

· 基础研究 ·

靶向MPO的次氯酸荧光探针用于细胞成像

徐辉军, 王玉婷, 秦亚娟, 厉廷有*

南京医科大学药学院, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的: 合成靶向髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)的次氯酸(hypochloric acid, HClO)荧光探针并评估其HClO示踪活性。方法: 以硅罗丹明为荧光团合成SiRho-GABA-KYC, 紫外分光光度计和荧光分光光度计检测其紫外光谱和荧光光谱以及pH稳定性和选择性, CCK-8法检测细胞毒性, 用共聚焦显微镜进行细胞荧光成像。结果: 合成了SiRho-GABA-KYC, 对HClO响应高, 选择性好, 细胞毒性小, 可示踪HeLa细胞中HClO浓度的变化。结论: 探针SiRho-GABA-KYC可用于检测HClO浓度进而反映MPO催化活性。

[关键词] 髓过氧化物酶; 次氯酸; 荧光探针

[中图分类号] R446

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2023)10-1342-08

doi: 10.7655/NYDXBNS20231002

Hypochloric acid fluorescence probe targeting MPO for cell imaging

XU Huijun, WANG Yuting, QIN Yajuan, LI Tingyou*

School of Pharmacy, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** The current study aims to synthesize hypochloric acid (HClO) fluorescent probes targeting myeloperoxidase (MPO) and evaluate its HClO tracing activity. **Methods:** Si-rhodamine was used as the fluorophore to synthesize SiRho-GABA-KYC. The UV spectrum, fluorescence spectrum, and pH stability and selectivity were detected with UV spectrophotometer and fluorescence spectrophotometer. Cytotoxicity was detected with CCK - 8 method, and cell fluorescence imaging was performed by confocal microscopy. **Results:** SiRho-GABA-KYC was synthesized, with a high response to HClO, a good selectivity, and a low cytotoxicity, which can trace changes in HClO concentration in HeLa cells. **Conclusion:** The probe SiRho-GABA-KYC can be used to detect HClO concentration, which in turn reflects MPO catalytic activity.

[Key words] myeloperoxidase; hypochloric acid; fluorescent probe

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(10): 1342-1349]

髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)介导吞噬体内卤代氧化剂的产生, 在细菌杀伤, 保护身体免受疾病侵害中起关键作用^[1]。Chen等^[2]研究发现MPO活性与脑卒中相关, 在短暂性大脑中动脉闭塞(transience middle cerebral artery occlusion, tMCAO)和永久性大脑中动脉闭塞(permanent middle cerebral artery occlusion, pMCAO)动物模型中, 缺血皮层中的MPO活性在缺血开始6 h升高, 在第5天

达到峰值, 并在第15天逐渐恢复到基础水平。对缺血性卒中模型使用MPO抑制剂KYC可以减小脑梗死体积, 保护血脑屏障, 减轻神经缺损^[3-5]。大量研究表明MPO可以作为脑卒中的标志物, 且MPO抑制剂可以用于治疗脑卒中。

次氯酸(hypochloric acid, HClO)常被认为是中性粒细胞介导的细胞内杀伤微生物的活性物质。当过氧化氢存在时, Fe³⁺-MPO(天然酶)经历双电子氧化, 形成化合物I(·⁺por-Fe[IV]=O)和H₂O。化合物I可以通过卤化物(Cl⁻, Br⁻, I⁻, 但不包括F⁻)或假卤化物(SCN⁻)的双电子还原转化为天然酶, 在还原

[基金项目] 国家自然科学基金(81573280)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: L_tingyou@njmu.edu.cn

过程中产生各自的次卤酸(HClO、HBrO、HIO或HOSCN),且由于血浆中Cl⁻的浓度远远高于其他卤化物,所以HClO是MPO卤化循环中最丰富和最重要的产物^[6]。脑卒中发生后,MPO被激活,引发HClO大量产生。

近年来,HClO荧光探针的研究取得了显著进展,虽然已发表的探针在体外对HClO均有很好的灵敏度、选择性、稳定性,且在细胞实验中获得了优秀的检测效果,然而其较短的激发和发射波长(一般情况下 $\lambda_{ex} < 600 \text{ nm}$, $\lambda_{em} < 650 \text{ nm}$)会带来多种问题,如可能会受到体内自身荧光信号的干扰、对生物样品产生光毒性以及可能出现光漂白现象等^[7-8]。且它们没有靶向检测MPO的能力,在体内使用受到限制。

本文以具有高光稳定性和近红外发射能力的硅罗丹明为荧光基团,通过酰肼硫脲键连接MPO的靶向基团KYC合成SiRho-GABA-KYC(图1)^[9-10]。HClO存在时硅罗丹明-硫氨基脲会发生环化反应并产生显著的荧光启动反应^[11]。该探针可在体外特异性检测HClO,可用于细胞成像。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂和仪器

¹H NMR、¹³C NMR(400 MHz核磁共振仪,JEOL公司,日本);质谱(Agilent-6410 LC/MS, Agilent公

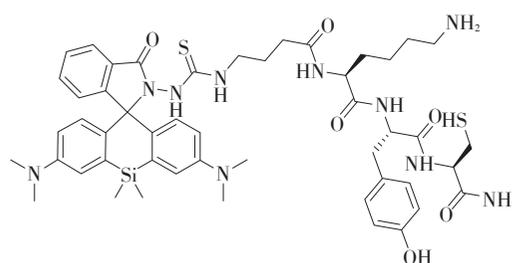


图1 探针SiRho-GABA-KYC结构

Figure 1 The structure of SiRho-GABA-KYC

司,美国);硅胶板(薄层层析用,青岛化工研究所);多功能酶标仪(SYNERGY H1, BioTek公司,美国);气浴恒温振荡器(CHA-S THZ-82 ZD-85,江苏正基仪器有限公司);台式低速冷冻离心机(CenLee 5R,湖南湘立科学仪器有限公司);CO₂培养箱(HERA-cell 150i, Thermo Scientific公司,美国);紫外分光光度计(UV-2450, Shimadzu公司,日本);荧光分光光度计(FL-4600, Hitachi公司,日本);激光共聚焦显微镜(LSM 800, Zeiss公司,德国)。化学试剂除特殊说明外均为市售试剂。

