

高选择性硒代半胱氨酸荧光探针的构建策略及成像

张莹珍 江丹丹 李娟华 王菁菁 刘昆明* 刘晋彪*

(江西理工大学化学化工学院 江西赣州 341000)

摘要 硒代半胱氨酸(Sec)在维持生命系统运行中具有重要地位,其浓度异常,将导致多种生理疾病.荧光探针具有高灵敏度、高时空分辨率、无损和可视化检测的优点.然而,由于生物硫醇的干扰,用于体内成像的高选择性硒代半胱氨酸探针构建具有挑战性.近年来,为了提高探针选择性、准确性和荧光特性等,人们采取了多种设计策略.基于识别机制类型,从设计原理、性能特点及成像应用几个方面对 Sec 荧光探针的研究进展进行了评述,并展望了该领域面临的挑战和发展趋势.

关键词 硒代半胱氨酸; 荧光探针; 设计策略; 选择性; 生物成像

Construction Strategy and Imaging of Highly Selective Selenocysteine Fluorescent Probes

Zhang, Yingzhen Jiang, Dandan Li, Juanhua Wang, Jingjing
Liu, Kunming* Liu, Jinbiao*

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Jiangxi University of Science and Technology, Ganzhou, Jiangxi 341000)

Abstract Selenocysteine (Sec) is important in maintaining the functioning of living systems and its abnormal concentration will lead to a variety of physiological disorders. Fluorescent probes offer the advantages of high sensitivity, high spatial and temporal resolution, nondestructive and visual detection. However, the construction of highly selective selenocysteine probes for *in vivo* imaging is challenging due to the interference of biothiols. In recent years, various design strategies have been adopted to improve probe selectivity, accuracy and fluorescence properties. The research progress of Sec fluorescent probes in terms of design principles, performance characteristics and imaging applications based on the type of recognition mechanism is reviewed, and the challenges and development trends in this field are predicted.

Keywords selenocysteine; fluorescent probe; design strategies; selectivity; bioimaging

自 1817 年硒元素被发现以来,其生物活性已被人们共识^[1].作为必需微量元素,硒在维持生物体氧化还原平衡、激活免疫反应、预防癌症和炎症等方面具有重要作用^[2-5].其中,硒代蛋氨酸是生物体中硒的主要储备来源,而硒代半胱氨酸(Sec)是硒蛋白(SePs)的活性中心,赋予后者各种细胞功能,影响着硒蛋白的许多功能(包括蛋白质结构、甲状腺激素的产生以及 DNA 合成和细胞生长)^[6-9].人体内 Sec 的水平异常,将导致功能性硒蛋白缺乏,诱发克山病、大骨节病、心血管疾病、神经退行性疾病等^[10-12].硒代半胱氨酸是硒蛋白的重要功能成分,为了阐明 Sec 在生物系统中的生理作用,人们已发展出多种检测技术,如电感耦合等离子体质谱(ICP-

MS)^[13]、原子荧光光谱(AFS)^[14]、高效液相色谱(HPLC)^[15]等,但大多需要样品制备与预处理,难以满足细胞中 Sec 的实时和原位检测.

荧光探针具有高特异性和灵敏度,对检测对象无破坏性,被广泛应用于高时空分辨率的生命系统荧光成像.发展至今,对生物体内活性氧、生物硫醇、金属离子等特异性识别的荧光探针已有大量报道^[16-22].硒代半胱氨酸主要分布在某些亚细胞之中,极易被空气氧化;并且化学性质与硫醇极为相似,在细胞中浓度通常低于半胱氨酸(Cys)、谷胱甘肽(GSH)等生物硫醇,竞争性反应将严重干扰探针的检测.因此,构建高选择性硒代半胱氨酸探针具有极大挑战性.近年来,随着一些新型荧

* Corresponding authors. E-mail: liukunming@jxust.edu.cn; liujinbiao@jxust.edu.cn

Received May 24, 2023; revised July 11, 2023; published online September 21, 2023.

Project supported by the Jiangxi Provincial Natural Science Foundation (No. 20212BAB203013), the Science and Technology Project of the Education Department of Jiangxi Province (No. GJJ2200820) and the National College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program (No. 202110407006).
江西省自然科学基金(No. 20212BAB203013)、江西省教育厅科技项目(No. GJJ2200820)和大学生创新创业训练计划(No. 202110407006)资助项目.

光团和识别基团的出现, 已开发出多种 Sec 探针, 并用于生物体内成像. 2020 年, 张继东等^[23]对硒化合物荧光传感器的研究进展进行了总结. 2023 年, Sivaiah 等^[24]对硒代半胱氨酸检测的最新进展和基于小分子荧光探针的生物医学应用进行了总结和评价. 本文根据识别机制类型, 从设计原理、性能特点及成像应用方面对从 2015 年至今报道的硒代半胱氨酸探针进行了总结, 着重阐述了改善探针特异性识别和成像能力所采用的策略.

1 不同识别机制的硒代半胱氨酸荧光探针

1.1 基于芳香亲核取代反应的 Sec 探针

使用荧光团连接的猝灭剂和作为亲核试剂的分析物的组合的策略在荧光传感设计中引起了极大的关注. 2,4-二硝基磺酸酯和磺酰胺基的芳香亲核取代反应, 常作为识别机制用于生物硫醇荧光探针的设计(图 1).

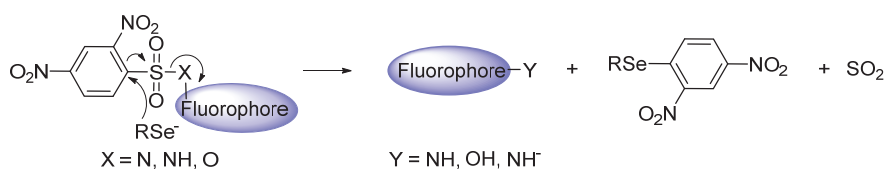


图 1 基于 2,4-二硝基苯磺基与 Sec 的反应机理

Figure 1 Reaction mechanism based on 2,4-dinitrophenylsulfonyl with Sec

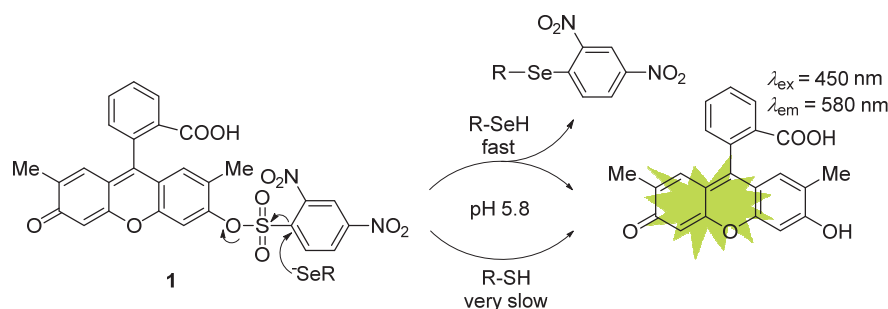


图 2 基于荧光素骨架的探针 1 对 Sec 的选择性识别机理

Figure 2 Mechanism of selective recognition of Sec by fluorescein backbone based probe 1

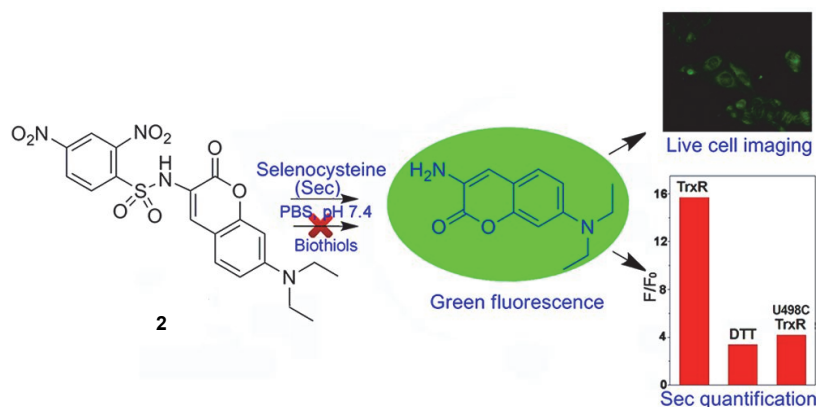


图 3 生理条件下的探针 2 对 Sec 的识别机理及成像^[26]

Figure 3 Recognition mechanism and imaging of Sec by probe 2 under physiological conditions^[26]

通过取代基调整荧光淬灭基团的电子云密度,从而调控探针的反应性能,有利于硒醇阴离子的优先进攻. 在 pH 7.4 下,探针 **2** 对 Sec 具有快速响应(<3 min),荧光增强高达 100 倍,且没有明显的生物硫醇、胺类或醇类干扰. 探针被成功用于硫氧还蛋白氧化还原酶(TrxR)中 Sec 含量的测定,并可对活性 HepG2 细胞中的内源性 Sec 成像.

2018 年,冯国强课题组^[27]基于 3-苯并噻唑-7-羟基香豆素(BTHC)荧光团构建了探针 **3**(图 4). 虽然识别机制与探针 **1** 相同,但仅需对检测溶液简单调控[含 2%~5%二甲基亚砜(DMSO)的水溶液],即可实现生理条件下对 Sec 的选择性识别. 探针 **3** 具有高灵敏度的比色/荧光双信号开启响应,检测限(LOD)为 47 nmol/L,并具有较宽的线性范围(0~80 $\mu\text{mol/L}$). 此外,探针 **3** 的低细胞毒性有利于血清样品和活细胞中外源性和内源性的 Sec 荧光成像.

