 ; 11. MnCl_2 ; 12. Na_2S ; 13. Na_2SO_4 ; 14. ZnCl_2 ; 15. $L\text{-Met}$; 16. TBHP ; 17. $L\text{-Arg}$; 18. $L\text{-Lys}$; 19. $L\text{-Val}$; 20. Na_2SO_3 ($p < 0.05$)

光学测试结果表明该探针极性响应呈现规律性变化, 并且排除生物体内其他因素干扰, 可进一步应用于生物体内极性的检测.

2.3 探针 **COM-PO** 的细胞成像实验

作为细胞微环境指示剂, 探针 **COM-PO** 应具有较高的生物相容性, 所以我们对探针进行了细胞毒性实验. 根据甲基噻唑基四唑法(MTT)测定了不同浓度下(2, 5, 10, 20, 30, 40, $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的细胞毒性(图 S2, 见支持信息), 在探针浓度为 $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的条件下细胞的存活率仍高达 90%以上, 由此可知该探针具有较低的细胞毒性, 进一步说明该探针具有潜在的生物微环境应用的能力.

研究表明异常细胞中的极性低于正常细胞^[30-31], 因此我们设计了荧光共聚焦成像实验来验证该探针是否能够有效区分正常细胞与疾病细胞中不同的极性. 我们选取四种不同的细胞(Hela 细胞和 HL-7702 细胞, 3T3 细胞和 4T1 细胞), 使用含 **COM-PO** ($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 培养液孵育 30 min 后进行成像实验(图 4). 可以观察到该探针在异常细胞 Hela 和 4T1 中有很强的橙色荧光, 但是在正常细胞 HL-7702 和 3T3 中荧光很弱, 平均荧光强度为异常细胞的 1/3. 结果表明该探针可以作为有效的细胞内极性示踪剂, 在异常细胞中发出较强的荧光, 因此我们有望实现该探针与极性相关的疾病的早期诊断.

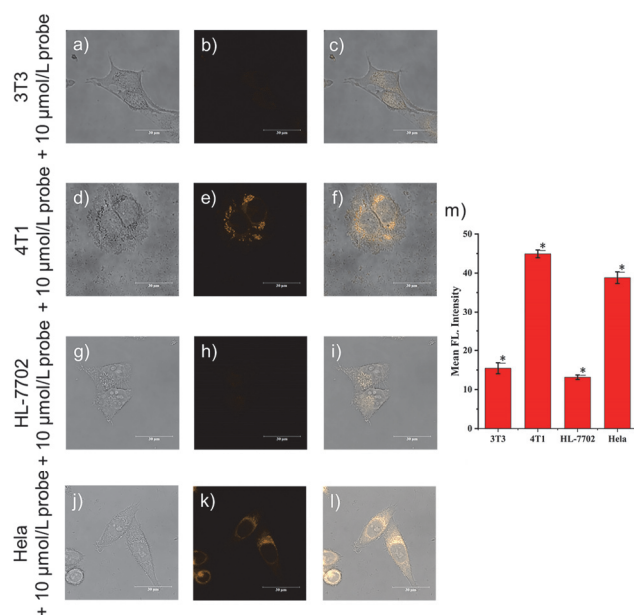


图 4 (a~c) 用探针 **COM-PO** ($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理后的 3T3 细胞成像图; (d~f) 用探针 **COM-PO** ($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理后的 4T1 细胞成像图; (g~i) 用探针 **COM-PO** ($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理后的 HL-7702 细胞成像图; (j~l) 用探针 **COM-PO** ($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理后的 Hela 细胞成像图; (m) 四组细胞成像的荧光强度对比图(* $p < 0.05$)

Figure 4 (a~c) Imaging plots of 3T3 cells treated with probe **COM-PO** ($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); (d~f) imaging plots of 4T1 cells treated with probe **COM-PO** ($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); (g~i) imaging plots of HL-7702 cells treated with probe **COM-PO** ($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); (j~l) imaging plots of Hela cells treated with probe **COM-PO** ($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); (m) comparison of the fluorescence intensity of the four groups of cells imaged (* $p < 0.05$)

2.4 探针 **COM-PO** 的肝脏疾病成像

肝脏作为脊椎动物体内的重要器官, 参与许多重要的生理功能, 如维生素和激素代谢、胆汁分泌、解毒、脂质代谢等^[32]. 因此, 开发一种能够对肝脏疾病进行早期诊断的荧光探针是至关重要的.

