一种“硫醇-色烯点击反应”的荧光探针的合成及应用

周柯岩, 刘红梅, 张颜, 张金超, 王书香*, 杨瑜涛*

药物化学与分子诊断教育部重点实验室, 河北省化学生物学重点实验室, 河北大学化学与环境科学学院, 保定 071002

*通讯作者, E-mail: wsx@hbu.edu.cn; yutaoyang2016@163.com

收稿日期: 2021-05-23; 接受日期: 2021-08-18; 网络版发表日期: 2021-09-01

国家自然科学基金(编号: 21807021)和河北省自然科学基金(编号: B2020201074)资助项目

摘要 本文设计合成了一种基于硫醇-色烯点击反应的荧光探针CHMPC-Ac, 用于半胱氨酸(Cys)、同型半胱氨酸(Hcy)和谷胱甘肽(GSH)的识别检测。这些生物硫醇因巯基的强亲核性而与探针的不饱和酮发生迈克尔加成反应, 导致色烯分子开环等分子内级联反应, 生成具有强荧光的香豆素衍生物, 分别使荧光强度增强107、69和66倍。CHMPC-Ac具有灵敏度高(Cys: 15 nM; Hcy: 26 nM; GSH: 22 nM)和响应快(Cys: 20 s; Hcy: 50 s; GSH: 30 s)等优点, 并已应用于HepG 2细胞和斑马鱼体内生物硫醇的识别检测。

关键词 荧光探针, 生物硫醇, 色烯

1 引言

生物体内的半胱氨酸(cysteine, Cys)、同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)和还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)等小分子生物硫醇参与机体的众多生理活动, 如维持机体氧化还原动态平衡, 清除外源性毒素, 参与信号转导和基因调控等。成人细胞中Cys的含量为30~200 μM ^[1,2], Cys过高可导致神经中毒, Cys缺乏会导致肝损伤、毛发色素脱失和皮肤病变等^[3~5]; 成年人血液中Hcy的含量为5~15 μM , 高于15 μM 会导致同型半胱氨酸血症的发生, 增大患心血管和脑血管疾病的风险^[6]; GSH是细胞内最丰富的小分子生物硫醇, 正常人体细胞中含量为1~10 mM^[7], 在维持细胞的氧化还原动态平衡中起着重要作用, 并已成为表征细胞抗

氧化能力的一个重要指标。机体内生物硫醇水平的改变与很多疾病密切相关。因此, 开发建立简捷、有效监测生物体内硫醇水平的方法至关重要。

荧光探针由于其灵敏度高、操作简单、可实现对生物物种进行实时原位监测的优势, 许多生物硫醇的荧光探针被报道。其设计原理主要是基于硫醇中高反应活性的巯基与探针发生特异性反应, 可分为迈克尔加成^[8~12]、亲核取代^[13~18]、磺酸酯裂解^[19~25]等。色烯(即苯并吡喃)可作为良好的迈克尔反应受体分子, 并且在抗癌、降血脂、抗抑郁等病理学中起着重要的药理活性作用^[26,27], 受到众多生物学家以及化学家的密切关注。近年来, 人们开发了一系列基于“硫醇-色烯点击反应”的荧光探针, 并显示出良好的识别性能^[28~30]。鉴于此, 本文报道了一种新的“硫醇-色烯点击反应”的

引用格式: Zhou K, Liu H, Zhang Y, Zhang J, Wang S, Yang Y. Specific fluorescent probe synthesis based on “thiol-chromene click reaction” and its applications. *Sci Sin Chim*, 2021, 51: 1269–1275, doi: [10.1360/SSC-2021-0124](https://doi.org/10.1360/SSC-2021-0124)

