

喹啉基粘度荧光探针的合成及其检测应用

武虹乐 郭锐 迟涵文 唐永和 宋思睿
葛恩香 林伟英*

(广西大学光功能材料与化学生物学研究院 广西电化学能源材料重点实验室 广西大学化学化工学院
省部共建特色金属材料与组合结构全寿命安全国家重点实验室 广西南宁 530004)

摘要 作为细胞微环境的一个重要参数,粘度通过影响生物分子之间的相互作用实现对生物功能的调节.粘度的异常会导致多种疾病,如阿尔茨海默病、肺炎等.因此,实现粘度变化的精准检测对相关疾病的预防和诊断具有重要意义.本工作构建了新型喹啉基荧光探针 **QUI-VI**.通过分子内的空间扭转(扭曲的光诱导分子内电荷转移机制),该探针实现了对粘度的检测.光学实验表明探针 **QUI-VI** 具有高化学和光稳定性以及灵敏的粘度检测性能等优点.通过光谱实验、细胞成像以及组织成像实验,表明该探针具有显著的粘度敏感性,荧光强度会随着测试体系粘度的增强而增强.结合首次报道的小鼠肺炎组织粘度成像实验表明探针 **QUI-VI** 有望对肺炎的早期诊断提供一定的理论支撑.

关键词 粘度; 荧光探针; 荧光成像; 肺炎; 喹啉

Viscosity Fluorescent Probes Based on Quinoline Group and Its Applications

Wu, Hongyue Guo, Rui Chi, Hanwen Tang, Yonghe Song, Sirui
Ge, Enxiang Lin, Weiying*

(Institute of Optical Materials and Chemical Biology, Guangxi Key Laboratory of Electrochemical Energy Materials, School of Chemistry and Chemical Engineering, State Key Laboratory of Featured Metal Materials and Life-cycle Safety for Composite Structures, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004)

Abstract As one of the important parameters of biological microenvironment, viscosity is closely related to many life activities, when diseases appear in the organism, such as pneumonia, diabetes, Alzheimer's disease, atherosclerosis, malignant tumors, etc., the cytoplasmic viscosity in the organelle also changes, the new crown pneumonia is becoming more and more serious, and it is urgent to detect the viscosity in the organism. Based on the fluorescence mechanism of twisted intramolecular charge transfer (TICT), a viscosity-mediated fluorescent probe **QUI-VI** is rationally designed and constructed, and its related properties are explored and applied to detect physiological viscosity changes *in vivo* to achieve the purpose of disease monitoring. The two conjugates were connected by the carbon-carbon double bond formed by the condensation of aminotri-nitrobenzene and benzopyridine quaternary ammonium salts by methyl and aldehyde groups, forming a large conjugated system. This not only increases the free transfer of electrons in the conjugated system, so that the constructed probe molecules have a long emission wavelength, but also regulates the fluorescence signal of the probe molecules because the freely rotatable carbon-carbon double bond can respond to the change of viscosity. The regulation process is: when **QUI-VI** is in a high-viscosity environment, the free rotation of the carbon-carbon double bond is greatly limited, so that the two conjugated systems on the molecule are in the same plane, at this time, the probe molecule is the lowest energy state, when irradiated by 450 nm light, absorb one photon energy. The molecule is excited in the excited state, and can emit long-wavelength fluorescence when transitioning back to the ground state. On the contrary, when it is in a medium with low viscosity, the free rotation of the carbon-carbon double bond is no longer hindered, and when the two conjugated systems rotate to the same plane perpendicularly, they are in the highest energy state, and the molecules emit shorter wavelengths of fluorescence when absorbing the energy of a photon and transitioning back to the ground state, that is, it is blue-shifted by 10 nm on the fluorescence spectrum. All in all, the fluorescence change of the probe **QUI-VI** constructed based on the TICT mechanism is controllable.

Keywords viscosity; fluorescent probes; fluorescence imaging; pneumonia; quinoline

* E-mail: weiyinglin2013@163.com

Received April 20, 2023; published June 7, 2023.

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. 21877048, 22077048, 22277014, 22104019), the Natural Science Foundation of Guangxi Province (Nos. 2019GXNSFBA245068, 2021GXNSFDA075003, AD21220061), and the Startup Fund of Guangxi University (No. A3040051003).

国家自然科学基金 (Nos. 21877048, 22077048, 22277014, 22104019)、广西壮族自治区自然科学基金 (Nos. 2019GXNSFBA245068, 2021GXNSFDA075003, AD21220061)和广西大学启动基金(No. A3040051003)资助项目.

1 引言

粘度是生物微环境的重要参数之一,其在生物分子之间的信号传递和相互作用中起着至关重要的作用.粘度的变化与很多生命活动息息相关,如生物分子与相关信号的传递、代谢物质在细胞内的扩散,以及大分子之间的相互作用^[1-3].异常的粘度状态与肺炎、糖尿病、阿尔茨海默病、动脉粥样硬化、恶性肿瘤等多种疾病的形成密切相关^[4-5].开发新型诊断方法对生物粘度变化的精准检测具有重要医学应用价值.

尽管传统检测粘度的方法有很多,如滴球粘度计、毛细管粘度计和旋转粘度计^[6-8]等,但都无法测量细胞等生物水平的粘度变化.相比之下,荧光探针成像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^[9-21].因此荧光探针可以作为检测细胞内粘度的一个强有力工具,实现对生物体内微环境粘度变化的可视化检测^[22-23].

