

基于锌配合物的一氧化氮荧光探针的构建及其细胞成像

陈壹刘, 宗洪凤, 段兆龙, 张一鹏, 高妍, 李超, 刘洋, 高云
(辽宁科技大学化学工程学院, 鞍山 114051)

摘要 合成了一种基于锌配合物检测 NO 的荧光探针 CMD-Zn²⁺. 以萘并呋喃酰肼和久洛尼定醛为原料, 经缩合反应制备了配体 CMD, 再将它与锌离子结合形成探针 CMD-Zn²⁺, 该探针可特异性识别 NO. 利用高分辨率质谱(HRMS)和核磁共振氢谱(¹H NMR)对 CMD 的结构进行了表征, 利用荧光光谱和紫外-可见吸收光谱考察了探针 CMD-Zn²⁺对 NO 的识别性能. 实验结果表明, 在其它竞争离子存在的情况下, 探针 CMD-Zn²⁺可特异性快速识别 NO, 响应时间为 30 s, 识别 NO 的检出限为 8.23×10⁻⁹ mol/L. 此外, 探针 CMD-Zn²⁺被成功应用于细胞和活鼠的荧光成像研究.

关键词 荧光探针; 锌配合物; 一氧化氮; 细胞成像; 小鼠成像

中图分类号 O65; O621.3 文献标志码 A doi: 10.7503/cjcu20240370

Construction and Imaging of NO Fluorescence Probe Based on Zinc Complex

CHEN Yiliu, ZONG Hongfeng, DUAN Zhaolong, ZHANG Yipeng,
GAO Yan, LI Chao, LIU Yang, GAO Yun*

(College of Chemical Engineering, University of Science and Technology Liaoning, Anshan 114051, China)

Abstract A fluorescent probe CMD-Zn²⁺ based on zinc complexes was constructed for NO detection, Ligand CMD was prepared by naphthalene and furanide and ligonidaldehyde by condensation reaction. The ligand CMD was combined with zinc ions to form the probe CMD-Zn²⁺. The probe CMD-Zn²⁺ could specifically recognize NO. The recognition performance of probe CMD-Zn²⁺ was examined by fluorescence spectroscopy and UV absorption spectroscopy, and the structure of CMD was characterized by high-resolution mass spectroscopy(HRMS) and nuclear magnetic resonance hydrogen spectroscopy(¹H NMR). The experimental results showed that in the presence of other competing ions, the probe CMD-Zn²⁺ specifically recognized NO, and the detection limit of NO recognition was 8.23×10⁻⁹ mol/L. The probe CMD-Zn²⁺ has been successfully applied in fluorescence imaging studies in cells and live mice.

Keywords Fluorescent probe; Zinc complex; NO; Cell imaging; Live mouse imaging

一氧化氮(NO)是人体一种重要的血管舒张因子, 并且在神经系统中充当神经递质, 参与神经细胞之间的信号传递, 在学习、记忆和睡眠等生理过程中发挥作用. NO可以促进促炎介质、免疫反应及细

收稿日期: 2024-07-28. 网络首发日期: 2024-09-09.

联系人简介: 高云, 女, 硕士, 教授, 主要从事生物化工、食品开发与检测方面的研究. E-mail: yuner9111@163.com

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: U1910215)、辽宁省自然科学基金面上项目(批准号: 2024LNYKJ27)、国家级大学生创新创业训练计划项目(批准号: 202410146032)和辽宁省大学生创新创业训练计划项目(批准号: S202410146065)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China(No. U1910215), the Liaoning Provincial Natural Science Foundation Surface Project, China(No.2024LNYKJ27), the National Innovation and Entrepreneurship Training Program, China(No. 202410146032) and the Liaoning Innovation and Entrepreneurship Training Program, China(No.S202410146065).

胞死亡的触发, 加速清除剂、中和剂和分解催化剂的产生. 然而, 过量的NO会导致强氧化的亚硝化剂(N_2O_3)或过氧亚硝酸盐($ONOO^-$)的生成. 这些强氧化物会造成DNA、脂质、蛋白质和酶等的损伤, 导致细胞死亡^[1-6].

当前, 检测NO的技术手段多种多样, 包括光谱分析、电化学传感器、荧光法、电子顺磁共振光谱法及色谱法等^[7-10]. 然而, 上述方法普遍依赖于复杂的设备和繁琐的操作流程, 且检测周期较长. 而荧光探针检测法^[11-13]具有操作简便、灵敏度高及选择性好等优点, 可以实现快速检测和体内成像^[14-22]. Su等^[23]研制了一种新的双通道线粒体靶向荧光探针Mi-NO, 可以监测活细胞中的线粒体NO, 且可应用于HeLa细胞和斑马鱼的成像. Zhang等^[24]合成了一种检测NO的新型近红外荧光探针BTBTN, 其可高选择性识别NO, 检出限为 2.888×10^{-8} mol/L, 有望用于复杂细胞和活体环境中NO的定量检测.

本文制备了新配体CMD, 其与 Zn^{2+} 结合形成可特异性识别NO的探针CMD- Zn^{2+} . 利用荧光光谱和紫外-可见吸收光谱考察了探针CMD- Zn^{2+} 对NO的识别性能, 并将其应用于细胞成像和小鼠成像.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

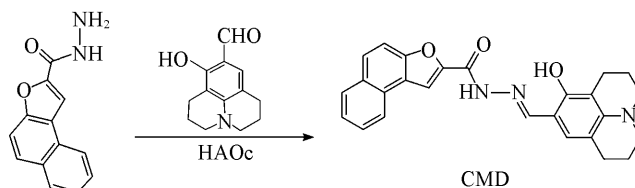
萘并呋喃酰肼、久洛尼定醛、4-溴-1,8-萘二酸酐、2-羟基-1-萘甲醛、溴乙酸乙酯、乌洛托品、正丁胺、三氟乙酸、甲醇钠、碳酸钾、水合肼、氢碘酸、乙腈、浓盐酸、冰醋酸、浓硫酸、甲醇、无水乙醇、二甲亚砜(DMSO)、氢氧化钠、乙酸乙酯、石油醚和*N*-2-羟乙基哌嗪-*N'*-2-乙磺酸(HEPES)均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 焦磷酸钠(PPi)、磷酸钠(Pi)、半胱氨酸(Cys)、谷胱甘肽(GSH)、高半胱氨酸(Hcy)、二十二碳六烯酸(DHA)、超氧化钾和过氧化氢均为分析纯, 阿拉丁试剂公司.

