

一种“关-开”型生物硫醇荧光探针和生物成像应用

周婷婷^{a,b} 杨瑜涛^{*,a,b} 周柯岩^{a,b} 胥稳智^{a,b} 李 玮^{*,a,b}^(a) 河北大学化学与环境科学学院 保定 071002)^(b) 河北大学药物化学与分子诊断教育部重点实验室 保定 071002)

摘要 设计合成了一种基于香豆素衍生物的“关-开”型荧光探针 CO-NBS, 用于选择性识别生物硫醇, 包括半胱氨酸(Cys)、高半胱氨酸(Hcy)和谷胱甘肽(GSH)。采用紫外-可见吸收光谱和荧光光谱对该探针的光学性能进行研究, 实验结果表明, 该探针能够实现对 Cys、Hcy 和 GSH 快速、高灵敏性和高选择性的检测, 检测限分别为 92、30、62 nmol/L。此外, 该探针具有低细胞毒性和良好的生物相容性, 能够成功应用于活细胞和斑马鱼中的生物硫醇的荧光成像。

关键词 荧光探针; 香豆素衍生物; 生物硫醇; 荧光成像

An “Off-On” Fluorescent Probe for Biothiols and Its Application in Bioimaging

Zhou, Tingting^{a,b} Yang, Yutao^{*,a,b} Zhou, Keyan^{a,b} Xu, Wenzhi^{a,b} Li, Wei^{*,a,b}^(a) College of Chemistry & Environmental Science, Hebei University, Baoding 071002)^(b) Key Laboratory of Medicinal Chemistry and Molecular Diagnosis of the Ministry of Education, Hebei University, Baoding 071002)

Abstract An “off-on” fluorescent probe CO-NBS based coumarin derivative was designed and synthesized, which can respond selectively with biothiols including cysteine (Cys), homocysteine (Hcy) and glutathione (GSH). The optical properties were studied by UV-Vis absorption spectrum and fluorescence spectrum. The results showed that probe was capable to respond rapidly, sensitively and selectively to Cys, Hcy and GSH with the detection limits of 92, 30 and 62 nmol/L, respectively. In addition, with low cytotoxicity and good biocompatibility, the probe can be successfully applied to image biothiols in living cells and in living zebrafish.

Keywords fluorescent probe; coumarin derivatives; biothiols; fluorescence imaging

生物硫醇, 如半胱氨酸(Cys)、高半胱氨酸(Hcy)和谷胱甘肽(GSH), 在生命体中的许多生理学过程中发挥至关重要的作用, 并且与多种疾病的病理形成过程密切相关^[1-4]。例如: Cys 能够参与蛋白质结构的构建^[5], 正常细胞内 Cys 浓度通常为 30~200 $\mu\text{mol/L}$ ^[6], Cys 的缺乏可导致多种疾病的发生, 如生长迟缓、水肿、皮肤损伤、毛发脱色、水肿、嗜睡、肝脏损伤等^[7,8]。Hcy 在保持细胞稳态方面发挥重要作用^[9], 血清中正常的 Hcy 水平约为 5~12 $\mu\text{mol/L}$, 异常的 Hcy 动态平衡水平与阿尔茨海默病^[10]、心血管疾病^[11]、炎症性肠病和骨质疏松症密切

相关。而 GSH 是最丰富和最重要的生物硫醇, 正常细胞内浓度通常为 1~10 mmol/L^[12-14], 已经证实 GSH 是一种细胞内源性凋亡调节因子和抗氧化剂, 与细胞内氧化还原活性、异生物质代谢、细胞内信号转导和基因调控相关^[15]。GSH 水平异常能够增加肝损伤、牛皮癣、白细胞丢失和癌症的等疾病的患病风险^[16-22]。因此, 追踪和监测生物体内的生物硫醇具有重要的生物学意义。

荧光探针基于与待分析物即时反应的独特能力, 能够实现对待测物的高灵敏度、高选择性、高时空分辨率的原位无破坏性分析, 在监控活细胞或组织中的痕量样

* Corresponding authors. E-mail: yutaoyang2016@163.com; liweihebeilab@163.com

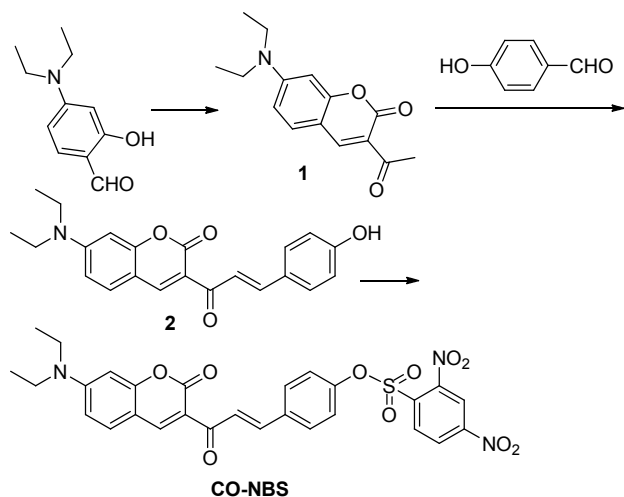
Received June 5, 2019; revised July 6, 2019; published online August 1, 2019.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21807021), the Priority Strategy Project of Key Laboratory of Medicinal Chemistry and Molecular Diagnosis of Ministry of Education (No. ts2019004), the Science Foundation for Youth of Hebei Province (No. B2017201093) and the Hebei University Science Foundation for High-Level Personnel.