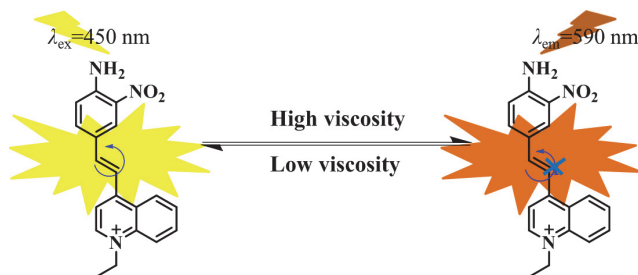
本工作设计合成了一种基于喹啉基团的粘度敏感型荧光探针 **QUI-VI**,该探针粘度具有的高灵敏性、高选择性、优秀的 pH 适应性、光稳定性以及良好的生物相容性.最重要的是探针 **QUI-VI** 的合成方法简单,廉价易得.同时该探针具有较大的斯托克斯位移(140 nm),在荧光成像检测中具有背景干扰低、对生物样品的光损伤小、样品穿透性强等特点^[24-25].通过对探针 **QUI-VI** 进行一系列实验证实其能有效地对肺炎疾病中粘度变化进行检测,在肺炎疾病的早期临床诊断和治疗中具有潜在的理论应用价值.

2 结果与讨论

2.1 探针 **QUI-VI** 的设计与合成

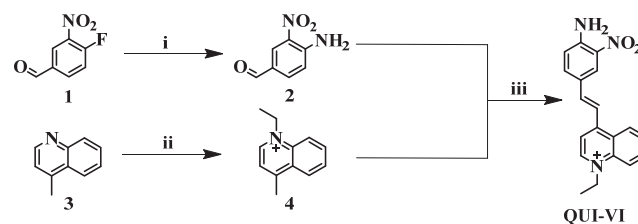
扭曲的光诱导分子内电荷转移(TICT)机制作为 ICT(分子内电荷转移)机制常常被用来设计粘度响应的荧光探针^[26-29].TICT 分子是由一个强电子受体基团和一个强电子给体基团通过共轭结构组成的.并且在分子内还具有可以高度旋转的化学键.研究表明喹啉季铵盐不仅仅具有强拉电子特性,还可以使探针具有更大的发射波长和斯托克斯位移^[20,30].因此在本工作中喹啉季铵盐基团被选用当作所构建的粘度探针的电子受体基团.4-氨基苯基基团具有较强的给电子能力,是探针设计中最常用的给电子基团.同时在氨基的邻位引入了一个硝基基团,使得氨基与硝基之间发生激发态分子内质子转移(ESIPT)机制,在高粘度的环境下,氢键共平面能力增强从而使得氢键能量更大,便于增强探针在高粘度状态下的荧光发射强度.反之,在低粘度情况下,氢键共平面能力削弱,导致氢键能力减弱,发射较弱荧光.在本工作中,喹啉季铵盐基团和 3-硝基-4-氨基苯基基团通过可以自由旋转的 C=C 双键相互连接便构成了新型粘度敏感性荧光探针 **QUI-VI**.探针的荧光响应机制如图式 1 所

示.在低粘度状态下,组成探针分子的各个基团都可以自由旋转,使处于激发态的探针分子通过非辐射过程释放能量,从而抑制荧光发射;在高粘度状态下,抑制分子自由旋转的程度逐渐增强,阻碍了 TICT 态的内部过渡,使得组成探针的各个基团处于共平面共轭状态,导致荧光强度增加.



图式 1 探针 **QUI-VI** 的机理
Scheme 1 The mechanism of **QUI-VI**

如图式 2 所示,探针 **QUI-VI** 的合成经过了三步有机合成,详细实验过程与表征数据见实验部分.



图式 2 **QUI-VI** 的合成路线
Scheme 2 Synthetic route of **QUI-VI**
Reagents and conditions: (i) Compound 1, tetrahydrofuran, aqueous ammonia, 25 °C, 1 h. (ii) Compound 3, iodoethane, acetonitrile, 85 °C, 12 h. (iii) Compound 2, compound 4, methanol, 65 °C, 1 h

2.2 探针 **QUI-VI** 的光谱性质

利用差量法称取 1.28 mg 的探针 **QUI-VI** 溶解于 4 mL 的二甲基亚砜(DMSO)中配制成探针测试母液.为了验证探针的光学性质不会受到溶剂极性变化的干扰,本工作测试了 10 μmol/L 探针在不同溶剂(1,4-二氧六环,四氢呋喃,甲醇,乙腈,二甲基亚砜,乙醇, *N,N*-二甲基甲酰胺)中的紫外-可见吸收光谱和荧光发射光谱.结果如图 1A 随着溶剂极性的增加,该探针 **QUI-VI** 的吸收波长发生了细小的改变.而极性荧光探针在极性改变情况下,会发生显著红蓝移现象,同时图 1B 所示,在不同溶剂内,尽管探针的荧光强度有变化,但并不是随着极性规律变化,表明溶剂极性的改变不会对探针的光学性质造成显著的干扰.为了进一步排除该探针能够应用于细胞内粘度检测,我们进行了后续细胞成像,详见 2.3 节.该实验表明溶剂极性的改变不会对探针的光学性质造成显著的干扰.

