

一个基于 NBD-NH₂ 荧光团的增强型 pH 荧光探针及其细胞造影研究

李 静 朱成成 何卫江*

(南京大学化学化工学院配位化学国家重点实验室, 南京 210093)

摘要: 本文以 NBD-NH₂ 荧光团偶联 *N*-(4-吡啶甲基)乙二胺质子受体构建了基于光致电子转移(PET)机制的 pH 探针 NBD-Py。探针在 pH 5.0~8.5 范围内显示 pH 降低导致的荧光增强响应, pK_a 为 6.48。该响应不受胞内常见金属离子干扰且有良好的可逆性。研究表明质子受体中引入 4-甲基吡啶修饰乙二胺是探针实现对弱酸/近中性 pH 响应的关键。HeLa 细胞中的造影证实了探针的 pH_i 造影能力和溶酶体靶向性能, 为溶酶体 pH 相关的生理过程研究提供了新的可靠手段。

关键词: pH_i; 荧光探针; 细胞; 造影

中图分类号: O 文献标识码: A 文章编号: 1001-4861(2013)12-2528-07

DOI: 10.3969/j.issn.1001-4861.2013.00.396

A Turn-on pH Fluorescent Probe Based on NBD-NH₂ Fluorophore and Its pH_i Imaging Application

LI Jing ZHU Cheng-Cheng HE Wei-Jiang*

(State Key Laboratory of Coordination Chemistry, School of Chemistry and Chemical Engineering, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

Abstract: A fluorescent probe of PET mechanism, NBD-Py, was constructed by coupling fluorophore NBD-NH₂ with a proton receptor *N*-(4-pyridylmethyl)ethylene diamine. This probe displays the pH decrease-induced emission enhancement in pH range from 5.0 to 8.5, with a pK_a of 6.48. This sensing behavior is reversible and not interfered by normal intracellular metal cations such as Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ and other transition metal cations. Comparison between the pH sensing behaviors of NBD-Py and its analogue without the *N*-(4-pyridyl) methyl group disclosed that the pyridylmethyl group is essential its pH sensing ability for weak acidic and near neutral pH, which is important for cell biology. Confocal imaging in HeLa cells confirmed the pH_i imaging ability and the lysosome-targetability of NBD-Py, which is valuable for lysosome cell biology.

Key words: pH_i; fluorescent probe; cells; imaging

许多细胞生理过程如细胞增殖和凋亡^[1]、黏附^[2]以及胞内离子输运与动态平衡^[3]等都涉及到质子化或去质子化过程, 并因细胞微环境 pH 的改变而发生变化, 因此精确检测细胞内 pH(pH_i)对于理解细胞的生理和病理过程非常重要。相比于其他 pH 测定方法, 荧光探针法进行 pH_i 检测由于灵敏度高、选择性好、无损伤等优点已成为 pH_i 检测的主要手

段。由于该方法可对 pH_i 进行实时原位检测, 为理解胞内快速生理过程提供更为真实可靠的信息, 因此 pH 荧光探针技术已是细胞生物学研究的重要工具之一, 而发展高性能 pH_i 荧光探针则将为该技术的应用奠定良好基础。

文献中已经报道的 pH 荧光探针大多是荧光素^[4]、罗丹明^[5]和氟硼二吡咯甲川类(BODIPY)荧光分

收稿日期: 2013-05-20。收修改稿日期: 2013-07-16。

国家自然科学基金(No.21271100)、国家重点基础研究发展计划(No.2011CB935800)资助项目。

*通讯联系人。E-mail: hewei69@nju.edu.cn

子的衍生物^[6]。这些探针主要通过识别基团的质子化/去质子化来改变信号团的荧光而实现 pH 响应。然而许多具有 pH 荧光响应能力的探针由于生物相容性低、细胞膜透过性差和激发/发射波长短等不足难以实现 pH_i 的荧光造影^[7-9]。由于细胞内 pH 大多在近中性,生理和病理条件下的 pH 变化也往往发生在近中性或弱酸性范围内,因此发展响应范围在近中性或弱酸性范围内的 pH 探针十分重要。前述的荧光素、罗丹明和 BODIPY 是细胞研究中最常用的几种荧光团,因此发展基于其他荧光团的 pH 探针也有利于进行细胞多重共染研究。由于 4-氨基-7-硝基-1,2,3-苯并呋喃(NBD-NH₂)荧光团是基于分子内电荷转移机制(ICT)的荧光团,其较大的 Stokes 位移有利于克服造影中激发光的干扰。其激发和发射波长都在可见光区域,有利于克服细胞造影过程中的自发荧光干扰和光毒性等问题。该荧光团同时具有合适的量子产率、良好的生物相容性和光稳定性^[10-11],已被用于氨基酸^[12]、羧甲基纤维素^[13]、Zn²⁺^[14]、Hg²⁺^[15]等荧光探针的构建。因此本研究拟利用 NBD-NH₂ 荧光团来构建在弱酸或近中性条件下具有 pH 响应能力的荧光探针。

