

一种基于 BODIPY 的 Zn^{2+} 荧光探针: ICT 增强效应

邱 琳^{1,2} 季一凡¹ 朱成成¹ 陈韵聪¹ 何卫江^{*,1} 郭子建^{*,1}

(¹ 南京大学化学化工学院配位化学国家重点实验室, 南京 210093)

(² 常州大学制药与生命科学学院, 常州 213164)

摘要: 为克服 BODIPY 类探针 Stokes 位移小、发射偏短等不足, 本文通过在 BODIPY 引入 α -(4-羟基)苯乙烯基增强分子内电荷转移(ICT)效应并结合 *meso*-位 Zn^{2+} 螯合团的引入构建了一个发射红移到黄色的、有较大 Stokes 位移(~ 50 nm)的 BODIPY 类 Zn^{2+} 荧光探针。这些特点有利于降低造影中自发荧光、光毒性和激发的干扰。光谱研究显示探针具有良好的 Zn^{2+} 特异性荧光增强响应, 且其他金属和近中性环境 pH 的干扰较小。该探针对于 Zn^{2+} 的线性响应范围为 $0.12 \sim 1.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 检测限为 $0.18 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。HeLa 细胞内 Zn^{2+} 共聚焦荧光成像研究表明该探针具有良好的细胞膜透过能力, 可对胞浆内“自由” Zn^{2+} 实现可逆跟踪。

关键词: 锌; 荧光探针; 分子内电荷转移; 细胞; 荧光成像

中图分类号: O614.24⁺1; O644.14

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2014)01-0169-10

DOI: 10.11862/CJIC.2014.077

A BODIPY-Derived Zn^{2+} Fluorescent Sensor: the Enhanced ICT Effect

QIU Lin^{1,2} JI Yi-Fan¹ ZHU Cheng-Cheng¹ CHEN Yun-Cong¹ HE Wei-Jiang^{*,1} GUO Zi-Jian^{*,1}

(¹ State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210093, China)

(² School of Pharmaceutical Engineering & Life Science, Changzhou University, Changzhou, Jiangsu 213164, China)

Abstract: Modifying BODIPY with a (4-hydroxyl)styryl group and a Zn^{2+} chelator respectively at α - and *meso*-positions resulted in a Zn^{2+} fluorescent sensor of yellow emission (580 nm) and large Stokes shift (~ 50 nm). The α -(4-hydroxyl)styryl-enhanced ICT effect is responsible for the enlarged Stokes shift and bathochromic shifted excitation/emission of BODIPY, which favor to reduce the imaging interference of autofluorescence, phototoxicity and excitation. Photospectroscopic study disclosed the specific Zn^{2+} -amplified fluorescence of this sensor, and the normal metal cations and near neutral pH show very little interference to its Zn^{2+} sensing behavior. Its linear response range to Zn^{2+} is $0.12 \sim 1.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, and the LOD is $0.18 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Confocal fluorescence imaging of intracellular Zn^{2+} in HeLa cells demonstrated the sensor's cell membrane permeability and its reversible cytosolic Zn^{2+} imaging ability.

Key words: zinc; fluorescent sensor; ICT; cell; fluorescence imaging

作为人体内最重要的过渡金属离子之一, 锌离子不仅参与了神经信号传递、基因转录、信号转导和免疫反应等生理过程^[1-2]而且还与许多疾病如老年痴呆症、糖尿病、前列腺癌等的病理过程相关^[3-5]。利用荧光探针检测锌离子在生命体系中的实时分布信息

对理解这些相关过程具有重要的意义, 因此发展锌离子荧光探针是目前研究的热点之一^[6]。除了紫外激发的经典探针 TSQ 系列外^[7], 目前报道较多的 Zn^{2+} 探针主要有 ZP 系列^[8]和 ZnAF 系列^[9], 也是目前最为成功的锌离子探针。这两类探针均基于荧光素而设