在一些硒缺乏症,如克山病或大骨节病患者体内,Sec 水平远低于健康成人血清硒浓度. 在这种情况下,由于上述探针荧光量子效率不高,导致内源性 Sec 的荧光成像敏感性低,限制了探针在体内检测的应用. 2016 年,杨文超课题组^[28]基于香豆素荧光团合成了探针 **4**(图 5),利用八氢喹啉结构阻断香豆素环 7-位氮原子的内部扭曲,使荧光量子效率获得显著提高. 与探针 **2** ($\Phi=0.14$)相比,该探针荧光量子效率提高至 0.30. 在 pH=6.0 的条件下,探针 **4** 与 Sec 反应后荧光强度增幅高达 250 倍,检测限低至 18 nmol/L,并具有更大的反应速率常数(约 2.15 min^{-1}). 利用探针 **4** 在接近零荧光背景

下细胞成像,能够通过流式细胞术检测内源性硒醇,并可用于区分癌细胞和正常细胞.

氧杂蒽类化合物因其优异的荧光量子效率、良好的光稳定性和化学稳定性而具有生物学应用. 2018 年,刘卫敏课题组^[29]设计了一种含有羟基的四氢蒽-氧杂蒽稠合染料,通过对 2,4-二硝基苯磺酰氯进行功能修饰,构建了具有高荧光量子效率的荧光探针 **5** ($\Phi=0.31$)(图 6). 该探针在水溶液中几乎没有荧光,对 Sec 响应快速(<2 min),624 nm 处荧光获得 124 倍增强,并具有高灵敏度(LOD=17 nmol/L). 探针 **5** 呈现良好的生物相容性,被用于活细胞中 Sec 的荧光成像. 该探针的不足在于:由于磺酸酯基的高活性,探针在检测 Sec 时将受到生物硫醇的轻微干扰. 2020 年,蒋玉仁课题组^[30]基于相同荧光骨架合成了探针 **6**(图 6),其特点在于通过向荧光团上修饰一个苯环,使氧杂蒽酮正离子更加稳定,从而具有更强的分子内电荷转移(ICT)效应. 探针在 3 min 内可对 Sec 产生荧光响应,在 614 nm 处荧光增强约 20 倍,定量检测范围为 0~32 $\mu\text{mol/L}$,检测限低至 11.2 nmol/L,并且不受生物硫醇和其它氨基酸的干扰.

激发态分子内质子转移(ESIPT)化合物具有特殊的激发态光物理过程,其显著的光物理性质是有较高的荧光量子产率及大的斯托克斯位移. 2022 年,蒋玉仁课题组^[31]采用菲并咪唑荧光骨架和 2,4-二硝基苯磺酰基(DNBS)识别基团设计了异构体探针 **7** 和 **8**(图 7). 两种探针与 Sec 发生芳香亲核取代后,磺酸酯基断裂释放出酚羟基. 由于羟基所处取代位置差异,将分别通过 ESIPT 效应和 ICT 效应恢复荧光发射. 两种探针对 Sec 均具有

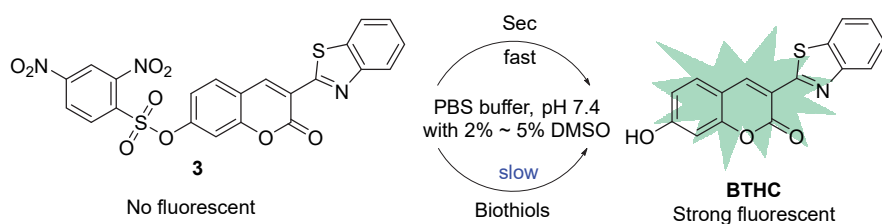


图 4 比色/荧光双信号探针 **3** 对 Sec 的识别

Figure 4 Identification of Sec by colorimetric/fluorescent dual signal probe **3**

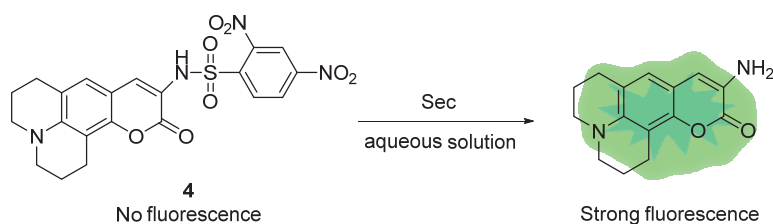


图 5 高荧光量子产率的探针 **4** 对 Sec 的识别

Figure 5 Identification of Sec by probe **4** with high fluorescence quantum yield

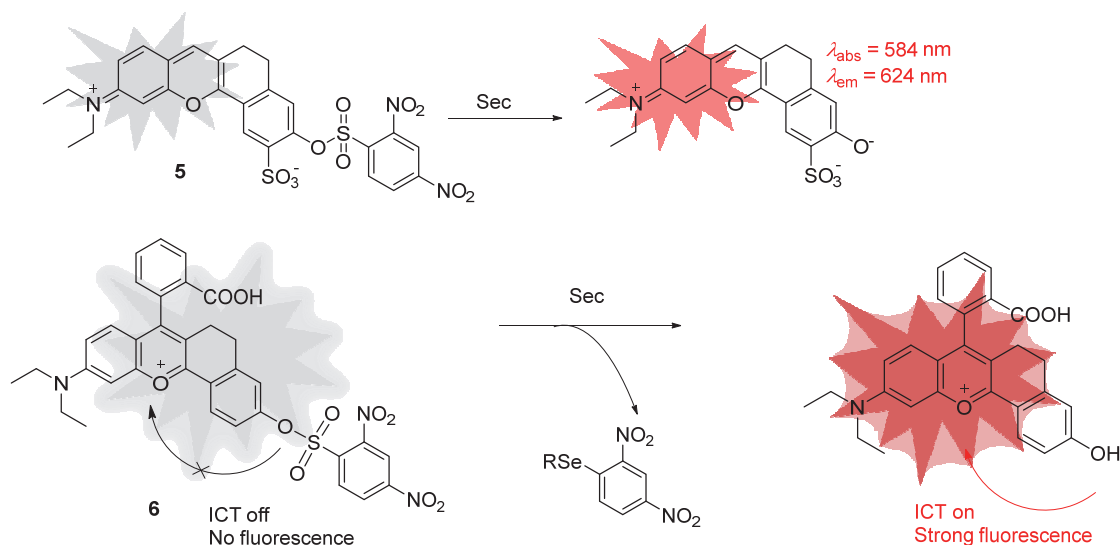


图6 基于四氢萘-氧杂蒽稠合染料骨架的探针5和6

Figure 6 Probes 5 and 6 based on tetrahydronaphthalene-oxanthene dyestuff backbone

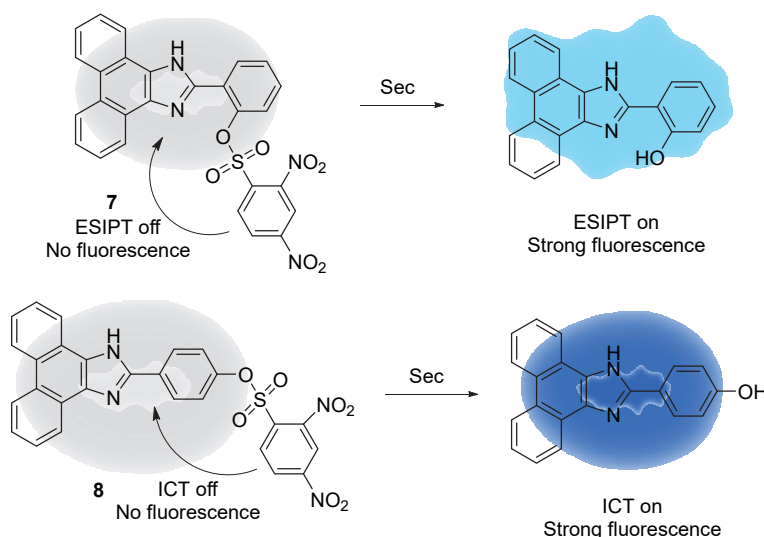


图7 识别位点区域性差异的异构体探针7和8

Figure 7 Isomeric probes 7 and 8 for regional differences in recognition sites

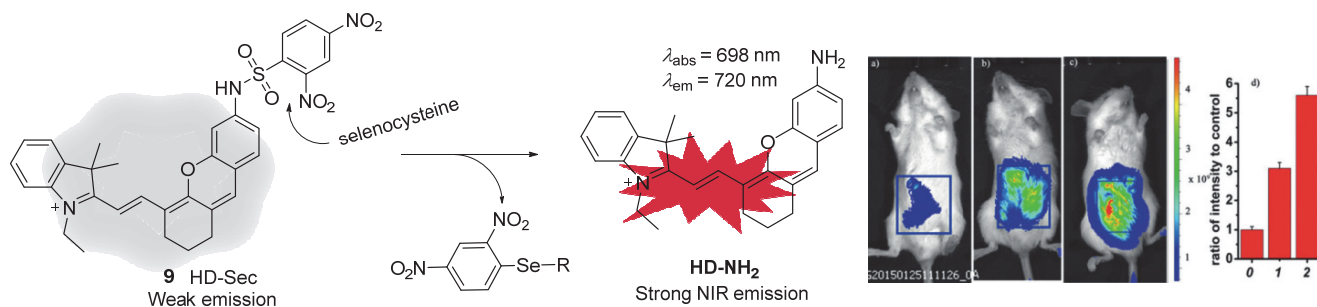
快速的荧光开启响应、较高的选择性和灵敏度,成功用于活细胞中 Sec 的荧光成像. 与探针 8 相比,探针 7 的 ESIPT 效应赋予其更大的 Stokes 位移(125 nm)、更宽的 pH 适用范围(5~10)和更低的检测限(65.4 nmol/L). 通过探针构效关系的比较,清楚地揭示了这两种设计原理的荧光探针优缺点,为开发具有大 Stokes 位移、低荧光自干扰和高灵敏度的 Sec 探针提供了指导.