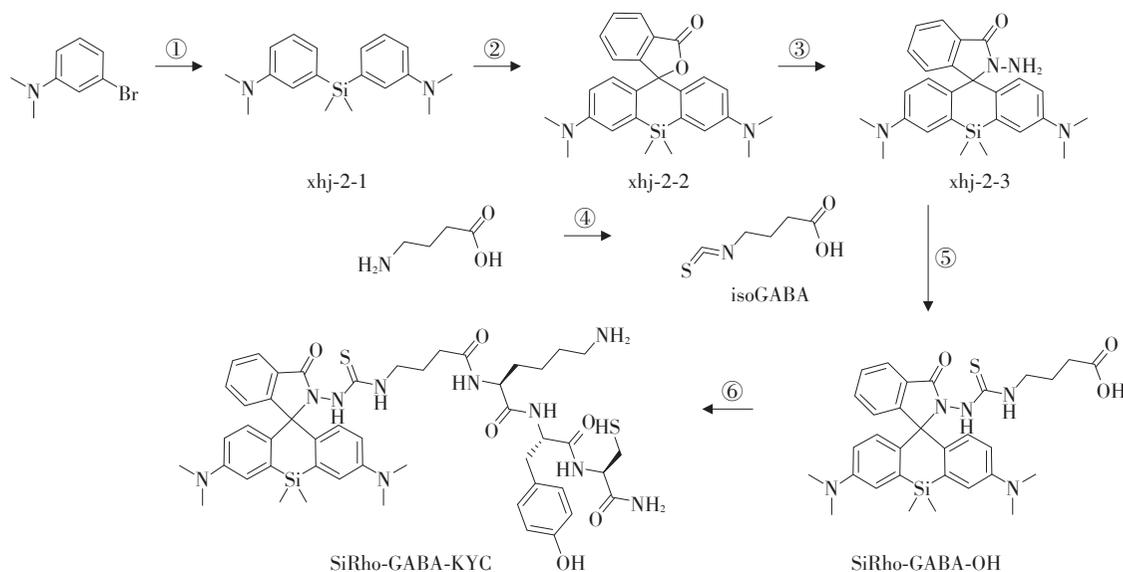
1.1.2 细胞系与培养条件

HeLa细胞常规培养于含10%胎牛血清,80 U/mL青霉素,0.08 mg/mL链霉素的DMEM培养基,置于5% CO₂,37 °C的培养箱中。

1.2 方法

1.2.1 化合物的合成

化合物的合成方法如图2所示。



试剂和条件:①正丁基锂,3-溴-N,N-二甲基苯胺,四氢呋喃,-78 °C~25 °C;②2-羧基苯甲醛,溴化铜,140 °C;③水合肼,乙醇,80 °C;④二硫化碳,碘,三乙胺,四氢呋喃/水,0 °C;⑤N,N-二甲基甲酰胺,氩气,90 °C;⑥固相肽合成。

图2 化合物的合成方法

Figure 2 Synthetic scheme for the compounds

1.2.1.1 xhj-2-1的合成

于氩气保护下,将3-溴-N,N-二甲基苯胺(10 g, 50 mmol)溶于30 mL无水四氢呋喃(THF)中,冷却至-78 ℃,加入正丁基锂(n-BuLi)(2.5 mol/L的己烷溶液, 22 mL, 55 mmol),反应2 h后,加入二氯二甲基硅烷(3.6 mL, 30 mmol),升温至室温继续反应2 h。反应结束后,加冰水淬灭,减压浓缩除尽THF后用乙酸乙酯(EA)萃取3次,合并有机层,加无水硫酸钠(Na₂SO₄)干燥。有机相减压浓缩后通过硅胶柱层析[石油醚(PE):EA=50:1]得浅黄色油状液体4.8 g,产率:64.34%。¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ: 7.25(d, J=5.6 Hz, 1H), 7.22(d, J=7.8 Hz, 1H), 6.93(d, J=2.7 Hz, 2H), 6.91(d, J=7.1 Hz, 2H), 6.76(dd, J=8.3, 2.4 Hz, 2H), 2.92(s, 12H), 0.53(s, 6H)。¹³C NMR(101 MHz, CDCl₃) δ: 150.13, 139.15, 128.68, 122.94, 118.53, 113.76, 40.89, -1.95。高分辨质谱(HRMS)[离子源类型(ESI)]m/z: 299.23[M+H]⁺。