AVANCE 400 MHz型核磁共振波谱仪(NMR), 瑞士Bruker公司; 6530 Q-TOFLC/MC型液相色谱-质谱联用仪(LC/MS), Agilent1100型高效液相色谱仪(HPLC), 美国Agilent公司; Lambda-900型紫外-可见分光光度计(UV-Vis)和LS55型荧光分光光度计(FL), 美国Perkin Elmer公司; AniView100型小动物活体成像系统(IVIS Spectrum), 广州博鹭腾生物科技有限公司; CarlZeiss LSM900型激光共聚焦显微镜(LSCM), 德国蔡司公司.

1.2 配体CMD的合成

1.2.1 中间体萘并[2,1-*b*]呋喃-2-碳酰肼的合成 将1.72 g(10 mmol)2-羟基-1-萘甲醛、1.66 g(10 mmol)溴乙酸乙酯、1.38 g(10 mmol)碳酸钾和20 mL乙腈依次加入50 mL圆底烧瓶中, 加热至回流反应7 h. 将混合物抽滤, 粗品用无水乙醇重结晶, 得到1.16 g中间体萘并[2,1-*b*]呋喃-2-甲醛. 将其加入50 mL圆底烧瓶中, 再加入1.76 g(30 mmol)水合肼和20 mL无水乙醇, 加热至回流反应10 h, 析出黄色沉淀. 经抽滤, 以无水乙醇重结晶, 得到中间体萘并[2,1-*b*]呋喃-2-碳酰肼^[25]. ¹H NMR(DMSO-*d*₆, 400 MHz), δ : 10.07(s, 1H), 8.35(d, $J=8$ Hz, 1H), 8.19(s, 1H), 8.09(d, $J=8$ Hz, 1H), 7.99(d, $J=8$ Hz, 1H), 7.83(d, $J=8$ Hz, 1H), 7.71(t, $J=8$ Hz, 1H), 7.60(m, 1H), 3.36(s, 1H).

1.2.2 配体CMD的合成 配体CMD的合成路线如Scheme 1所示.



Scheme 1 Synthetic route of CMD

将萘并[2,1-*b*]呋喃-2-碳酰肼0.226 g(1 mmol)、久洛尼定醛0.216 g(1 mmol)和20 mL冰醋酸加入50 mL烧瓶中, 加热反应9 h, 反应中有固体析出, 抽滤, 干燥, 粗品经柱层析提纯(乙酸乙酯/石油醚体积比2:8), 得到米色晶体配体CMD. ¹H NMR(DMSO-*d*₆, 400 MHz), δ : 12.25(s, 1H), 11.74(s, 1H), 8.42(d, $J=4$ Hz, 2H), 8.36(s, 1H), 8.11(d, $J=8$ Hz, 1H), 8.04(d, $J=8$ Hz, 1H), 7.88(d, $J=8$ Hz,

1H), 7.73(t, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.62(m, 1H), 6.74(s, 1H), 3.19(t, $J=4$ Hz, 4H), 2.66(m, 4H), 1.90(t, $J=12$ Hz, 4H); HRMS($C_{26}H_{23}N_3O_3$ 理论值), m/z : 448.16355(448.16370)[CMD+Na⁺]⁺.

1.3 探针CMD-Zn²⁺的合成

探针CMD-Zn²⁺采用顺序添加方法合成. 称取0.05 g的CMD配成溶液, 按照1:1的摩尔比加入Zn²⁺, 使其反应完全, 即可得到探针CMD-Zn²⁺.

1.4 CMD溶液的配制

测试时, 取5.0 mL CMD浓溶液于50 mL容量瓶中, 加入10.0 mL *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF), 再用缓冲溶液定容, 用DMF/HEPES混合溶液(体积比3:7)将溶液稀释到 1×10^{-5} mol/L. 所有测试均在DMF/HEPES混合溶液(体积比3:7, pH=7.2, 20 mmol/L)中进行, 荧光光谱激发波长 $\lambda_{ex}=435$ nm, 发射波长 $\lambda_{em}=540$ nm.

1.5 细胞毒性测定

在DMF/HEPES混合溶液(体积比3:7, pH=7.2, 20 mmol/L)中, 采用标准噻唑蓝(MTT)法评估了探针CMD-Zn²⁺对HeLa细胞的毒性^[26].

1.6 细胞成像实验

考察了探针CMD-Zn²⁺在HeLa细胞内对NO的识别成像. 将HeLa细胞在含有10%牛血清(FBS)、1%青霉素和1%链霉素的DMEM培养液中培养; 然后在含有5%CO₂和95%空气的37 °C培养箱中培养20 h; 去除培养基后, 将细胞用含有10 μ mol/L CMD的HEPES溶液(0.01 mol/L, pH=7.20)孵育1 h, 再用PBS缓冲溶液清洗2次后, 用激光扫描共聚焦显微镜在蓝色通道下成像. 然后, 依次加入10 μ mol/L Zn²⁺和30 μ mol/L NO处理20 min, 换用新鲜的DMEM培养基进行共聚焦成像.

1.7 小鼠体内荧光成像实验

将100 μ L 10 μ mol/L CMD皮下注射到小鼠腹部, 然后原位注射25 μ L 5 mmol/L Zn²⁺溶液, 使用430 nm激发滤光片和530 nm发射滤光片记录细胞在30, 60, 90和120 s时的荧光图像, 以空白小鼠作为对照组. 再继续原位注射25 μ L 2 mmol/L NO, 用相同的激发滤光片和发射滤光片记录1, 2, 3和4 min时的荧光图像.