1.1.2 基于近红外区域的 Sec 探针

探针 1~8 的荧光发射位于可见光区域,适用活细胞的成像研究. 对于活体动物的成像,则要求探针荧光具有足够的穿透性. 近红外光(NIR)在生物成像中具有

对生物样品的光损伤小,组织穿透能力强,活体系统中生物分子的背景自发荧光干扰低等优点. 近年来,几类新型近红外荧光团被用来构建高选择性 NIR 荧光探针,为活体动物体内 Sec 荧光成像提供了新思路.

2015 年,林伟英课题组^[32]采用近红外染料 HD-NH₂ 作为荧光团,并通过 2,4-二硝基苯磺酰基(DNBS)修饰游离氨基,合成了 NIR 荧光探针 9(图 8). 探针与 Sec 通过芳香亲核取代反应释放香豆素衍生物,引起 65 倍荧光增强. 在生理条件下,探针对常见氨基酸、金属离子和生物硫醇表现优异的抗干扰性,并具有良好的生物相容性,成功用于活体细胞和动物中硒醇的荧光成像.

图 8 近红外染料骨架探针 9 对 Sec 的识别及成像^[32]Figure 8 Identification and imaging of Sec by NIR dye skeleton probe 9^[32]

2021 年, 蒋玉仁课题组^[33]通过向氧杂蒽染料引入共轭芳环, 将荧光发射拓宽至近红外区, 构建了 NIR 探针 10(图 9). 在生理条件下向探针 10 中加入 Sec, 5 min 内在 660 nm 处产生显著的近红外荧光增强. 探针的灵敏度能够满足生物体内 Sec 的定量检测(线性范围 0~40 $\mu\text{mol/L}$, LOD=18.5 nmol/L). 与课题组开发的探针 6 相比, 探针 10 克服了水溶性差、发射波长短等缺点, 被用于活体细胞和活体小鼠中 Sec 的可视化检测.

在近红外探针的分子设计中, 合理选择荧光团十分

重要. 对于 Stokes 位移较小的探针, 由于激发背散射效应, 可能导致严重的荧光自猝灭和较大的检测误差. 2017 年, 冯国强课题组^[34]选择二氨基甲基苯并吡喃骨架为荧光团, 设计合成了具有大 Stokes 位移(192 nm)的 NIR 探针 11(图 10). 探针具有显著的比色和荧光信号开启变化、低检测限(60 nmol/L)和较宽的线性范围(0.2~80 $\mu\text{mol/L}$), 成功用于血清样品、活细胞和动物中的 Sec 检测, 展现出生物学应用潜力. 2018 年, 赵劲课题组^[35]采用二氨基槐酮为荧光团, 设计的 NIR 探针 12(图 10)

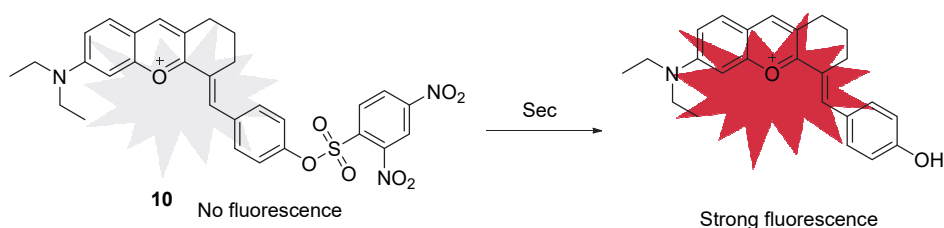


图 9 基于氧杂蒽染料骨架的近红外探针 10

Figure 9 NIR probe 10 based on xanthene dye backbone

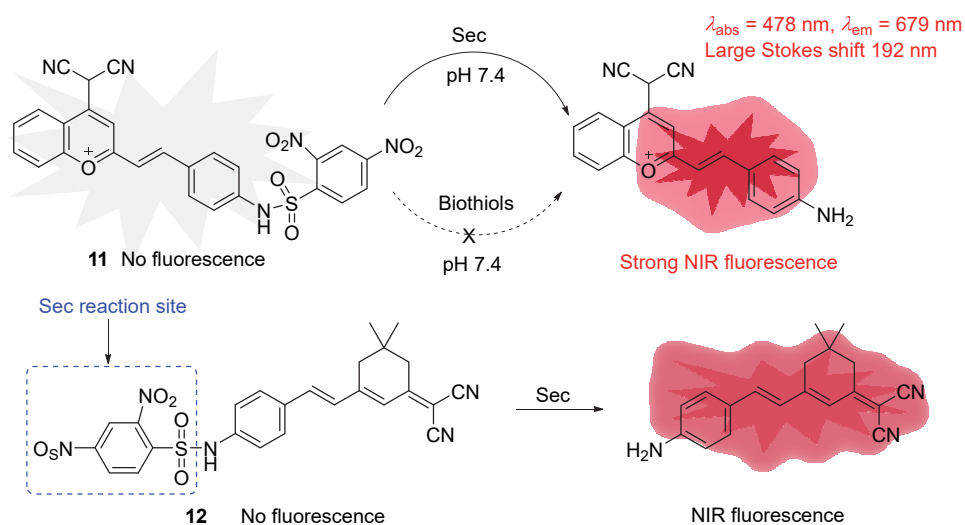


图 10 具有大斯托克斯位移的近红外探针 11 和 12

Figure 10 NIR probes 11 and 12 with large Stokes shifts

同样具有明显的 Stokes 位移(195 nm), 对 Sec 的选择性识别表现出荧光增强 195 倍、高灵敏度(LOD = 10 nmol/L). 良好的选择性和低细胞毒性使得该探针可用于检测裸鼠异种移植活肿瘤中内源性 Sec.

2023 年, 周礼义课题组^[36]发现通过调整硝基荧光染料苯环上硝基的取代位置, 可方便地将荧光发射拓宽至 740 nm. 采用 DNBS 对染料游离羟基进行修饰, 构建了一种基于分子内电荷转移机理(ICT 效应)的 NIR 荧光探针 **13** (图 11). 探针具有较大的 Stokes 位移(120 nm)和荧光量子效率($\Phi=0.17$), 可获得 20 倍的近红外荧光增强, 并表现出高灵敏度和高选择性的靶向能力. 探针 **13** 被用于活细胞和小鼠的 NIR 成像, 深度成像结果说明其在生物系统中的潜在应用价值.

硒代半胱氨酸作为线粒体中氧化还原酶的重要活性位点, 负责细胞保护作用 and 细胞内氧化还原稳态. 二

硫化碳(CS_2)是工业中常见的溶剂, 可以抑制氧化还原酶的活性并诱导氧化应激. 2018 年, 陈令新课题组^[37]基于七甲基花菁荧光团, 构建了一种线粒体靶向近红外比率探针 **14**. 探针由三个部分组成: 近红外七甲基花菁为信号转导单元, 2,4-二硝基苯磺酰胺为响应单元, 亲脂性三苯基膦阳离子(PPh_3^+)为线粒体靶向单元. 在花菁片段引入大空间位阻取代基, 有助于调控探针与 SePs 的反应选择性(图 12). 探针可在 4 min 内快速响应 Sec, 不受硫醇、金属离子和阴离子的干扰, 可用于定量评估对 CS_2 诱导的细胞和肝损伤的 Sec 保护作用.

