

高选择性亚硝酰氢荧光探针的合成及生物应用

赵美, 石迪, 马韬, 胡婉迪, 卢丹青*
(中南林业科技大学理学院, 湖南长沙 410004)

摘要:以 6-苯并-d-噻唑-2-萘酚为荧光母体和二苯基膦苯甲酸酯为 HNO 的特异性识别基团, 设计合成了一种荧光增强型探针 (BNB-HNO), 该探针对 HNO 具有较好的选择性、抗干扰性、高灵敏度 (LOD = 54.6 nmol/L) 以及响应迅速 (反应时间 < 10 min) 等优点; 另外, BNB-HNO 可以直接用于血清样品中 HNO 的定量检测和斑马鱼中外源性 HNO 的成像研究。证明 BNB-HNO 具有用于生物体系中 HNO 检测的潜力, 是生物系统中 HNO 的理想“追踪器”。

关键词: HNO; 有机小分子探针; 荧光检测; 活体成像

中图分类号: O657.3

文献标志码: A

文章编号: 0253-4320(2021)12-0235-05

DOI: 10.16606/j.cnki.issn 0253-4320.2021.12.048

Synthesis and biological application of fluorescent probe with high selectivity for nitrosyl hydrogen

ZHAO Mei, SHI Di, MA Tao, HU Wan-di, LU Dan-qing*

(College of Science, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China)

Abstract: A turn-on fluoresce-enhanced probe (BNB-HNO) for nitrosyl hydrogen (HNO) is designed and synthesized with 6-benzo-d-thiazole-2-naphthol as the fluorescent matrix and diphenyl phosphinobenzoate as the specific recognition group of HNO. This probe presents good selectivity, strong anti-interference, high sensitivity (LOD = 54.6 nmol·L⁻¹) and rapid response (less than 10 min). Moreover, BNB-HNO can be directly used for the quantitative detection of HNO in serum samples, and successfully applied to imaging of exogenous HNO in zebrafish. It is proven that BNB-HNO has the potential for HNO detection in biological system and is an ideal “tracker” for HNO in biological system.

Key words: nitrosyl hydrogen; probe for organic small molecule; fluorescence detection; living imaging

HNO 是 NO 的还原态, HNO 因独特的生物活性和药理性质引起科研工作者的极大兴趣。最近, 研究发现 HNO 在癌症组织中具有独特的氧化还原活性, 可以作为一种潜在的生物标志物来设计合适的肿瘤治疗策略^[1]。然而, 探究微环境中内源性 HNO 的产生仍是一个挑战。研究受阻的原因主要有以下 3 个方面。① HNO 与其他氮氧化物难以区别^[2]; ② HNO 极易自发二聚, 生成 N₂O 和 H₂O 很难直接检测; ③ HNO 的高反应活性, 必须在原位利用供体化合物生成^[3]。因此开发一种可高灵敏且可特异性识别 HNO 的方法具有重要的意义。

传统检测 HNO 的方法有电化学分析法^[4]、气液相色谱法^[5]、质谱分析法^[6]等。以上方法是基于 HNO 自聚脱水后最终产物 N₂O 来判断 HNO 的水

平, 所以测试数据极不稳定^[7]。而荧光探针具有高灵敏度、响应迅速、特异性强、高分辨原位实时成像以及无损检测等优点受到科研者的广泛关注^[8-13]。现有用于 HNO 检测的荧光探针主要基于以下 2 种识别机理: 一类 HNO 探针主要是基于诱导 Cu(II) 配合物还原至相应的 Cu(I) 类似物^[14-15], 但极易在微环境中受到大量生物还原剂如抗坏血酸(AA)和谷胱甘肽(GSH)等物质的干扰。另一类探针是以二苯基膦苯甲酸酯为识别基团, HNO 作为一种特殊的亲电试剂与芳基膦化合物发生反应生成氮杂叶立德, 氮杂叶立德进攻相邻的酯键, 释放荧光^[16-17]。后者可以克服前者选择性差的缺陷, 且响应迅速, 速率常数高至 9×10⁵ M⁻¹·S⁻¹。因此, 第二种识别机理受到了该领域科研工作者的注意。