本研究中我们选用 NBD-NH₂ 作为荧光团、N-(4-吡啶甲基)乙二胺作为质子的响应基团设计合成了一个基于光致电子转移(PET)机制的 pH 荧光探针 NBD-Py,它的合成路线如式 1 所示。研究同时还合成了该探针不含吡啶的类似物 NBD-en,用以对比它们的 pH 荧光响应行为。Taliani 等曾合成该类似物作为中间体与苯基吡啶二酮偶联作为外周型苯二氮卓类受体的荧光探针^[16]。探针 NBD-Py 中的 N-(4-吡啶甲基)乙二胺作为质子受体,其吡啶 N 和二烷基胺 N 均可通过 PET 效应猝灭 NBD-NH₂ 的荧光^[17]。该受体质子化时可阻断 PET 效应并导致探针荧光增强。设计中选择 4-吡啶甲基而非常见的 2-吡啶甲基的连接方式,目的是尽量避免形成适于金属配位的 1,4-螯合结构以降低金属对探针 pH 响应行

为的干扰。其类似物 NBD-en 的质子受体为乙二胺,质子化乙二胺的 pK_a 约为 10.66,但 NBD-en 本身的 pK_a 约在 8.29,无法应用于中性或弱酸性 pH 的检测。虽然质子化吡啶的 pK_a 约为 5.19,本研究发现吡啶与乙二胺在 NBD-Py 中的组合可以使整个受体质子化后的表观 pK_a 接近 7.0,从而获得对弱酸和近中性 pH 响应的能力。

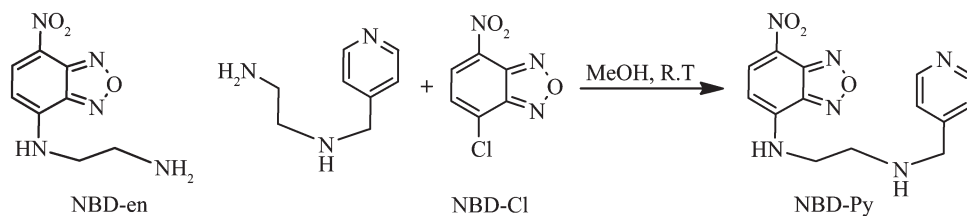
1 实验部分

1.1 试剂和仪器

合成 NBD-Cl 的原料 2,6-二氯苯胺为国内工业品,4-吡啶甲醛购买于 Sigma 公司。NBD-en 根据文献合成^[16]。合成实验中所用溶剂和其他试剂均来自南京大学化学化工学院采购的国产试剂,使用前未做进一步纯化。所有光谱测试中使用的溶剂都是购自 Aldrich 公司的光谱纯溶剂,所用水是 MILIPORE 处理的超纯水。核磁共振谱在 Bruker DRX-500 核磁仪 (500 MHz) 上采集,高分辨质谱由 Bruker Autoflex II MALDI-TOF 测定。荧光光谱由 Fluoromax-4 荧光光谱仪记录,紫外-可见光谱用 Perkin Elmer Lambda 35 紫外可见分光光度计测定。pH 值用 Sartorius PB-10 精密 pH 计测定。荧光造影用 OLYMPUS IX81 激光共聚焦荧光显微镜完成。

1.2 NBD-Py 的合成和表征

NBD-Py 的合成路线如式 1 所示,其中 NBD-Cl 和 N-(4-吡啶甲基)乙二胺分别根据文献方法在本实验室合成^[18-19]。将 10 mL NBD-Cl(400 mg,2 mmol)甲醇溶液搅拌下逐滴加入到 N-(4-吡啶甲基)乙二胺 (300 mg,2 mmol)的甲醇溶液中(10 mL)。在室温条件下维持反应并用 TLC($V_{\text{CH}_2\text{Cl}_2}/V_{\text{CH}_3\text{OH}}=20$)跟踪至原料反应完全。减压脱去溶剂后残余物通过硅胶柱层析 ($V_{\text{CH}_2\text{Cl}_2}/V_{\text{CH}_3\text{OH}}=25$)分离得到橘黄色固体 NBD-Py (106 mg,yield 16.9%)。¹H NMR(500 MHz, (CD₃)₂SO) δ :2.84(t, $J=6.2$, 2H), 3.60(t, $J=6.2$, 2H), 3.78(s, 2H), 6.



式 1 化合物 NBD-en 和探针 NBD-Py 的合成

Scheme 1 Compound NBD-en and the synthesis of NBD-Py

45 (d, $J=8.9, 1\text{H}$), 7.34 (d, $J=5.7, 2\text{H}$), 8.47 (d, $J=5.7, 2\text{H}$), 8.51 (d, $J=8.9, 1\text{H}$). ^{13}C NMR (125 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ : 43.92, 47.02, 51.70, 99.73, 121.04, 123.41, 138.32, 144.60, 144.94, 145.90, 149.82 and 150.23. ESI-HRMS (positive mode, m/z): calcd. 315.1206; Found 315.1201 for $[\text{M}+\text{H}]^+$.