2 结果与讨论

2.1 配体CMD的表征

通过紫外-可见吸收光谱验证了配体CMD与Zn²⁺之间的配位作用. CMD的最大紫外吸收波长位于400 nm, 随着Zn²⁺(0~20 μ mol/L)的不断加入, 400 nm处的吸光度逐渐下降, 同时位于435 nm处的吸收峰强度不断增大并逐渐形成新的吸收峰, 表明CMD-Zn²⁺的形成(见本文支持信息图S1). 为了考察配体CMD与Zn²⁺配位的专一性, 在CMD溶液中分别加入等量的其它常见金属离子, 如Mg²⁺, Al³⁺, Fe²⁺, Ca²⁺, Cr²⁺, Co³⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Ag⁺, Cd²⁺, Ba²⁺, Hg²⁺和Pb²⁺. 结果表明, CMD对其它离子并无响应, 表明CMD与Zn²⁺存在特异性配位作用.

在DMF/HEPES(体积比3:7, pH=7.2, 20 mmol/L)溶液中, CMD具有弱黄色荧光. 由图S2(见本文支持信息)可知, CMD的荧光强度在60 h内几乎无改变, 表明CMD具有优异的荧光稳定性. 如图1(A)所示, 随着Zn²⁺(0~20 μ mol/L)的浓度不断增加, CMD的荧光强度逐渐增强, 且最大发射波长由540 nm逐渐红移至575 nm, 表明CMD对Zn²⁺有着良好的荧光响应. 由CMD识别Zn²⁺的Job图(见本文支持信息图S3)可知, CMD荧光强度的拐点对应的Zn²⁺摩尔分数为0.5, 说明CMD与Zn²⁺配位的计量比为1:1. 采用Benesi-Hildebrand线性方程经线性拟合计算得出CMD与Zn²⁺的络合常数为 4.791×10^4 L/mol.

采用荧光光谱验证了配体CMD与Zn²⁺之间的特异结合作用, 如本文支持信息图S4(A)所示, 向CMD溶液中分别加入15种常见的金属阳离子Mg²⁺, Al³⁺, Fe²⁺, Ca²⁺, Cr³⁺, Fe³⁺, Co³⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Ag⁺, Cd²⁺, Ba²⁺, Hg²⁺和Pb²⁺(20 μ mol/L), 仅有Zn²⁺的加入使CMD的荧光强度发生改变, 表明CMD可高选择性与Zn²⁺络合. 进一步考察了pH对CMD键合Zn²⁺的影响, 图S5(见本文支持信息)表明, 当pH为

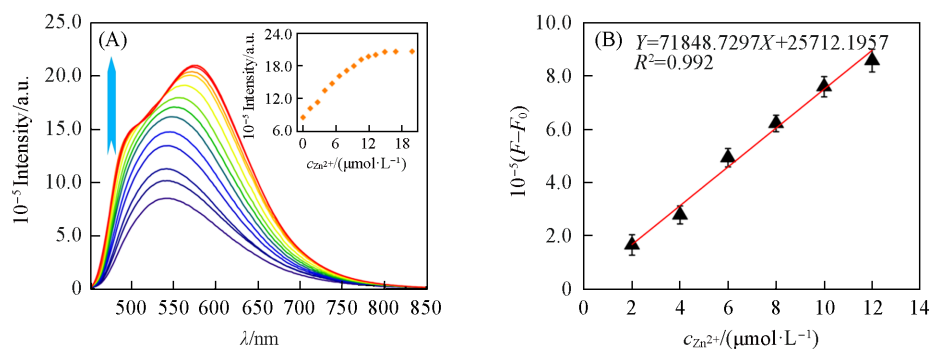


Fig. 1 Fluorescence titration spectra of Zn^{2+} (0—20 $\mu\text{mol/L}$) identified by CMD (10 $\mu\text{mol/L}$) (A) and fluorescence response of CMD (10 $\mu\text{mol/L}$) with concentration of Zn^{2+} (0—12 $\mu\text{mol/L}$) (B)

(A) Inset: fluorescence intensity of CMD with the concentration of Zn^{2+} ; (B) $\lambda_{\text{ex}}=435\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=540\text{ nm}$.

3.0~12.0时, CMD的荧光强度非常稳定, 同时CMD对 Zn^{2+} 均有明显的荧光增强响应, 表明CMD能够在较宽的pH范围内络合 Zn^{2+} .

2.2 探针CMD- Zn^{2+} 识别NO的紫外-可见吸收光谱表征

利用紫外-可见吸收光谱考察了探针CMD- Zn^{2+} 对13种常见阴离子及生物小分子Pi, PPI, H_2O_2 , NO_2^- , NO_3^- , $\cdot OH$, O_2^- , NO, Hcy, GSH, Cys, DHA和ONOO $^-$ 的识别性能. 如图2所示, 探针CMD- Zn^{2+} 在435 nm处有最强紫外吸光峰, 加入NO后探针CMD- Zn^{2+} 的吸光波长发生蓝移且强度有所下降, 而其它12种阴离子和生物小分子对探针CMD- Zn^{2+} 的紫外光谱并无明显影响, 表明探针CMD- Zn^{2+} 可选择性识别NO.