实验小鼠经解剖后取出肝脏, 用适量 PBS 溶液($\text{pH} = 7.42$)洗净肝脏上附着的血水后, 将正常肝脏模型(图 5(a))和脂肪肝疾病模型(图 5(b))分别浸泡在含 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 探针的 PBS 溶液 1 h, 然后使用小动物活体成像系统进行组织荧光成像实验. 结果显示(图 5(c)), 正常肝脏显示较弱荧光, 而在脂肪肝模型组中显示出强烈

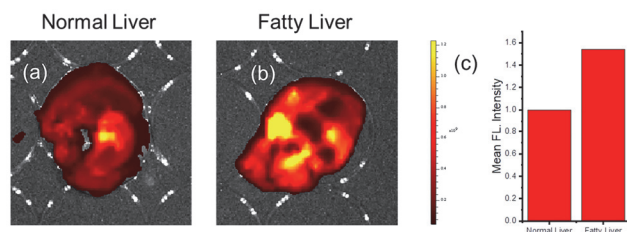


图 5 探针 **COM-PO** 在(a)正常肝脏和(b)脂肪肝中不同的荧光强度的成像图; (c) 探针 **COM-PO** 在不同肝脏中荧光强度对比图

Figure 5 Different fluorescence intensities of probe **COM-PO** when using in (a) normal liver and (b) fatty liver; (c) comparative diagram of the fluorescence intensity of probe **COM-PO** in different livers

的荧光, 两者形成鲜明对比. 这一结果表明该探针能够作为一种生物体内的极性示踪剂, 在疾病肝脏中显著发光, 进一步说明了该探针有望实现与极性相关疾病的早期诊断.

2.5 探针 COM-PO 的活体小鼠成像

经过小鼠肝脏组织实验后, 我们对体内肝炎的小鼠模型进行了体内成像对照实验. 我们通过腹腔内注射脂多糖(LPS)诱导小鼠肝炎疾病, 然后将探针 **COM-PO** ($10\ \mu\text{L}$, $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)注射到小鼠腹腔内 30 min 后进行成像实验. 如图 6 所示, 小鼠肝炎模型在体内的荧光强度比正常小鼠高 25 倍, 这与肝脏实验结果一致, 证明了 **COM-PO** 具有用于体内肝病病变诊断的潜力.

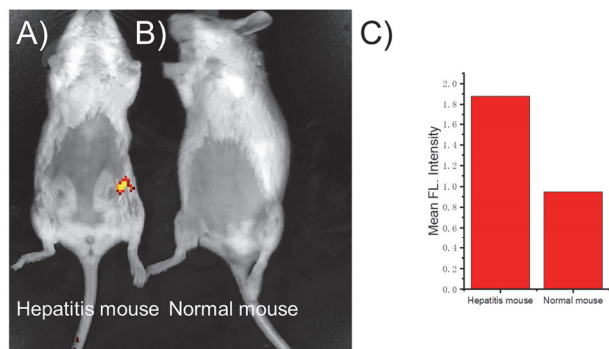


图6 探针 **COM-PO** 在活体小鼠体内的荧光成像. (A) 注射 **COM-PO** 的肝炎小鼠模型; (B) 注射 **COM-PO** 的正常小鼠模型; (C) 探针 **COM-PO** 在不同小鼠体内荧光强度对比图($\lambda_{\text{ex}}=480\ \text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=570\ \text{nm}$)
Figure 6 Fluorescence imaging of living mice. (A) The image of hepatitis mouse injected with **COM-PO**; (B) the normal mouse model injected with **COM-PO**; (C) the relative fluorescence intensities of mouse model ($\lambda_{\text{ex}}=480\ \text{nm}$, $\lambda_{\text{em}}=570\ \text{nm}$)

3 结论

在本工作中, 我们在传统香豆素化合物基础上进行合理的结构改造, 设计并合成了对极性敏感的探针 **COM-PO**. 光学实验表明该探针具有较高的极性敏感性以及较好的化学稳定性能, 随后的成像实验表明该探针能够检测不同生物样品中极性的状态. 更重要的是, 我们检测到了肝脏发生病变(如脂肪肝)时极性相对于正常肝脏发生了显著变化, 因此该探针有望通过极性检测来为相关疾病的早期诊断提供实验支撑.