1.2.1.2 xhj-2-2的合成

将xhj-2-1(1 g, 3.35 mmol), 2-羧基苯甲醛(2.52 g, 16.8 mmol)和溴化铜(CuBr₂)(75 mg, 0.34 mmol)置于耐压管中,升温至140 ℃搅拌5 h。反应结束后,反应液冷却至室温,二氯甲烷(DCM)稀释后调节pH至碱性,用DCM萃取3次,收集有机相,无水Na₂SO₄干燥后减压浓缩,通过硅胶柱层析(PE:EA:Et₃N=50:1:1)得粗品,再次通过硅胶柱层析(PE:DCM=1:10),所得粗品用EA/PE(石油醚)重结晶得淡蓝色固体300 mg,产率:20.86%。¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ: 7.95(d, J=7.6 Hz, 1H), 7.62(td, J=7.5, 1.0 Hz, 1H), 7.53(dd, J=11.1, 3.9 Hz, 1H), 7.29(d, J=7.7 Hz, 1H), 6.96(d, J=2.7 Hz, 2H), 6.78(d, J=8.8 Hz, 2H), 6.54(dd, J=8.9, 2.8 Hz, 2H), 2.95(s, 12H), 0.64(s, 3H), 0.60(s, 3H)。¹³C NMR(101 MHz, CDCl₃) δ: 170.90, 154.57, 149.44, 137.17, 133.85, 128.86, 128.34, 127.21, 125.82, 124.76, 116.79, 113.48, 92.06, 40.48, 0.63, -1.32。HRMS(ESI) m/z: 429.22[M+H]⁺。

1.2.1.3 xhj-2-3的合成

将xhj-2-2(44 mg, 0.10 mmol)溶于5 mL乙醇(EtOH)中,升温至80 ℃,加入85%水合肼(0.2 mL, 3.48 mmol),搅拌回流4 h,反应结束后减压浓缩。浓缩液用EA稀释,饱和食盐水洗涤3次,收集有机相,加无水Na₂SO₄干燥。有机相减压浓缩后通过硅胶柱层析(PE:EA=3:1)得8 mg无色油状液体,产率:17.63%。¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ: 7.95~

7.86(m, 1H), 7.34~7.26(m, 2H), 6.89(d, J=2.8 Hz, 2H), 6.88~6.85(m, 1H), 6.73(d, J=9.0 Hz, 2H), 6.63(dd, J=9.0, 2.9 Hz, 2H), 3.68(s, 2H), 2.94(s, 12H), 0.60(s, 3H), 0.57(s, 3H)。¹³C NMR(101 MHz, CDCl₃) δ: 167.79, 153.66, 149.02, 135.79, 132.59, 130.33, 128.82, 127.90, 127.48, 123.83, 122.95, 116.19, 115.34, 73.72, 40.43, 1.12, 0.27。HRMS(ESI) m/z: 443.26[M+H]⁺。

1.2.1.4 isoGABA的合成

将二硫化碳(1.74 mL, 28.93 mmol)加入到γ-氨基丁酸(GABA)(1 g, 9.7 mmol)和Et₃N(3.4 mL, 24.5 mmol)的THF/H₂O(7 mL/7 mL)溶液中,于室温搅拌14 h后,冷却至0 ℃,缓慢滴加碘(I₂)(2.7 g, 10.6 mmol)的THF(7 mL)溶液,滴加完毕后于0 ℃继续反应3 h。反应结束后,向反应液加入6 mL 2 mol/L稀盐酸和Na₂SO₃(0.24 g, 1.9 mmol),加入EA分层,取有机层减压浓缩后通过硅胶柱层析(PE:EA=2:1)得浅棕色油状液体1.34 g,产率:95.2%。¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ: 9.32(s, 1H), 3.67~3.55(m, 2H), 2.50(dd, J=9.0, 5.3 Hz, 2H), 2.06~1.90(m, 2H)。¹³C NMR(101 MHz, CDCl₃) δ: 178.69, 131.06, 44.35, 30.83, 25.04。

1.2.1.5 SiRho-GABA-OH的合成

将xhj-2-3(550 mg, 1.24 mmol)和isoGABA(4.32 g, 29.76 mmol)溶于干燥无水N,N-二甲基甲酰胺(DMF)(20 mL)中,在氩气保护下于90 ℃搅拌过夜,通过TLC监测反应。反应完成后,冷却至室温,EA反复萃取3次,收集有机层。有机层用饱和食盐水冲洗3次后,无水Na₂SO₄干燥,减压浓缩后通过硅胶柱层析(PE:EA=1:1)得淡绿色固体440 mg,产率:60.2%。¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ: 7.97(d, J=7.1 Hz, 1H), 7.63~7.51(m, 2H), 7.12(d, J=7.5 Hz, 1H), 6.88(s, 1H), 6.83(d, J=2.8 Hz, 2H), 6.56(dd, J=9.0, 2.9 Hz, 2H), 6.48(d, J=8.9 Hz, 2H), 5.72(t, J=5.8 Hz, 1H), 3.22(dd, J=13.0, 6.7 Hz, 2H), 2.92(s, 12H), 2.08~1.99(m, 2H), 1.44~1.32(m, 2H), 0.53(d, J=4.3 Hz, 6H)。¹³C NMR(101 MHz, CDCl₃) δ: 182.91, 177.83, 168.00, 153.26, 149.24, 137.95, 134.40, 129.88, 129.35, 129.20, 128.72, 124.72, 123.93, 115.92, 114.76, 73.75, 43.92, 40.22, 31.07, 23.83, 0.36, -0.59。质谱MS(ESI) m/z: 586.41[M-H]⁻。