1.3 NBD-Py 和 NBD-en 的光谱测试

将 NBD-Py 的储备液用 HEPES 缓冲溶液 (50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES, 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KNO_3 ; pH 7.40) 稀释成 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 溶液 ($V_{\text{DMSO}}:V_{\text{HEPES}}=1:99$), 然后分别测量探针的荧光光谱和紫外-可见吸收光谱。量子产率测定时选用 4-甲氨基-7-硝基-1,2,3-苯并呋喃 (NBD-NHCH₃) 作为基准物^[20], 以其最大激发波长 458 nm 为 NBD-Py 探针的激发波长, 对基准物和探针分别进行紫外吸收测定与荧光光谱测定。量子产率通过如下公式进行计算^[21]:

$$\Phi_{\text{is}} = \Phi_{\text{R}} F_{\text{S}} A_{\text{R}} n_{\text{S}}^2 / (F_{\text{R}} A_{\text{S}} n_{\text{R}}^2)$$

Φ_{f} 表示量子产率, 公式中下标 R 与 S 分别代表基准物与样品, A 表示相应激发波长处的吸光度, n 为样品溶液的折射系数, F 表示化合物溶液荧光发射光谱的积分面积。

NBD-Py 的 pH 滴定和响应可逆性实验在含 1% DMSO 的水溶液中进行。储备液用 H_2O 稀释成 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。溶液 pH 的调节是通过加入少量 (几微升) 的 HCl 或 NaOH 水溶液, 在迅速测定 pH 后快速完成紫外-可见吸收光谱或荧光光谱测试。NBD-Py 对金属离子的荧光响应性能在 DMSO/HEPES (1:99, V/V , 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES, 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KNO_3 , pH 7.40) 中测试, 测试浓度是 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 其中碱金属和碱土金属的离子浓度是探针浓度的 1 000 倍, 而其他金属离子和探针浓度相等。

1.4 NBD-Py 探针的细胞造影研究

利用荧光共聚焦显微镜考察了 NBD-Py 对 HeLa 细胞内 pH 的造影能力。细胞内 pH 的调节是通过在孵育介质中加入尼日利亚菌素 (10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 使细胞内外 pH 一致, 再通过调节孵育介质的 pH 实现的^[22]。具体操作为室温下将 HeLa 细胞与探针 NBD-Py (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 共同孵育 30 min, 孵化的介质为含有尼日利亚菌素且具有不同 pH (4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 和 7.0) 的 PBS 缓冲溶液。造影直接用 Olympus IX81 激光共聚焦荧光显微镜完成。通过和溶酶体荧光染色试剂 (LysoTracker Red DND-99) 对 HeLa 细胞共染确定了 NBD-Py 探针的溶酶体靶向

性能。

2 结果与讨论

2.1 NBD-Py 和 NBD-en 的紫外和荧光光谱

首先我们研究了 NBD-Py 探针在 DMSO/HEPES (1:99, V/V , 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES, 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KNO_3 , pH 7.40) 体系中的光谱行为。如图 1 所示, NBD-Py 探针最大紫外吸收波长为 475 nm (消光系数 $6.5 \times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), 在 344 nm 处还有一弱吸收峰 (消光系数 $2.1 \times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)。它们可以分别指认为探针分子 4-氨基与 7-硝基间的 ICT 效应所引起的吸收峰 (ICT 带) 和 NBD 荧光团本身的 $\pi-\pi^*$ 跃迁吸收带。其类似物 NBD-en 的 ICT 和 $\pi-\pi^*$ 吸收峰的位置与 NBD-Py 基本相似, 消光系数也相似 (467 nm, $4.5 \times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$; 336 nm, $1.5 \times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)。探针 NBD-Py 的最大激发波长与最大发射波长分别为 465 和 539 nm, 均处于可见光区, 其较大的 Stokes 位移 (74 nm), 有助于降低造影过程中激发光的干扰。其类似物 NBD-en 的最大激发和发射波长分别为 464 和 533 nm。从图 1 可以看出 NBD-Py 的量子产率要小于 NBD-en, 而实际以 NBD-NHCH₃ 作为基准物进行的量子产率测定也表明 NBD-Py 的量子产率为 0.011, 而 NBD-en 则为 0.028。

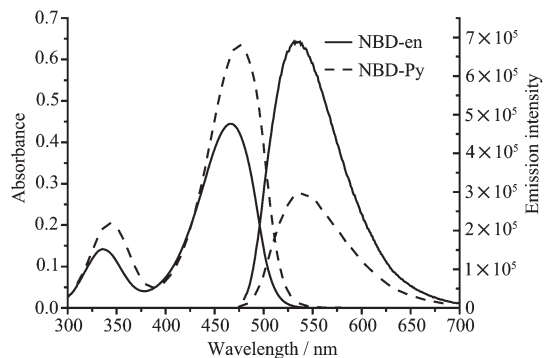
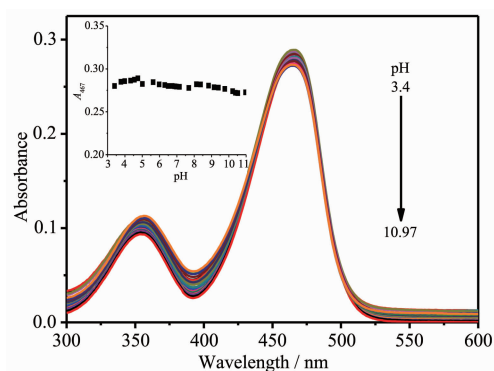