荧光探针 **CHMPC-Ac** 用于生物硫醇的检测与成像。

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

半胱氨酸(Cys)、同型半胱氨酸(Hcy)、谷胱甘肽(GSH)、丙氨酸(Ala)、缬氨酸(Val)、天冬氨酸(Asp)、亮氨酸(Leu)、赖氨酸(Lys)、异亮氨酸(Ile)、脯氨酸(Pro)、甘氨酸(Gly)、蛋氨酸(Met)、色氨酸(Trp)、精氨酸(Arg)、苯丙氨酸(Phe)、天冬酰胺(Asn)、谷氨酰胺(Gln)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、酪氨酸(Tyr)、谷氨酸(Glu)、组氨酸(His)、九水合硫化钠($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)、*N*-乙基马来酰亚胺(NEM)和1-苯基-2-硫脲(PTU)购于Sigma-Aldrich公司(美国)。其他试剂均为分析纯, 购于北京伊诺凯试剂公司(中国)。细胞培养所用试剂购置于维森特生物技术有限公司(中国)。

核磁共振波谱仪(AVANCEIII Bruker公司, 美国)、高分辨质谱仪(Agilent 1260, Agilent公司, 美国)、紫外分光光度计(Cary 60 Agilent公司, 美国)、荧光分光光度计(Cary Eclipse Agilent公司, 美国)、激光共聚焦显微镜(LSM 880, Zeiss公司, 德国)。

2.2 探针CHMPC-Ac的合成

CHMPC-Ac的合成路线如图1所示, 原料1、2和3按文献^[26~28]方法合成。在避光条件下, 将化合物3 (0.062 g, 0.25 mmol)与乙氧甲酰基亚甲基三苯基膦(0.087 g, 0.25 mmol)溶于5 mL甲苯, 于45℃搅拌反应5 h。冷却至室温, 二氯甲烷(DCM) (20 mL×3)萃取, 饱和食盐水(20 mL)洗涤, 合并有机相, 用无水硫酸钠干燥, 真空浓缩除去溶剂后得到粗产品。采用快速柱色谱法($V_{\text{PE}}/V_{\text{EA}}=7:1$)分离粗产物, 得到0.05 g黄色固体(收率63.1%)。m.p.=161.2~163.8℃, ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ (ppm): 7.79 (d, $J=16.2$ Hz, 1H), 7.36 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 7.12 (d, $J=2.2$ Hz, 1H), 7.00 (d, $J=2.0$ Hz, 1H), 6.39 (d, $J=16.2$ Hz, 1H), 5.22 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 4.20 (q, $J=7.2$ Hz, 2H), 2.73~2.68 (m, 1H), 2.57~2.52 (m, 1H), 2.32~2.26 (m, 1H), 2.17~2.11 (m, 1H), 1.27 (t, $J=7.2$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ (ppm): 200.7, 166.7, 152.2, 137.1, 133.1, 130.9, 129.7, 127.1, 125.7, 124.6, 123.9, 120.8, 76.2, 60.7, 37.0, 28.0, 14.3. HRMS (ESI, m/z): Calcd. for

图1 **CHMPC-Ac**的合成路线

Figure 1 Synthesis route of **CHMPC-Ac**.

$\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{ClO}_4$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 319.0737, found: 319.0731.

2.3 光谱测试

将1.27 mg **CHMPC-Ac** (0.004 mmol)溶解于2 mL的二甲基亚砜(DMSO)中, 得到浓度为2 mM的探针母液, 于4℃密封保存。各种分析物用超纯水进行配制, 现配现用。所有光谱测试均在磷酸缓冲液PBS (10 mM, pH 7.4, 20% 二甲基甲酰胺(DMF))中进行, 测试温度为25℃。荧光光谱测试条件: 激发波长为405 nm, 激发和发射狭缝均为5.0 nm, 电压为650 V。

2.4 细胞毒性测试和荧光成像

以HepG2细胞为模型, 向细胞中加入不同浓度(0、2、5、10、15和20 μM)的**CHMPC-Ac**溶液, 采用噻唑蓝(MTT)法测试**CHMPC-Ac**的细胞毒性(图S1, 见网络版补充材料)。利用激光共聚焦显微镜考察了**CHMPC-Ac**对细胞内的生物硫醇的荧光成像。荧光成像条件: 激发波长为405 nm, 发射信号范围为450~600 nm, 标尺为20 μm 。

2.5 活体成像

以5日龄的脊椎动物斑马鱼为模型, 研究**CHMPC-Ac**在活体中的应用, 在斑马鱼胚胎时期加入PTU抑制黑色素的产生。利用激光共聚焦显微镜评估了**CHMPC-Ac**检测斑马鱼体内生物硫醇的能力。测试条

件: 激发波长为405 nm, 发射信号范围为450~600 nm, 标尺为500 μm .