国家自然科学基金(No. 21807021)、河北大学药物化学与分子诊断教育部重点实验室提升计划(No. ts2019004)、河北省自然科学基金(No. B2017201093)和河北大学高层次人才资助项目。

品方面发挥着重要作用^[20~22]. 目前, 已报道的生物硫醇荧光探针的反应机制主要包括迈克尔加成反应^[23~29], S—S 键或 Se—N 键的裂解反应^[30~32], 亲核取代反应^[33], 金属络合反应^[34].

本文设计合成了一种新的荧光探针 **CO-NBS** (Scheme 1), 它可以在二甲亚砜-磷酸缓冲盐溶液 (DMSO-PBS, $V:V=1:1$, 10 mmol/L, pH 7.4) 中, 高灵敏性和高选择性地实现对 Cys, Hcy 或 GSH 的响应, 反应时间分别为 70, 70, 140 s, 检出限分别为 92、30、62 nmol/L. 该探针以香豆素衍生物作为荧光团(**CO-OH**), 2,4-二硝基苯磺酰基部分(**NBS**)作为荧光猝灭剂和生物硫醇的选择性识别位点, 由于荧光团部分与 2,4-二硝基苯磺酰基部分之间的光诱导电子转移过程(PET), 探针本身几乎没有荧光. 一旦硫醇与探针发生亲核取代反应, 探针的磺酰基键断裂, 导致荧光团的释放, 伴随的橙色荧光的恢复(图 1). 此外, 该探针能够对 Cys、Hcy、GSH 实现超快速、高选择性和高灵敏性的反应, 而不受其它生物分子(包括其他氨基酸和各种阴离子)的干扰.



图式 1 探针 **CO-NBS** 的合成路线图
Scheme 1 Synthetic route of probe **CO-NBS**

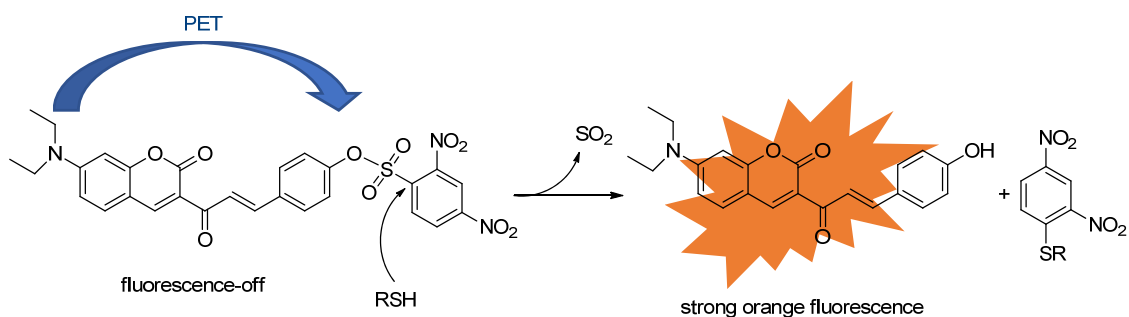


图 1 探针与生物硫醇的反应机理
Figure 1 Reaction mechanism between **CO-NBS** and biothiols

其次, 该探针具有低细胞毒性和良好的生物相容性, 可用于的细胞和斑马鱼中硫醇的荧光成像.

1 结果与讨论

1.1 探针 **CO-NBS** 的紫外-可见吸收光谱和荧光光谱研究

首先通过紫外-可见吸收光谱和荧光发射光谱在 DMSO-PBS ($V:V=1:1$, 10 mmol/L, pH 7.4) 缓冲溶液中对探针 **CO-NBS** 的光学性能进行研究. 如图 2a 所示, 在 DMSO-PBS ($V:V=1:1$, 10 mmol/L, pH 7.4) 缓冲溶液中, 探针 **CO-NBS** (10 $\mu\text{mol/L}$) 在 455 和 315 nm 处有最大吸收峰, 随着 Cys (10 $\mu\text{mol/L}$, 1 equiv.) 的加入, 455 和 315 nm 处的吸收峰逐渐降低, 355 nm 处新的吸收峰逐渐升高. 相对应地, 我们通过荧光光谱研究了探针 **CO-NBS** 对 Cys、Hcy、GSH 响应. 在 DMSO-PBS ($V:V=1:1$, 10 mmol/L, pH 7.4) 缓冲溶液中, 探针 **CO-NBS** (10 $\mu\text{mol/L}$) 几乎没有荧光, 向缓冲溶液中加入 Cys 后, 575 nm 处产生新的荧光发射峰, 并且随着 Cys 浓度的增加荧光强度逐渐增强, 直至加入 Cys (10 $\mu\text{mol/L}$, 1 equiv.) 后, 体系达到饱和, 荧光强度不再增加, 较空白探针相比, 体系在 575 nm 处的荧光强度增加了 15 倍, 表明探针 **CO-NBS** 能够实现 Cys 的“关-开”型检测(图 2b). 同时, 利用紫外-可见滴定光谱和荧光光谱对探针 **CO-NBS** 对 Hcy 和 GSH 响应性质进行了研究, 荧光动力学研究表明探针 **CO-NBS** 能够实现三种生物硫醇快速响应(图 2c). 接下来, 我们研究了 pH 对探针 **CO-NBS** 识别性能的影响, 在 pH 3~13 的 DMSO-PBS 缓冲液(10 mmol/L, $V:V=1:1$) 中, 探针 **CO-NBS** 的荧光信号无明显变化, 表明该探针具有较高的耐酸碱性能, 当加入三种生物硫醇后, 在 pH 4~9 范围内观察到明显的荧光信号增强, 表明该探针能够在较宽的 pH 范围(pH 4~9)内, 实现对生物硫醇的检测(图 2d).