2.3 探针CMD- Zn^{2+} 识别NO的荧光发射光谱表征

2.3.1 探针CMD- Zn^{2+} 对不同阴离子的荧光响应
利用荧光光谱考察了探针CMD- Zn^{2+} 对13种阴离子和生物小分子Pi, PPI, H_2O_2 , NO_2^- , NO_3^- , $\cdot OH$, O_2^- , NO, Hcy, GSH, Cys, DHA和ONOO $^-$ 的识别性能. 如图3(A)所示, 仅加入NO后探针CMD- Zn^{2+} 的荧光完全猝灭. 由图3(B)可知, 加入其它离子后CMD- Zn^{2+} 溶液的荧光颜色均无明显变化[图3(B)中

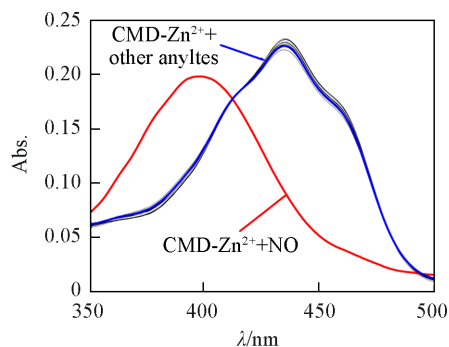


Fig. 2 UV-Vis spectra of probe CMD- Zn^{2+} (10 $\mu\text{mol/L}$) to different anions and 30 $\mu\text{mol/L}$ small biological molecules (Pi, PPI, H_2O_2 , NO_2^- , NO_3^- , $\cdot OH$, O_2^- , NO, Hcy, GSH, Cys, DHA and ONOO $^-$)

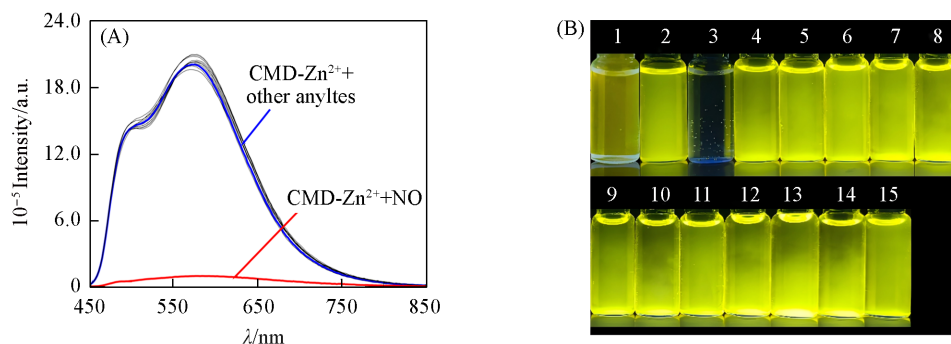


Fig. 3 Fluorescence spectra of 10 $\mu\text{mol/L}$ CMD- Zn^{2+} upon common anions and 30 $\mu\text{mol/L}$ small biological molecules (Pi, PPI, H_2O_2 , NO_2^- , NO_3^- , $\cdot OH$, O_2^- , NO, Hcy, GSH, Cys, DHA and ONOO $^-$) (A) and fluorescence color of probe CMD (10 $\mu\text{mol/L}$) and the addition of 13 anions and 30 $\mu\text{mol/L}$ small biological molecules to 10 $\mu\text{mol/L}$ CMD- Zn^{2+} (B)

(B) 1. CMD; 2. blank; 3. NO; 4. NO_2^- ; 5. NO_3^- ; 6. H_2O_2 ; 7. ONOO $^-$; 8. $\cdot OH$; 9. O_2^- ; 10. Cys; 11. Hcy; 12. GSH; 13. Pi; 14. DHA; 15. PPI; 30 $\mu\text{mol/L}$.

4~15], 只有加入NO后探针溶液的强黄绿色荧光明显猝灭, 表明探针CMD-Zn²⁺可特异性识别NO.

2.3.2 探针CMD-Zn²⁺对不同浓度NO的荧光响应 考察了探针CMD-Zn²⁺对不同浓度NO的荧光响应. 如图4(A)所示, 随着NO浓度(0~30 μmol/L)的不断增加, CMD-Zn²⁺的荧光强度逐渐降低, 波长也逐渐发生蓝移. 由图4(B)可知, 当向配体CMD溶液中加入Zn²⁺后其荧光明显增强, 再加入NO后体系的荧光强度则大幅猝灭. 上述结果表明, 探针CMD-Zn²⁺可以高灵敏识别NO.

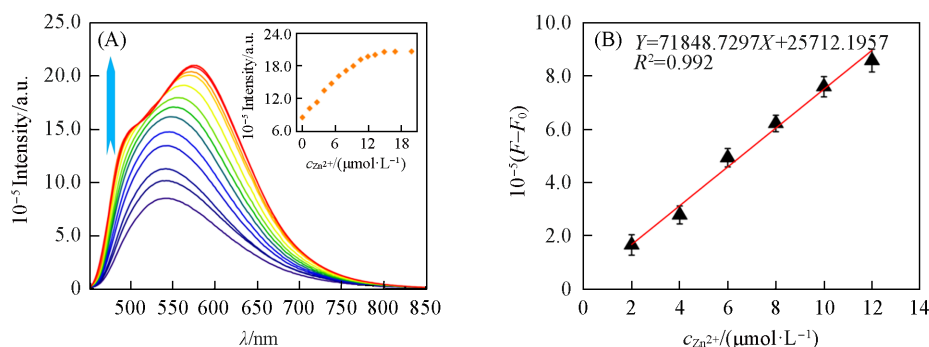


Fig. 4 Fluorescence spectra of the 10 μmol/L probe CMD-Zn²⁺ towards 0—30 μmol/L NO(A) and fluorescence spectra of 20 μmol/L Zn²⁺ and 30 μmol/L NO identified by 10 μmol/L probe CMD relay(B)

(A) Inset: fluorescence intensity of CMD-Zn²⁺ varies with NO concentration.

2.3.3 竞争离子对探针CMD-Zn²⁺识别NO性能的影响 如图5所示, 黄色柱为探针CMD-Zn²⁺的荧光强度. 当向探针CMD-Zn²⁺溶液中加入除NO之外的其它阴离子和生物小分子如Pi, PPI, H₂O₂, NO₂⁻, NO₃⁻, ·OH, O₂⁻, NO, Hey, GSH, Cys, DHA和ONOO⁻(图5中绿色柱)时, 其荧光强度与探针CMD-Zn²⁺相比几乎无改变; 向探针CMD-Zn²⁺溶液中加入NO则会使探针溶液的荧光完全猝灭(图5中蓝色柱). 当向含有其它竞争物的探针CMD-Zn²⁺溶液中继续加入NO后, 其荧光强度均完全猝灭(图5中红色柱), 且与探针CMD-Zn²⁺单独识别NO时的荧光强度几乎一致. 上述结果表明, 其它竞争离子的存在对探针CMD-Zn²⁺识别NO的性能并无干扰.