1.1.3 基于双响应模式和双光子的 Sec 探针

双响应模式探针和双光子探针在生物活性成分的检测中日益受到重视, 前者有助于提高检测结果的准确度, 后者则有助于避免对生命系统的光毒性问题. 2020 年, 蒋玉仁课题组^[38]以香豆素荧光团为供体、4-羟基萘

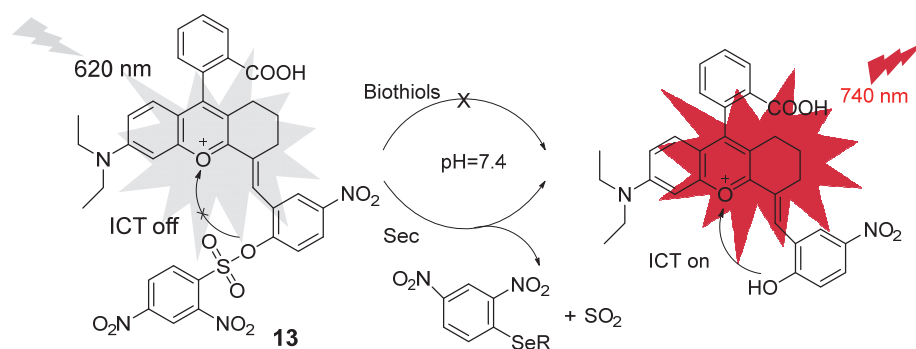


图 11 基于 ICT 效应的近红外探针 **13**
Figure 11 NIR probe **13** based on ICT effect

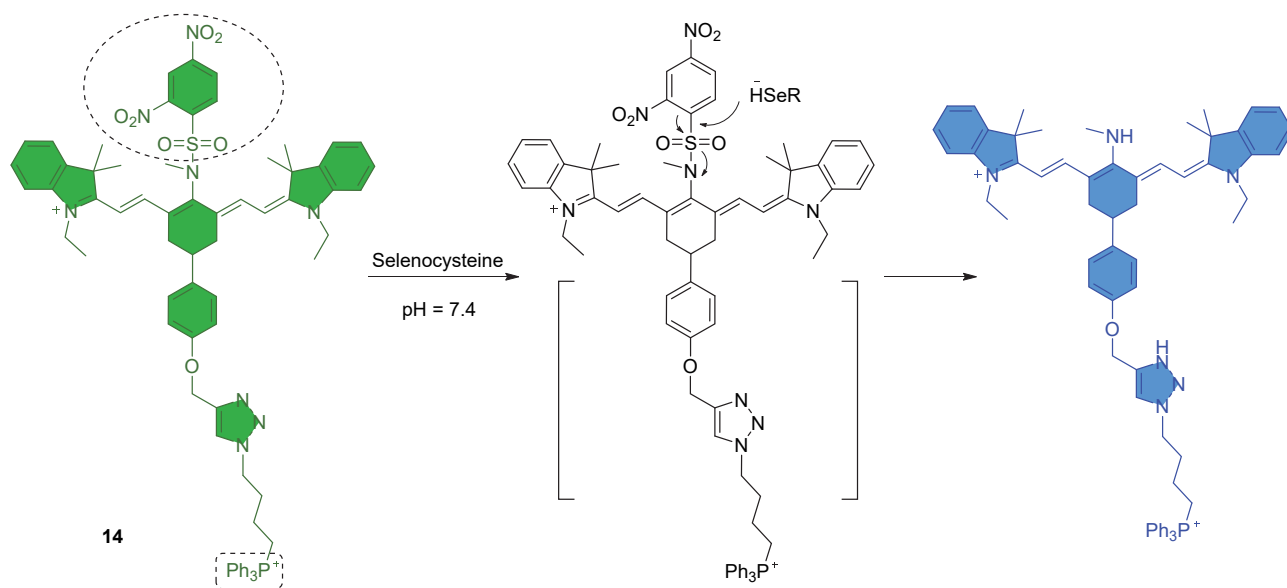


图 12 基于七甲基花菁骨架的近红外比率探针 **14**
Figure 12 NIR ratio probe **14** based on heptamethanocyanine backbone

二甲酰亚胺荧光团为受体、DNBS 为荧光信号猝灭剂,设计了一种双响应型比率荧光探针 **15**(图 13). 由于 DNBS 的强吸电子性, 探针 **15** 具有 ICT 效应, 在 482 nm 处产生荧光发射; 当与 Sec 作用后, 磺酸酯基裂解形成羟基, 产生荧光共振能量转移(FRET), 导致 550 nm 处荧光增强. 探针在 4 min 内能快速形成比率荧光响应, 并对常见氨基酸和无机硒化物具有优良的抗干扰能力. 与课题组开发的探针 **6** 和 **10** 相比, ICT/FRET 双响应模式赋予探针 **15** 更宽的检测范围($0\sim 45\ \mu\text{mol/L}$)和更高的灵敏度($\text{LOD}=6.9\ \text{nmol/L}$), 在活体细胞成像中展现出明显的信号变化.

与单光子光源相比, 使用双光子激光器作为光源可以避免对生物系统的光毒性问题, 实现更深的穿透深度. 2021 年, 周礼义课题组^[39]以具有 D- π -A 结构的 2-(2-萘基)苯并噻唑作为双光子荧光团, DNBS 作为 Sec 响应位点合成新型双光子荧光探针 **16**(图 14). 随着硒醇负离子亲核进攻断裂磺酸酯基, 探针在 510 nm 处呈 18.9 倍荧光增强, 所释放的双光子荧光团具有低细胞毒性和 pH 稳定性, 对活体细胞和斑马鱼中 Sec 的荧光检测具有高分辨成像性能.

1.1.4 基于荧光碳点的 Sec 探针

与有机小分子荧光探针相比, 荧光碳点(CDs)具有更优良的光稳定性和生物相容性, 在生物体的长期成像方面优势明显. 2017 年, 杨小峰课题组^[40]以间氨基苯酚(mAP)为碳源, 采用一锅溶剂热法制备了黄绿色发光碳

点(Y-G-CD)作为荧光团, 并通过化学修饰在 Y-G-CD 表面引入 2,4-二硝基苯磺酰基(DNS)识别基团, 构建了首例生理条件下的 Sec 荧光纳米探针 **17**(图 15). 由于硒醇负离子的亲核性高于硫醇负离子, 探针在与 Sec 反应时, DNS 基团更易裂解形成高强度荧光的 Y-G-CD, 而对 Hcy(同型半胱氨酸)、Cys 和 GSH 等生物硫醇, 则只开启较弱的荧光信号, 表现出对 Sec 更高的灵敏度和选择性. 尽管与小分子探针相比, 探针 **17** 在检测液中是非均相的, 但该探针在细胞中具有可渗透性, 同样适于活细胞中 Sec 的荧光成像. 这一工作对寻找更好的荧光团, 构建可生物成像的 Sec 探针具有新的启示.

1.2 基于苯醚磺解反应的 Sec 探针

苯醚的磺解反应被广泛用于生物硫醇探针的设计. 其中, 2,4-二硝基苯醚(DNB)由于邻、对位硝基的强吸电子效应, 易接受亲核试剂进攻发生醚键断裂, 近年来也被用于硒代半胱氨酸探针的构建. 基于 2,4-二硝基苯醚磺解的探针, 与上述描述的 2,4-苯磺酰胺基和磺酯基相比, 含有 2,4-二硝基苯醚基的荧光探针以更快的速率与 Sec 反应(图 16). 2016 年, 宋钦华课题组^[41]通过向荧光染料硼-二苯并吡喃甲烷(B-Bodipy)中引入 2,4-二硝基苯氧基, 设计合成了两个 NIR 荧光探针 **18** 和 **19**(图 17). 两种探针均能利用硒醇和硫醇之间的 pK_a 值差异优先接受 Sec 进攻, 断裂 2,4-二硝基苯基片段, 在 655 nm 以上开启荧光. 检测限分别为 16 nmol/L 和 9 nmol/L. 由于识别位点和荧光团的细微差异, 探针 **19** ($\text{LOD}=9$

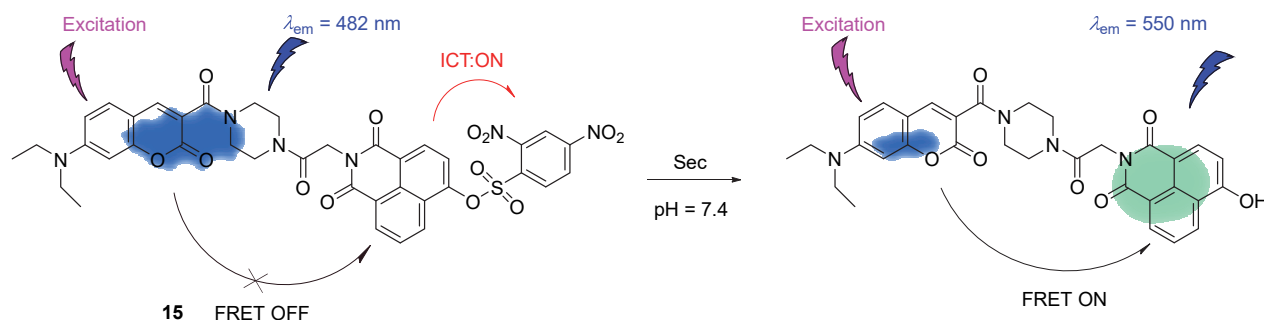


图 13 双响应型比率探针 **15** 对 Sec 的识别

Figure 13 Identification of Sec by dual response ratio probe **15**

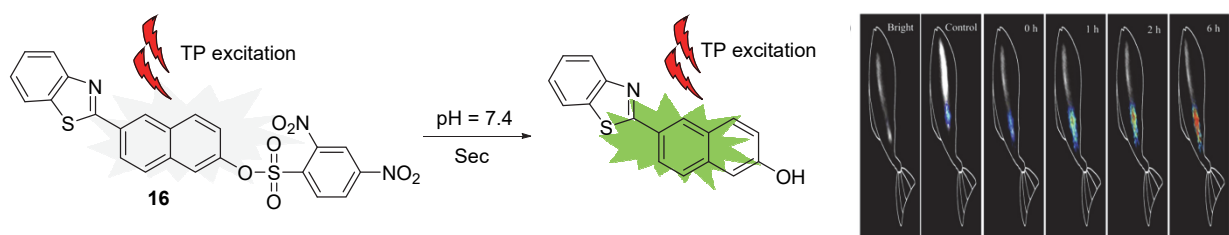


图 14 双光子探针 **16** 对 Sec 的识别^[39]