图 1 NBD-en (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 实线) 和 NBD-Py (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 虚线) 在含 1% DMSO HEPES 缓冲溶液 (50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KNO_3 , pH 7.40) 中的紫外-可见吸收光谱和荧光发射光谱

Fig.1 UV-Vis absorption and emission spectra of NBD-en (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; solid line) and NBD-Py (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; dashed line) in HEPES buffer (50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KNO_3 , pH 7.40) containing 1% DMSO

2.2 NBD-Py 的紫外可见和荧光 pH 滴定

NBD-Py 探针的 pH 紫外-可见光谱滴定实验是在含 1% DMSO 的水溶液中进行的。如图 2 所示,



Inset is the pH titration profile based on the absorbance at 467 nm

图 2 NBD-Py ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $V_{\text{DMSO}}/V_{\text{H}_2\text{O}}=1/99$)水溶液在不同 pH 条件下的吸收光谱

Fig.2 UV-vis absorption spectra of NBD-Py ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) obtained in aqueous solution ($V_{\text{DMSO}}/V_{\text{H}_2\text{O}}=1/99$) at different pH values

NBD-Py 探针的吸收光谱在 pH 3.4~10.97 范围内变化不明显,474 nm 处吸收有微弱的下降,而 344 nm 处的吸收有微弱上升,同时未观察到吸收峰的移动。作为 ICT 荧光团,其稳定的吸收光谱表明其作为电子给体的 4-氨基在此 pH 范围内没有发生质子化或去质子化效应,然而这不能排除侧链氨基或吡啶发生质子化或去质子化作用。

NBD-Py 的 pH 荧光滴定在同样的溶液中完成。如图 3(a)所示,NBD-Py 在 pH 3.0~5.0 之间具有较强的荧光,并且相对稳定。当 pH 进一步升高时 NBD-Py 的荧光强度逐渐降低,直至当 pH>8.0 时,NBD-Py 的荧光强度再次趋于稳定。在 pH 逐渐升高的过程中其荧光发射波长未见移动,这也表明 pH 变化

过程中 NBD-NH₂ 荧光团的 ICT 效应没有变化,也表明给电子基 4-氨基未发生质子化,这也与紫外 pH 滴定的结果相一致。显然,NBD-Py 在 pH 5.0~8.5 范围内显示的 pH 依赖的荧光强度变化与探针质子受体中侧链氨基或吡啶的质子化有关。当 pH>8.0 时,侧链氨基和吡啶均未质子化,相应 N 原子上的孤对电子可以发生光致电子转移(PET)而猝灭荧光团的荧光,NBD-Py 显示较弱的荧光。当 pH 逐渐降低时,侧链氨基和吡啶逐渐发生质子化,相应的 PET 效应被抑制并导致荧光团荧光逐渐恢复,荧光强度逐渐增强。当 pH<5.0 时,侧链氨基和吡啶已被完全质子化,PET 效应完全被阻断,荧光达到最强。NBD-Py 荧光的 pH 依赖行为表明该探针是一个基于 PET 机制的 pH 荧光探针,其质子化导致的荧光增强倍数达到~9.0($F_{\text{pH } 5.0}/F_{\text{pH } 8.5}$)。利用 NBD-Py 探针最大发射波长 539 nm 处的荧光强度对 pH 作图,得到图 3(b)显示的荧光 pH 滴定曲线。利用 Henderson-Hasselbach 方程对该滴定曲线进行拟合的结果表明 NBD-Py 探针的 $\text{p}K_{\text{a}}$ 为~6.48^[23]。这一数值表明该探针适合于中性到弱酸性 pH 的检测,达到了研究的设计目的。

NBD-en 的 pH 荧光滴定表明其荧光在 pH<7.0 时最强,而且其强度在此范围内不受 pH 影响。在 pH 7.0~10.5 范围时,该化合物的荧光强度随着 pH 值的升高而逐渐降低,而发射波长没有明显的移动。在 pH 高于 10.0 以上时荧光趋于稳定。在 pH 7.0~10.5 范围内 pH 依赖的荧光变化同样可以归结为侧链氨基在较低 pH 时(pH<10.0)发生质子化有效阻断侧链氨基的 PET 效应所致。NBD-en 探针侧链