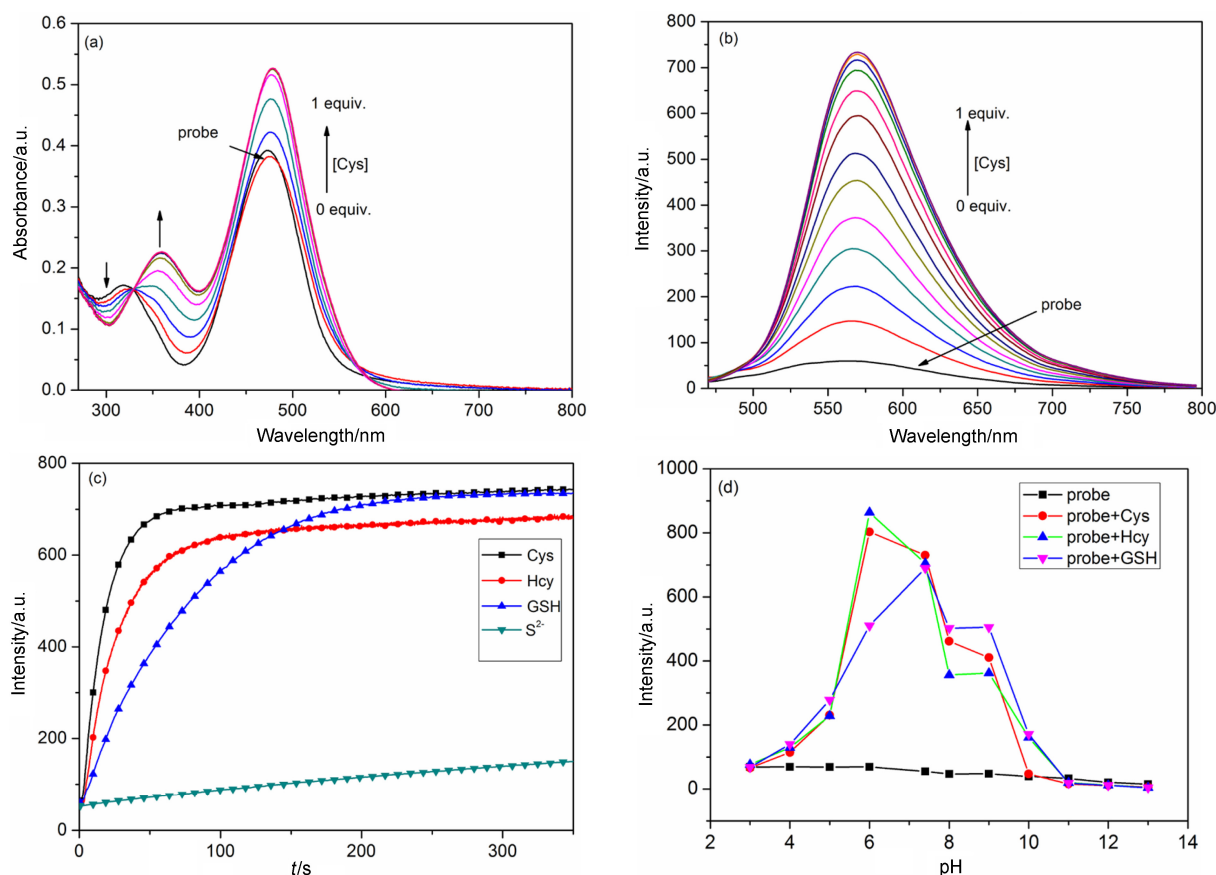


图2 探针 CO-NBS (10 $\mu\text{mol/L}$) 在 DMSO-PBS 缓冲溶液 ($V:V=1:1$, 10 mmol/L, pH 7.4) 体系中与 Cys (0~10 $\mu\text{mol/L}$) 作用的 (a) 紫外滴定光谱和 (b) 荧光滴定光谱, (c) 探针 CO-NBS 与 Cys, Hcy, GSH 和 S^{2-} 的反应时间图, (d) pH 对探针 CO-NBS 识别生物硫醇的影响

Figure 2 UV-vis absorption spectrum (a) and fluorescence spectra (b) of CO-NBS (10 $\mu\text{mol/L}$) in presence of Cys (0~10 $\mu\text{mol/L}$) in DMSO-PBS ($V:V=1:1$, 10 mmol/L, pH 7.4) (each spectrum is recorded 50 s after Cys addition), (c) reaction time profile of fluorescence spectra of CO-NBS (10 $\mu\text{mol/L}$) upon addition of Cys, Hcy, GSH and Na_2S (100 $\mu\text{mol/L}$) 575 nm, and (d) effect of pH on the fluorescence intensity of probe CO-NBS (10 $\mu\text{mol/L}$) upon addition of Cys, Hcy and GSH