收稿日期: 2021-01-28; 修回日期: 2021-10-10

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(22004132); 湖南省自然科学基金项目(2020JJ5963); 湖南省教育厅科学研究项目(19C1892); 湖南省大学生创新创业训练计划项目(湘教通[2019]100 号第 1624 项)

作者简介: 赵美(1995-), 女, 硕士生, 研究方向为有机小分子荧光探针的合成, 1955826621@qq.com; 卢丹青(1989-), 女, 博士, 讲师, 研究方向为有机小分子荧光探针的合成、化学与生物传感器, 通讯联系人, danqinglu@csuft.edu.cn。

本研究选择具有较好的双光子吸收截面、较高的量子产率以及易于合成修饰等优点的 6-苯并-d-噻唑-2-萘酚为荧光报告基团^[18-20],选择二苯基膦苯甲酸酯为识别基团,合成了一种高灵敏 HNO 荧光探针(BNB-HNO)。研究了其光谱性质,实验结果表明,在 DMF:PBS = 1:99 (v/v, 10 mmol/L, pH = 7.4) 缓冲体系中,BNB-HNO 在检测 HNO 时具有较好的选择性、抗干扰性、高灵敏性和响应迅速等优点。HNO 浓度梯度为 0~10 $\mu\text{mol/L}$,探针 BNB-HNO 可定量检测 HNO,检出限为 54.6 nmol/L,并且该探针可以直接用于血清样品中 HNO 的定量检测,在浓度梯度为 0~60 $\mu\text{mol/L}$,探针 BNB-HNO 的荧光信背比和 HNO 浓度呈良好的线性关系,此外,成功地将探针 BNB-HNO 用于斑马鱼中外源性 HNO 的实时无损检测。

1 实验部分

1.1 实验试剂和仪器

6-羟基-2-萘甲醛、2-氨基苯硫酚、对甲苯磺酸一水化合物、2-(二苯基膦)苯甲酸、4-二甲氨基吡啶(EMAP)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC)均直接购买于西格玛公司;胎牛血清(FBS)是 zata 品牌;实验所用水均为二次蒸馏水。

核磁共振光谱仪, Bruker DRX-500; 质谱仪, LC-MS; 荧光分光光度计, F4500, Agilent, USA; pH 计, 梅特勒-托利多 FE-28; 小动物活体成像仪, Photo IMAGER RT, Biospace Lap, France。

1.2 探针 BNB-HNO 的合成

6-苯并-d-噻唑-2-萘酚: 根据已有的文献合成^[18-19]。

探针 BNB-HNO: 如图 1 所示, 将 6-苯并-d-噻唑-2-萘酚(278 mg, 1 mmol)、2-(二苯基膦)苯甲酸(306.0 mg, 1 mmol)、4-二甲氨基吡啶(6.1 mg, 0.05 mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(191.7 mg, 1.0 mmol)溶于 35 mL 无水 CH_2Cl_2 中。将混合溶液置于 45 $^\circ\text{C}$ 搅拌 4 h, 反应结束后, 旋转蒸发除去溶剂。所得残渣用硅胶柱层析纯化(硅胶: 石油醚/乙酸乙酯 = 15:1 作为洗脱剂), 旋干后得到白色固体, 即探针 BNB-HNO (395.59 mg, 产率 70%)。通过红外(探针 BNB-HNO 上的 $\text{C}=\text{O}$ 在 1710 cm^{-1} ; $\text{C}-\text{O}$ 在 1250 cm^{-1} 处出峰; $\text{C}-\text{P}$ 在 1110 cm^{-1} 处出峰)、核磁共振波谱以及质谱对探针的结构进行表征。¹HNMR (400 MHz, DMSO), δ : 8.74(s, 1H), 8.26(d, $J = 8.4\text{ Hz}$, 1H), 8.20(d, $J =$

4.2 Hz, 1H), 8.11(d, $J = 8.1\text{ Hz}$, 1H), 8.06(d, $J = 8.6\text{ Hz}$, 1H), 7.75~7.48(m, 9H), 7.42(s, 6H), 7.25(s, 3H), 6.96(s, 1H)。MS(EI), m/z , 583.135 9 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 。