1.2.1.6 SiRho-GABA-KYC的合成

树脂溶胀:称取Rink Amide树脂(0.97 g, 0.71 mmol),加入DMF(9 mL)充分振摇使溶胀树脂,

30 min后抽干DMF。DMF洗涤6次,振摇5 min/次。

肽键的形成:加入含20%哌啶的DMF(9 mL),振摇5 min,抽干;再次加入相同的DMF溶液(9 mL),振摇40 min,抽干;DMF洗涤6次。加入Fmoc-Cys(Trt)-OH(2.5 eq, 1 038 mg),六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基三吡咯烷基磷(PyBop)(2.5 eq, 927 mg),1-羟基苯并三唑(HOBT)(2.5 eq, 240 mg),N,N-二异丙基乙胺(DIPEA)(4.0 eq, 472 μ L),DMF(9 mL),26 $^{\circ}$ C恒温振摇4 h。抽干,DMF洗涤6次,每次振摇5 min,抽干。

二肽:加入含20%哌啶的DMF(9 mL),振摇5 min,抽干;再次加入相同的DMF溶液(9 mL),振摇40 min,抽干;DMF洗涤6次。加入Fmoc-Tyr(tBu)-OH(2.5 eq, 815 mg),PyBop(2.5 eq, 927 mg),HOBT(2.5 eq, 240 mg),DIPEA(4.0 eq, 472 μ L),DMF(9 mL),恒温26 $^{\circ}$ C振摇4 h。抽干,DMF洗涤6次,振摇5 min/次,抽干。

三肽:加入含20%哌啶的DMF(9 mL),振摇5 min,抽干;再次加入相同的DMF溶液(9 mL),振摇40 min,抽干;DMF洗涤6次。加入Fmoc-Lys(Boc)-OH(2.5 eq, 834 mg),PyBop(2.5 eq, 927 mg),HOBT(2.5 eq, 240 mg),DIPEA(4.0 eq, 472 μ L),DMF(9 mL),恒温26 $^{\circ}$ C振摇4 h。抽干,DMF洗涤6次,振摇5 min/次,抽干。

四肽:加入含20%哌啶的DMF(9 mL),振摇5 min,抽干;再次加入相同的DMF溶液(9 mL),振摇40 min,抽干;DMF洗涤6次。加入SiRho-GABA-OH(1.05 eq, 440 mg),PyBop(1.2 eq, 460 mg),HOBT(1.2 eq, 120 mg),DIPEA(2.0 eq, 236 μ L),DMF(9 mL),恒温26 $^{\circ}$ C振摇4 h。抽干,DMF洗涤6次,振摇5 min/次,抽干。

树脂后处理:DMF洗涤3次,DCM洗涤3次,MeOH洗涤3次,DCM洗涤3次,MeOH洗涤3次,振摇5 min/次,洗涤后放入真空干燥器充分干燥。

在上述充分干燥的树脂中加入三氟乙酸(9.5 mL)和三异丙基硅烷(0.5 mL),恒温26 $^{\circ}$ C振摇2 h,抽滤,滤液保存待用。此步骤重复2次,合并3次切割所得滤液,减压浓缩至小体积,加入冰乙醚析出沉淀,过滤干燥得粗品。溶解后用液相进行半制备。 1 H NMR(400 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.65(s, 1H), 8.00(dd, J=11.0, 8.0 Hz, 2H), 7.90(d, J=6.9 Hz, 1H), 7.83(d, J=7.8 Hz, 1H), 7.76~7.56(m, 5H), 7.24(d, J=13.6 Hz, 2H), 7.04~6.93(m, 5H), 6.72~6.27(m, 6H), 2.97(dd, J=16.0, 5.4 Hz, 3H), 2.89(d, J=3.2 Hz, 12H),

2.83~2.67(m, 5H), 2.25~2.18(m, 1H), 1.87(t, J=7.2 Hz, 2H), 1.63~1.35(m, 4H), 1.21(d, J=6.9 Hz, 4H), 0.49(d, J=14.1 Hz, 6H)。MS(ESI)m/z: 491.34 [1/2M+H] $^{+}$ 。

1.2.2 活性测试

1.2.2.1 光谱测量

紫外测定:在PBS(50% DMF, pH 5.0)中,SiRho-GABA-KYC(5 μ mol/L)与HClO(50 μ mol/L, PBS)于37 $^{\circ}$ C孵育30 min后检测紫外吸收光谱。

荧光测定:在PBS(50% DMF, pH 5.0)中,SiRho-GABA-KYC(5 μ mol/L)与HClO(50 μ mol/L, PBS)于37 $^{\circ}$ C孵育30 min后,检测激发光谱和发射光谱。

pH稳定性:在不同pH(4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.4、8.0、8.5)的PBS缓冲液(50% DMF)中,SiRho-GABA-KYC(5 μ mol/L)与HClO(50 μ mol/L)于37 $^{\circ}$ C孵育30 min后,用620 nm激发检测波长681 nm处的荧光强度。

浓度依赖性:在PBS(50% DMF, pH 5.0)中,SiRho-GABA-KYC(5 μ mol/L)与HClO(0、0.25、0.50、0.75、1.00、2.50、5.00、10.00、20.00、25.00、40.00、50.00 μ mol/L)于37 $^{\circ}$ C孵育30 min后检测荧光光谱。

选择性:在PBS(50% DMF, pH 5.0)中,SiRho-GABA-KYC(5 μ mol/L)与不同底物(50 μ mol/L)于37 $^{\circ}$ C孵育30 min后,用620 nm激发检测波长681 nm处的荧光强度。各组底物:①Control;②H₂O₂;③HBrO;④ \cdot OH;⑤tBuOO \cdot ;⑥ROO \cdot ;⑦TBHP;⑧ONOO $^{-}$;⑨NO;⑩NO $_2^{-}$;⑪NO $_3^{-}$;⑫Na $^{+}$;⑬K $^{+}$;⑭Ca $^{2+}$;⑮Mg $^{2+}$;⑯Zn $^{2+}$;⑰Cu $^{2+}$;⑱Fe $^{3+}$;⑲Cl $^{-}$;⑳I $^{-}$;㉑Arg;㉒Gly;㉓Glu;㉔Cys;㉕H₂S;㉖GSH;㉗HOCl。