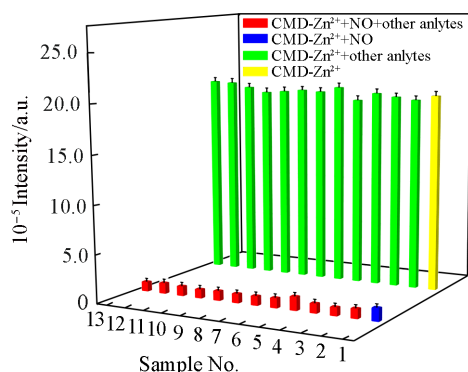


Fig. 5 Fluorescence intensity of adding 30 μmol/L NO to 10 μmol/L probe CMD-Zn²⁺ solution containing competing ions

- Pi; 2. PPI; 3. H₂O₂; 4. NO₂⁻; 5. NO₃⁻; 6. ·OH; 7. O₂⁻;
- NO; 9. Hey; 10. GSH; 11. Cys; 12. DHA; 13. ONOO⁻.

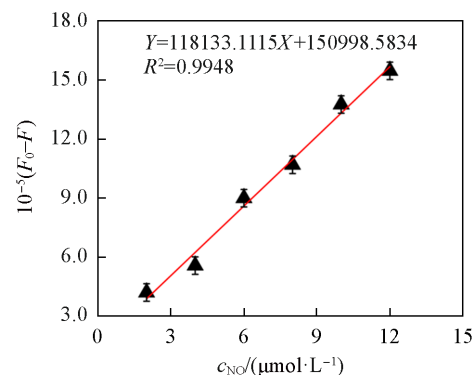


Fig. 6 Fluorescence intensity of 10 μmol/L CMD-Zn²⁺ as a function of NO concentration(3—13 μmol/L)
λ_{ex}=435 nm, λ_{em}=575 nm.

2.3.4 探针CMD-Zn²⁺识别NO的检出限 以NO的浓度为横坐标, 以575 nm处CMD-Zn²⁺识别NO后荧光强度的变化值(F₀-F)为纵坐标绘制工作曲线(图6). 当NO浓度在2~13 μmol/L范围内, CMD-Zn²⁺的荧光强度与NO浓度呈线性变化(R²=0.9948). 通过线性拟合计算得出探针CMD-Zn²⁺识别NO的检出限为8.23×10⁻⁹ mol/L, 表明探针CMD-Zn²⁺识别NO的灵敏度较高.

2.3.5 探针CMD-Zn²⁺识别NO的pH稳定性和响应时间 如图7(A)所示, 在pH=5.0~10.0时, 探针

CMD-Zn²⁺自身具有稳定的强荧光发射. 向探针CMD-Zn²⁺溶液中加入NO后, 其荧光在考察的pH范围内均为猝灭状态, pH的改变对其荧光强度无明显影响, 表明探针CMD-Zn²⁺能够在较宽的pH范围内完成对NO的检测. 如图7(B)所示, 将30 μmol/L NO加入探针CMD-Zn²⁺溶液(10 μmol/L)中, 其在530 nm处的荧光强度在30 s内降到最低, 表明探针CMD-Zn²⁺可快速识别NO.

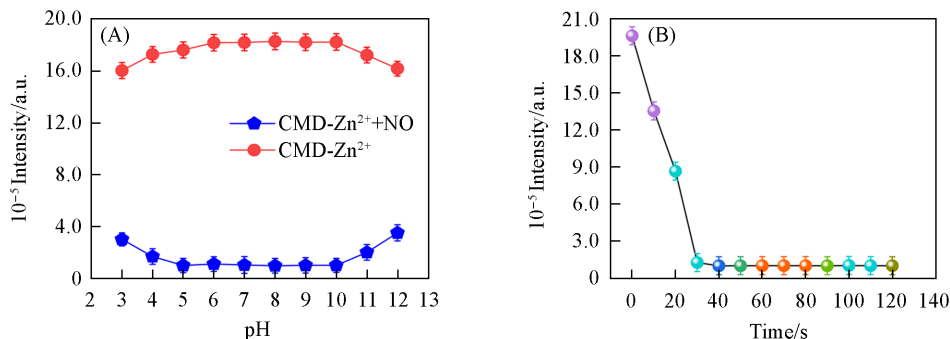
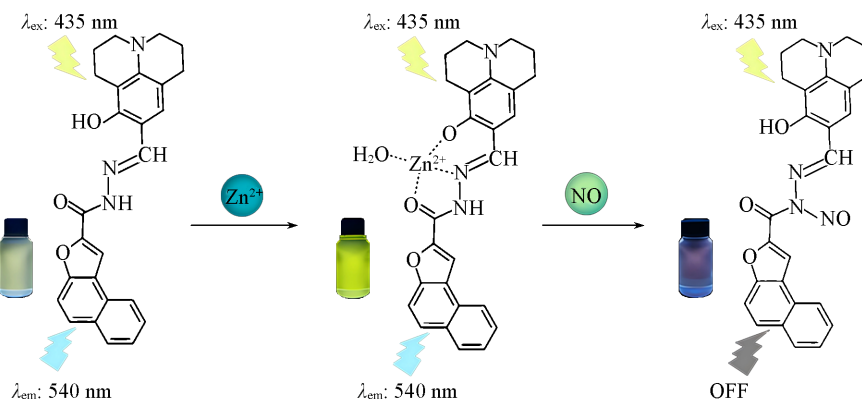


Fig. 7 Fluorescence intensity of the probe CMD-Zn²⁺ (10 μmol/L) before and after the addition of 30 μmol/L NO at different pH values in DMF/HEPES (volume ratio 3:7, 20 mmol/L) ($\lambda_{\text{ex}}=435$ nm, $\lambda_{\text{em}}=575$ nm) (A) and the response time of probe CMD-Zn²⁺ (10 μmol/L) solution to 30 μmol/L NO (B)