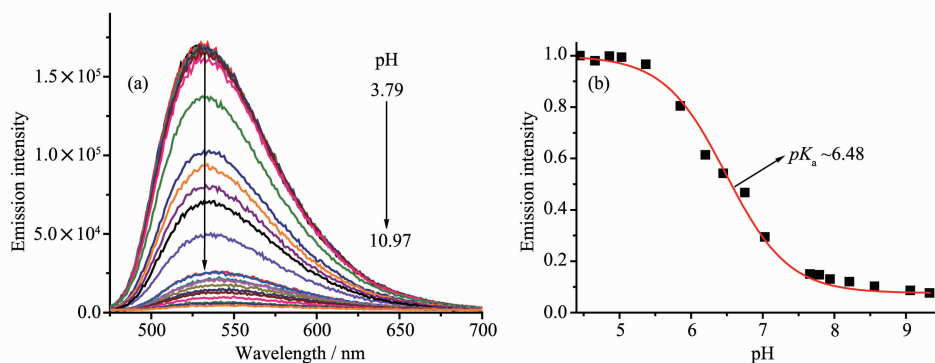


图 3 (a) NBD-Py 水溶液($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $V_{\text{DMSO}}/V_{\text{H}_2\text{O}}=1/99$, $\lambda_{\text{ex}}=465 \text{ nm}$)在不同 pH 条件下的荧光发射光谱;(b)基于 539 nm 处荧光强度的 pH 滴定曲线(■)及 $\text{p}K_{\text{a}}$ 拟合曲线

Fig.3 (a) Emission spectra of NBD-Py ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in aqueous solution ($V_{\text{DMSO}}/V_{\text{H}_2\text{O}}=1/99$) obtained at different pH values (pH 3.79~10.97); (b) Fluorescent pH titration profile based on the normalized emission intensity at 539 nm (■) and the related $\text{p}K_{\text{a}}$ simulation profile; $\lambda_{\text{ex}}=465 \text{ nm}$

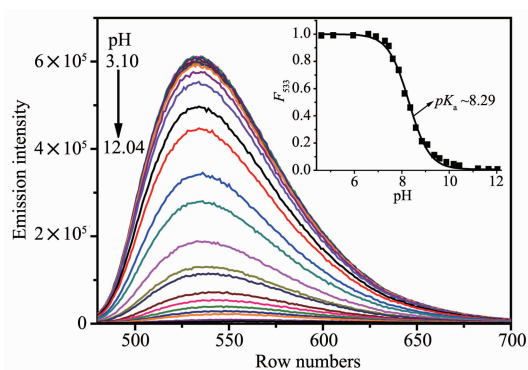


图 4 NBD-en 水溶液($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $V_{\text{DMSO}}/V_{\text{H}_2\text{O}}=1/99$, $\lambda_{\text{ex}}=465 \text{ nm}$)在不同 pH 的荧光发射光谱。插图为基于 533 nm 处荧光强度的 pH 滴定曲线(■)及 pK_a 拟合曲线

Fig.4 Emission spectra of NBD-en ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in aqueous solution ($V_{\text{DMSO}}/V_{\text{H}_2\text{O}}=1/99$) obtained at different pH values (pH 3.10~12.04); Inset is the fluorescent pH titration profile based on the normalized emission intensity at 533 nm and the related pK_a simulation profile; $\lambda_{\text{ex}}=465 \text{ nm}$

氨基质子化导致的荧光强度增强倍数约为 16($F_{\text{pH } 6.91}/F_{\text{pH } 9.88}$)。拟合发现 NBD-en 的 pK_a 约为 8.29。比较 NBD-Py 与 NBD-en 的 pK_a 可以发现吡啶的引入有效地将荧光分子中质子受体的 pK_a 从 8.29 降低到 6.48。一般认为仲胺的碱性要强于伯胺,所以 NBD-

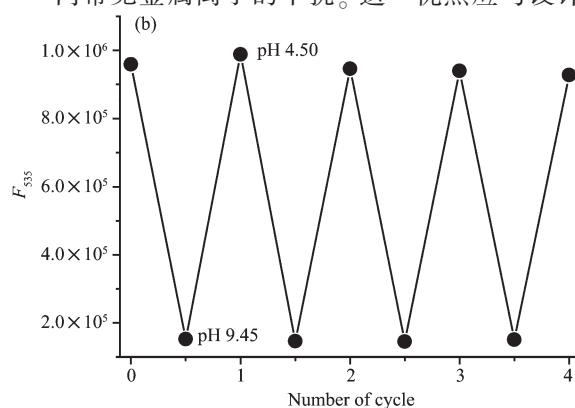
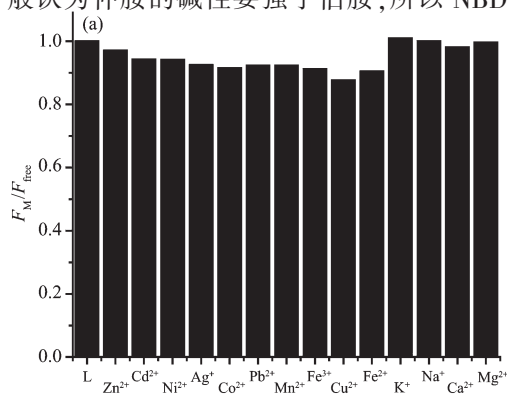