1.2.2.2 细胞毒性

取处于对数生长期的HeLa细胞制成悬液并接种到96孔板中(细胞密度约为 5×10^4 个/孔),于37 $^{\circ}$ C,5% CO₂的孵育环境中培养12 h,加入SiRho-GABA-KYC溶液(相当于细胞培养基中浓度为0、5、10、20、30、50 μ mol/L),另设空白组(无细胞),每组设6个复孔,于培养箱中继续孵育24 h,弃去上清液,加入100 μ L无血清培养基和10 μ L CCK-8溶液,继续培养1 h后,在酶联免疫检测仪波长450 nm处测量各孔的吸光值。

1.2.2.3 外源性HClO细胞成像

取处于对数生长期的HeLa细胞制成悬液,加入到预先放置盖玻片的24孔板中,于37 $^{\circ}$ C,5% CO₂培养箱中培养12 h,弃去培养基,用PBS缓冲液清洗1次,加入不同浓度的次氯酸钠(相当于细胞培养基

中浓度为0、5、10、15、20、30 $\mu\text{mol/L}$)和 opti-MEM 预孵育 30 min 后, 更换 opti-MEM, 然后加入 SiRho-GABA-KYC (细胞培养基中浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$, 1% DMF) 和 Hoechst 33258 (8 $\mu\text{mol/L}$) 孵育 30 min 后, 弃去上清液, 用 PBS 缓冲液清洗细胞 3 次, 加 4% 多聚甲醛于室温下固定 15 min 后, 用 PBS 清洗 3 次, 取出盖玻片, 细胞贴壁面朝下置于载玻片 (滴加 5 μL 抗荧光猝灭剂) 上, 盖玻片四周用指甲油密封, 避光, 使用 Zeiss LSM 800 激光共聚焦显微镜观察拍照。

1.3 统计学方法

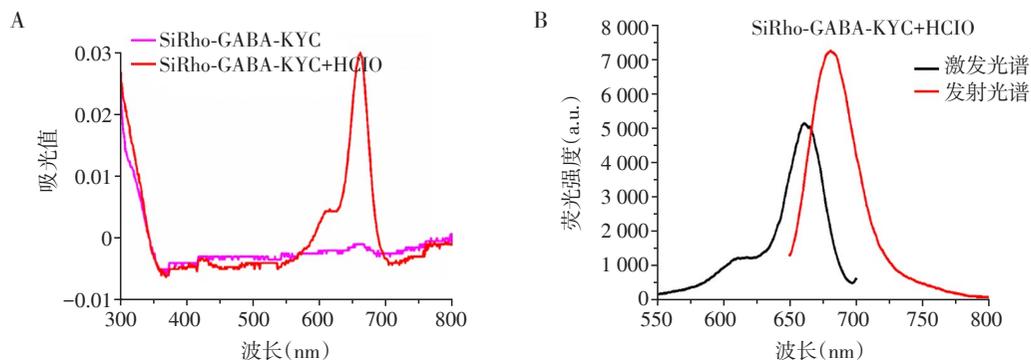
实验数据结果采用 GraphPad Prism7 软件分析, 符合正态分布的定量数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表

示。两组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 探针的光谱特性

SiRho-GABA-KYC 加入 HClO 后, 如图 3A 所示, 紫外最大吸收波长位于 660 nm。随后检测 SiRho-GABA-KYC 与 HClO 反应后的荧光发射, 如图 3B 所示, 探针 SiRho-GABA-KYC 和 HClO 反应后, 其最大激发波长位于 660 nm, 最大发射波长位于 681 nm, 但是使用 660 nm 激发会影响发射光谱, 所以使用 620 nm 作为激发波长。



A: 在 HClO (50 $\mu\text{mol/L}$) 存在下, SiRho-GABA-KYC (5 $\mu\text{mol/L}$) 在 PBS 中的紫外-可见吸收光谱; B: 在 HClO (50 $\mu\text{mol/L}$) 存在下, SiRho-GABA-KYC (5 $\mu\text{mol/L}$) 在 PBS 中的激发光谱和发射光谱, PBS (50% DMF, pH 5.0)。