收稿日期: 2013-10-27。收修改稿日期: 2013-12-01。

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

*通讯联系人。E-mail: hewej69@nju.edu.cn, zgao@nju.edu.cn

计,一般激发在 490 nm 左右,发射在 520 nm 左右。显然发展具有更长激发和发射波长的锌离子荧光不仅有利于进行各类细胞共染造影,而且有利于降低自发荧光、光毒性及光漂白等短波长造影中的不足。

用于探针设计的典型荧光团有荧光素^[9-11]、萘酰亚胺^[12-14]、香豆素^[15-16]、川菁^[17-18]、罗丹明^[19-21]以及氟硼吡咯^[22-23](4-difluoro-4-borata-3a-azonia-4a-aza-s-indacene, BODIPY)等。其中 BODIPY 类染料分子有较高的刚性和芳性,因此该类染料具有良好的光稳定性、较高的摩尔消光系数和荧光量子产率。由于这类分子还具有发光性能环境依赖性小、吸收及发射带较窄等优点,因而基于 BODIPY 的探针设计报道较多^[24-25],以 BODIPY 来构筑锌离子荧光探针有利于降低光漂白延长造影时间,并为各类共染造影和不同激发光源配置的造影设备提供更多的选择。然而常见 BODIPY 探针 Stokes 位移较小(<20 nm),易造成激发干扰。它们的激发波长一般在 500 nm 左右,与荧光素类探针的激发过于接近,共染时易发生相互影响。BODIPY 通常发出绿色荧光,波长在 510 nm 左右的,较易受到自发荧光干扰。根据 Rurack 等人的报道,BODIPY 类荧光团 α -位进行推电子基取代苯乙烯修饰,不仅可明显增强 BODIPY 分子内存在的 ICT 效应,而且能显著提高 BODIPY 荧光团的吸收和发射波长、增加斯托克斯位移^[26]。这些均有利于进一步降低造影中的自发荧光干扰、光毒性和激发干扰。据此我们设计了一个新的基于 BODIPY 的 Zn^{2+} 荧光探针 BDP-*m*-BPA (图 1)。在探针分子中 meso-位引入了将对位氨基修饰为 Zn^{2+} 螯合团 bis(2-pyridylmethyl)amine(BPA)^[27-28]的苯环。其中 BPA 基团

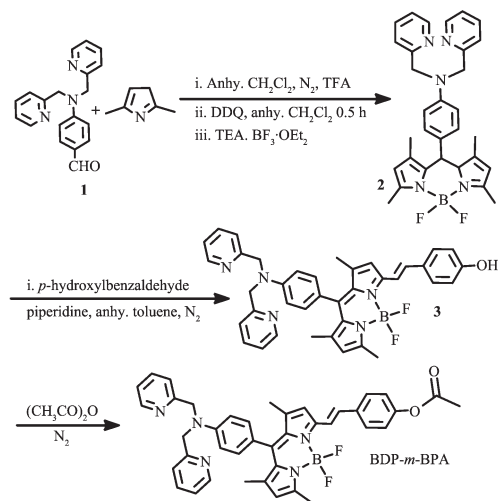


图 1 探针 BDP-*m*-BPA 的合成路线

Fig.1 Synthesis of sensor BDP-*m*-BPA

的氨基将对 BODIPY 荧光团的荧光具有 PET 淬灭效应^[28]。BPA 与 Zn^{2+} 配位将导致 PET 效应的阻断并诱导探针分子的荧光增强,实现对 Zn^{2+} 的增强响应。 α -(4-羟基) 苯乙烯的引入可扩展分子的共轭体系并促进 ICT 效应以提高探针的激发和发射波长并增大 Stokes 位移。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