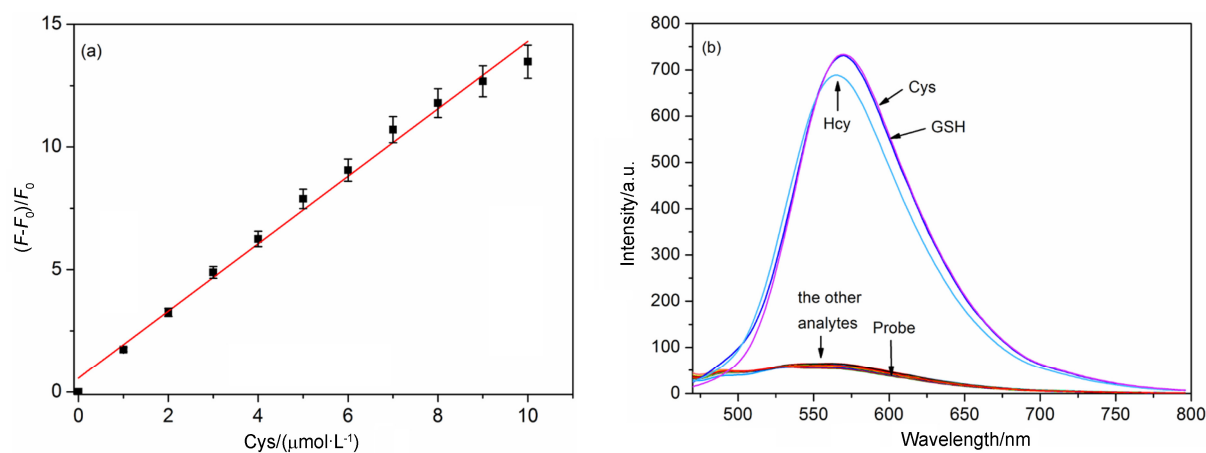


图3 (a) 575 nm 处探针 CO-NBS 的荧光强度与 Cys 浓度的工作曲线, 以及 (b) 探针 CO-NBS 对生物硫醇的荧光光谱的选择性实验

1.2 探针 CO-NBS 对生物硫醇检出限研究

我们通过对探针 CO-NBS 溶液 (10 $\mu\text{mol/L}$) 扫描 10

次, 测定其在 575 nm 处的荧光强度, 计算得到标准偏差 σ , 根据探针在不同浓度生物硫醇的 575 nm 处的荧光强度得到的荧光强度与 Cys、Hcy、GSH 浓度的工作曲线。

对于 Cys 线性方程为: $Y_{\text{cys}} = 1.53433[\text{Cys}] + 0.61998$, $R^2 = 0.99059$ (图 2d), 根据检出限计算公式 $C_{\text{DL}} = 3\sigma/k$, 得到其检出限为 92 nmol/L. 同样, 探针 **CO-NBS** 对于 Hcy 和 GSH 的检出限分别为 30、62 nmol/L.

1.3 探针 **CO-NBS** 的选择性研究

接下来, 进一步研究了探针 **CO-NBS** 对三种生物硫醇的选择性 (图 3a). 在含有探针 **CO-NBS** (10 $\mu\text{mol/L}$) 的 DMSO-PBS 缓冲溶液 ($V:V=1:1$, 10 mmol/L PBS, pH 7.4) 中, 分别加入 100 $\mu\text{mol/L}$ 的其它生物小分子 (Asp, Arg, Gln, Val, Thr, Ala, Glu, Leu, His, Gly, Ile, Lys, Met, Trp, Pro, Tyr, Ser, Phe, Asn, S^{2-} , NO_3^- , Cl^- , F^- , I^- , Br^- , SCN^- , HSO_3^- , CH_3COO^-) 或者三种生物硫醇. 结果表明, 其他生物小分子, 几乎不会引起荧光信号的改变, 而加入 Cys、Hcy 或者 GSH 后, 575 nm 处荧光信号强度的显著增强, 表明探针 **CO-NBS** 对生物硫醇的检测有高选择性.

1.4 反应机理研究

为了研究探针 **CO-NBS** 与 Cys、Hcy、GSH 的传感机制, 以 Cys 为代表, 通过有机合成的方法制备出了探针 **CO-NBS** 与 Cys 的反应产物, 并对产物结构进行了 ^1H NMR 和 HRMS 表征. 对产物、化合物 **CO-OH**、探针 **CO-NBS** 的 ^1H NMR 谱图进行了对照 (图 4), 加入 Cys 后, 探针 **CO-NBS** 的质子氢由 δ 7.81 和 7.28 (Hg 和 Hh) 分别转移到 δ 7.51 和 6.79 (Hg' 和 Hh'), 质子 δ 9.12、8.61、8.26 (Hf、Hk、Hj) 消失, 伴随活泼质子 δ 10.03 (Hi) 的出现, 并且其产物与化合物 **CO-OH** 的 ^1H NMR 基本一致. 同时将 **CO-NBS** 与 Cys 反应溶液用高分辨质谱进行了表征, 特征离子峰 $[\text{M} + \text{H}]^+ m/z$ 364.1539 (calcd

364.1549) 的出现也验证了提出的反应机理.

1.5 细胞成像研究

采用噻唑蓝 (MTT) 法对探针 **CO-NBS** 对 BT-474 乳腺癌细胞的毒性进行了测试. 研究结果显示, 探针浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$, 细胞存活率仍保持在 80% 以上, 说明探针 **CO-NBS** 对 BT-474 乳腺癌细胞具有较低的毒性. 鉴于此, 为进一步评估探针 **CO-NBS** 追踪活细胞中生物硫醇的能力, 对 **CO-NBS** 进行了细胞成像研究. 如图 5 所示, 首先, 只用探针 **CO-NBS** (10 $\mu\text{mol/L}$) 孵育 BT-474 人乳腺癌细胞 30 min 后, 显现出橙色荧光信号 (图 5b), 而先用 *N*-乙基马来酰亚胺 (NEM, 一种生物硫醇捕获剂) 孵育 30 min 后, 再用探针 **CO-NBS** (10 $\mu\text{mol/L}$) 孵育 BT-474 人乳腺癌细胞 30 min 后, 基本无荧光信号的产生, 说明该探针能够检测到细胞内内源性的生物硫醇 (图 5c). 接下来, 先用 NEM 培养 30 min, 再分别用外源的 Cys、Hcy、GSH (1 mmol/L) 孵育 BT-474 人乳腺癌细胞 30 min, 最后分别用探针 **CO-NBS** (10 $\mu\text{mol/L}$) 孵育细胞 30 min, BT-474 人乳腺癌细胞显示出较强的荧光信号 (图 5d~5f). 以上结果表明该探针具有检测活细胞中内外源性生物硫醇的潜力.