4 实验部分

4.1 仪器与试剂

本实验所用试剂均为市面所售的化学纯或试剂纯产品, 未经纯化直接使用. 所使用的超纯水为实验室自制. 小鼠乳腺肿瘤细胞系(4T1 细胞), 小鼠胚胎成纤维细胞系(3T3 细胞), 人宫颈癌细胞系(Hela 细胞)和人肝脏正常细胞(HL7702 细胞)购自卓强生物技术公司. ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据在 Bruker Avance III HD 500 MHz

数字核磁共振仪(德国)上获得, 分别以 CDCl_3 - d_6 为溶剂, 以四甲基硅烷(TMS)为内参照. 高分辨率质谱(HR-MS)由 Agilent 6520a 系列 Q-TOF LC/MS 系统(美国)获得. 吸收光谱是用岛津 UV-2700 紫外可见分光光度计(日本)测量的, 荧光光谱是用日立 F4700 荧光光度计(日本)记录的. 荧光成像实验是在 Leica SP8 DIVE 荧光显微镜(德国)上进行的. 实验所用溶液的 pH 值是上海仪电科学仪器股份有限公司的 PHS-3C 测量的. 六周龄实验小鼠购买自广西医科大学. 小鼠成像实验使用 PerkinElmer IVIS 得到数据.

4.2 探针合成

4.2.1 化合物 3 的合成

在 100 mL 圆底烧瓶中加入化合物 **1** (4-二乙氨基水杨醛, 3.8 g, 30.3 mmol)以及化合物 **2** (乙酰乙酸乙酯, 3.9 g, 30 mmol), 加入 50 mL 的乙醇加热回流使其溶解. 反应 4 h 后, 用薄层色谱跟踪反应进度, 反应完全后, 冷却至室温 12 h 后有橙色晶体析出, 抽滤得到化合物 **3** (5.2 g, 20 mmol), 产率 66.7%.

4.2.2 COM-PO 的合成

称取化合物 **3** (259 mg, 1 mmol) 置于 150 mL 的圆底烧瓶中, 加入化合物 **4** (4-(二甲基氨基)-苯甲醛, 208 mg, 1.4 mmol), 向体系中加入 8 mL 的无水乙醇, 摇匀后再加入催化量的六氢吡啶, 在氮气的保护下回流, 反应 8 h. 用薄层色谱跟踪反应进度, 反应完全后, 停止反应. 冷却至室温, 减压抽滤, 制样, 用柱色谱进行纯化, 洗脱液为石油醚/乙酸乙酯(体积比 10:1), 然后进行减压蒸出溶剂, 最终得到 **COM-PO** 192 mg, 产率 51.1%. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 - d_6) δ : 8.54 (s, 1H), 7.97 (d, $J=15.5\ \text{Hz}$, 1H), 7.84 (d, $J=15.5\ \text{Hz}$, 1H), 7.60 (d, $J=8.8\ \text{Hz}$, 2H), 7.41 (d, $J=8.9\ \text{Hz}$, 1H), 6.68 (dd, $J=35.3, 5.6\ \text{Hz}$, 2H), 6.61 (dd, $J=8.9, 2.5\ \text{Hz}$, 1H), 6.49 (d, $J=2.3\ \text{Hz}$, 1H), 3.45 (q, $J=7.1\ \text{Hz}$, 4H), 3.04 (s, 6H), 1.24 (t, $J=7.1\ \text{Hz}$, 6H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 - d_6) δ : 186.18, 160.93, 158.44, 152.63, 148.15, 144.56, 131.53, 130.73, 117.51, 109.66, 108.68, 96.60, 45.11, 40.21, 12.49. HR-MS (ESI) calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 391.2016, found 391.2016.

4.3 光谱分析

用分析天平准确称取 1.1 mg 荧光探针固体, 用 3 mL 的二甲基亚砜(DMSO)将其溶解, 得到 $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 **COM-PO** 的母液备用.

溶剂化测试: 准确移取二甲基亚砜(DMSO)、乙腈、甲醇、1,4-二氧六环、四氢呋喃(THF)、PBS 六种溶剂 1980 μL , 在光谱测试前再加入 20 μL 上述的荧光探针母液并摇匀, 摇匀后放入比色皿中, 使用紫外分光光度计以及荧光分光光度计测试.