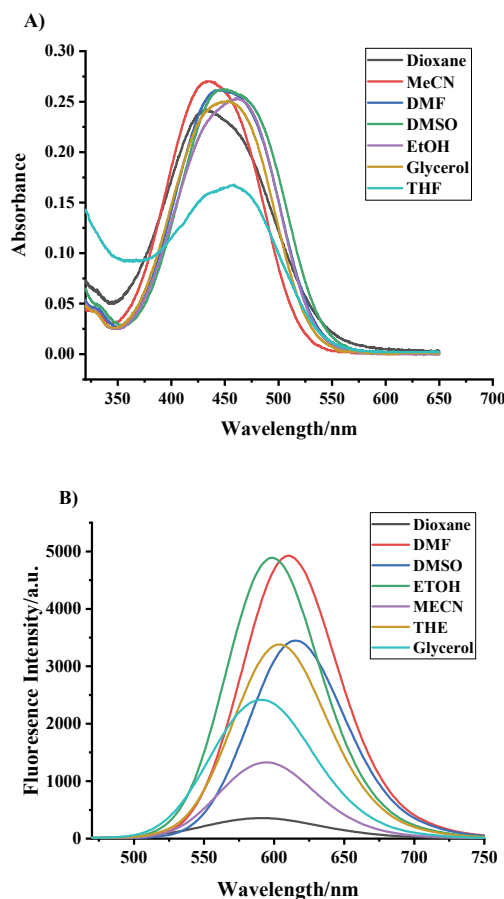


图 1 (A) QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$) 在不同极性溶剂中的紫外吸收光谱. (B) QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$) 在不同极性溶剂中的荧光发射光谱

Figure 1 (A) UV absorption spectra of QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$) in different polar solvents. (B) Fluorescence emission spectra of QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$) in different polar solvents ($\lambda_{\text{em}}=450\text{ nm}$)

为了探究探针 QUI-VI 对粘度变化监测的灵敏度, 随后进行了探针(10 $\mu\text{mol/L}$)在不同粘度环境体系(甘油和磷酸缓冲溶液混合测试体系, 甘油的体积分数为 0%~100%)中的荧光发射光谱测试. 结果如图 2 所示,

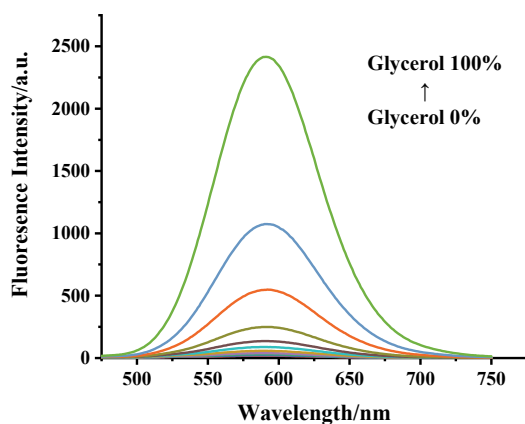


图 2 QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$) 在甘油-水混合溶剂体系中的荧光发射光谱 ($\lambda_{\text{em}}=450\text{ nm}$)

Figure 2 Fluorescence emission spectra of QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$) in glycerol-water mixed solvent system ($\lambda_{\text{em}}=450\text{ nm}$)

探针 QUI-VI 在低粘度的磷酸缓冲溶液(PBS)中发射出微弱的荧光信号(最大发射波长为 580 nm). 随着测试体系中甘油含量的增加, 测试体系的荧光强度逐渐增强. 与探针在 PBS 溶液中的荧光强度成鲜明对比的是, 探针 QUI-VI 在高粘度溶剂——甘油中释放出强烈的荧光信号(最大发射波长为 590 nm), 荧光强度提高了 1200 倍. 该实验表明, 探针 QUI-VI 具有显著的粘度敏感性能, 可以用于检测测试体系中粘度的变化, 也为后续的生物成像实验提供了一定的理论支撑.

作为荧光示踪试剂, 探针应该具有宽泛的 pH 适用范围和较好的光稳定性能. 测试体系的 pH 值是易于干扰荧光示踪试剂性能的外界因素之一. 作为一种生物示踪试剂, 探针 QUI-VI 应具有较宽的 pH 工作范围. 测试了探针 QUI-VI 在不同 pH 值(4.0~10.0)的测试体系(甘油体积分数分别为 0%、50%和 80%)中的荧光发射光谱. 如图 S1(见支持信息)所示, 在不同的测试体系中, 探针 QUI-VI 没有受到 pH 变化的干扰, 其荧光强度没有发生较大的偏移. 该实验说明该探针 QUI-VI 不会受到生物样品中 pH 变化的干扰, 能有效跟踪生物样品的粘度变化.

光稳定性是衡量生物示踪试剂性能的一个关键性指标, 决定着探针是否能够在光照条件下长时间检测系统内粘度变化. 为了验证探针的光稳定性能, 10 $\mu\text{mol/L}$ 探针 QUI-VI 在甲醇(低粘度溶剂)和纯甘油(高粘度溶剂)中进行了荧光发射光谱测试. 如图 S2(见支持信息)所示, 在 561 nm 波长的光的持续照射下, 探针在不同粘度的测试体系中的荧光强度与未经光照的荧光强度相对比并未发生明显变化, 说明探针 QUI-VI 具有较高的抗光漂白特性, 具有长时间进行生物内粘度监测的潜力.