1.6 斑马鱼成像

基于活细胞成像的初步研究, 以 3 日龄的脊椎动物斑马鱼作为测试模型, 进一步评估探针 **CO-NBS** 在检测活体内生物硫醇的能力 (图 6). 仅用探针 **CO-NBS** (10 $\mu\text{mol/L}$) 处理 30 min 后, 斑马鱼显示出较弱的荧光; 预先用生物硫醇捕获剂 NEM (100 mmol/L) 预处理 30 min, 再用探针 **CO-NBS** (10 $\mu\text{mol/L}$) 处理 30 min 后, 斑马鱼几乎没有荧光信号; 预先用生物硫醇清除剂 NEM (100

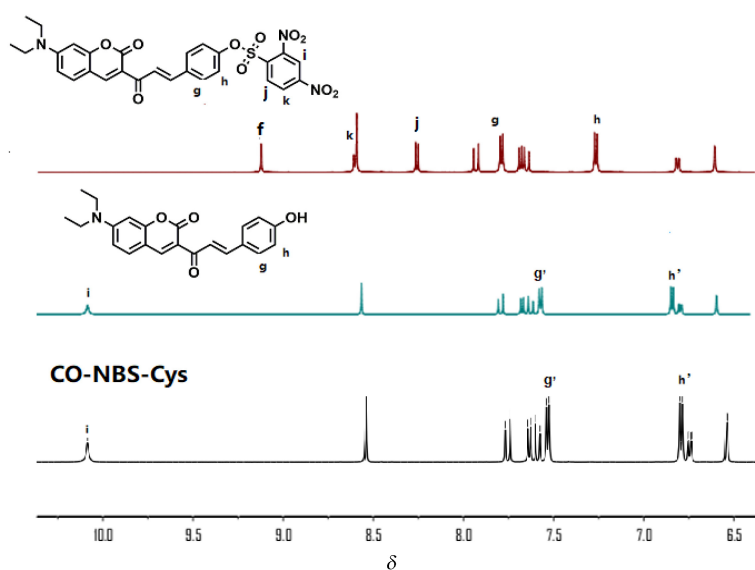


图 4 产物、化合物 **CO-OH**、化合物 **CO-NBS** 的 ^1H NMR 对照谱图

Figure 4 ^1H NMR spectra of the product, **CO-OH**, and **CO-NBS**

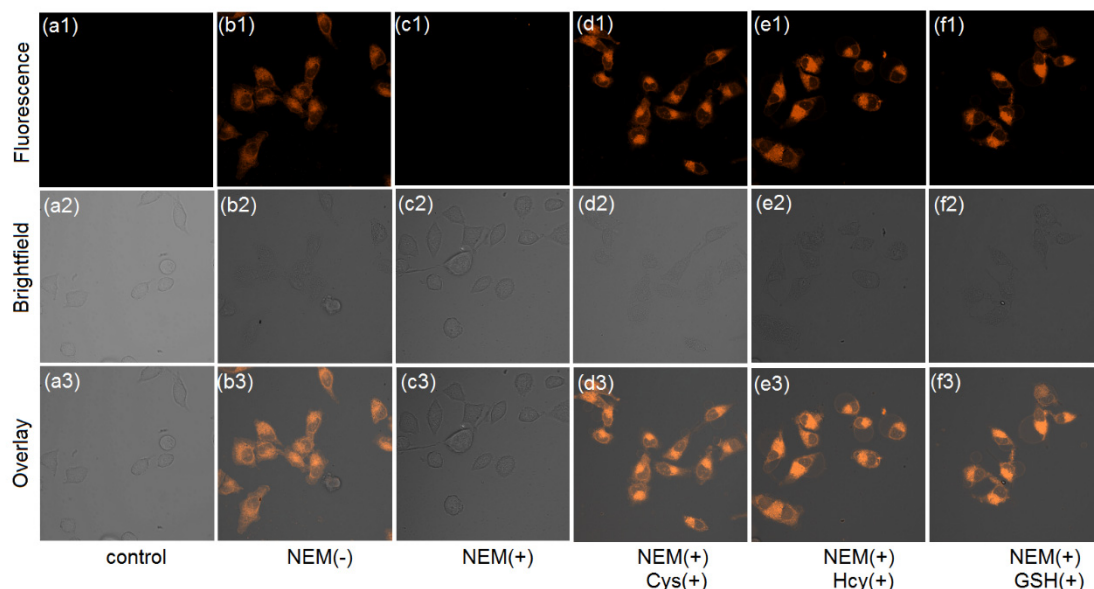


图5 探针 CO-NBS 在 BT-474 人乳腺癌细胞中的激光共聚焦成像图

Figure 5 Laser confocal imaging of CO-NBS in BT-474 human breast cancer cells

(a1-3) Image of cells in the absence of probe CO-NBS, (b1-3) image of cells which were incubated with probe CO-NBS (10 $\mu\text{mol/L}$) for 30 min, (c1-3) the cells were pretreated with NEM (1 mmol/L), (d1-3, e1-3, f1-3) the cells were pretreated with NEM (1 mmol/L) for 30 min and then incubated with Cys, Hcy and GSH (1 mmol/L) for 30 min and probe CO-NBS (10 $\mu\text{mol/L}$) for 30 min subsequently. Emission was collected at 493~591 nm, excited at 458 nm, scale bar: 40 μm