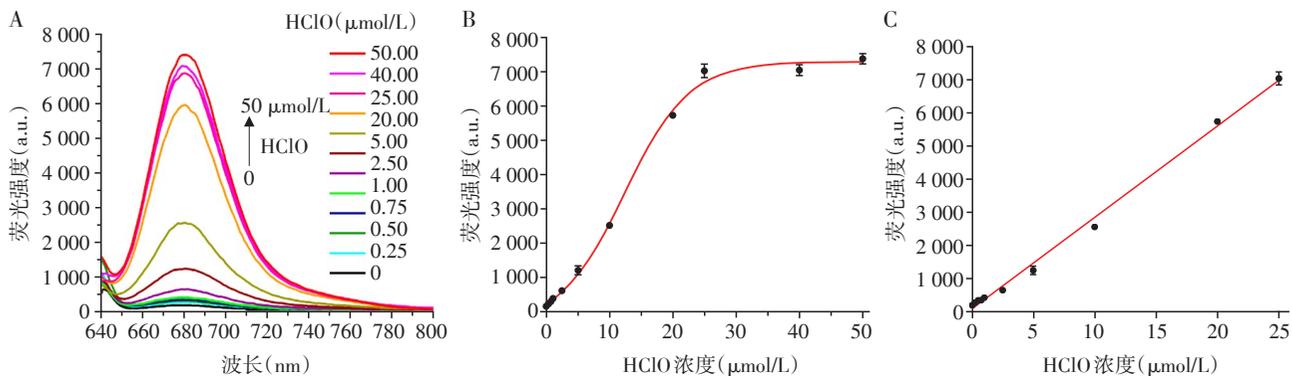
图3 SiRho-GABA-KYC 的光谱特性

Figure 3 Spectral characteristics of SiRho-GABA-KYC

2.2 探针对 HClO 的浓度依赖性

检测 SiRho-GABA-KYC 与不同浓度 HClO 反应的荧光发射, 如图 4A 所示, 发现随着 HClO 浓度 (0~25 $\mu\text{mol/L}$) 的升高, 荧光也逐渐增强。将 681 nm

处的荧光强度与 HClO 浓度 (0~50 $\mu\text{mol/L}$) 进行线性拟合, 如图 4B 所示, HClO 在 0~25 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度范围内存在良好的线性关系 ($y=276.5x+70.51$, $R^2=0.996$)。



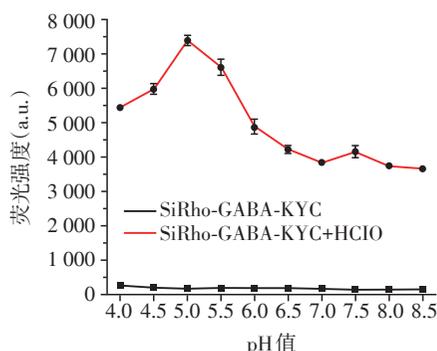
A: 在不同浓度 HClO (0~50 $\mu\text{mol/L}$) 存在下, SiRho-GABA-KYC (5 $\mu\text{mol/L}$) 在 PBS 中的荧光光谱; B: 在 HClO 0~50 $\mu\text{mol/L}$ 范围内对 SiRho-GABA-KYC 的荧光强度进行线性拟合; C: 在 HClO 0~25 $\mu\text{mol/L}$ 范围内对 SiRho-GABA-KYC 的荧光强度进行线性拟合; PBS (50% DMF, pH 5.0), $\lambda_{\text{exc}}=620 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=681 \text{ nm}$, $n=3$ 。

图4 SiRho-GABA-KYC 的浓度依赖性

Figure 4 Concentration dependence of SiRho-GABA-KYC

2.3 探针对pH的稳定性

为了检测探针在不同pH环境中的稳定性及检测HClO的效果,测定了pH从4.0~8.5共10个pH的纯探针以及和次氯酸反应的荧光强度。如图5所示,探针本身在不同pH的缓冲液中荧光强度基本不发生变化,说明探针受pH变化的影响很小,对pH稳定。当探针用于检测HClO时,在pH值为5.0时荧光最强,于生理pH(7.35~7.45)范围时,探针对HClO仍有较强响应,因此该探针适用于细胞及体内成像。



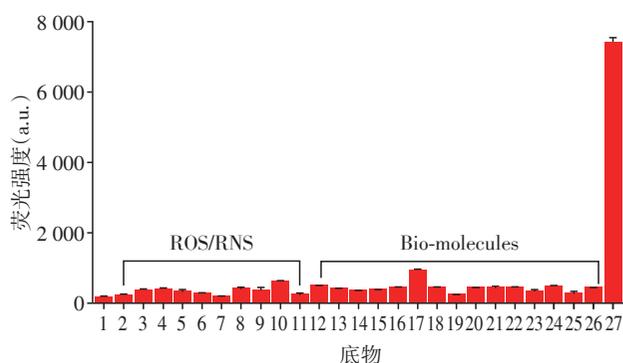
不存在和存在HClO(50 μmol/L)情况下,pH对SiRho-GABA-KYC(5 μmol/L)在681 nm处荧光强度的影响,λ_{ex}=620 nm,λ_{em}=681 nm,n=3。

图5 SiRho-GABA-KYC的pH稳定性
Figure 5 pH stability of SiRho-GABA-KYC

2.4 探针对HClO的选择性

为了验证探针检测HClO的选择性,对该探针与其他可能会与探针反应的活性氧或活性氮(H₂O₂、HBrO、·OH、tBuOO·、ROO·、TBHP、ONOO⁻、NO、NO₂⁻、NO₃⁻),生物硫醇(Cys、H₂S、GSH),金属离子

(Na⁺、K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺、Cu²⁺、Fe³⁺),卤素离子(Cl⁻、I⁻)和氨基酸(Arg、Gly、Glu)的响应活性进行了检测,如图6所示。探针对HClO的选择性优于其他生物相关分子,只有HClO促进了荧光发射的显著增强,而在其他底物的存在下,探针的荧光光谱没有观察到明显的变化。在681 nm处,探针对HClO响应后的荧光增强相较于其他检测底物>30倍。



存在各种分析物(50 μmol/L)下探针SiRho-GABA-KYC(5 μmol/L)在681 nm处的荧光响应。1: Control; 2: H₂O₂; 3: HBrO; 4: ·OH; 5: tBuOO·; 6: ROO·; 7: TBHP; 8: ONOO⁻; 9: NO; 10: NO₂⁻; 11: NO₃⁻; 12: Na⁺; 13: K⁺; 14: Ca²⁺; 15: Mg²⁺; 16: Zn²⁺; 17: Cu²⁺; 18: Fe³⁺; 19: Cl⁻; 20: I⁻; 21: Arg; 22: Gly; 23: Glu; 24: Cys; 25: H₂S; 26: GSH; 27: HClO, λ_{ex}=620 nm, λ_{em}=681 nm, n=3。