2.4 探针CMD-Zn²⁺识别NO的机理

利用高分辨质谱技术探究了CMD-Zn²⁺对NO的识别机理. 在图S6(见本文支持信息)中, m/z 448. 16355处的离子峰可归为[CMD+Na⁺]⁺的分子量. 将Zn²⁺加入探针CMD溶液中, m/z 506. 11384处的离子峰可归为[CMD-H⁺+Zn²⁺+H₂O]⁺的分子量(见本文支持信息图S7). 这也验证了CMD与Zn²⁺的1:1配位模式. 进一步将NO加入CMD-Zn²⁺溶液后, 图S8(见本文支持信息)中 m/z 455. 17859处的离子峰可归为[CMD+NO⁺-H⁺+H⁺]⁺的分子量. 基于此, 推测CMD对Zn²⁺和NO可能的响应机制如Scheme 2所示.



Scheme 2 Response mechanism of NO recognition by the probe CMD-Zn²⁺

2.5 探针CMD-Zn²⁺及NO的细胞成像

选用10 μmol/L的探针CMD-Zn²⁺溶液进行细胞成像实验. 首先, 采用MTT法检测了探针CMD-Zn²⁺的细胞毒性. 由图8可见, HeLa细胞在较高浓度(30 μmol/L)的探针CMD-Zn²⁺溶液中孵育24 h后, 其存活率维持在80%以上, 表明探针CMD-Zn²⁺具有较低的细胞毒性.

在此基础上, 考察了探针CMD-Zn²⁺在HeLa细胞中的成像性能. 由图9(A₁)~(A₃)的明场照片可观察到细胞的完整形态; 图9(B₁)~(B₃)

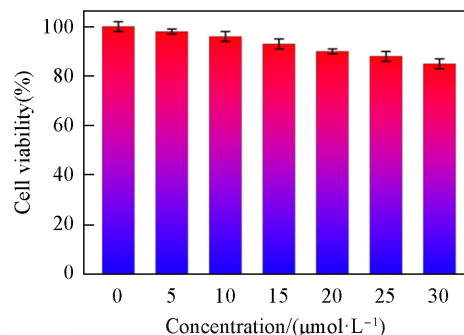


Fig. 8 Viability of HeLa cells incubated with 30 μmol/L CMD-Zn²⁺ for 24 h

示出了蓝光通道下配合物 CMD 与 Zn^{2+} 结合的荧光响应情况 ($\lambda_{em}=540\text{ nm}$)；图 9(C₁)~(C₃) 为合并图像 ($\lambda_{em}=540\text{ nm}$)。可见，配合物 CMD 在细胞中呈现较弱的蓝色荧光，当 Zn^{2+} 进入细胞后，可以观察到强烈的蓝色荧光，继续加入 NO 后细胞的蓝色荧光完全猝灭。上述结果表明，探针 CMD- Zn^{2+} 具有低毒性和优异的细胞通透性。

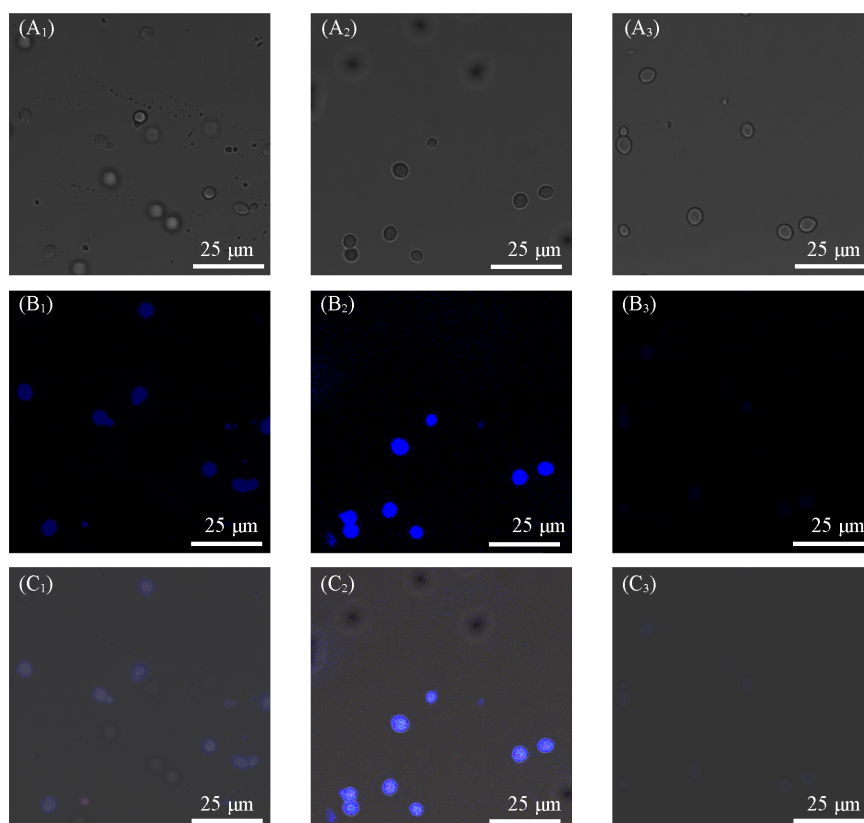


Fig. 9 Confocal fluorescence images of $20\ \mu\text{mol/L}\ Zn^{2+}$ and $30\ \mu\text{mol/L}\ NO$ identified by $10\ \mu\text{mol/L}\ CMD$ (A₁)—(C₁) CMD; (A₂)—(C₂) CMD- Zn^{2+} ; (A₃)—(C₃) CMD- Zn^{2+} -NO; (A₁)—(A₃) bright field; (B₁)—(B₃) blue channel; (C₁)—(C₃) merge.