Figure 14 Identification of Sec by two-photon probe **16** ^[39]

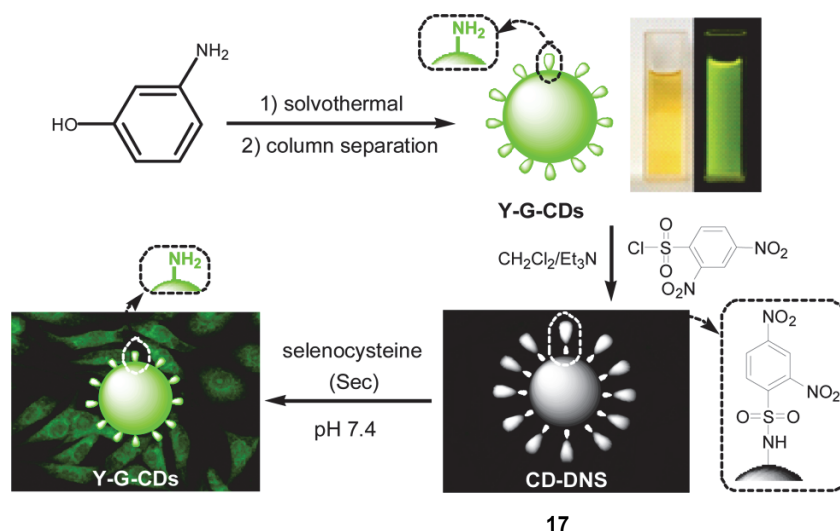
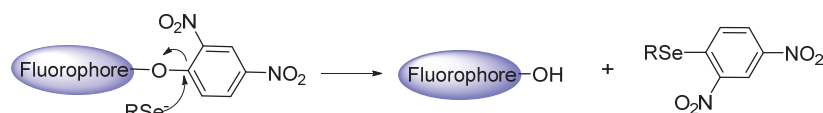
图 15 碳点探针 17 的合成及对 Sec 的识别^[40]Figure 15 Synthesis of carbon dot probe 17 and recognition of Sec^[40]

图 16 基于苯醚与 Sec 硒解反应机理

Figure 16 Based on the reaction mechanism of selenolysis between phenyl ether and Sec

nmol/L)表现出比探针 18 (LOD=16 nmol/L)更高的灵敏度,可用于检测活细胞中的外源性 Sec 和亚硒酸诱导产生的 Sec. 此外,探针 18 对光漂白更为温和,作为 NIR 荧光探针成功用于小鼠成像实验,为进一步用于人体中 Sec 含量的检测提供了良好的开端.

2017 年,冯国强课题组^[42]基于二腈基亚甲基苯并吡喃骨架构建了一种 Sec 比色/荧光双信号探针 20(图

18). 探针的 2,4-二硝基苯醚基团被硒解后,所释放的荧光团在 560 nm 处有紫外吸收和 706 nm 处有近红外荧光发射,呈现显著的 Stokes 位移(146 nm). 在常见氨基酸和生物硫醇等干扰物存在下,探针的线性检测范围(0.2~80 $\mu\text{mol/L}$)可满足对生理浓度内 Sec 的高灵敏度快速响应(LOD=62 nmol/L),实现了对 HeLa 细胞中 Sec 的定量检测和荧光成像.

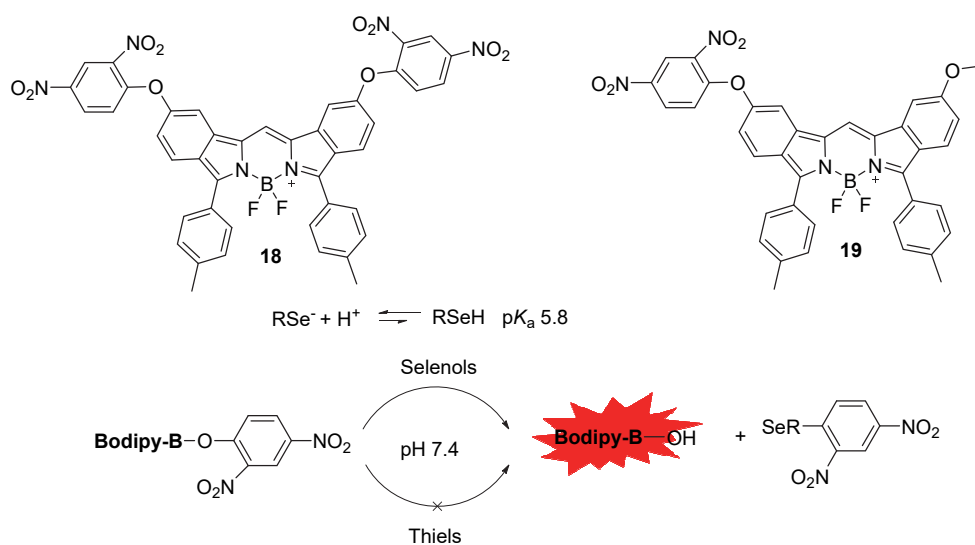
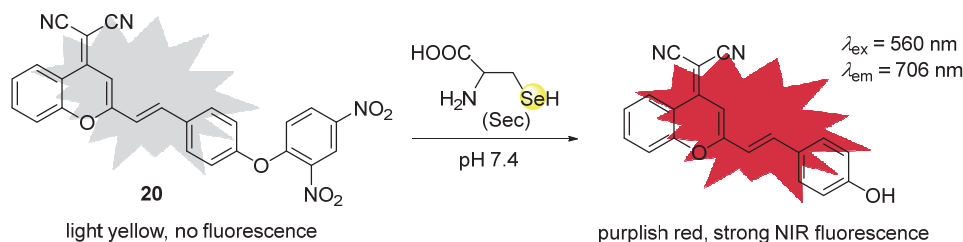


图 17 基于 B-Bodipy 骨架的探针 18 和 19 对 Sec 的选择性识别

Figure 17 Selective recognition of Sec by probes 18 and 19 based on the B-Bodipy backbone

图 18 比色/荧光双信号探针 **20** 对 Sec 的识别Figure 18 Identification of Sec by colorimetric/fluorescent dual signal probe **20**

2020 年, 周礼义课题组^[43]将具有 D- π -A 结构的香豆素骨架与萘二甲酰亚胺荧光团偶联, 经 DNB 修饰后合成了一种基于荧光共振能量转移(FRET)机理的双光子比率荧光探针 **21**(图 19). 探针具有优异的抗干扰性, 能在 35 种常见金属离子、阴离子、无机硒化物和氨基酸中特异性识别 Sec. 借助双光子探针组织穿透性强, 光毒性低的优势, 探针 **21** 被成功用于 HeLa 细胞、裸鼠肝组织和斑马鱼的荧光成像.

1.3 基于加成-环化-裂解串联反应的 Sec 探针

丙烯酸酯是常见的 Michael 受体型检测基团和典型的 TrxR 抑制剂, 可以结合到暴露的酶表面和高活性的半胱氨酸(Cys)或硒代半胱氨酸残基上来抑制酶活性^[44]. 设计的探针与 Sec 响应, 丙烯酸酯基团和硒代半胱氨酸会发生 Michael 加成, 酯基被硒代半胱氨酸的氨基裂解, 通过内部环化形成酰胺, 使得探针荧光发生变化(图 20). 2017 年, 敬静课题组^[45]将丙烯酸酯部分作为反应受体连接在 4-羟基萘酰亚胺上作为信号基团, 并引入丙烯酸酯作为吸电子基团, 设计合成了一种基于 ICT 机理的 Sec 比率探针 **22**(图 21). 丙烯酸酯可以有效地调节电子, 以改变探针的光物理性能. 在 Sec 作用下, 丙烯酸酯部分去除后, 在 1 min 内表现出明显的比率和红移(*ca.* 117 nm)荧光信号, 同时表现出从无色到淡黄色的明显颜色变化, 发射红移约 117 nm. 该探针具有大的斯托克斯位移(*ca.* 100 nm), 当用于生理条件下定量检测 Sec 时, 大鼠 Sec 的检测限为 12 nmol/L. 在生物条件下, 大鼠 Sec

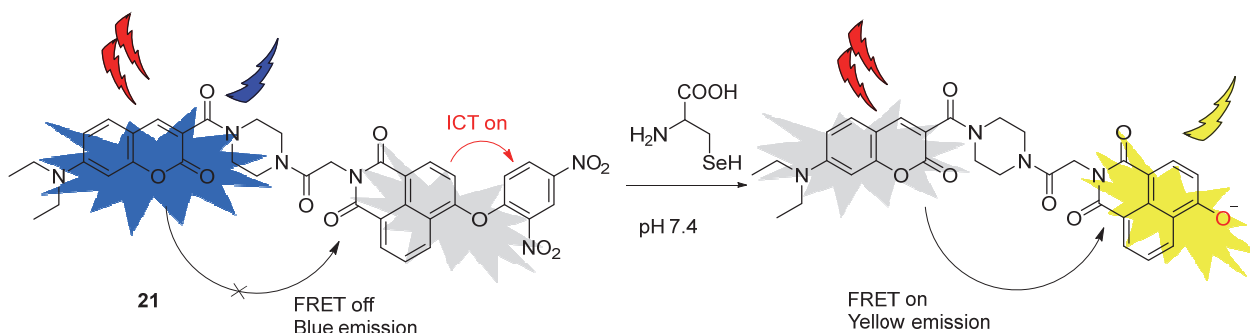
可选择性地对生物硫醇、胺或活性氧 ROS 产生反应, 用于对活细胞中的外源和内源性 Sec 进行成像.