3 结果与讨论

3.1 光学性能研究

首先采用紫外分光光度和荧光分光光度法考察了 **CHMPC-Ac** 对生物硫醇的特异性响应性能. 在含 **CHMPC-Ac** (20 μM) 的 PBS (10 mM, pH 7.4, 20% DMF) 溶液中, 分别加入 100 μM 的生物硫醇 (Cys、Hcy 或 GSH) 和 200 μM 的其他分析物 (Arg、His、Lys、Asp、Glu、Ser、Thr、Asn、Gln、Sec、Leu、Met、Phe、Tyr、Trp、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、H₂S). 如图 2a 所示, 探针本身在 280 nm 处有最大吸收峰, 加入不同分析物后, 紫外吸收光谱基本没有变化. 当加入生物硫醇后, 280 nm 处的吸收强度降低, 在 400 nm 处出现新的吸收峰. 相应地, 荧光光谱分析结果显示 (图 2b), **CHMPC-Ac** 与生物硫醇作用后, 555 nm 处荧光强度 (激发波长 405 nm) 显著增加, 而与其他分析物作用后, 荧光强度基本不变. 以上实验结果表明, **CHMPC-Ac** 对生物硫醇有高的选择性. 同时, 考察了 **CHMPC-Ac** 对生物硫醇浓度变化的荧光响应情况. 如图 3a 所示, 在 PBS (10 mM, pH 7.4, 20% DMF) 溶液中, 慢慢加入 Cys, 555 nm 处荧光显著增强, 加入 25 μM Cys 时, 反应平稳, 荧光强度增加 107 倍. 当 Cys 处于 0~16 μM 范围内时, 555 nm 处的荧光强度与 Cys 浓度呈现出很好的线

性关系 ($R^2=0.98734$), 检测限为 15 nM (图 3b). Hcy 和 GSH 的浓度分别处于 0~16 μM 和 0~22 μM 范围时, 荧光强度与 Hcy 和 GSH 浓度同样呈现良好的线性关系, 检测限分别为 26 和 22 nM (图 S1). 在 PBS (10 mM, pH 7.4, 20% DMF) 溶液中, **CHMPC-Ac** 对生物硫醇的紫外-可见吸收光谱和荧光光谱随时间的变化进行了全面测试. 实验结果显示, 在光照条件下, 探针与硫醇反应后生成了具有强荧光类物质 (图 S2). 同时, 进一步研究了 **CHMPC-Ac** (20 μM) 对生物硫醇 (100 μM) 的响应时间 (图 3c). 探针与 Cys、Hcy 和 GSH 的反应在 20、50 和 30 s 内基本完成, 1500 s 内荧光强度基本不变, 说明 **CHMPC-Ac** 能够对生物硫醇进行快速检测. 以 Cys 为例, 评估了探针在不同 pH 环境下对硫醇的识别能力. 结果表明, 在 pH 7~10 范围内, 探针 **CHMPC-Ac** (20 μM) 对 Cys (100 μM) 有很好的响应, 可进一步进行体内硫醇检测.