图 5 (a) NBD-Py($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 在 HEPES 缓冲体系($V_{\text{DMSO}}/V_{\text{HEPES}}=1/99$, $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES, $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KNO_3 , pH 7.40)中对各种金属离子的荧光响应(根据 535 nm 处荧光强度绘制,过渡金属离子浓度为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 浓度为 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$); (b) NBD-Py 在 pH 4.50~9.45 间振荡时在 535 nm 处的荧光变化; $\lambda_{\text{ex}}=465 \text{ nm}$

Fig.5 (a) Fluorescence responses of NBD-Py ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in aqueous solution ($V_{\text{DMSO}}/V_{\text{water}}=1/99$; $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES, $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KNO_3 ; pH =7.40) to different metal cations based on the emission at 535 nm. The final concentration of Na^+ , K^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+} is $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively, while those for other cations are $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; (b) Fluorescence intensity of NBD-Py at 535 nm upon adjusting pH between 4.50 and 9.45 pH in a reversible manner; $\lambda_{\text{ex}}=465 \text{ nm}$

Py 结合质子能力低于 NBD-en 的原因是吡啶结构本身的影响而非伯胺转变为仲胺所致。实际上在 NBD-Py 探针中存在着侧链氨基和吡啶的两个质子化过程,这两个质子化过程相互影响,导致了居中的表观 pK_a 。显然,这一调节质子受体 pK_a 的策略应可作为调节 pH 荧光探针 pH 响应范围的有效手段。

2.3 NBD-Py 探针 pH 响应行为的抗金属干扰能力和可逆性

细胞中存在大量高浓度的化学物种,它们均可能与探针发生相互作用而影响探针的 pH 响应行为,尤其胞内的阳离子往往会与质子相竞争。其中高浓度的 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 和一些其他常见的过渡金属离子的影响往往比较明显。实用的胞内 pH 造影探针其 pH 响应行为应不受胞内其他金属离子的干扰。本研究对 NBD-Py 的抗金属干扰能力也进行了测试。测试的介质为 pH 7.40 的 HEPES 缓冲溶液,测试中引入高浓度的碱金属或碱土金属离子是为模拟细胞内环境。由图 5(a)可以看出,当与探针等量的过渡金属离子如 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 等加入到 NBD-Py 探针溶液中时,其荧光强度及发射波长均未发生明显的变化。另外加入探针 1 000 倍量的 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 同样未影响探针的荧光。这一结果表明 NBD-Py 探针能专一地响应 pH 而不受胞内常见金属离子的干扰。这一优点应与设计中选择

4-吡啶甲基修饰乙二胺尽量减少质子受体对金属的螯合作用有关。这些结果表明 NBD-Py 具有胞内 pH 造影的前景。

由于细胞内 pH 值往往发生振荡变化, 并且非均匀分布, 因此 pH 探针具有可逆响应能力十分重要。因此我们还对 NBD-Py 对 pH 响应的可逆性进行了测试。实验中我们循环调节测试溶液的 pH 使其 pH 在 4.50 和 9.45 之间振荡, 并反复测试其荧光光谱。如图 5(b)所示, NBD-Py 的荧光至少在 4 个循环内在相同的 pH 下保持稳定, 表明该探针具有较好的可逆响应 pH 的能力, 可以实现对细胞内 pH 振荡变化的有效响应。

2.4 NBD-Py 细胞造影研究

利用共聚焦荧光显微镜我们进一步考察了 NBD-Py 细胞内 pH 造影能力。造影使用的 HeLa 细胞与探针 NBD-Py($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)共同孵育 30 min, 孵育的介质为加入了尼日利亚菌素($10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)的具有不同 pH 的 PBS 缓冲溶液。孵育结束后进行单通道模式共聚焦造影。如图 6 所示, 当孵育溶液 pH 为 4.0 时, HeLa 细胞内显示的平均荧光强度较强。当 pH 逐渐升高时, 胞内荧光逐渐减弱, 直至 pH 7.0 时荧光强度趋于稳定。胞内 pH 的荧光响应图(图 6h)表明该探针在 HeLa 细胞内可在 pH 4.0~6.5 内线性响应 pH_i。这一响应趋势和行为类似于溶液中观察