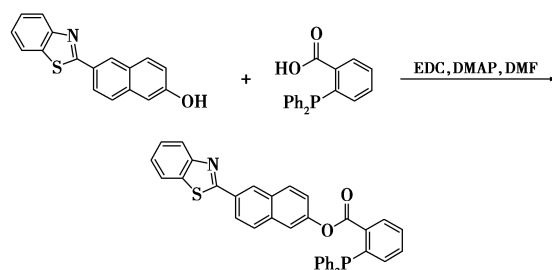


图 1 探针 BNB-HNO 的合成

1.3 溶液的配制和光谱的测定

1.0 mmol/L 探针溶液的配制: 将 BNB-HNO (5.67 mg, 0.01 mmol/L) 溶于 DMF (10 mL) 中, 得到 1.0 mmol/L 储备液, 4 $^\circ\text{C}$ 保存。

1.0 mmol/L HNO 溶液的配制: 将购买的 Angeli's salt ($\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$, 简称 AS, HNO 供体) 用 0.01 mol/L NaOH 溶液稀释, 置于 -20 $^\circ\text{C}$ 下保存备用, 使用前, 在 248 nm 处的吸光度验证了 AS 的浓度 ($\epsilon = 8.3 \times 10^3\text{ M/cm}$)。

其他选择性和竞争性生物分子均溶解于二次蒸馏水中, 配置成所需浓度, 供一般使用。

除非特别说明, 测定条件始终维持激发波长为 365 nm, 发射波长范围为 450~600 nm, 激发光和发射光夹缝均为 10.0 nm, 测试体系为 DMF:PBS = 1:99 (v/v, 10 mmol/L, pH = 7.4), 其他光学性实验类似。

1.4 胎牛血清中 HNO 的检测

为了验证该探针 BNB-HNO 可直接用于实际样品中 HNO 的检测, 本实验首先用 PBS (10 mmol/L, pH = 7.4) 缓冲溶液将胎牛血清溶液稀释至 5 倍, 再分别加入 BNB-HNO (10 $\mu\text{mol/L}$, 10 μL) 和不同浓度的 HNO (0、10、20、40、50、60、100、150、200、300 $\mu\text{mol/L}$) 在室温下反应 10 min 后转移至荧光比色皿中进行荧光测定。

1.5 活体成像

出生第五天的野生斑马鱼由湖南师范大学生命科学学院捐赠。对照组仅用 BNB-HNO (5 $\mu\text{mol/L}$) 孵育 30 min, 再用 PBS 缓冲液冲洗 3 次后成像。实验组斑马鱼尾部先静脉注射 BNB-HNO (5 $\mu\text{mol/L}$) 再注射 HNO (100 $\mu\text{mol/L}$) 分别孵育 10、20、30、60 min, PBS 缓冲液冲洗 3 次后成像。激发波长为

420 nm, 发射波长为 450~600 nm。

2 结果和讨论

2.1 探针 BNB-HNO 检测 HNO 的动力学测试

对探针 BNB-HNO 检测 HNO 的反应进行动力学测试。在含有探针 BNB-HNO ($10 \mu\text{mol/L}$) 的 DMF:PBS = 1:99 (v/v , 10 mmol/L , $\text{pH} = 7.4$) 溶液体系中加入 $60 \mu\text{mol/L}$ HNO, 测定激发波长为 365 nm 条件下的荧光光谱情况。如图 2(a) 所示, 随着时间延长体系中荧光强度逐渐增加; 通过读取最大荧光发射波长 510 nm 处荧光强度, 如图 2(b) 所示, 反应达到 10 min 时, 510 nm 处荧光强度达到最大值, 且延长至 20 min 荧光强度基本保持不变, 结果表明该探针具有较好的稳定性和灵敏性。