3.2 识别机理研究

基于以前的相关研究推测, **CHMPC-Ac** 对生物硫醇的识别机理如图 4 所示. 首先, 生物硫醇的巯基与 **CHMPC-Ac** 的不饱和酮发生迈克尔加成反应, 导致色烯开环, 生成的中间产物的酚氧负离子进攻缺电性羰基碳, 生成香豆素衍生物 4 (图 S4), 实现对生物硫醇的识别检测. 采用高分辨质谱对识别机理进行了验证 (图 S4), 从测试结果中发现探针本身在 319.0731 (m/z) 处有强的离子峰, 与 Cys 反应后, 394.0510 (m/z) 处的离子峰

图 2 (a) **CHMPC-Ac** 与 Cys、Hcy、GSH 和其他分析物响应的紫外光谱图和 (b) 荧光光谱图 (**CHMPC-Ac** 浓度为 20 μM , [Cys]=100 μM) (网络版彩图)

Figure 2 (a) Ultraviolet-visible spectroscopy (UV-vis) and (b) fluorescence spectra of **CHMPC-Ac** with Cys, Hcy, GSH and other analytes ([**CHMPC-Ac**]=20 μM , [Cys]=100 μM) (color online).

图3 (a) CHMPC-Ac随Cys浓度变化的荧光光谱图(CHMPC-Ac浓度为20 μ M, [Cys]=25 μ M). (b) CHMPC-Ac与Cys作用后555 nm处的荧光强度变化. (c) CHMPC-Ac与Cys、Hcy和GSH作用的动力学研究. (d) CHMPC-Ac与Cys在不同pH条件下的荧光强度变化(CHMPC-Ac浓度为20 μ M, [Cys]=100 μ M) (网络版彩图)

Figure 3 (a) Fluorescence spectra of CHMPC-Ac with Cys ([CHMPC-Ac]=20 μ M, [Cys]=25 μ M). (b) Fluorescence of CHMPC-Ac with Cys at 555 nm. (c) Kinetics of CHMPC-Ac with Cys, Hcy and GSH. (d) Fluorescence of CHMPC-Ac and Cys under different pH conditions ([CHMPC-Ac]=20 μ M, [Cys]=100 μ M) (color online).

图4 CHMPC-Ac与Cys可能的响应机理.

Figure 4 The sensing mechanism of CHMPC-Ac and Cys.

可归属于反应产物(化合物4), 表明CHMPC-Ac在生物硫醇作用下发生分子内级联反应, 先后经历加成、环化等, 生成强荧光的香豆素物质4.

3.3 细胞和活体成像

以HepG2细胞为模型, 采用MTT法测试了CHMPC-Ac的细胞毒性(图S3). 向细胞中加入不同浓

度(0、2、5、10、15和20 μ M)的CHMPC-Ac溶液, 孵育24 h后细胞存活率达到75%以上, 说明探针对细胞有低毒性, 可用于细胞成像. 利用激光共聚焦显微镜考察了CHMPC-Ac对细胞内的生物硫醇的荧光成像. 如图5所示, 空白对照细胞几乎没有荧光, CHMPC-Ac与细胞孵育30 min后, 可以观察到有明显的荧光信号. 但是, 当细胞用硫醇抑制剂NEM预处理30 min后, 再加入

探针孵育30 min, 荧光信号显著降低, 然而分别继续加入外源的Cys、Hcy和GSH孵育30 min后, 有强烈的荧光出现, 以上结果显示, **CHMPC-Ac**可以监测细胞内的生物硫醇。

为了进一步考察**CHMPC-Ac**在活体中的应用, 在同样条件下, 通过激光共聚焦显微镜评估了**CHMPC-Ac**检测斑马鱼体内生物硫醇的能力。如图6所示, 将斑

马鱼分为6组, 第一组为空白对照组, 几乎没有荧光; 第二组, 用**CHMPC-Ac** (15 μM)孵育60 min, 观察到明显的荧光信号; 第三组, 用NEM (500 μM)抑制剂预处理后, 再用**CHMPC-Ac** (15 μM)孵育60 min, 荧光减弱; 第四、五、六组, 用NEM (500 μM)预处理后, 分别加入Cys/Hcy/GSH (500 μM), 再用**CHMPC-Ac** (15 μM)孵育60 min, 荧光增强。以上实验结果表明, **CHMPC-**

图 5 (a) **CHMPC-Ac**对HepG2细胞中生物硫醇检测的荧光成像图(激发波长: 405 nm; 发射信号范围: 450~600 nm; 标尺: 20 μm); (b) 图(a)的平均荧光强度图 (网络版彩图)

Figure 5 (a) Fluorescence image of **CHMPC-Ac** for biothiol in HepG2 cells (λ_{ex} =405 nm, λ_{em} =450–600 nm, scale bar: 20 μm); (b) the average fluorescence intensity of (a) (color online).