细胞、组织、生物体等生物样品的组成复杂, 含有活性功能性小分子、生物酶、无机盐等多种物质, 作为粘度示踪试剂, 探针 QUI-VI 应具备良好的抗干扰特性. 随后, 10 $\mu\text{mol/L}$ 探针 QUI-VI 在含有各种分析物质(无机盐、活性氧、氨基酸等代表性生物分子)的两种不同测试体系($V(\text{PBS}):V(\text{甘油})=8:2$; $V(\text{甘油}):V(\text{PBS})=8:2$)中进行了荧光发射光谱测试. 测试结果显示在不同的测试体系中, 探针在 450 nm 处的荧光发射强度并未发生显著的改变(图 3), 说明生物样品中复杂的化合物组成不会对探针 QUI-VI 的粘度检测产生干扰.

光学测试表明探针 QUI-VI 具有优异的光学性能, 如粘度检测能力强, 光稳定性好, 化学稳定性好, pH 工作范围宽, 且具有较大的斯托克斯位移(大约 150 nm), 这促使我们继续进行后续的生物成像应用.

2.3 探针 QUI-VI 的细胞成像实验

作为生物荧光粘度示踪剂, 探针 QUI-VI 应具备较低的细胞毒性, 以确保在使用过程中不会对生物样品造成损害. 因此我们使用 Hela 细胞进行了探针的噻唑蓝比色法(MTT)试验. 如图 S3(见支持信息)所示, 在探针浓

度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的条件下细胞的存活率仍高达 90% 以上, 由此该探针具有较低的细胞毒性, 能够用于生物体内微环境的检测。

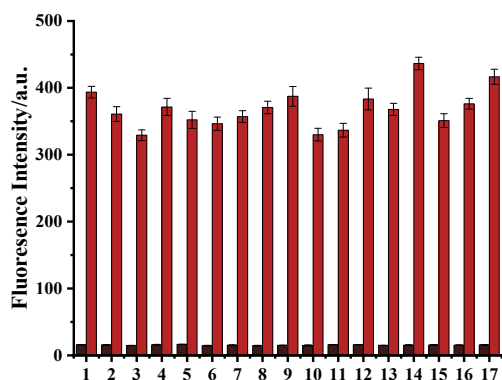


图 3 探针 QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$) 在不同无机离子和氨基酸的溶液体系中荧光发射柱状图

Figure 3 Fluorescence emission histograms of QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$) in solution systems of different inorganic ions and amino acids

The numbers represent: 1. NaClO; 2. L-Cys; 3. NaF; 4. GSH; 5. H₂O₂; 6. DL-Hey; 7. KI; 8. MgCl₂; 9. MnCl₂; 10. Na₂S; 11. Na₂SO₄; 12. ZnCl₂; 13. L-Met; 14. TBHP; 15. L-Arg; 16. L-Lys; 17. Na₂SO₃ ($\lambda_{\text{em}}=450\text{ nm}$)

众所周知, 癌细胞中的极性明显低于正常细胞, 为了排除细胞内极性变化对于探针 QUI-VI 成像, 我们采用四种极性不同的细胞(4T1 以及 3T3、HL-7702 以及 HepG-2)形成对比实验。细胞成像实验表明(图 4), 经探针 QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$) 处理的四种细胞(4T1、HL-7702、3T3、HepG-2)释放出了强度差异不大的荧光信号, 证明细胞内的极性对于探针 QUI-VI 成像影响不大。

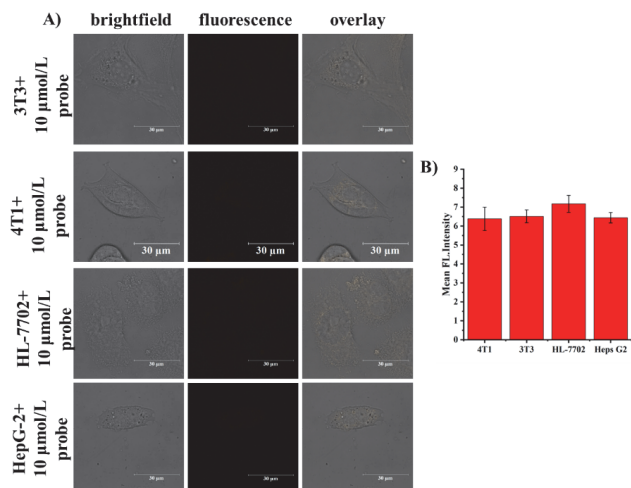


图 4 (A) 用 QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$) 和油酸(OA) (400 $\mu\text{mol/L}$) 处理的 4 种不同细胞系的共聚焦成像($\lambda_{\text{ex}}=580\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=610\sim750\text{ nm}$), 比例尺=30 μm ; (B) (A) 的红色通道的相对荧光强度(* $p<0.05$)

Figure 4 (A) Confocal imaging of four different cell lines treated with QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$) and OA (400 $\mu\text{mol/L}$) ($\lambda_{\text{ex}}=580\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=610\sim750\text{ nm}$), scale bar=30 μm ; (B) the relative fluorescence intensities of the red channels of (A) (* $p<0.05$)