2020 年, 陈光课题组^[46]以近红外七甲基花菁荧光团、丙烯酰胺作为响应部分和脂溶性三苯基膦作为线粒体定位基团, 设计并合成了比率式近红外 Sec 荧光探针 **23**(图 22). 探针与 Sec 首先进行迈克尔加成, 酰胺键断裂后发生亲核反应, 引发 ICT 效应, 使得发射波长蓝移, 表现出明显的比率荧光信号, 并伴随着从绿色到蓝色的颜色变化. 探针 **23** 成功用于检测人体 Nthy-ori-3/BHT 101 细胞和小鼠甲状腺疾病模型中 Sec 浓度的波动, 有望用于诊断甲状腺疾病的临床诊断.

2021 年, Shimomura 课题组^[47]开发了一种通过硒代半胱氨酸和荧光素 O,O'-二丙烯酸酯探针 **24**(FOdA)的反应的安全、简单和可靠的方法来测量胱氨酸摄取活性, 使用硒代胱氨酸作为半胱氨酸类似物, FOdA 作为硒代半胱氨酸的荧光探针, 结合三(2-羧乙基)膦(TCEP)在弱酸条件下进行摄取(图 23). 由于该方法使用过程简单, 可能应用于微板测定. 该方法将有助于阐明与细胞代谢改变和癌症细胞氧化应激相关的胱氨酸摄取调节, 并用于通过高通量筛选发现潜在的抗癌药物, 同时为构建硒代半胱氨酸探针提供了思路.

1.4 基于其它反应的 Sec 探针

除了以上几类反应, 二硫键的硒解^[48]和氮-硒键^[49]的裂解反应也被开发为 Sec 探针的识别策略(图 24). 2017 年, 陈令新课题组等^[50]将七甲基花菁作为近红外

图 19 基于 FRET 机理的双光子比率探针 **21** 对 Sec 的识别Figure 19 Two-photon ratio probe **21** based on FRET mechanism for Sec identification

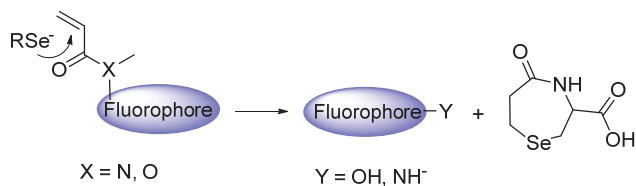


图 20 基于丙烯酸酯与 Sec 的加成-环化-裂解串联反应机理
Figure 20 Mechanism of addition-cyclization-cleavage tandem reaction based on acrylate and Sec

荧光团和双(2-羟乙基)二硫化物作为 Sec 响应位点, 设计合成一种基于分子内部电荷转移(ICT)的比率式近红外荧光探针 **25**(图 25). 探针 **25** 与 Sec 的硒硫交换反应触发 ICT 从绿色到蓝色的颜色变化机制, Sec 还原二硫键触发了快速分子内环化, 在相邻酰胺键裂解后, 释放的荧光基团表现出更大的光谱蓝移. 探针可在 3 min 内产生快速响应, 成功用于活 HepG2, HL-7702 细胞和

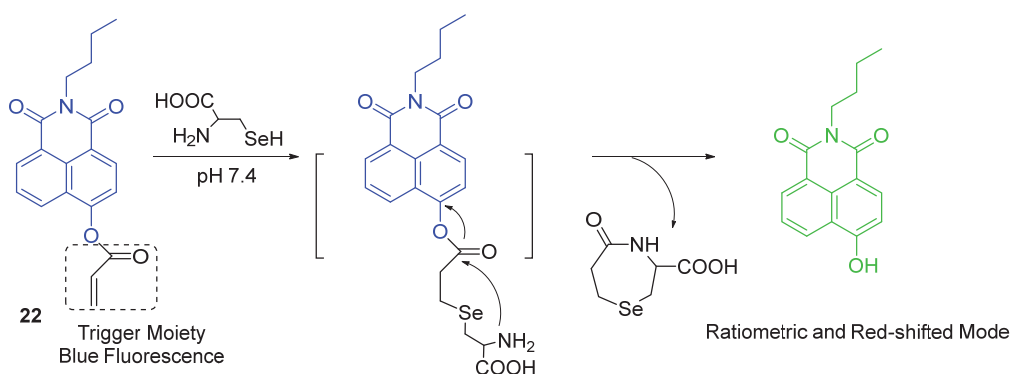


图 21 基于 ICT 机理的比率探针 **22** 对 Sec 的识别机理
Figure 21 Recognition mechanism of Sec by ratio probe **22** based on ICT mechanism

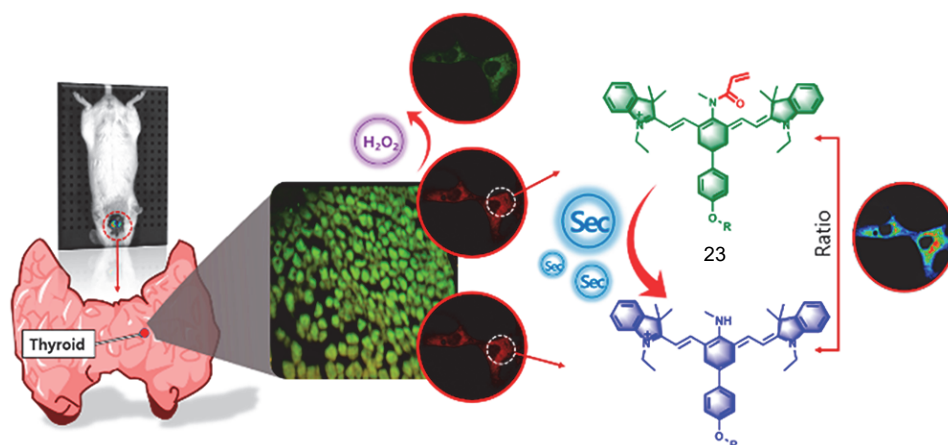


图 22 基于近红外七甲基花菁骨架的比率探针 **23** 对 Sec 的识别及成像^[46]
Figure 22 Identification of Sec by ratio probe **23** based on NIR heptamethocyanine skeleton and imaging^[46]

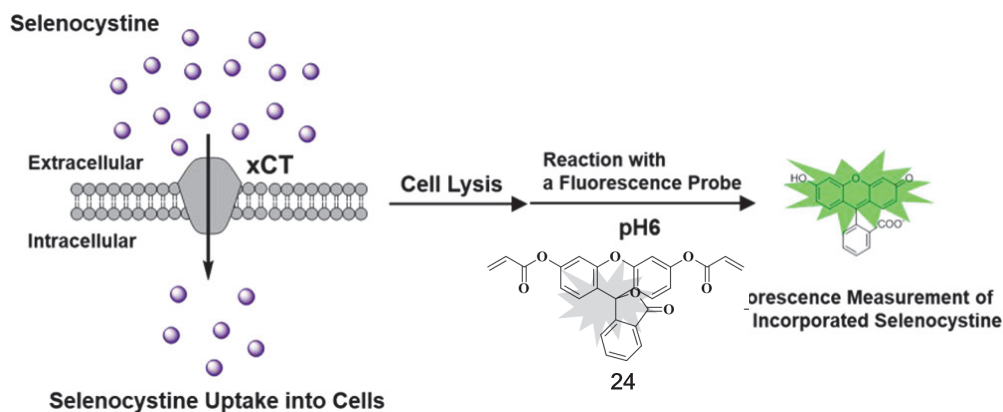


图 23 基于二丙烯酸酯的探针 **24** 对 Sec 的识别及胱氨酸摄取^[47]
Figure 23 Recognition of Sec and cystine uptake by diacrylate-based probe **24**^[47]