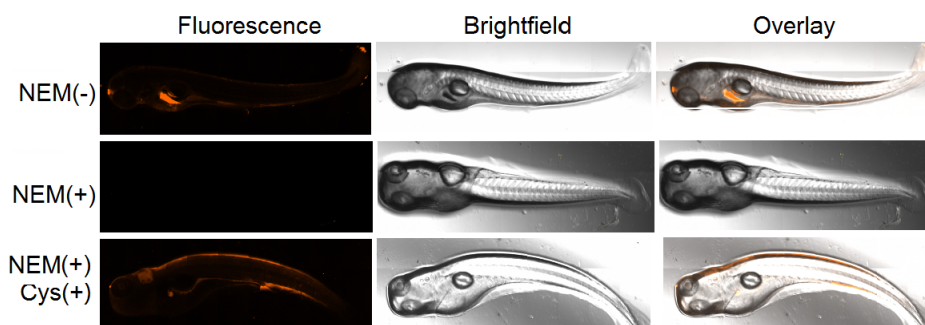


图6 探针 CO-NBS 在 3 日龄的斑马鱼中的荧光成像图

Figure 6 Fluorescence images of probe CO-NBS sensing Cys in 3-day-old zebrafish

Emission was observed at 493~591 nm, excited at 458 nm, scale bar: 40 mm

mmol/L)预处理 30 min, 再用探针 CO-NBS (10 $\mu\text{mol/L}$) 与 Cys (100 $\mu\text{mol/L}$)处理 30 min 后, 斑马鱼显示出强烈的荧光信号(图 6). 表明探针 CO-NBS 可以很好地检测到斑马鱼体内的生物硫醇.

2 结论

合成了一种新型的基于香豆素衍生物的荧光探针 CO-NBS, 该探针以 2,4-二硝基苯磺酰基部分作为生物硫醇的选择性识别位点, 具有低检测选择性检测生物硫醇的能力. 在 DMSO-PBS ($V:V=1:1$, 10 mmol/L, pH 7.4)的缓冲溶液中, 能够实现 Cys、Hcy、GSH 的快速 (70, 70, 140 s)、高灵敏性(检出限分别为 92、30、62 nmol/L)响应, 并且该探针 CO-NBS 能够成功应用于

BT-474 细胞和脊椎动物斑马鱼中生物硫醇的荧光成像, 在研究硫醇在病理学分析方面具有潜在应用价值.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

^1H NMR 和 ^{13}C NMR 数据由核磁共振波谱仪(瑞士 Bruker AVANCEIII 600 MHz)测定, 高分辨率电喷雾质谱(ESI-HRMS)数据由 Ultra-Apex Fourier-transform 离子回旋共振质谱仪(Bruker Daltonics Inc)进行测定, 紫外-可见吸收光谱和荧光发射光谱分别由 Agilent Technologies Cary 60 分光光度计和 Agilent Cary Eclipse 荧光光度计记录. 细胞成像和斑马鱼成像图片由激光共聚焦荧光显微镜 Carl of Zeiss (Zeiss LSM 880)拍摄.

4-(二乙基氨基)水杨醛、乙酰乙酸乙酯、哌啶、对羟基苯甲醛、2,4-二硝基苯磺酰氯、九水合硫化钠($\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$)、亚硫酸氢钠(NaHSO_3)、硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)、溴化钠(NaBr)、氯化钠(NaCl)、氟化钠(NaF)、碘化钠(NaI)、半胱氨酸(Cys)、高半胱氨酸(Hcy)、谷胱甘肽(GSH)精氨酸(Arg)、天冬酰胺(Asn)、甲硫氨酸(Met)、缬氨酸(Val)、甘氨酸(Gly)、组氨酸(His)、赖氨酸(Lys)、异亮氨酸(Ile)、酪氨酸(Tyr)、苏氨酸(Thr)、谷氨酰胺(Gln)、天冬氨酸(Asp)、亮氨酸(Leu)、丝氨酸(Ser)、苯甲氨酸(Phe)、谷氨酸(Glu)、色氨酸(Trp)、丙氨酸(Ala)、脯氨酸(Pro)均为分析纯, 购自于安耐吉、麦克林、阿拉丁、科密欧试剂公司。

3.2 探针 CO-NBS 的合成方法

将 4-(二乙基氨基)水杨醛(2.90 g, 15 mmol)、乙酰乙酸乙酯(2.15 g, 16.5 mmol)用 30 mL 乙醇溶解, 然后向烧瓶中滴加哌啶(0.15 mL)。室温搅拌 30 min 后, 将反应液在 78 °C 下再回流 2 h。过滤沉淀, 用乙醇重结晶得到亮黄色晶体 3-乙酰基-7-二乙氨基香豆素(**1**), 3.42 g, 产率 88%。 ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.55 (s, 1H), 7.51 (d, $J=15.8$ Hz, 1H), 6.78 (dd, $J=9.0, 2.0$ Hz, 1H), 6.61 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 3.51~3.39 (m, 4H), 2.47 (s, 3H), 1.22 (t, $J=7.0$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 198.1, 158.9, 156.2, 118.7, 136.8, 130.7, 129.1, 107.9, 107.1, 96.5, 46.8, 29.3, 12.2。