制霉菌素(Nys)和莫能菌素(Mon)作为离子载体, 可通过破坏线粒体离子稳态引起线粒体异常功能障碍, 从而引起细胞粘度变化。因此, 我们使用这两种试剂(Nys、Mon)改变细胞的粘度, 并通过细胞成像实验验证所构建的荧光探针能否有效检测细胞内粘度的变化。细胞成像实验表明(图 5~图 8), 经探针 QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$) 处理的四种细胞(3T3、4T1、HL-7702、HepG-2)仅释放出了不易察觉的荧光信号, 与之成鲜明对比的是, 用 Nys 和 Mon 预处理过的细胞再被探针 QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$) 孵育后的四种细胞表现出较强的荧光信号, 荧光增长倍数分别在两倍以上。细胞成像实验表明所构建的荧光探针 QUI-VI 能有效监测细胞内粘度的变化。

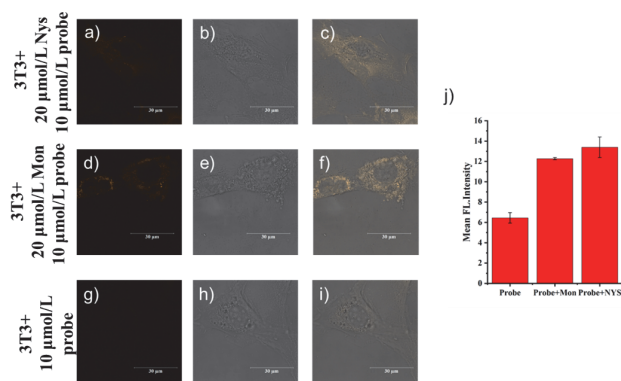


图 5 (a~c) QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$) 以及制霉菌素(20 $\mu\text{mol/L}$) 处理后的 3T3 细胞成像; (d~f) QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$) 以及莫能菌素(20 $\mu\text{mol/L}$) 处理后的 3T3 细胞成像; (g~i) QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$) 处理后的 3T3 细胞成像; (j) 三组成像实验结果对比图

Figure 5 (a~c) 3T3 cell imaging after treatment with probe QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$) and Nys (20 $\mu\text{mol/L}$); (d~f) 3T3 cell imaging after treatment with probe QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$) and Mon (20 $\mu\text{mol/L}$); (g~i) 3T3 cell imaging after treatment with probe QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$); (j) fluorescence intensity comparison chart of three groups of cell imaging

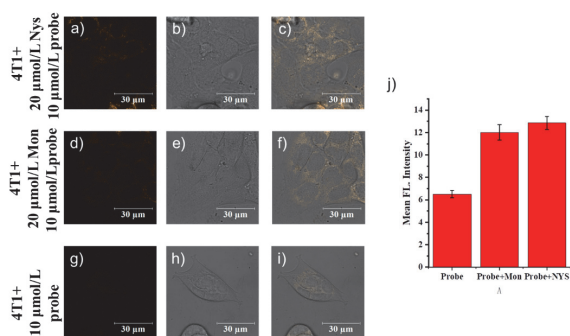


图 6 (a~c) QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$) 以及制霉菌素(20 $\mu\text{mol/L}$) 处理后的 4T1 细胞成像; (d~f) QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$) 以及莫能菌素(20 $\mu\text{mol/L}$) 处理后的 4T1 细胞成像; (g~i) QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$) 处理后的 4T1 细胞成像; (j) 三组成像实验结果对比图

Figure 6 (a~c) 4T1 cell imaging after treatment with probe QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$) and Nys (20 $\mu\text{mol/L}$); (d~f) 4T1 cell imaging after treatment with probe QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$) and Mon (20 $\mu\text{mol/L}$); (g~i) 4T1 cell imaging after treatment with probe QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$); (j) fluorescence intensity comparison chart of three groups of cell imaging

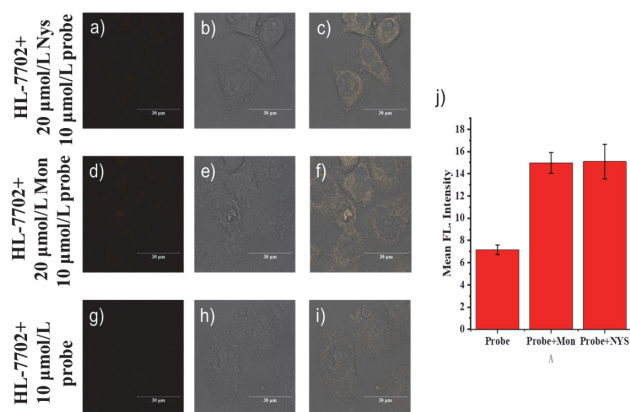


图 7 (a~c) QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$)以及制霉菌素(20 $\mu\text{mol/L}$)处理后的 HL-7702 细胞成像; (d~f) QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$)以及莫能菌素(20 $\mu\text{mol/L}$)处理后的 HL-7702 细胞成像; (g~i) QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$)处理后的 HL-7702 细胞成像; (j) 三组成像实验结果对比图

Figure 7 (a~c) HL-7702 cell imaging after treatment with probe QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$) and Nys (20 $\mu\text{mol/L}$); (d~f) HL-7702 cell imaging after treatment with probe QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$) and Mon (20 $\mu\text{mol/L}$); (g~i) HL-7702 cell imaging after treatment with probe QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$); (j) fluorescence intensity comparison chart of three groups of cell imaging