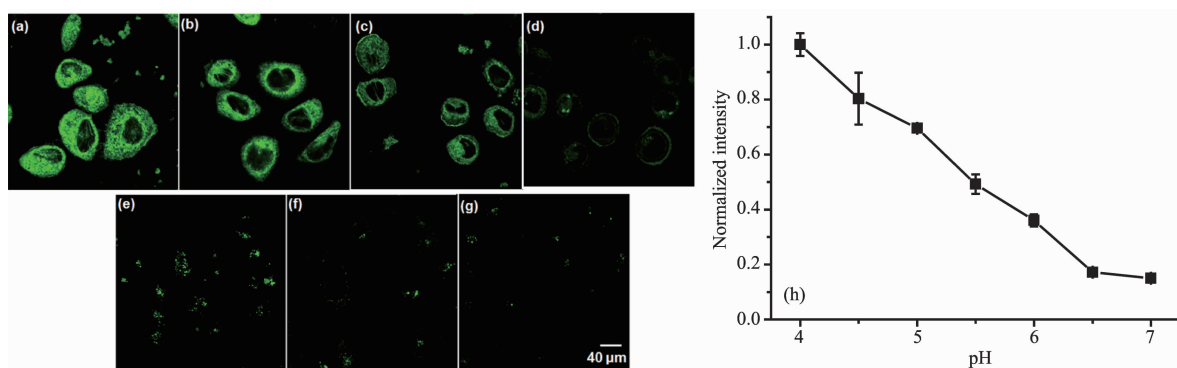


图 6 NBD-Py 对 HeLa 细胞内 pH 的激光共聚焦荧光造影图。HeLa 细胞分别用含 NBD-Py ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的具有不同 pH 的 PBS 缓冲溶液孵育 30min(25 °C)进行造影测试。介质中同时含有尼日利亚菌素($10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$); (a)、(b)、(c)、(d)、(e)、(f)、(g)分别是在 pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 条件下孵育的细胞造影图, 造影荧光通道为 500~600 nm, 激发波长为 488 nm; (h)为经归一化后细胞内平均荧光强度对 pH 的变化曲线

Fig.6 Confocal pH_i imaging of HeLa cells stained by NBD-Py ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) at different pH values; The cells were incubated for 30 min with NBD-Py in PBS buffers of different pH at 25°C, which containing nigericin ($10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$); (a) pH 4.0; (b) pH 4.5; (c) pH 5.0; (d) pH 5.5; (e) pH 6.0; (f) pH 6.5; (g) pH 7.0; Band path: 500~600 nm; excitation, 488 nm; (h) Normalized average intracellular fluorescent intensity versus pH_i

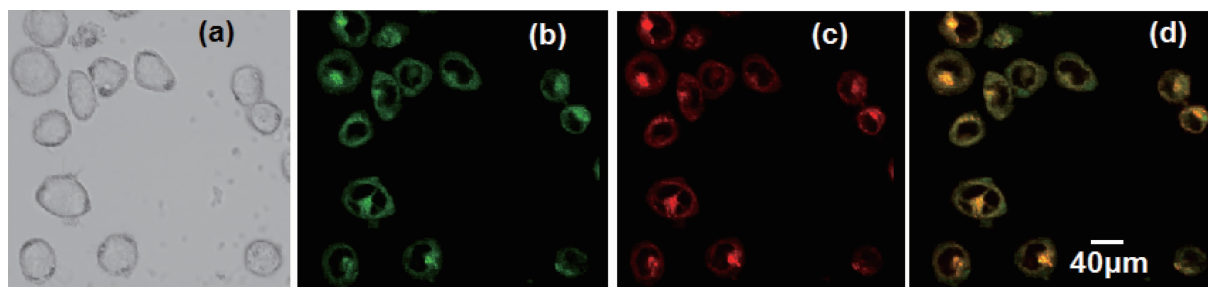


图 7 在 pH 为 4.0 室温条件下, 用 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NBD-Py 和 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LysoSensor Red DND-99 孵化 30 min 后的 HeLa 细胞共聚焦造影图; (a) HeLa 细胞明场图; (b) 488 nm 激发时下由 500 到 600 nm 造影通道获得的造影图; (c) 565 nm 激发时下由 570 到 600 nm 造影通道获得的造影图; (d) 为(b)和(c)的叠合图

Fig.7 Confocal imaging of HeLa cells contained by $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NBD-Py and $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LysoSensor Red DND-99 after incubation for 30 min at 25 °C (pH 4.0): (a) Bright field image; (b) image obtained with a band path from 500 to 600 nm upon excitation at 488 nm (NBD-Py); (c) image obtained with a band path from 570 to 600 nm upon excitation at 565 nm (LysoSensor Red DND-99); (d) overlay of (b) and (c)

到的现象,但显然其响应的线性范围与溶液中略有不同,胞内环境与溶液模拟环境之间的区别可能是导致这一差异的原因。胞内 pH 造影表明 NBD-Py 具有良好的细胞膜透过能力,并且具有 pH_i 响应能力,是一个可对弱酸性胞内环境进行 pH 造影的良好探针。同时该探针具有良好的细胞相容性,在测试过程中未见明显的细胞凋亡现象。同时从图 6(a~g)可以看出,探针主要分布于胞浆中,显示了清晰的点状荧光分布,表明探针可能具有特定细胞器的选择性结合能力。为了进一步确定 NBD-Py 探针的亚细胞分布,我们利用溶酶体荧光染色试剂 Lysotracker Red DND-99 和 NBD-Py 探针对 HeLa 细胞进行了共定位研究。由图 7d 可知,NBD-Py 和 Lysotracker Red DND-99 的荧光在细胞中有很好的重叠,两者的共定位系数达 90%以上。因此可以认为 NBD-Py 具有较好的溶酶体靶向能力,可以有效地检测溶酶体的 pH 变化。