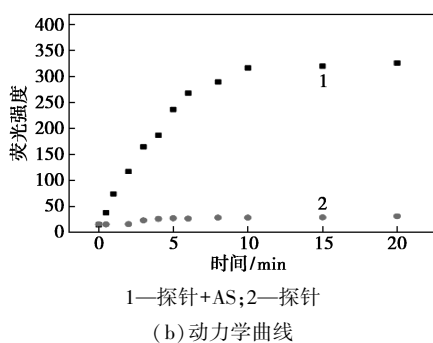
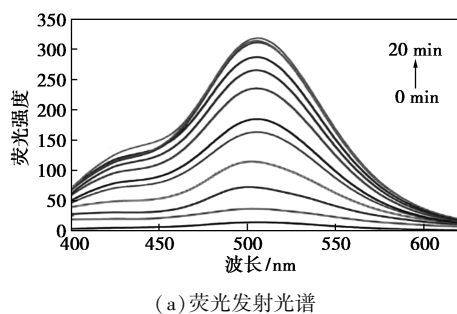


图 2 探针 BNB-HNO 对 HNO 的时间响应曲线

2.2 探针 BNB-HNO 对 HNO 的光谱响应

考察探针 BNB-HNO 对不同浓度的 HNO 的光谱响应情况。如图 3(a) 所示, 在 DMF:PBS = 1:99 (v/v , 10 mmol/L , $\text{pH} = 7.4$) 缓冲溶液体系中, 在只含有探针 BNB-HNO ($10 \mu\text{mol/L}$) 的溶液基本无荧光, 随着体系中加入不同浓度的 HNO ($0 \sim 60 \mu\text{mol/L}$), 510 nm 处荧光强度相应增加, 当 HNO 浓度为 $60 \mu\text{mol/L}$ 时, 体系中荧光强度达到最大值。通过绘制探针 BNB-HNO 对 HNO 响应的荧光信背比和 HNO 浓度的校正曲线, 从图 3(b) 插图可知, 510 nm 处荧光信背比和 HNO 浓度 ($0 \sim 10 \mu\text{mol/L}$) 呈良好的线性关系, 通过检出限计算公式 $\text{LOD} = 3\delta/k$ 计

算, (δ 表示只存在探针溶液的标准方差 SD , k 表示线性拟合方程的斜率), 探针对 HNO 的检出限为 54.6 nmol/L , 以上实验结果证明, BNB-HNO 具有定性定量分析检测低浓度 HNO 的潜力。

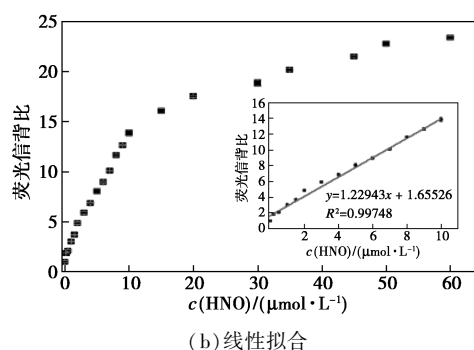
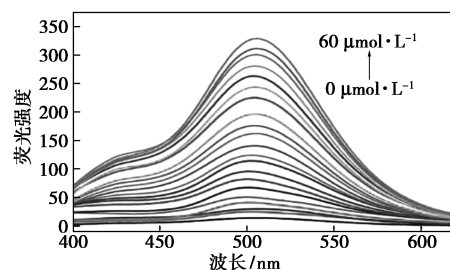


图 3 探针 BNB-HNO 与不同浓度 HNO 的荧光响应曲线及线性拟合

2.3 pH 影响

考察 $\text{pH} = 5 \sim 12$, 探针 BNB-HNO 和 HNO 反应前后荧光强度变化情况, 如图 4 所示, BNB-HNO 自身的荧光值基本不随 pH 的改变而变动; BNB-HNO 和 HNO 反应后, 在 $\text{pH} = 5 \sim 9$, 体系中的荧光强度随着 pH 增加荧光强度不断增加, 分析原因, 主要是酸性条件下反应受到抑制; 弱碱性条件下, 反应后释放的荧光团去质子化程度越高, 荧光增强。而强碱性条件下, AS 分解产生 HNO 速度降低, 荧光减弱。对于在生物系统, $\text{pH} = 7.4$, 探针 BNB-HNO 已经具有良好的信背比优势。因此, BNB-HNO 具有用于生物样品中检测 HNO 的潜力。