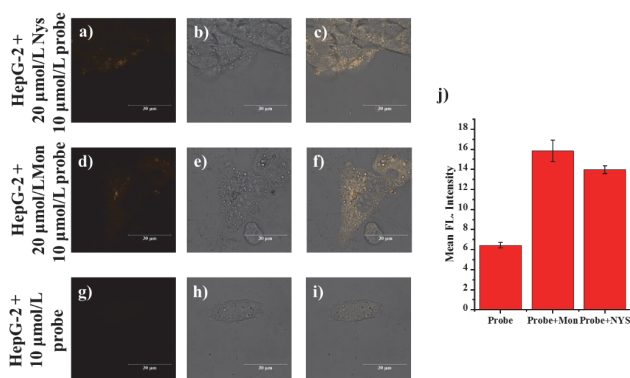


图 8 (a~c) QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$)以及制霉菌素(20 $\mu\text{mol/L}$)处理后的 HepG-2 细胞成像; (d~f) QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$)以及莫能菌素(20 $\mu\text{mol/L}$)处理后的 HepG-2 细胞成像; (g~i) QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$)处理后的 HepG-2 细胞成像; (j) 三组成像实验结果对比图

Figure 8 (a~c) HepG-2 cell imaging after treatment with probe QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$) and Nys (20 $\mu\text{mol/L}$); (d~f) HepG-2 cell imaging after treatment with probe QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$) and Mon (20 $\mu\text{mol/L}$); (g~i) HepG-2 cell imaging after treatment with probe QUI-VI (10 $\mu\text{mol/L}$); (j) fluorescence intensity comparison chart of three groups of cell imaging

2.4 探针 QUI-VI 的肺炎疾病成像

肺作为动物体内的重要器官,参与许多重要的生理功能。而肺炎是一种常见的急性呼吸道感染,会影响肺泡和远端气道,具有高发病率和死亡率^[31]。现如今新冠肺炎横行,开发一种能够对肺炎进行早期诊断的方法至关重要。

小鼠作为最常用的实验脊椎动物,在人类疾病的研究和预防方面做出了突出贡献。为了验证所构建的荧光探针 QUI-VI 能否用于更复杂的生物样品中的粘度检测,

我们营造了小鼠肺炎模型,并利用小动物活体成像系统进行了组织荧光成像实验。离体的肺脏组织(正常肺脏和炎症肺脏)经超纯水洗去附着的血水后,再分别浸泡在含 10 $\mu\text{mol/L}$ 探针的 PBS 溶液 1 h,最后使用小动物活体成像系统进行组织荧光成像实验。结果如图 9 所示,正常肺脏显示较弱的荧光发射信号,而在肺炎模型组中显示出强烈的荧光信号,两者形成鲜明对比。这一结果表明探针 QUI-VI 能够作为生物粘度示踪剂,进一步说明了探针在肺脏疾病的诊断中具有潜在的应用价值。

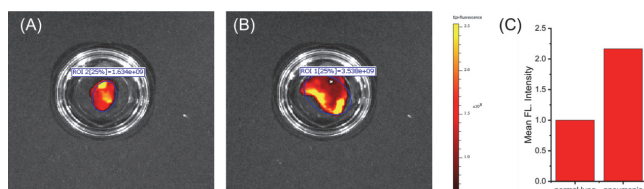


图 9 QUI-VI 在(A) 正常肺组织和(B) 肺炎组织的成像; (C) QUI-VI 在不同肺组织成像的荧光强度对比图

Figure 9 Different fluorescence intensities of probe QUI-VI in (A) normal lung and (B) pneumonia; (C) comparative diagram of the fluorescence intensity of probe QUI-VI in different lungs

3 结论

综上所述,基于 TICT 机制,我们选用喹啉季铵盐基团作为电子受体基团和 3-硝基-4-氨基苯基基团作为电子供体基团,并将这两个基团通过可以自由旋转的 C=C 双键相互连接,设计并合成了一种新型粘度敏感性荧光探针 QUI-VI。通过光学实验证明探针 QUI-VI 具有卓越的粘度检测特异性,以及良好的化学稳定性。成像实验表明探针 QUI-VI 能够检测到生物体内粘度的变化状态。更重要的是,我们成功将探针应用于肺炎病灶部位的粘度检测。因此探针 QUI-VI 有望通过粘度的相关检测来为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。人宫颈癌细胞系(Hela 细胞)购自卓强生物技术公司。¹H NMR 和 ¹³C NMR 数据在 Bruker Avance III HD 500 MHz 数字核磁共振仪(德国)上获得,以 DMSO-*d*₆ 为溶剂,以四甲基硅烷(TMS)为内参照。高分辨率质谱(HR-MS)由安捷伦 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。六周龄雌性实验小鼠(昆明鼠)购买自广西医科大学,成像实验使用珀金埃尔默 IVIS 小动物成像系统(美国)得到数据。