图6 SiRho-GABA-KYC的选择性
Figure 6 Selectivity of SiRho-GABA-KYC

2.5 探针的响应机制

氧(硅)杂蒽螺环开环是检测次氯酸常用的一个识别基团,依照已有的研究猜测,它与HClO反应后,硅罗丹明-氨基硫脲基团成环,氧(硅)杂环形成共轭结构,如图7所示。

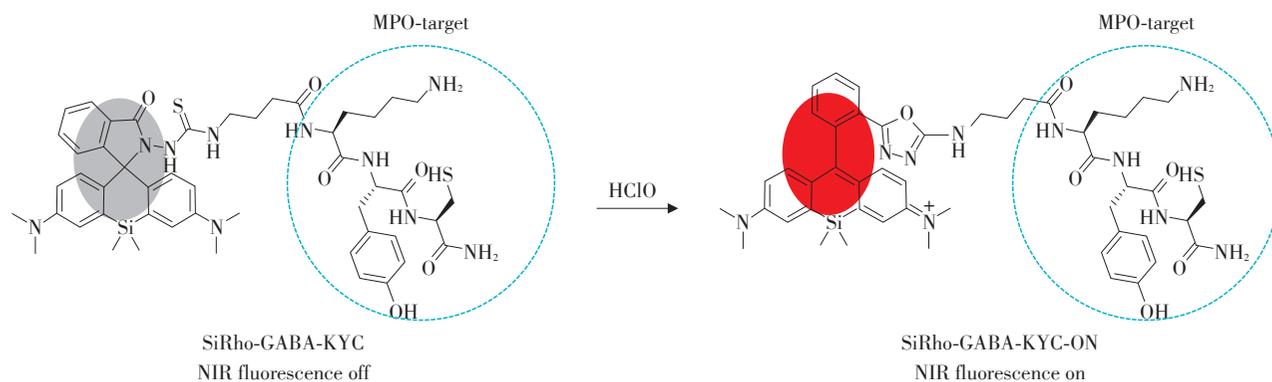
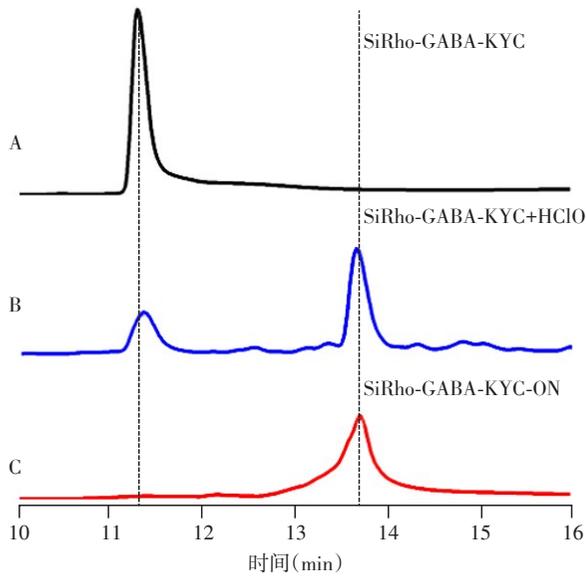


图7 SiRho-GABA-KYC与HClO的响应机制图
Figure 7 Response mechanism of SiRho-GABA-KYC with HClO

为了研究探针与次氯酸是否如预期反应,设计此实验。现设置如下3组实验:①探针溶液,②探针与HClO混合溶液,③产物溶液,在37℃孵育5 min

后,使用液相进行分析,收集探针与目标产物的信号(图8)。探针与次氯酸的混合溶液中出现的新峰与产物峰保留时间一致,说明探针与次氯酸按照设

想的机制进行反应。



A: SiRho-GABA-KYC; B: SiRho-GABA-KYC+HClO; C: SiRho-GABA-KYC-ON。

图8 HPLC分析结果
Figure 8 HPLC analysis

2.6 细胞毒性

用CCK-8比色法进行探针的细胞毒性实验。

结果如图9, HeLa细胞与50 μmol/L以下的SiRho-GABA-KYC孵育24 h后,细胞存活率超过90%,表明SiRho-GABA-KYC对HeLa细胞的毒性很小,生物相容性好,细胞对10 μmol/L的探针是完全可以耐受的。