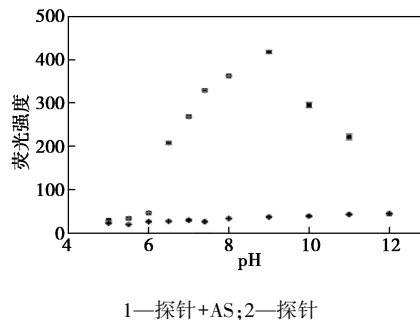


图 4 pH 对于探针 BNB-HNO 及其产物的影响

2.4 探针 BNB-HNO 检测 HNO 的选择性

测试多种常见的金属盐以及生物硫醇等干扰性物质与探针 BNB-HNO 的荧光响应情况。从图 5 可知,当分别存在 (1.0 mmol/L) KCl、NaCl、CaCl₂、FeCl₃、Na₂S、ZnCl₂、MgCl₂、NaNO₃、NaNO₂、Hcy、GSH 时,体系的荧光强度和仅仅只含有探针的荧光强度基本无异,只有加入 60 μmol/L HNO 时,探针的荧光信背比才明显增加至 25 倍,实验结果证明了探针 BNB-HNO 对 HNO 的识别具有专一性。

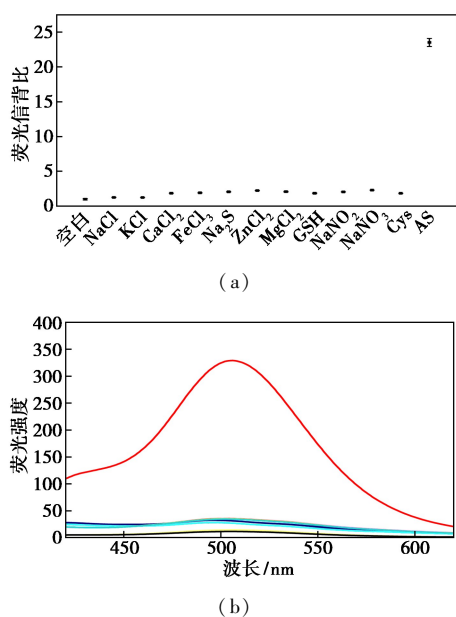


图 5 探针 BNB-HNO (10 μmol/L) 对 HNO (60 μmol/L) 和其他物质 (1 mmol/L) 的荧光响应

2.5 探针 BNB-HNO 检测 HNO 的抗干扰性

在微环境中检测 HNO,不仅要考察探针的选择性,探针的抗干扰能力也十分重要。如图 6 所示,分别向 (1.0 mmol/L) KCl、NaCl、CaCl₂、FeCl₃、Na₂S、ZnCl₂、MgCl₂、NaNO₃、NaNO₂、Hcy、GSH 干扰体系中继续加入 (60 μmol/L) HNO,体系中仍然可以产生

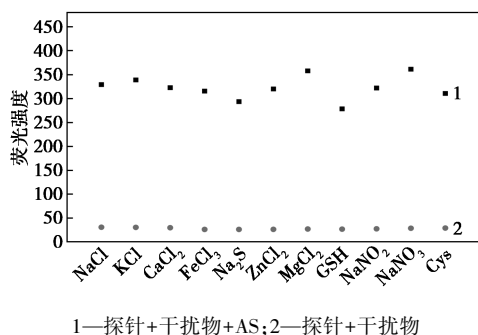
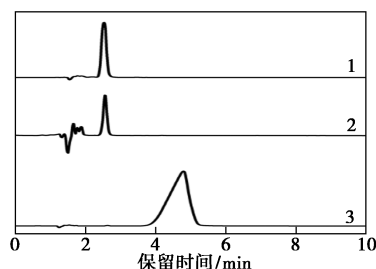


图 6 干扰物存在时 BNB-HNO (10 μmol/L) 对 HNO (60 μmol/L) 的荧光响应

强烈荧光,探针 BNB-HNO 对 HNO 响应后的荧光强度基本不受干扰物质的干扰,以上抗干扰性实验结果证明 BNB-HNO 具有较好的抗干扰能力,可以用于生物环境中 HNO 的特异性检测。