4.2 探针合成

4.2.1 化合物 2 的合成

将化合物 1 (4-氟-3-硝基苯甲醛, 1 g, 5.9 mmol) 加入 100 mL 圆底烧瓶中, 在烧瓶内加入四氢呋喃至化合物 3 溶解 (36 mL), 常温搅拌下加入氨水 (9 mL), 反应完全后, 反应体系经二氯甲烷萃取后, 再用饱和食盐水洗涤 2~3 次。有机相经减压蒸馏得到黄色化合物 2。

4.2.2 化合物 4 的合成

在 100 mL 的圆底烧瓶中加入化合物 3 (4-甲基喹啉, 1.9 g, 7 mmol), 再加入乙腈 (20 mL), 搅拌下逐滴加入碘乙烷 (1.3 mL), 氮气保护下加热回流, 反应 12 h 后冷却至室温, 减压过滤得到黄色固体 (化合物 4)。

4.2.3 探针 QUI-VI 的合成

称取化合物 2 (1 g, 6.0 mmol) 和化合物 4 (1 g, 5.8 mmol) 加到 100 mL 的圆底烧瓶中, 向体系中加入无水甲醇 (50 mL)。反应体系在 65 °C 氮气氛围内加热回流, 反应 1 h 后。反应体系冷却至室温, 减压过滤, 最终得到红色固体 QUI-VI 1.85 g, 产率 99%。¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 9.35 (d, *J*=6.6 Hz, 1H), 9.05 (d, *J*=8.1 Hz, 1H), 8.52 (d, *J*=8.9 Hz, 1H), 8.47 (d, *J*=2 Hz 1H), 8.42 (d, *J*=6.6 Hz, 1H), 8.24~8.26 (m, 2H), 8.20 (q, *J*=15.8 Hz, 2H), 7.99~8.03 (m, 3H), 7.15 (d, *J*=9.0 Hz, 1H), 4.99 (q, *J*=7.2 Hz, 2H), 1.59 (t, *J*=7.2 Hz, 3H)。¹³C NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 153.36, 148.11, 147.27, 142.71, 138.13, 135.51, 134.50, 130.52, 129.36, 128.99, 127.30, 126.94, 123.84, 120.51, 119.41, 117.26, 116.08, 52.43, 15.60。HR-MS (ESI) calcd. for C₁₉H₁₈N₃O₂⁺ [M]⁺ *m/z* 320.1394, found 320.1396。

4.3 光谱分析

利用差量法精准称取 1.28 mg 荧光探针 QUI-VI 固体粉末, 将其溶解于 4 mL 的二甲基亚砜分析纯溶液 (DMSO), 得到 1 mmol/L 的探针 QUI-VI 的测试母液。

溶剂化测试: 各取 1,4-二氧六环, 四氢呋喃, 甲醇, 乙腈, 二甲基亚砜, 乙醇, *N,N*-二甲基甲酰胺 980 μ L 至离心管, 在光谱测试前再加入 20 μ L 荧光探针母液, 摇匀, 将测试体系稀释至 1 μ mol/L, 摇匀后分别放入比色皿中, 使用紫外分光光度计以及荧光分光光度计测试。

甘油-PBS 混合溶剂的荧光发射光谱: 配置不同比例的甘油-PBS 混合体系 (含甘油体积分数 0%~100%) 1980 μ L, 在光谱测试前加入 20 μ L 测试母液, 摇匀, 使用荧光分光光度计进行光谱测试。

pH 对荧光探针 QUI-VI 的影响: 实验前配置不同 pH 溶剂, 然后将溶剂置于离心管中, 加入上述荧光探针母液, 摇匀, 使用荧光分光光度计进行光谱测试。

光照环境对荧光探针 QUI-VI 的影响: 各取甘油 1980 μ L 两份和甲醇 1980 μ L 两份, 向其中加入 20 μ L 测试母液, 使用荧光分光光度计进行光谱测试。

荧光探针 QUI-VI 的选择性: 准确称取并配置 NaClO、*L*-Cys、NaF、GSH、H₂O₂、*DL*-Hcy、KI、MgCl₂、MnCl₂、Na₂S、Na₂SO₄、ZnCl₂、*L*-Met、TBHP、*L*-Arg、*L*-Lys、Na₂SO₃ 等溶液, 然后加入上述探针, 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 3T3、4T1、HL-7702、HepG-2 细胞分别均匀地铺在 96 孔板中。培养 24 h 后吸走上清液, 在每个孔中加入不同浓度的探针培养基混合溶液 100 μ L (探针浓度 0~50 μ mol/L), 继续培养 24 h, 再加入 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 μ L 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 (%) = (OD_{sample} - OD_{blank}) / (OD_{control} - OD_{blank}) $\times$ 100%

OD_{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, OD_{control} 表示培养基所测量的结果。

4.5 细胞成像实验

将 3T3、4T1、HL-7702、HepG-2 细胞均匀地铺在十二孔板的载玻片上, 用 1 mL 的 DMEM 高糖液体培养基培养 24 h 后取出载玻片置于成像皿中, 分别加入莫能菌素以及制霉菌素 20 μ mol/L, 再加入含 QUI-VI (10 μ mol/L) 培养液孵育 30 min 后进行成像实验。

4.6 肺组织成像实验

在小鼠腹腔内接种脂多糖 (LPS) 溶液 (100 μ L, 0.1 mg/mL) 48 h 以建立小鼠肺炎模型, 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, 解剖取出肺片, 用 PBS 洗净外表血水, 分别浸泡在含 10 μ mol/L 探针的 PBS 溶液 1 h, 使用 PerkinElmer IVIS 进行拍摄。