2.6 探针 CMD- Zn^{2+} 识别 NO 的活体成像

选择 8 周龄的 C57 小鼠考察了探针 CMD- Zn^{2+} 的荧光成像能力。如图 10(A) 所示，将 CMD ($10\ \mu\text{mol/L}$, $100\ \mu\text{L}$) 皮下注射到小鼠左腹，与空白鼠样 [图 10(A₁)] 相比，注射 CMD 后的小鼠左腹产生

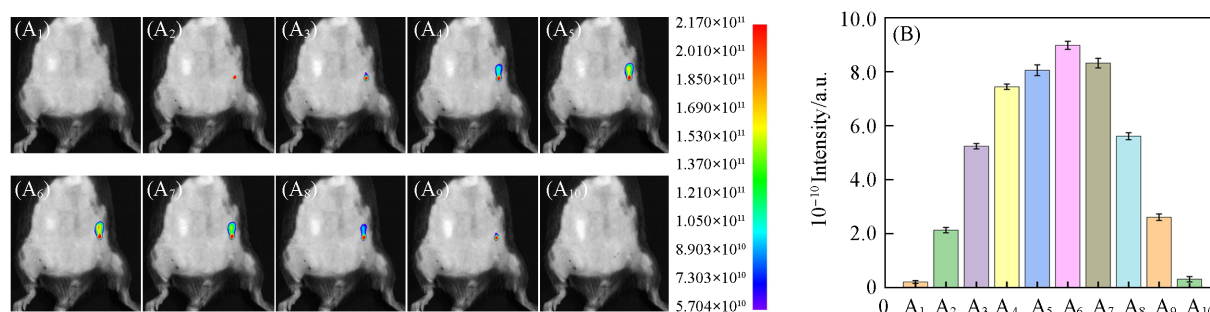


Fig. 10 Fluorescence imaging of exogenous recognition of NO by probe CMD- Zn^{2+} in mice(A) and the average fluorescence intensity of Zn^{2+} and NO detected by CMD in mice($\lambda_{ex}=435\text{ nm}$, $\lambda_{em}=575\text{ nm}$)(B)

(A₁) Blank control group; (A₂) CMD ($10\ \mu\text{mol/L}$, $100\ \mu\text{L}$) was subcutaneously injected into the left abdomen of the mice; the fluorescence images recorded by subcutaneous injection of Zn^{2+} ($5\ \text{mmol/L}$, $25\ \mu\text{L}$) into the same interest area of mice at $30\ \text{s}$ (A₃), $60\ \text{s}$ (A₄), $90\ \text{s}$ (A₅), and $120\ \text{s}$ (A₆); the fluorescence images of continued injection of NO ($2\ \text{mmol/L}$, $25\ \mu\text{L}$) *in situ* were recorded at $1\ \text{min}$ (A₇), $2\ \text{min}$ (A₈), $3\ \text{min}$ (A₉) and $4\ \text{min}$ (A₁₀).

较弱荧光信号, 再将 Zn^{2+} (5 mmol/L, 25 μL) 原位注射到小鼠左腹, 由图 10(A₃)~(A₆) 可见, 小鼠左腹的荧光强度逐渐增强, 120 s 后基本不再变化. 然后, 原位注射 NO (2 mmol/L, 25 μL), 如图 10(A₇)~(A₁₀) 所示, 小鼠左腹的荧光强度又逐渐猝灭, 4 min 后荧光降到最弱. 图 10(B) 为对应图 10(A) 中小鼠注射处的平均荧光强度. 小鼠活体内荧光成像实验结果表明, 探针 CMD-Zn²⁺ 可以实现生物体内对 NO 的识别检测, 从而具有良好的生物成像应用前景.

3 结 论

利用中间体萘并[2,1-*b*]呋喃-2-碳酰肼与久洛尼定醛经缩合反应制备配体 CMD, 通过 HRMS 和 ¹H NMR 对其结构进行了表征, 配体 CMD 能够高选择性地结合 Zn^{2+} 生成探针 CMD-Zn²⁺. 在 DMF/HEPES (体积比 3:7, pH=7.2, 20 mmol/L) 缓冲溶液中, 探针 CMD-Zn²⁺ 可高选择性识别 NO. 加入 NO 后探针溶液的荧光完全猝灭, 利用 HRMS 分析了 CMD-Zn²⁺ 识别 NO 可能的响应机制. 该方法的检出限为 8.23 nmol/L, 具有响应速度快、抗干扰性强和毒性小等优点. 探针 CMD-Zn²⁺ 被成功应用于 HeLa 细胞中外源性的共聚焦成像以及活鼠的生物成像.

支持信息见 <http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/20240370>.