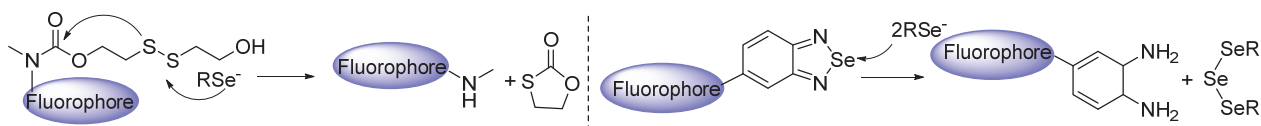
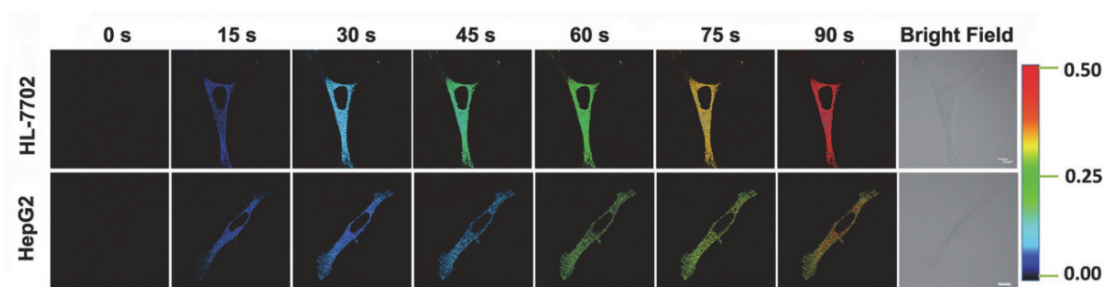
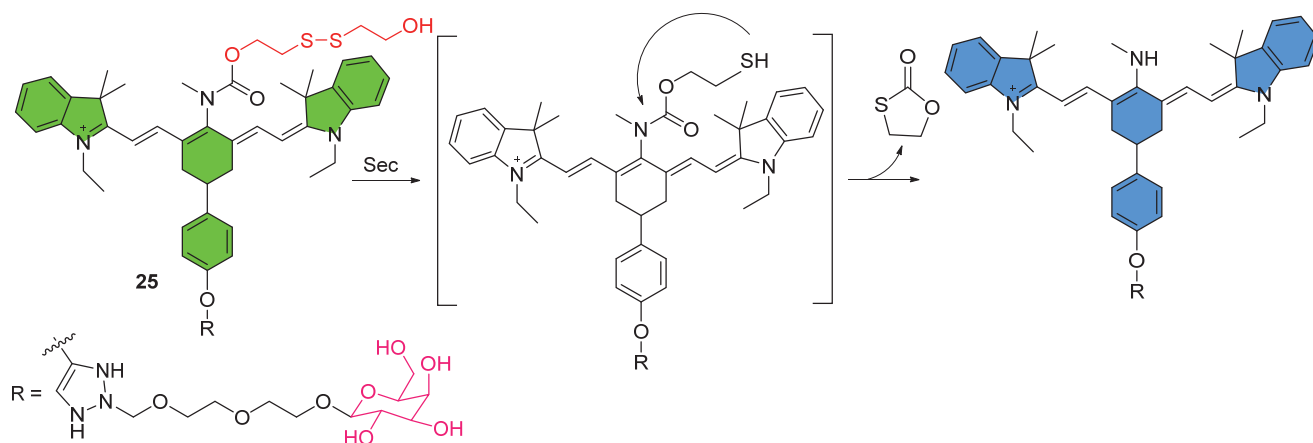


图 24 二硫键的硒解及氮-硒键的裂解机理

Figure 24 Mechanism of selenolysis of disulfide bond and cleavage of N—Se bond

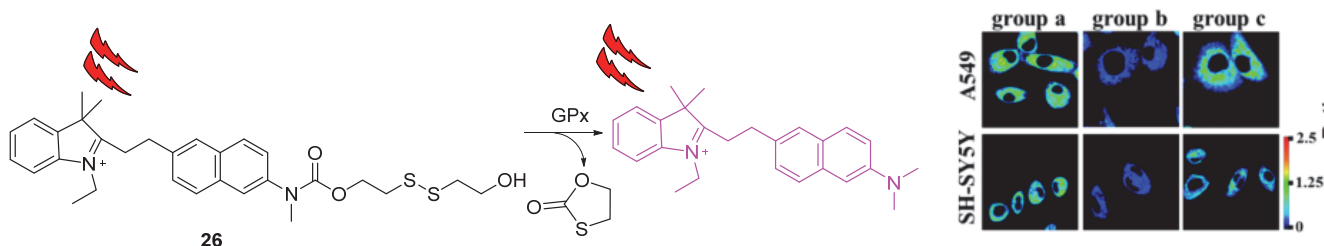
图 25 基于二硫键的探针 25 对 Sec 的识别机理及细胞成像应用^[50]Figure 25 Mechanism of disulfide bond-based probe 25 for Sec recognition and cell imaging applications^[50]

原代小鼠肝细胞中 Sec 的准确定量检测。

2020 年, 该课题组^[51]采用双光子荧光团 **TP-NN** 作为发色团, 基于硒交换反应设计合成了第一个用于检测谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)的双光子比率荧光探针 **26** (图 26), 二硫键被硒反应位点中断, 探针快速分子内环化以释放荧光团 **TP-NN**, 并显示出大的光谱红移。该探针采用两个发射波段的荧光光谱的比率, 有效地防止了

各种环境条件的干扰。探针可在 10 min 内快速检测, 避免 GSH 和其它干扰物的干扰。在探针的帮助下, 发现 GPx 在衰老细胞和小鼠模型中的浓度波动, 结果表明 GPx 的活性在衰老细胞中降低, 为 GPx 的研究提供了新的思路。

徐克花课题组^[52]发现, 依布硒啉中的 Se—N 键可以被巯基高选择性裂解。如果采用 Se—N 键能更高的化合

图 26 基于双光子荧光探针 26 对 Sec 的识别及细胞成像^[51]Figure 26 Identification and cellular imaging of Sec based on two-photon fluorescent probe 26^[51]

物,则需要更强的亲核试剂断键. 2015 年,该课题组^[53]首次将 2,1,3-苯并硒二唑(BS)部分整合到半花菁素染料中,设计并合成了一种新型荧光探针 **27**(图 27). 由于 BS 中的 Se—N 键更稳定,只能被亲核性更高的硒醇切断,因此探针 **27** 对硫醇具有优异的抗干扰性. 加入 Sec 后,BS 结构转化为二胺,导致探针的双电子受体结构改变为给体-受体(D-A)结构,产生 ICT 效应开启荧光信号. 该探针在生理条件下对 Sec 具有高灵敏度和选择性,不

受巯基和其他生物活性物质(如必需离子和氨基酸)的干扰,已成功应用于活体细胞和体内 Sec 浓度变化的成像. 此外,结合细胞周期和线粒体膜电位的分析,发现 Na₂SeO₃ 诱导的 HepG2 细胞凋亡与硒醇水平密切相关. 研究结果将有助于提高硒化合物在癌症治疗和预防中的疗效,扩大其应用范围.

2 结论与展望

本文总结了 2015 年至今硒代半胱氨酸荧光探针的研究进展,以识别机制为主线,对 Sec 探针的构建策略和生物成像应用进行了归纳,并对探针性能予以比较(表 1). 研究者在发展高选择性、高穿透性和低光毒性探针采用了多种策略:通过体系 pH 值调控、识别基团及取代基调控、溶剂组成调控等方法,增大探针与硒醇/硫醇的反应型差异,实现对 Sec 的特异性识别;设计高荧光量子效率分子骨架或近红外荧光团,增强探针光学性能,实现对内源性 Sec 的体内成像;引入多荧光团或双光子荧光团,构建双响应探针或双光子探针,实现对细胞、组织中的 Sec 高准确度成像.

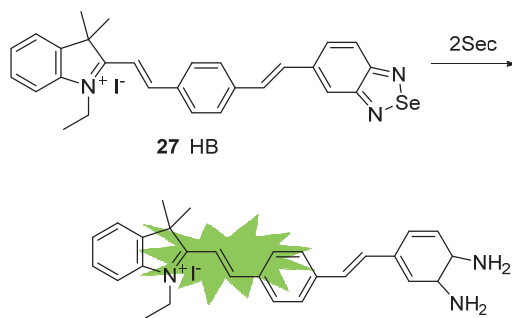


图 27 基于 2,1,3-苯并硒二唑的探针 **27**

Figure 27 Probe **27** based on 2,1,3-benzoselenadiazole

表 1 各类 Sec 探针性能比较

Table 1 Comparison of the performance of various Sec probes

识别机制	探针编号	荧光骨架	线性范围/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	检测限(LOD)/($\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	响应时间/min	参考文献
芳香亲核取代反应	1	荧光素	—	—	10	[25]
	2	香豆素	0.5~100	—	3	[26]
	3	香豆素	0~80	47	30	[27]
	4	香豆素	0~100	18	6	[28]
	5	四氢萘-氧杂蒽	0~50	17	2	[29]
	6	四氢萘-氧杂蒽	0~32	11.2	3	[30]
	7	菲并咪唑	0~50	65.4	4	[31]
	8	菲并咪唑	0~50	84.7	3.5	[31]
	9	染料 HD-NH ₂	0~40	—	10	[32]
	10	氧杂蒽染料	0~40	18.5	5	[33]
	11	二氰基甲基苯并吡喃荧光素	0.2~80	60	10	[34]
	12	二氰基槐酮	0~100	10	20	[35]
	13	染料 NN	0~1	22	2.5	[36]
	14	七甲基花菁素	0~7	—	4	[37]
	15	香豆素	0~45	6.9	4	[38]
	16	2-(2-萘基)苯并噻唑	0~10	10.6	10	[39]
	17	黄绿色发光碳点	0~30	—	12	[40]
苯醚硒解反应	18	硼-二苯并吡喃甲烷染料	0~25	16	10	[41]
	19	硼-二苯并吡喃甲烷染料	0~10	9	10	[41]
	20	二腈基亚甲基苯并吡喃	0.2~80	62	5	[42]
	21	香豆素	0~50	7.88	10	[43]
加成-环化-裂解串联	22	4-羟基萘酰亚胺骨架	0~30	12	1	[45]
	23	七甲基花菁素	0~15	92	5	[46]
	24	荧光素	—	—	—	[47]
其他反应	25	七甲基花菁素	0~20	90	3	[50]
	26	TP-NN	—	—	—	[51]
	27	半花菁素染料	0~20	7	—	[53]

尽管高选择性 Sec 荧光探针的分子设计及生物成像应用已进入快车道,但也面临挑战: (1)基于当前识别机制的反应型探针响应时间较长,难以实现对体内 Sec 的实时追踪成像. 开发其它有机反应,构建新型识别机制是 Sec 探针的发展趋势之一. (2)生物自发荧光的干扰是探针临床应用的一大障碍,开发近红外 II 区的 Sec 探针,能为生物成像提供更多选择. (3)与有机小分子相比,碳纳米点和石墨烯量子点具有荧光信号稳定、生物相容性好的特点,在活性氧、生物硫醇等荧光识别中已被广泛应用,但基于荧光碳点的 Sec 探针只有少数报道. 发展多种识别机制下的荧光碳点探针,对丰富 Sec 探针构建策略和成像应用具有积极意义.