2.6 探针 BNB-HNO 识别 HNO 的反应机理

通过 HPLC 法验证该反应机理。图 7 表明,探针与 HNO 反应后,探针 BNB-HNO 自身的信号峰消失,6-苯并-d-噻唑-2-萘酚信号峰明显增强,表明 BNB-HNO 与 HNO 反应机理是基于 HNO 作为一种特殊的亲电试剂与探针上芳基磷酸酯键发生特异性反应使其断裂,释放 6-苯并-d-噻唑-2-萘酚,产生荧光。

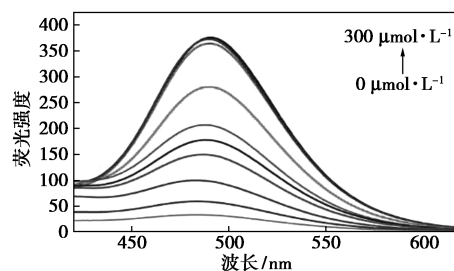


从上到下依次 1—6-苯并-d-噻唑-2-萘酚 (1 mmol/L);
2—探针 BNB-HNO (10 μmol/L) 和 HNO (60 μmol/L);
3—探针 BNB-HNO (1 mmol/L)

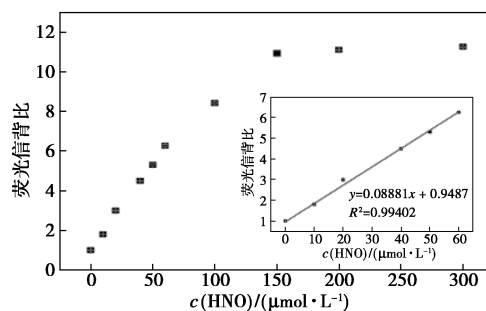
图 7 不同反应体系的色谱图

2.7 胎牛血清中 HNO 的检测

为了考察探针 BNB-HNO 在血清中特异性识别 HNO 的能力,从图 8 可知,随着血清体系中 HNO 浓



(a) 荧光发射光谱



(b) 线性拟合

图 8 探针 BNB-HNO 在血清体系中与不同浓度 HNO 的荧光发射光谱及线性拟合

度(0~300 $\mu\text{mol/L}$)的增加,探针的荧光强度不断增加,荧光信背比可达 11 倍,值得注意的是,如图 8(b)插图所示,在血清体系中,探针 BNB-HNO 的荧光信背比和 HNO 浓度在 0~60 $\mu\text{mol/L}$ 呈良好的线性关系,表明该探针具有在血清溶液中定性定量检测 HNO 的能力。

2.8 斑马鱼成像

进一步考察探针 BNB-HNO 在斑马鱼中外源性 HNO 的成像应用。从图 9(斑马鱼尾部的代表性荧光图像)可知,与只注射 BNB-HNO 的斑马鱼相比注射 AS 的斑马鱼表现出明显的荧光强度,且荧光强度随时间的延长不断增加,实验表明,探针 BNB-HNO 可以用于斑马鱼外源性 HNO 的成像。

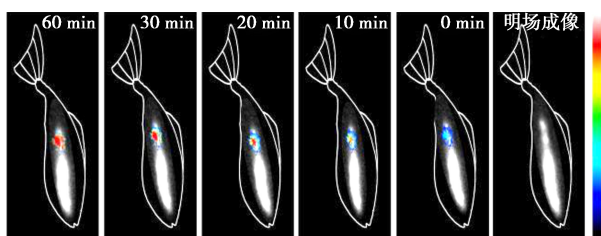


图 9 注射 AS 不同时间后,探针 BNB-HNO 在斑马鱼尾部的代表性荧光图像(伪彩色)

3 结论

基于 ICT 响应机理设计合成了一种荧光增强型探针,成功用于 HNO 的定性定量检测。反应机理为 HNO 作为一种特殊的亲电试剂与探针上芳基磷酸酯键发生特异性反应使其断裂,释放荧光团。该探针 BNB-HNO 在对 HNO 识别上具有灵敏性高、选择性好、抗干扰能力强以及稳定性好等优点。此外,该探针 BNB-HNO 还可直接用于血清样品 HNO 的定量分析,并成功实现了活体斑马鱼中外源性 HNO 的实时无损追踪。