参 考 文 献

- [1] Nakamura T., Tu S. C., Akhtar M. W., Sunico C. R., Okamoto S. I., Lipton S. A., *Neuron*, **2013**, 78(4), 596—614
- [2] Calabrese V., Mancuso C., Calvani M., Rizzarelli E., Butterfield D. A., Stella A. M. G., *Nat. Rev. Neurosci.*, **2007**, 8(10), 766—775
- [3] Hill B. G., Dranka B. P., Bailey S. M., Lancaster J. R., Darley-Usmar V. M., *J. Biol. Chem.*, **2010**, 285(26), 19699—19704
- [4] Chang X. D., Chen M. J., Liao H., Dong H. M., Cai S. X., *J. Nanjing Med. Univ.*, **2023**, 43(8), 1410—1416 (常潇丹, 陈美佳, 廖画, 董航明, 蔡绍曦. 南京医科大学学报, **2023**, 43(8), 1410—1416)
- [5] Pei T. X., Zhang K. Z., Lu Y., *J. Nanjing Med. Univ.*, **2024**, 44(8), 1155—1164 (裴桐忻, 张克忠, 鲁严. 南京医科大学学报, **2024**, 44(8), 1155—1164)
- [6] Li H. Q., Hu Q. X., *Zhongnan Pharmacy*, **2023**, 21(10), 2547—2552 (李昊琦, 呼庆勋. 中南药学, **2023**, 21(10), 2547—2552)
- [7] He W. J., Lu J. C., Gao L., Wu Q., Wu X. Y., Nie H. G., Chen X. J., Shao J., *J. Optics*, **2024**, 44(5), 153—160 (何伟杰, 卢俊城, 高璐, 吴琼, 吴晓虞, 聂华贵, 陈孝敬, 邵杰. 光学学报, **2024**, 44(5), 153—160)
- [8] Bai Y., Liu X. J., Xiong H. Z., Zhou Y. F., Chen X., Yang W. S., *Chinese J. Anal. Chem.*, **2023**, 51(10), 1603—1610 (白杨, 刘雪娇, 熊涵之, 周贇璠, 陈旭, 杨文胜. 分析化学, **2023**, 51(10), 1603—1614)
- [9] Xiong Y. L., Mao Y., Huang D., Fan L. R., Fu D. Y., Tan W. Y., Zhang H., Wu Y. R., *Chinese J. Anal. Lab.*, **2023**, 42(12), 1644—1648 (熊桢林, 毛娅, 黄丹, 范力瑞, 付大友, 谭文渊, 张欢, 吴雨燃. 分析实验室, **2023**, 42(12), 1644—1648)
- [10] Wang Y. Y., *Design, Synthesis and Application of Nitroreductase and Nitric Oxide Fluorescent Probes Study*, Jilin University, Changchun, **2023** (王颖艺. 硝基还原酶和一氧化氮荧光探针的设计合成和应用研究, 长春: 吉林大学, **2023**)
- [11] Yao H. W., Guo X. F., Wang H., *J. Anal. Sci.*, **2022**, 38(5), 635—640 (姚惠文, 郭小峰, 王红. 分析科学学报, **2022**, 38(5), 635—640)
- [12] Wang J., Liu Q., Meng W., Chang S. M., Zhang J. L., Hou X. Q., *Res. Explor. Lab.*, **2020**, 39(6), 175—179, 184 (王晶, 刘强, 孟微, 常世民, 张江丽, 侯晓强. 实验室研究与探索, **2020**, 39(6), 175—179, 184)
- [13] Tang Q., Zhang T. Y., Wang A. L., Cao H. Y., Zheng X. F., *Chemistry*, **2020**, 83(6), 516—528 (唐乾, 张婷瑶, 王爱玲, 曹洪玉, 郑学仿. 化学通报, **2020**, 83(6), 516—528)
- [14] Li N., Li Z., Wang S. J., Chen Y., Xiao L. W., *Chinese J. Anal. Lab.*, **2023**, 42(10), 1311—1316 (李娜, 李政, 王树军, 陈钰, 肖立伟. 分析实验室, **2023**, 42(10), 1311—1316)
- [15] Wang Y. M., Zhao Q., Liao X. F., Zhou R. H., Liu B., Wu X. H., Zhang J. F., *Chinese J. Anal. Lab.*, **2023**, 42(1), 16—21 (王玉敏, 赵巧, 廖旭芳, 周日海, 刘波, 吴相华, 张俊峰. 分析实验室, **2023**, 42(1), 16—21)
- [16] Li R. X., Huang M. Y., Zhou P., Duan Y. C., *Chinese J. Lumin.*, **2023**, 44(10), 1872—1880 (李如雪, 黄明玥, 周珊, 段春迎. 发光学报, **2023**, 44(10), 1872—1880)
- [17] Feng C. J., Liu J., Wu C. L., Shen R. B., Yang J. W., Du K., *J. Chem. Eng. Chinese U.*, **2021**, 35(6), 1109—1114 (丰诚杰, 刘健, 吴春雷, 沈润溥, 杨金纬, 杜奎. 高校化学工程学报, **2021**, 35(6), 1109—1114)
- [18] Zhang X. W., Zhang F., *Chinese J. Anal. Lab.*, **2024**, 43(6), 871—875 (张晓文, 张飞, 分析实验室, **2024**, 43(6), 871—875)
- [19] Liu S. Y., Xu J. H., Ma Q. J., Li L. K., Mao G. J., Wang G. G., Wu X. W., *Anal. biochem.*, **2024**, 692, 115552

- [20] Zhou R., Wang C. G., Lu G. Y., *Chin. Opt.*, **2022**, *15*(6), 1228—1242(周日, 王晨光, 卢革宇. 中国光学, **2022**, *15*(6), 1228—1242)
- [21] Liao Y. H., Wang S., Chen W. H., Feng H. J., Chen G. Y., He W. Y., *Chinese J. Lumin.*, **2024**, *45*(2), 351—363(廖元溟, 王帅, 陈婉慧, 冯华杰, 陈光英, 何文英. 发光学报, **2024**, *45*(2), 351—363)
- [22] Gu Y. Q., Ding J. F., Chen J. E., Xie W. N., Xiao L. X., *Chem. J. Chinese Universities*, **2023**, *44*(12), 20230367(顾亚琴, 丁劲峰, 陈金娥, 谢文娜, 肖林霞. 高等学校化学学报, **2023**, *44*(12), 20230367)
- [23] Su W. T., Huang L., Liang X., Zhu L., Li W. Y., *J. Photoch. Photobio. A*, **2021**, *412*, 113256
- [24] Zhang M. T., Wu L., Du J. Y., *J. Instrum. Anal.*, **2022**, *41*(8), 1163—1169(张梦田, 吴丽, 杜江燕. 分析测试学报, **2022**, *41*(8), 1163—1169)
- [25] Wang M. H., *Synthesis, Characterization and Simulation of Urease Catalytic Activity of the Nickel Complexes with Salicylhydrazide Derivative*, South-Central Minzu University, Wuhan, **2021**(王梦痕. 水杨酰肼衍生物镍金属配合物的合成、表征及模拟脲酶的催化活性研究, 武汉: 中南民族大学, **2021**)
- [26] Arvas B., Ucar B., Acar T., Arvas M. B., Sahin Y., Aydogan F., Yolacan C., *Tetrahedron*, **2021**, *88*, 132127

(Ed.: L, V, K)