1,4-二氧六环-PBS 混合溶剂的荧光发射光谱: 配置

好不同比例的 PBS-1,4-二氧六环混合体系(含 1,4-二氧六环 20%~100%) 1980 μL , 在光谱测试前准确移取 20 μL 新型极性荧光探针的母液加入其中并摇匀, 摇匀后使用荧光分光光度计进行光谱测试。

pH 对新型极性荧光探针的影响: 实验前先配置好不同的 pH 溶剂, 然后准确移取溶剂置于离心管中, 加入上述荧光探针母液并且摇匀, 使用荧光分光光度计进行光谱测试。

新型极性荧光探针的选择性: 准确称取并配置 CaCl_2 、 NaClO 、 CuSO_4 、 $L\text{-Cys}$ 、 NaF 、 GSH 、 H_2O_2 、 $DL\text{-Hcy}$ 、 KI 、 MgCl_2 、 MnCl_2 、 Na_2S 、 Na_2SO_4 、 ZnCl_2 、 $L\text{-Met}$ 、 TBHP 、 $L\text{-Arg}$ 、 $L\text{-Lys}$ 、 $L\text{-Val}$ 、 Na_2SO_3 等溶液, 然后加入上述探针并且摇匀, 使用荧光分光光度计进行光谱测试。

4.4 细胞毒性

将细胞密度大于 90% 的四种细胞(4T1, 3T3, HeLa, HL-7702)分别均匀地铺在 96 孔板中。培养 24 h 后, 吸走上清液, 向每个孔加入不同浓度的探针培养基混合溶液 100 μL (探针浓度 0~50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 后继续培养 24 h。随后加入 0.1 mg/L 的 MTT 溶液孵育 4 h, 让其进入活细胞。最后吸走培养液, 加入 100 μL 的 DMSO 溶液将底部紫色晶体溶解, 用酶标仪测试其在 492 nm 下的吸光度。

根据以下公式可计算细胞的存活率: 细胞存活率 (%) = $(\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{blank}}) / (\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{blank}}) \times 100\%$

$\text{OD}_{\text{sample}}$ 表示在不同的孔板中加入不同浓度的探针孵育细胞所测量的结果, OD_{blank} 表示空白培养基所测量的结果, $\text{OD}_{\text{control}}$ 表示培养基所测量的结果。

4.5 细胞成像实验

将四种细胞(4T1、3T3、HeLa、HL-7702)均匀地铺在十二孔板的载玻片上, 用 1 mL 的 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 培养液培养 24 h 后取出载玻片置于成像皿中, 加入含 COM-PO (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 培养液孵育 30 min 后进行成像实验。

4.6 肝脏成像实验

向一只实验小鼠投喂高脂饲料三天, 通过称量体重确定建立小鼠脂肪肝模型后, 另取一只健康小鼠作为对照组实验小鼠。将两只小鼠麻醉后断颈致死, 解剖取出肝脏, 用 PBS 洗净肝脏外表血水, 分别浸泡在含 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 探针的 PBS 溶液 1 h, 使用 PerkinElmer IVIS 进行拍摄。

4.7 活体小鼠成像

将小鼠腹腔内接种脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS) 溶液(100 μL , 0.1 mg/mL) 48 h 以建立小鼠肝炎模型。然

后将 10 μL 探针 COM-PO (1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 注射到肝炎小鼠的腹腔中, 并使用体内成像系统成像。同时, 将正常小鼠在相同的喂养条件下腹腔内注射探针 COM-PO 溶液作为对照实验。