图 6 (a) **CHMPC-Ac**对斑马鱼体内生物硫醇检测的荧光成像图(激发波长: 405 nm; 发射信号范围: 450~600 nm; 标尺: 500 μm); (b) 图(a)的平均荧光强度图; (c) 斑马鱼局部荧光成像图 (网络版彩图)

Figure 6 (a) Fluorescence image of **CHMPC-Ac** for biothiol in zebrafish (λ_{ex} =405 nm, λ_{em} =450–600 nm; scale bar: 500 μm); (b) the average fluorescence intensity of (a); (c) local fluorescence image of zebrafish (color online).

Ac具有检测斑马鱼体内生物硫醇的能力。

4 结论

本研究设计合成了一种新的特异性识别生物硫醇

的荧光增强型探针**CHMPC-Ac**。硫醇与探针中的不饱和酮发生迈克尔加成反应, 引发分子内级联反应, 原位生成具有大共轭、强荧光的香豆素类物质, 实现硫醇的在线监测。该研究结果为探针分子的设计提供了一种新的研究思路 and 参考。

补充材料

本文的补充材料见网络版<http://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。

致谢 “科学三号”上所有工作人员在取样过程中付出辛勤工作, 在此一并致谢。

参考文献

- 1 Zhang Y, Shao X, Wang Y, Pan F, Kang R, Peng F, Huang Z, Zhang W, Zhao W. *Chem Commun*, 2015, 51: 4245–4248
- 2 Yue Y, Huo F, Yin C. *Sci Sin Chim*, 2017, 47: 249–257 [岳永康, 霍方俊, 阴彩霞. 中国科学: 化学, 2017, 47: 249–257]
- 3 Shahrokhian S. *Anal Chem*, 2001, 73: 5972–5978
- 4 Li L, Wu M, Zhang H, Li K, Yu X. *Sci Sin Chim*, 2017, 47: 1029–1034 [李玲玲, 吴明雨, 张宏, 李坤, 余孝其. 中国科学: 化学, 2017, 47: 1029–1034]
- 5 Ye Z, Duan C, Hu Q, Zhang Y, Qin C, Zeng L. *J Mater Chem B*, 2017, 5: 3600–3606
- 6 Nygård O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE. *N Engl J Med*, 1997, 337: 230–237
- 7 Hong R, Han G, Fernández JM, Kim B, Forbes NS, Rotello VM. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 1078–1079
- 8 Sippel TO. *J Histochem Cytochem*, 1981, 29: 314–316
- 9 Kanaoka Y, Machida M, Ando K, Sekine T. *Biochim Biophys Acta (BBA)–Protein Structure*, 1970, 207: 269–277
- 10 Long Y, Liu J, Tian D, Dai F, Zhang S, Zhou B. *Anal Chem*, 2020, 92: 14236–14243
- 11 Wang X, Zha J, Zhang W, Zhang W, Tang B. *Analyst*, 2020, 145: 6119–6124
- 12 Li S, Song D, Huang W, Li Z, Liu Z. *Anal Chem*, 2020, 92: 2802–2808
- 13 Zhang M, Yu M, Li F, Zhu M, Li M, Gao Y, Li L, Liu Z, Zhang J, Zhang D, Yi T, Huang C. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 10322–10323
- 14 Niu LY, Guan YS, Chen YZ, Wu LZ, Tung CH, Yang QZ. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 18928–18931
- 15 Xu T, Zhao S, Wu X, Zeng L, Lan M. *ACS Sustain Chem Eng*, 2020, 8: 6413–6421
- 16 Fu YL, Chen XG, Li H, Feng W, Song QH. *New J Chem*, 2020, 44: 13781–13787
- 17 Yao J, Yin G, Yu T, Li H, Yin P. *Anal Methods*, 2021, 13: 1358–1363
- 18 Zou Y, Li M, Xing Y, Duan T, Zhou X, Yu F. *ACS Sens*, 2020, 5: 242–249