References

- [1] Schwarz, K.; Foltz, C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 3292.
- [2] Hassan, Z. M.; Mohammadi, F. G.; Zamaninour, N. *Obes. Surg.* **2019**, 29, 3743.
- [3] Wu, D.; Chen, L.; Kwon, N.; Yoon, J. *Chem* **2016**, 1, 674.
- [4] Brinkman, M.; Buntinx, F.; Muls, E.; Zeegers, M. P. *Lancet Oncol.* **2006**, 7, 766.
- [5] Reich, H.; Hondal, R. *ACS Chem. Biol.* **2016**, 11, 821.
- [6] Burk, R. F.; Hill, K. E. *Annu. Rev. Nutr.* **2015**, 35, 109.
- [7] Roman, M.; Jitaru, P.; Barbante, C. *Metallomics* **2014**, 6, 25.
- [8] Diamond, A. *Nutrients* **2015**, 7, 3938.
- [9] Steibrenner, H.; Speckmann, B.; Klotz, L. O. *Arch. Biochem. Biophys.* **2016**, 595, 113.
- [10] Schoenmakers, E.; Chatterjee, K. *Antioxid. Redox Signaling* **2020**, 33, 481.
- [11] Puppala, A. K.; French, R. L.; Matthies, D.; Baxa, U.; Subramaniam, S.; Simonović, M. *Sci. Rep.* **2016**, 6, 32563.
- [12] Santesmasses, D.; Gladyshev, V. N. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 11593.
- [13] Vonderheide, A. P.; Montes-Bayon, M.; Caruso, J. A. *Analyst* **2002**, 127, 49.
- [14] Liang, L.; Mo, S.; Zhang, P.; Cai, Y.; Mou, S.; Jiang, G.; Wen, M. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1118, 139.
- [15] Quijano, M. A.; Gutiérrez, A. M.; Pérez-Conde, M. C.; Cámara, C. *J. Anal. At. Spectrom.* **1996**, 11, 407.
- [16] Xu, Q.; Heo, C. H.; Kim, J. A.; Lee, H. S.; Hu, Y.; Kim, D.; Swamy, K. M. K.; Kim, G.; Nam, S.-J.; Kim, H. M. *Anal. Chem.* **2016**, 88, 6615.
- [17] Xia, S.; Wang, J.; Bi, J.; Wang, X.; Fang, M.; Phillips, T.; May, A.; Conner, N.; Tanasova, M.; Luo, F.-T. *Sens. Actuators, B* **2018**, 265, 699.
- [18] Liu, W.; Chen, J.; Xu, Z. *Coord. Chem. Rev.* **2021**, 429, 213638.
- [19] Hyman, L. M.; Franz, K. J. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, 256, 2333.
- [20] Wang, H.-S. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2016**, 85, 181.
- [21] Li, J.; Zhang, Y.; Wang, P.; Yu, L.; An, J.; Deng, G.; Sun, Y.; Kim, J. S. *Coord. Chem. Rev.* **2021**, 427, 213559.
- [22] Chen, C.; Liu, W.; Xu, C.; Liu, W. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, 85, 46.
- [23] Zhang, J. D.; Zhan, Y. *Chin. J. Org. Chem.* **2020**, 40, 1847 (in Chinese).
(张继东, 詹妍, 有机化学, **2020**, 40, 1847.)
- [24] Valand, R. S.; Sivaiah, A. *J. Mater. Chem.* **2023**, 11, 2614.
- [25] Maeda, H.; Katayama, K.; Matsuno, H.; Uno, T. *Angew. Chem.*, **2006**, 118, 1842.
- [26] Zhang, B.; Ge, C.; Yao, J.; Liu, Y.; Xie, H. C.; Fang, J. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 757.
- [27] Zhang, H.; Li, M.; Feng, W.; Feng, G. Q. *Dyes Pigm.* **2018**, 149, 475.
- [28] Sun, Q.; Yang, S. H.; Wu, L.; Dong, Q. J.; Yang, W. C.; Yang, G. F. *Anal. Chem.* **2016**, 88, 6084.
- [29] Zhang, P.; Ding, Y.; Liu, W.; Niu, G.; Zhang, H.; Ge, J.; Wu, J.; Li, Y.; Wang, P. *Sens. Actuators, B* **2018**, 264, 234.
- [30] Wang, Z.; Zheng, H.; Zhang, C.; Tang, D.; Wu, Q.; Dessie, W.; Jiang, Y. *Sensors* **2020**, 20, 4768.
- [31] Wang, Z.; Su, W.; Zheng, H.; Yang, S.; Yang, T.; Han, T.; Dessie, W.; He, X.; Jiang, Y.; Hao, Y. *Spectrochim. Acta, Part A* **2022**, 267, 120585.
- [32] Chen, H.; Dong, B.; Tang, Y.; Lin, W. *Chem.-Eur. J.* **2015**, 21, 11696.
- [33] Wang, Z.; Yang, S.; Liu, X.; Yang, T.; Han, T.; He, X.; Jiang, Y.; Hao, Y. *Microchem. J.* **2021**, 170, 106681.
- [34] Feng, W. Y.; Li, M. X.; Sun, Y.; Feng, G. Q. *Anal. Chem.* **2017**, 89, 6106.
- [35] Zhang, L.; Kai, X.; Zhang, Y.; Zheng, Y.; Xue, Y.; Yin, X.; Zhao, J. *Analyst* **2018**, 143, 4860.
- [36] Luo, K.; Jia, M.; Xie, C.; Yang, Q.; Tan, L.; Liu, X.; Zhou, L. *Sens. Actuators, B* **2023**, 375, 132944.
- [37] Han, X.; Wang, R.; Song, X.; Yu, F.; Chen, L. *Anal. Chem.* **2018**, 90, 8108.
- [38] Wang, Z.; Hao, C.; Luo, X.; Wu, Q.; Zhang, C.; Dessie, W.; Jiang, Y. *Molecules* **2020**, 25, 4768.
- [39] Zhao, M.; Shi, D.; Hu, W.; Ma, T.; He, L.; Lu, D.; Hu, Y.; Zhou, L. *Spectrochim. Acta, Part A* **2021**, 260, 119983.
- [40] Wang, Q.; Zhang, S.; Zhong, Y.; Yang, X. F.; Li, Z.; Li, H. *Anal. Chem.* **2017**, 89, 1734.
- [41] Dai, C. G.; Wang, J. L.; Song, Q. H. *J. Mater. Chem. B* **2016**, 4, 6726.
- [42] Li, M.; Feng, W.; Zhai, Q.; Feng, G. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, 87, 894.
- [43] Zhao, X.; Yuan, G.; Ding, H.; Zhou, L.; Lin, Q. *J. Hazard. Mater.* **2020**, 381, 120918.
- [44] Fu, Z. H.; Han, X.; Shao, Y. L.; Fang, J. G.; Zhang, Z. H.; Wang, Y. W.; Peng, Y. *Anal. Chem.* **2017**, 89, 1937.
- [45] Tian, Y.; Xin, F.; Gao, C.; Jing, J.; Zhang, X. *J. Mater. Chem.* **2017**, 5, 6890.
- [46] Luo, X.; Wang, R.; Lv, C.; Chen, G.; You, J.; Yu, F. *Anal. Chem.* **2020**, 92, 1589.
- [47] Shimomura, T.; Hirakawa, N.; Ohuchi, Y.; Ishiyama, M.; Shiga, M.; Ueno, Y. *ACS Sens.* **2021**, 6, 2125.
- [48] Han, Y. Y.; Liu, C.; Xu, H. P.; Cao, Y. *Chin. J. Chem.* **2022**, 40, 1578.
- [49] Tian, Y.; Zhu, B. C.; Yang, W.; Jing, J.; Zhang, X. L. *Sens. Actuators, B* **2018**, 262, 345.
- [50] Han, X.; Song, X.; Yu, F.; Chen, L. *Adv. Funct. Mater.* **2017**, 27, 1700769.
- [51] Wang, Y.; Zhang, L. W.; Chen, L. X. *Anal. Chem.* **2020**, 92, 1997.
- [52] Xu, K.; Qiang, M.; Gao, W.; Su, R.; Li, N.; Gao, Y.; Xie, Y.; Kong, F.; Tang, B. *Chem. Sci.* **2013**, 4, 207890.
- [53] Kong, F.; Hu, B.; Gao, Y.; Xu, K.; Pan, X.; Huang, F.; Zheng, Q.; Chen, H.; Tang, B. *Chem. Commun.* **2015**, 51, 3102.

(Cheng, F.)