3 结 论

本文将 4-吡啶甲基修饰乙二胺形成的质子受体与 NBD-NH₂ 荧光团偶联构建了一个具有在弱酸性和近中性 pH 范围内敏感响应细胞内 pH 的荧光探针 NBD-Py。该探针在 pH 5.0~8.5 范围内显示随 pH 降低导致的荧光增强响应,并且显示了良好的可逆响应能力和抗金属干扰性能,pK_a 约为 6.48。研究表明探针质子受体中吡啶的引入是导致其弱酸和近中性 pH 响应的关键。细胞造影研究不仅证实了其 pH_i 造影能力,而且发现了其良好的溶酶体靶向性能,为研究细胞溶酶体 pH 相关生理和病理过程提供了可靠工具。

参考文献:

- [1] (a)Gottlieb R A, Giesing H A, Zhu J Y, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1995**,**92**:5965-5968
(b)Gottlieb R A, Dosanjh A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1996**,**93**:3587-3588
- [2] Yuli I, Oplatka A. *Science.*, **1987**,**235**:340-342
- [3] (a)Liang E, Liu P, Dinh S. *Int. J. Pharm.*, **2007**,**338**:104-109
(b)Montrose M H, Friedrich T, Murer H. *J. Membr. Biol.*, **1987**,**97**:63-78
- [4] (a)Donoso P, Beltran M, Hidalgo C. *Biochemistry*, **1996**,**35**:13419-13425
(b)Hille C, Walz B. *J. Exp. Biol.*, **2008**,**211**:568-576
- [5] (a)Tang B, Yu F, Li P, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**,**131**:3016-3023
(b)Zhu H, Fan J L, Xu Q L, et al. *Chem. Commun.*, **2012**,**48**:11766-11768
- [6] (a)Hecht M, Kraus W, Rurack K. *Analyst.*, **2013**,**138**:325-332
(b)WANG Yan-Wei(王艳玮), LI Min(李敏), SHEN Zhen(沈珍), et al. *Chinese J. Inorg. Chem.(Wuji Huaxue Xuebao)*, **2008**,**24**:1247-1252
- [7] Hutt J T, Jo J, Olasz A, et al. *Org. Lett.*, **2012**,**14**:3162-3165
- [8] Hecht M, Kraus W, Rurack K. *Analyst.*, **2013**,**138**:325-332
- [9] (a)LIU Chao(刘超), SUN Hui(孙辉), YANG Xiao-Liang(杨晓亮), et al. *Chinese J. Inorg. Chem.(Wuji Huaxue Xuebao)*, **2011**,**27**:2121-2127
(b)Percivalle C, Mahmood T, Ladame S. *Med. Chem. Commun.*, **2013**,**4**:211-215
- [10]de Silva A P, Gunaratne H Q N, Gunnlaugsson T, et al. *Chem. Rev.*, **1997**,**97**:1515-1566
- [11]Ishiguro K, Ando T, Goto H. *Biotechniques*, **2008**,**45**:465-468
- [12](a)Andrews W W, Hill F C, Allison W S. *J. Biol. Chem.*, **1984**,**259**:14378-14382
(b)Santa T, Matsumura D, Huang C Z, et al. *Biomed. Chromatogr.*, **2002**,**16**:523-528
- [13]Wang Q, Lawrence D S. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**,**127**:7684-7685
- [14]Qian F, Zhang C L, Zhang Y M, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**,**131**:1460-1468
- [15](a)Kim S H, Youn N J, Park J Y, et al. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **2006**,**27**:1553-1556
(b)WANG Pi(王丕), CHEN Ma-Liang(陈马亮), GUO Wei(郭伟). *J. Shanxi Univ.: Nat. Sci. Ed(Shangxi Daxue Xuebao: Ziran Kexue Ban)*, **2011**,**34**:73-76
- [16]Taliani S, Simorini F, Sergianni V, et al. *J. Med. Chem.*, **2007**,**50**:404-407
- [17]Bissell R A, de Silva A P, de Silva S A, et al. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1992**,**2**:1559-1564
- [18]HE Juan(何娟), CHANG Jun-Biao(常俊标), CHEN Rong-Feng(陈荣峰), et al. *Chin. J. Pharmaceut.(Zhongguo Yiyao Huagong Zazhi)*, **2012**,**33**:425-426
- [19]Wang K, Cui J, Xie L, et al. *Heteroatom Chemistry*, **2009**,**20**:418-424
- [20]Parker C A, Rees W T. *Analyst*, **1960**,**85**:587-600
- [21]Lakowicz J R. *Principle of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Klumer Academic, **1999**:52-53
- [22]Thomas J A, Buchsbaum R N, Zimniak A, et al. *Biochemistry*, **1979**,**18**:2210-2218
- [23](a)Henderson L J. *Am. J. Physiol.*, **1908**,**21**:173-179
(b)Hasselbalch K A. *Biochem. Z.*, **1917**,**78**:112-144