将化合物 **1** (6.50 g, 15 mmol)、对羟基苯甲醛(2.01 g, 16.5 mmol)用 50 mL CH_3CN 溶解, 然后向烧瓶中滴加哌啶(0.66 mL), 将反应液于 80 °C 回流反应 8 h。停止反应, 过滤沉淀, 沉淀用 CH_3CN 洗涤、干燥得到黄色粉末 (*E*)-7-(二乙氨基)-3-(3-(4-羟苯基)丙烯酰基)-2H-吡喃-2-酮(**2**), 3.06 g, 产率 56%。 ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 10.02 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 7.74 (d, $J=15.6$ Hz, 1H), 7.63~7.56 (m, 2H), 7.52 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 6.79 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 6.74 (dd, $J=9.0, 2.0$ Hz, 1H), 6.54 (d, $J=1.6$ Hz, 1H), 3.46~3.42 (m, 4H), 1.09 (t, $J=7.0$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 183.9, 159.4, 157.7, 156.7, 149.1, 146.8, 143.9, 134.1, 130.2, 129.6, 127.1, 125.1, 115.3, 107.9, 106.4, 96.4, 48.9, 37.7, 11.4。

将化合物 **2** (0.54 g, 1.5 mmol)、三乙胺(0.18 g, 1.65 mmol)用 15 mL DMF 溶解, 室温下搅拌 10 min, 然后滴加 2,4-二硝基苯磺酰氯(0.48 g, 1.65 mmol)于烧瓶中。在室温下搅拌反应 10 h 后, 加入水(15 mL)淬灭反应, 然后用 CH_2Cl_2 (20 mL $\times$ 3)萃取。合并有机相, 用无水硫酸钠干燥, 减压旋蒸除去溶剂。将粗产物用柱色谱进一步纯化, 用洗脱液石油醚/乙酸乙酯($V:V=10:1$)洗脱得到橙色固体, 即为探针 CO-NBS, 0.47 g, 产率 53%。m.p.

236.8~237.7 °C; ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 9.13 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 8.62 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 8.60 (s, 1H), 8.26 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.94 (d, $J=15.8$ Hz, 1H), 7.80 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.70~7.64 (m, 2H), 7.28 (d, $J=8.6$ Hz, 2H), 6.82 (dd, $J=9.0, 2.0$ Hz, 1H), 6.62 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 3.51~3.49 (m, 4H), 1.25 (t, $J=7.0$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 185.4, 153.1, 149.3, 148.5, 148.1, 132.4, 130.3, 126.7, 121.1, 115.3, 110.3, 107.9, 95.9, 44.46, 12.33; HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_{10}\text{S}$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 594.1138, found 594.1177。

3.3 探针 CO-NBS 的光谱测试方法

准确称取 CO-NBS 固体(1.18 mg, 2 mmol), 用 1 mL DMSO 溶解得到浓度为 2×10^{-3} mol/L (2 mmol/L) 的探针储备溶液; 同时准确称取各种分析物, 并将其用去离子水溶解, 得到 2×10^{-2} mol/L 的储备溶液。荧光光谱仪设置为: 激发波长 450 nm, 狭缝 5 nm/10 nm, 电压 700 V。

3.4 探针 CO-NBS 细胞毒性测定方法

首先将 BT-474 细胞接种于 96 孔板中, 密度为每孔 1×10^4 个细胞, 然后在培养箱(5% CO_2 , 20% O_2 , 37 °C)中培养 24 h。向培养板中加入梯度浓度(0, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$)探针 CO-NBS 后, 将细胞再培养 12 或 24 h。然后每孔加入 10 μL MTT 溶液(5 mg/L, 溶于 DMSO 中), 温育 4 h 后, 除去 MTT 溶液, 再向每个孔中加入 100 μL DMSO, 在多孔板读数器上记录 490 nm 处的吸光度值。最终根据公式计算细胞存活率: 细胞存活率(%)=(实验组的平均吸光度-空白的平均吸光度)/(对照组的平均吸光度-空白的平均吸光度) $\times 100\%$ 。

辅助材料(Supporting Information) 探针 CO-NBS 的 ^1H NMR、 ^{13}C NMR、HR-MS、紫外和荧光光谱以及 MTT 数据。这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载。

References

- [1] Zhang, S.; Ong, C. N.; Shen, H. M. *Cancer Lett.* **2004**, 208, 143.
- [2] Wang, S. Q.; Shen, S. L.; Zhang, Y. R.; Dai, X.; Zhao, B. X. *Chin. J. Org. Chem.* **2014**, 34, 1717 (in Chinese).
(王胜清, 申世立, 张延如, 戴溪, 赵宝祥, 有机化学, **2014**, 34, 1717.)
- [3] Yan, P. P.; Wang, T.; Zhang, D.; Ma, X. Y. *Chin. J. Org. Chem.* **2019**, 39, 916 (in Chinese).
(闫沛沛, 王婷, 张丹, 马晓雪, 有机化学, **2019**, 39, 916.)
- [4] Niu, L. Y.; Chen, Y. Z.; Zheng, H. R.; Wu, L. Z.; Tung, C. H.; Yang, Q. Z. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 6143.
- [5] Weerapana, E.; Wang, C.; Simon, G. M.; Richter, F.; Khare, S.; Dillon, M. B. D.; Bachovchin, D. A.; Mowen, K.; Baker, D. *Nature* **2010**, 468, 790.
- [6] Yue, Y. K.; Huo, F. J.; Ning, P.; Zhang, Y. H.; Chao, J. B.; Meng, X.