参考文献

- [1] Sun H J, Lee W T, Leng B, *et al.* Nitroxyl as a potential theranostic in the cancer arena[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2020, 32(5): 331-349.
- [2] Mao Z, King S B. Recent advances in the chemical biology of nitroxyl (HNO) detection and generation[J]. *Nitric Oxide*, 2016, 57: 1-14.
- [3] An W W, Ryan L S, Reeves A G, *et al.* A Chemiluminescent probe for HNO quantification and real-time monitoring in living cells[J]. *Angewandte Chemie: International Edition in English*, 2019, 58(5): 1361-1365.
- [4] Suarez S A, Fonticelli M H, Rubert A A, *et al.* A surface effect allows HNO/NO discrimination by a cobalt porphyrin bound to gold

- [J]. *Inorganic Chemistry*, 2010, 49(15): 6955-6966.
- [5] Donzelli S, Espey M G, Thomas D D, *et al.* Discriminating formation of HNO from other reactive nitrogen oxide species[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2006, 40(6): 1056-1066.
- [6] Cline M R, Tu C K, Silverman D N, *et al.* Detection of nitroxyl (HNO) by membrane inlet mass spectrometry[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2011, 50(10): 1274-1279.
- [7] Reisz J A, Zink C N, King S B. Rapid and selective nitroxyl (HNO) trapping by phosphines: Kinetics and new aqueous ligations for HNO detection and quantitation[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133: 11675-11685.
- [8] Mao G J, Wang Y Y, Dong W P, *et al.* A lysosome-targetable two-photon excited near-infrared fluorescent probe for visualizing hypochlorous acid-involved arthritis and its treatment [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2021, 249: 119326.
- [9] Wang Q, Zhou L Y, Qiu L P, *et al.* An efficient ratiometric fluorescent probe for tracking dynamic changes in lysosomal pH[J]. *Analyst*, 2015, 140(16): 5563-5569.
- [10] Zhang J, Jin Z, Hu X X, *et al.* Efficient two-photon fluorescent probe for glutathione S-transferase detection and imaging in drug-induced liver injury sample[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(15): 8097-8103.
- [11] 张璐, 信熙卿, 魏白. 反应型香豆素探针的合成及其对废水中汞离子的检测[J]. *现代化工*, 2021, 41(1): 239-242.
- [12] 吴平, 任红, 韩丹丹, 等. “关-开”型铜(II)离子荧光探针的研究进展[J]. *现代化工*, 2020, 40(11): 238-242.
- [13] 杨玲, 廖超强, 曹杰, 等. 合成新型荧光增强型探针用于巯基蛋白质的检测[J]. *现代化工*, 2016, 36(3): 178-181, 183.
- [14] Palanisamy S, Wang Y L, Chen Y J, *et al.* In vitro and in vivo imaging of nitroxyl with copper fluorescent probe in living cells and zebrafish[J]. *Molecules*, 2018, 23(10): 2551.
- [15] Zhou Y, Liu K, Li J Y, *et al.* Visualization of nitroxyl in living cells by a chelated copper(II) coumarin complex[J]. *Organic Letters*, 2011, 13(6): 1290-1293.
- [16] Wei C, Wang X F, Li X Y, *et al.* An isophorone-fused near-infrared fluorescent probe with a large Stokes shift for imaging endogenous nitroxyl in living cells and zebrafish[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, 227: 117765.
- [17] He M Y, Li C H, Pang Z G, *et al.* A new phenolate-ion-type two-photon near infrared fluorophore-based biosensor for high-performance detection of HNO [J]. *Chemistry*, 2020, 26(53): 12140-12144.
- [18] Lu D Q, Zhou L Y, Wang R W, *et al.* A two-photon fluorescent probe for endogenous superoxide anion radical detection and imaging in living cells and tissues[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017, 250: 259-266.
- [19] Ma Q J, Xu J H, Zhang X B, *et al.* A naphthalene-based two-photon fluorescent probe for selective and sensitive detection of thiophenols [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016, 229: 434-440.
- [20] Mao G J, Wei T T, Wang X X, *et al.* High-sensitivity naphthalene-based two-photon fluorescent probe suitable for direct bioimaging of H₂S in living cells [J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85: 7875-7881. ■