References

- [1] Nagy, M.; Rácz, D.; Nagy, Z. L.; Nagy, T.; Fehér, P. P.; Purgel, M.; Zsuga, M.; Keki, S. *Dyes Pigm.* **2016**, *133*, 445.
- [2] Li, M.; Fan, J.; Li, H.; Du, J.; Long, S.; Peng, X. *Biomaterials* **2018**, *164*, 98.
- [3] Fan, L.; Wang, X.; Zan, Q.; Fan, L.; Li, F.; Yang, Y.; Zhang, C.; Shuang, S.; Dong, C. *Anal. Chem.* **2021**, *93*, 8019.
- [4] Gissen, P.; Arias, I. M. *J. Hepatol.* **2015**, *63*, 1023.
- [5] Doherty, J.; Raoof, A.; Hussain, A.; Wolna, M.; Cinque, G.; Brown, M.; Gardner, P.; Denbigh, J. *Analyst* **2019**, *144*, 997.
- [6] Liu, H.; Chen, L.; Xu, C.; Li, Z.; Zhang, H.; Zhang, X.; Tan, W. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 7140.
- [7] Yin, J.; Huang, L.; Wu, L.; Li, J.; Jame, D. T.; Lin, W. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 12098.
- [8] Ren, M.; Li, Z.; Deng, B.; Wang, L.; Lin, W. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 2932.
- [9] Wang, J.; Lin, W.; Li, W. *Biomaterials* **2013**, *34*, 7429.
- [10] Zheng, K.; Lin, W.; Tan, L. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 9683.
- [11] Yuan, L.; Lin, W.; Yang, Y.; Song, J. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4703.
- [12] Yu, X.; Xiang, L.; Yang, S.; Qu, S.; Zeng, X.; Zhou, Y.; Yang, R. *Spectrochim. Acta, Part A* **2021**, *245*, 118887.
- [13] Chen, X.; Wang, F.; Hyun, J. Y.; Wei, T.; Qiang, J.; Ren, X.; Shin, I.; Yoon, J. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 2976.
- [14] Jiang, C.; Huang, H.; Kang, X.; Yang, L.; Xi, Z.; Sun, H.; Pluth, M. D.; Yi, L. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 7436.
- [15] Gao, L.; Wang, W.; Wang, X.; Yang, F.; Xie, L.; Shen, J.; Brimble, M. A.; Xiao, Q.; Yao, S. Q. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 1219.
- [16] Xiao, H.; Zhang, W.; Li, P.; Zhang, W.; Wang, X.; Tang, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 4216.
- [17] Cai, F.; Hou, B.; Zhang, S.; Chen, H.; Ji, S.; Shen, X. C.; Liang, H. *J. Mater. Chem. B* **2019**, *7*, 2493.
- [18] Zhang, S.; Chen, H.; Wang, L.; Qin, X.; Jiang, B. P.; Ji, S. C.; Shen, X. C.; Liang, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202107076.
- [19] Liu, L.; Xu, J.; Zhang, S.; Chen, H.; Wang, L.; Shen, X. C.; Chen, H. *Sens. Actuators, B* **2022**, *367*, 132171.
- [20] Ma, Y.; Chen, K. X.; Guo, Z.-L.; Liu, S. J.; Zhao, Q.; Huang, W.-Y. *Acta Chim. Sinica* **2020**, *78*, 23 (in Chinese). (马云, 陈可欣, 郭则灵, 刘淑娟, 赵强, 黄维扬, 化学学报, **2020**, *78*, 23.)
- [21] Li, Y.; Zhang, H.; Li, M. *New Chem. Mater.* **2019**, *47*, 135 (in Chinese). (李阳, 张辉, 李明, 化工新型材料, **2019**, *47*, 135.)
- [22] Margar, S. N.; Sekar, N. *Chemistry* **2016**, *327*, 58.
- [23] Cao, D.; Liu, Z.; Verwilt, P.; Koo, S.; Jangjili, P.; Kim, J. S.; Lin, W. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 10403.
- [24] Sun, Q.; Sun, D.; Song, L.; Chen, Z.; Chen, Z.; Zhang, W.; Qian, J. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 3400.
- [25] Bai, H.; Qian, J.; Tian, H.; Pan, W.; Zhang, L.; Zhang, W. *Dyes Pigm.* **2014**, *103*, 1.
- [26] Heo, W.; Joo, T. *ChemPhysChem* **2019**, *20*, 1448.
- [27] Cui, J.; Zang, S.; Nie, H.; Shen, T.; Su, S.; Jing, J.; Zhang, X. *Sens. Actuators, B* **2021**, *171*, 129069.
- [28] Hao, G.; Xu, Z.; Li, L. *RSC Adv.* **2018**, *8*, 22182.
- [29] Thomsen, A. B.; Kim, S.; Aalback, F.; Aalkjaer, C.; Boedtker, E. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* **2014**, *34*, 161.
- [30] Li, M.; Fan, J.; Li, H.; Du, J.; Long, S.; Peng, X. *Biomaterials* **2018**, *164*, 98.
- [31] Wang, Y.; Wang, G.; Wang, K.; Wang, Z.; Guo, Y.; Zhang, H. *Sens. Actuators, B* **2018**, *261*, 210.
- [32] Wang, Y.; Zhang, C. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1582.

(Cheng, B.)