- 19 Tang Y, Yang HR, Sun HB, Liu SJ, Wang JX, Zhao Q, Liu XM, Xu WJ, Li SB, Huang W. *Chem Eur J*, 2013, 19: 1311–1319
- 20 Maity D, Govindaraju T. *Org Biomol Chem*, 2013, 11: 2098–2104
- 21 Wang XB, Li HJ, Liu C, Hu YX, Li MC, Wu YC. *Anal Chem*, 2021, 93: 2244–2253
- 22 Li P, Shi X, Xiao H, Ding Q, Bai X, Wu C, Zhang W, Tang B. *Analyst*, 2019, 144: 191–196
- 23 Chen J, Wang Z, She M, Liu M, Zhao Z, Chen X, Liu P, Zhang S, Li J. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11: 32605–32612
- 24 Li LL, He PY, Shi L, Pan SL, Li MY, Zhou Q, Zhang H, Wang N, Li K, Yu XQ. *Anal Methods*, 2019, 11: 821–826
- 25 Ma K, Zhao L, Yue Y, Huo F, Chao J, Yin C. *Anal Chem*, 2020, 92: 15936–15942
- 26 Kim HM, Yang PR, Seo MS, Yi JS, Hong JH, Jeon SJ, Ko YG, Lee KJ, Cho BR. *J Org Chem*, 2007, 72: 2088–2096
- 27 Chen X, Ko SK, Kim MJ, Shin I, Yoon J. *Chem Commun*, 2010, 46: 2751–2753
- 28 Huo FJ, Sun YQ, Su J, Yang YT, Yin CX, Chao JB. *Org Lett*, 2010, 12: 4756–4759
- 29 Yang Y, Zhou T, Jin M, Zhou K, Liu D, Li X, Huo F, Li W, Yin C. *J Am Chem Soc*, 2020, 142: 1614–1620
- 30 Yue Y, Yin C, Huo F, Chao J, Zhang Y. *Sens Actuat B–Chem*, 2016, 223: 496–500

Specific fluorescent probe synthesis based on “thiol-chromene click reaction” and its applications

Keyan Zhou, Hongmei Liu, Yan Zhang, Jinchao Zhang, Shuxiang Wang^{*}, Yutao Yang^{*}

Key Laboratory of Medicinal Chemistry and Molecular Diagnosis, Key Laboratory of Chemical Biology of Hebei Province, College of Chemistry & Environmental Science, Hebei University, Baoding 071002, China

Abstract: A new fluorescent probe **CHMPC-Ac** for biothiol was designed and synthesized based on thiol-chromene click reaction. Nucleophilic addition of sulfhydryl group to the unsaturated ketones in **CHMPC-Ac** induced chromene ring opening and then triggered the intramolecular cascade reaction to generate coumarins with strong fluorescence. The fluorescence intensity can be enhanced by as much as 107, 69 and 66 times, respectively. Meanwhile, **CHMPC-Ac** showed some advantages, such as high sensitivity (Cys: 15 nM; Hcy: 26 nM; GSH: 22 nM) and fast response (Cys: 20 s; Hcy: 50 s; GSH: 30 s). Moreover, it has been successfully applied to image biothiol in HepG2 cells and zebrafish.

Keywords: fluorescent probe, biothiol, chromene

doi: [10.1360/SSC-2021-0124](https://engine.scichina.com/doi/10.1360/SSC-2021-0124)