- M.; Yin, C. X. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 3181
- [7] Huo, F. J.; Sun, Y. Q.; Su, J.; Chao, J. B.; Zhi, H. J.; Yin, C. X. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4918.
- [8] Qian, Q.; Chen, S. H.; Chen, J. L.; Liu, R.; Wang, Y. S.; Yang, X.; Ye, Y. *Chin. J. Org. Chem.* **2019**, *39*, 2089 (in Chinese). (田庆, 陈双虎, 陈景龙, 刘蕊, 汪雨诗, 杨晓朋, 叶勇, 有机化学, **2019**, *39*, 2089.)
- [9] Fowler, B. *Semin. Vasc. Med.* **2005**, *5*, 77.
- [10] Seshadri, S.; Beiser, A.; Selhub, J.; Jacques, P. F.; Rosenberg, I. H. R.; D'Agostino, B.; Wilson, P. W. F.; Wolf, P. A. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *346*, 476.
- [11] Refsum, H.; Ueland, P. M.; Nygaard, O.; Vollset, S. E. *Annu. Rev. Med.* **1998**, *49*, 31.
- [12] van Meurs, J. B. J.; Dhonukshe-Rutten, R. A. M.; Pluijm, S. M. F.; von der Klift, M.; de Jonge, R.; Lindemans, J.; de Groot, L. C. P. G. M.; Hofman, A.; Witteman, J. C. M.; van Leeuwen, J. P. T. M.; Breteler, M. M. B.; Lips, P.; Pols, H. A. P.; Uitterlinden, A. G. N. *Engl. J. Med.* **2004**, *350*, 2033.
- [13] Hong, R.; Han, G.; Fernández, J. M.; Kim, B. J.; Forbes, N. S.; Rotello, V. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1078.
- [14] Hassan, S. S. M.; Rechnitz, G. A. *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 1972.
- [15] Hwang, C.; Sinsky, A.; Lodish, H. *Science* **1992**, *257*, 1496.
- [16] Liu, Y. C.; Xiang, K. Q.; Tian, B. Z.; Zhang, J. L. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57*, 2478.
- [17] Pan, J.; Xu, J. C.; Zhang, Y. L.; Wang, L.; Qin, C. Q.; Zeng, L. T.; Zhang, Y. *Spectrochim. Acta, Part A* **2016**, *168*, 132.
- [18] Li, X. Q.; Huo, F. J.; Yue, Y. K.; Zhang, Y. B.; Yin, C. X. *Sens. Actuators, B* **2017**, *253*, 42.
- [19] Xie, J. Y.; Li, C. Y.; Li, Y. F.; Fei, J. J.; Xu, F.; Yang, J. O.; Liu, J. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 9746.
- [20] Yang, Y.; Zhao, Q.; Feng, W.; Li, F. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 192.
- [21] Chan, J.; Dodani, S. C.; Chang, C. J. *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 973.
- [22] Yang, Z.; Cao, J.; He, Y.; Yang, J. H.; Kim, T.; Peng, X.; Kim, J. S. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 4563.
- [23] Chen, S.; Wang, J.; Hou, P.; Liu, L.; Wang, X. *J. Instrum. Anal.* **2016**, *35*, 1004 (in Chinese). (陈颂, 王静, 侯鹏, 刘磊, 王鑫, 分析测试学报, **2016**, *35*, 1004.)
- [24] Wang, P.; Wang, Q. Q.; Huang, J. X.; Li, N.; Gu, Y. Q. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *92*, 583.
- [25] Yu, Y. W.; Yang, J. J.; Xu, X. H.; Jiang, Y. L.; Wang, B. X. *Sens. Actuators, B* **2017**, *251*, 902.
- [26] Wang, J. Y.; Liu, Z. R.; Ren, M. G.; Kong, X. Q.; Lin, W. Y. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 134.
- [27] Tong, L. L.; Qian, Y. J. *Mater. Chem. B* **2018**, *6*, 1791.
- [28] Wang, L. Y.; Chen, X. G.; Cao, D. R. *Sens. Actuators, B* **2017**, *244*, 531.
- [29] Zhao, J. Z.; Huang, L.; Cui, X. N.; Li, S. J.; Wu, H. J. *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 9194.
- [30] Kong, F. P.; Liang, Z. Y.; Luan, D. R.; Liu, X. J.; Xu, K. H.; Tang, B. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 6450.
- [31] Xu, K. H.; Qiang, M. M.; Gao, W.; Su, R. X.; Li, N.; Gao, Y.; Xie, Y. X.; Kong, F. P.; Tang, B. *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 1079.
- [32] Ye, Z.; Duan, C.; Hu, Q.; Zhang, Y.; Qin, C. Q.; Zeng, L. T. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 3600.
- [33] Yang, J.; Lu, Y. R.; Ni, W. H.; Yin, W. B.; Liu, T. H.; Chen, S. J. *J. Instrum. Anal.* **2018**, *37*, 1004 (in Chinese). (杨晶, 卢宜然, 倪伟华, 尹博文, 刘桃花, 陈颂, 分析测试学报, **2018**, *37*, 1004.)
- [34] Li, J. S.; Zhou, W. Y.; Ouyang, X. Y.; Yu, H.; Yang, R. H.; Tan, W. H.; Yuan, J. L. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 1356.

(Cheng, F.)