References

- [1] Cheng, C.; Chang, Y.; Chu, Y. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1947.
- [2] Castellana, M.; Wilson, M. Z.; Xu, Y.; Joshi, P.; Cristea, I. M.; Rabinowitz, J. D. *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 1011.
- [3] Miao, Y.; Bhattacharya, S.; Edwards, M.; Cai, H.; Inoue, T.; Iglesias, P. A. *Nat. Cell. Biol.* **2017**, *19*, 329.
- [4] Nativ, O.; Shinitzky, M.; Manu, H.; Hecht, D.; Roberts, Jr. C. T.; LeRoith, D. *Biochem. J.* **1994**, *298*, 443.
- [5] Patrizia, M.; Flint, B.; Roberta, C.; Marria, P.; Antonio, C.; Fausto, C. *Mol. Chem. Neuropathol.* **1997**, *31*, 53.
- [6] Kaliviotis, E.; Yianneskis, M. *Proc. Inst. Mech. Eng. Part H* **2007**, *221*, 887.
- [7] Haidekker, M. A.; Theodorakis, E. A. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1669.
- [8] Zhou, K.; Ren, M.; Deng, B.; Lin, W. *New J. Chem.* **2017**, *41*, 11507.
- [9] Yin, J. L.; Huang, L.; Wu, J.; Li, James, T. D.; Lin, W. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 12098.
- [10] Ren, M.; Li, Z.; Deng, B.; Wang, L.; Lin, W. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 2932.
- [11] Wang, J.; Lin, W.; Li, W. *Biomaterials* **2013**, *34*, 7429.
- [12] Song, S.; Tang, Y.; Sun, L.; Guo, R.; Jiang, G.; Lin, W. *Acta Chim. Sinica* **2022**, *80*, 1217 (in Chinese). (宋思睿, 唐永和, 孙良广, 郭

- 锐, 姜冠帆, 林伟英, 化学学报, **2022**, 80, 1217.)
- [13] Yuan, L.; Lin, W.; Yang, Y.; Song, J. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 4703.
- [14] Yu, X.; Xiang, L.; Yang, S.; Qu, S.; Zeng, X.; Zhou, Y.; Yang, R. *Spectrochim. Acta, Part A* **2021**, 245, 118887.
- [15] Chen, X.; Wang, F.; Hyun, J. Y.; Wei, T.; Qiang, J.; Ren, X.; Shin, I.; Yoon, J. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, 45, 2976.
- [16] Jiang, C.; Huang, H.; Kang, X.; Yang, L.; Xi, Z.; Sun, H.; Pluth, M. D.; Yi, L. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, 50, 7436.
- [17] 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.
- [18] Tang, Y.; Song, S.; Peng, J.; Zhang, Q.; Lin, W. *J. Mater. Chem. B* **2022**, 10, 6974.
- [19] Zhang, S.; Chen, H.; Chen, H.; Wang, L.; Qin, X.; Jiang, B. P.; Ji, S. C.; Shen, X. C.; Liang, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, 61, e202107076.
- [20] Tang, Y.; Peng, J.; Zhang, Q.; Song, S.; Lin, W. *Talanta* **2022**, 249, 123647.
- [21] Liu, L.; Xu, J.; Zhang, S.; Chen, H.; Wang, L.; Shen, X. C.; Chen, H. *Sens. Actuators, B* **2022**, 367, 132171.
- [22] Liu, C.; Zhou, L.; Zheng, Y.; Man, H.; Xiao, Y. *Chin. Chem. Lett.* **2022**, 33, 2537.
- [23] Zhang, X.; Wang, L.; Li, N.; Xiao, Y. *Chin. Chem. Lett.* **2021**, 32, 2395.
- [24] Zhang, G.; Sun, Y.; He, X.; Zhang, W.; Tian, M.; Feng, R.; Zhang, R.; Li, X.; Guo, L.; Yu, X.; Zhang, S. *Anal. Chem.* **2015**, 87, 12088.
- [25] Zhang, Y.; Wang, J.; Jia, P.; Yu, X.; Liu, H.; Liu, X.; Zhao, N.; Huang, B. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 4582.
- [26] Jiang, N.; Fan, J.; Zhang, S.; Wu, T.; Wang, J.; Gao, P.; Qu, J.; Zhou, F.; Peng, X. *Sens. Actuators, B* **2014**, 190, 685.
- [27] Yang, Z.; He, Y.; Lee, J. H.; Park, N.; Suh, M.; Chae, W. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 9181.
- [28] Zhu, D.; Qu, P.; Sun, C.; Yang, Y.; Liu, D.; Shen, Q.; Hao, Y. *Spectrosc. Spectral Anal.* **2020**, 40, 1775.
- [29] Lai, Y.; Chen, X.; Chen, F.; Ni, L.; Wang, T.; Zhu, Z.; Man, J.; Jiang, C.; Xie, Z. *Chin. J. Org. Chem.* **2022**, 42, 2850.
- [30] Zhang, Y.; Li, Z.; Hu, W.; Liu, Z. *Anal. Chem.* **2019**, 15, 10302.
- [31] Kim, G. L.; Seon, S. H.; Rhee, D. K. *Arch. Pharmacol. Res.* **2017**, 40, 885.

(Cheng, B.)