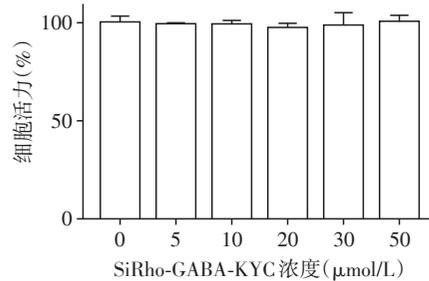
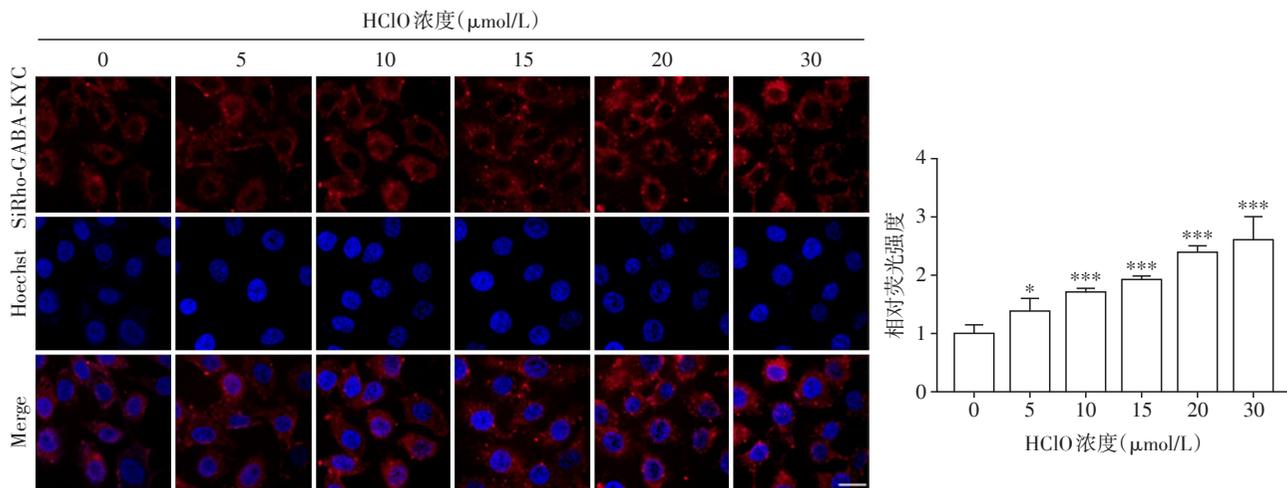


图9 SiRho-GABA-KYC对HeLa细胞活力的影响
Figure 9 Effect of SiRho-GABA-KYC on relative of cell viability of HeLa cells

2.7 外源性次氯酸成像

为了考察探针对细胞中外源性HClO的成像能力,用不同浓度的HClO处理HeLa细胞(图10)。荧光强度随外源性HClO浓度升高而增强,加入30 μmol/L HClO孵育的荧光强度比对照组增强>2倍,表明探针能够有效检测HeLa细胞的外源性HClO,且与HClO呈浓度依赖性增强。



HeLa细胞与HClO(0~30 μmol/L)孵育30 min,再与SiRho-GABA-KYC(10 μmol/L)孵育30 min的荧光成像和荧光强度。与0 μmol/L组比较,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$, $n=3$ 。

图10 SiRho-GABA-KYC对细胞中外源性HClO的成像能力
Figure 10 Imaging ability of SiRho-GABA-KYC for exogenous HClO in cells

3 讨论

HClO是氧化应激中非常重要的一类生物标志物,它的过量产生与多种疾病密切相关。脑卒中发生后,MPO表达量和催化活性上调,HClO生成增

加。目前,HClO荧光探针的研究取得了显著进展,虽然这些HClO探针在体外对HClO均有很好的灵敏度、选择性、稳定性,但没有靶向检测MPO的能力。在此前提下,设计合成了SiRho-GABA-KYC。该探针对HClO响应较高,选择性好。细胞实验结

果表明探针对细胞毒性小,对细胞外源性的HClO有较好的检测能力。希望可以对该探针进行深入的研究,用于生物活体成像,以期最终应用于脑卒中的诊断和治疗。

[参考文献]

- [1] ARNHOLD J. The dual role of myeloperoxidase in immune response[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21): 8057
- [2] CHEN S, CHEN H, DU Q, et al. Targeting myeloperoxidase (MPO) mediated oxidative stress and inflammation for reducing brain ischemia injury: potential application of natural compounds[J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 433
- [3] YU G, LIANG Y, HUANG Z, et al. Inhibition of myeloperoxidase oxidant production by N-acetyl lysyltyrosylcysteine amide reduces brain damage in a murine model of stroke[J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13(1): 119
- [4] KIM H J, WEI Y, WOJTKIEWICZ G R, et al. Reducing myeloperoxidase activity decreases inflammation and increases cellular protection in ischemic stroke [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2019, 39(9): 1864-1877
- [5] WANG Y C, LU Y B, HUANG X L, et al. Myeloperoxidase: a new target for the treatment of stroke? [J]. *Neural Regen Res*, 2022, 17(8): 1711-1716
- [6] DENG B, REN M, KONG X, et al. Development of an enhanced turn-on fluorescent HOCl probe with a large stokes shift and its use for imaging HOCl in cells and zebrafish [J]. *Sens Actuators B Chem*, 2018, 255: 963-969
- [7] YUAN L, LIN W Y, ZHENG K B, et al. Far-red to near infrared analyte-responsive fluorescent probes based on organic fluorophore platforms for fluorescence imaging [J]. *Chem Soc Rev*, 2013, 42(2): 622-661
- [8] SUN Y Q, LIU J, LV X, et al. Rhodamine-inspired far-red to near-infrared dyes and their application as fluorescence probes [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, 51(31): 7634-7636
- [9] YANG M W, FAN J L, DU J J, et al. Small-molecule fluorescent probes for imaging gaseous signaling molecules: current progress and future implications [J]. *Chem Sci*, 2020, 11(20): 5127-5141
- [10] MAO G J, LIANG Z Z, BI J, et al. A near-infrared fluorescent probe based on photostable Si-rhodamine for imaging hypochlorous acid during lysosome-involved inflammatory response [J]. *Anal Chim Acta*, 2019, 1048: 143-153
- [11] WANG Q Q, WANG Y Y, LI Y, et al. A lysosome-targetable fluorescent probe based on HClO-mediated cyclization reaction for imaging of hypochlorous acid [J]. *Anal Sci*, 2022, 38(1): 175-182

[收稿日期] 2023-06-02

(责任编辑:蒋莉)

欢迎投稿 欢迎订阅