合成中常用试剂和溶剂均为国内商业试剂,其中二氯甲烷经 CaH_2 干燥后使用,甲苯经钠/二苯甲酮回流干燥后使用,其余试剂未做纯化。三氟乙酸(TFA)和 2,4-二甲基吡咯购自 Alfa 公司。 N,N,N',N' -四(2-吡啶甲基)乙二胺(TPEN), $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$,三羟甲基氨基甲烷(Tris)和用于光谱及造影测试中的各类无机盐均为来自 Aldrich 和 Alfa 的分析纯试剂。光谱测试中所用溶剂如乙醇等为 Aldrich 光谱纯试剂,水为经 MILIPORE 处理的超纯水。电喷雾质谱用 LCQ 电喷雾质谱仪(Thermo Finnigan)测定,并用 ISOPRO 3.0 程序模拟其同位素分布模式。探针分子高分辨质谱用 Agilent 6540Q-TOF HPLC-MS 测定。 ^1H , ^{13}C NMR 在 Bruker DRX-500 或 Bruker DRX-600 核磁仪上用标准脉冲序列测定 (298 K)。紫外光谱用 PerkinElmer Lambda 35 紫外可见光谱仪测定。荧光光谱在 Horiba Scientific Fluoromax-4 发光光谱仪上测定。pH 值用 PHS3 精密 pH 计记录。

1.2 荧光配体 BDP-*m*-BPA 的合成

1.2.1 化合物 2 的合成

化合物 1 采用文献报道的方法^[29]。氮气保护下将化合物 1 (0.303 g, 1 mmol) 和 2,4-二甲基吡咯 (0.190 g, 2 mmol) 用 50 mL 无水二氯甲烷溶解,加入一滴 TFA 后室温搅拌^[30]。TLC 跟踪至化合物 1 反应完全。加入无水二氯甲烷溶解的 DDQ (0.220 g, 1 mmol) 后继续搅拌 30 min。随后加入 2 mL 无水三乙胺搅拌 5 min,继续加入 2 mL $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ 搅拌 1 h。将混合物用饱和食盐水洗涤一次后以无水硫酸钠干燥有机层,硅胶柱层析分离(200~300 目, $V_{\text{CH}_3\text{OH}}:V_{\text{AcOEt}}=1:10$)得到橘色固体 102 mg,产率 20%。 ^1H NMR(300 MHz, CDCl_3) $\delta=1.47$ (s, 6H), 2.56 (s, 6H), 4.91 (s, 4H), 5.97 (s, 2H), 6.82 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.02 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.23 (m, $J=12$ Hz, 2H), 7.27 (d, $J=8$ Hz, 2H), 7.67 (t, $J=15$ Hz, 2H), 8.63 (d, $J=4.5$, 2H)。

1.2.2 化合物 3 合成

氮气保护下将化合物 **2** (0.240 g, 0.46 mmol), 对羟基苯甲醛 (0.060 g, 0.50 mmol), 0.10 mL 吡啶, 少量 4A 分子筛, 一起置于 5 mL 无水甲苯中混合加热至 110 °C 并维持 24 h^[30]。冷却至室温后蒸干溶剂, 残余物经硅胶柱层析分离 (200~300 目, $V_{\text{AcOEt}}:V_{\text{MeOH}}=20:1$) 得到深紫红色固体 60 mg, 产率 21%。¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) $\delta=1.45(\text{s}, 3\text{H}), 1.50(\text{s}, 3\text{H}), 2.50(\text{s}, 3\text{H}), 4.95(\text{s}, 4\text{H}), 6.02(\text{s}, 1\text{H}), 6.69(\text{s}, 1\text{H}), 6.83(\text{d}, J=10\text{ Hz}, 2\text{H}), 6.87(\text{d}, J=10\text{ Hz}, 2\text{H}), 7.03(\text{d}, J=8\text{ Hz}, 2\text{H}), 7.31(\text{m}, J=35\text{ Hz}, 3\text{H}), 7.37(\text{d}, J=8\text{ Hz}, 2\text{H}), 7.44(\text{m}, J=25\text{ Hz}, 3\text{H}), 7.79(\text{t}, J=15\text{ Hz}, 2\text{H}), 8.55(\text{d}, J=5\text{ Hz}, 2\text{H})$ 。

1.2.3 目标化合物 BDP-*m*-BPA 的合成

60 mg 化合物 **3** 加入 2 mL 醋酸酐加热至 50 °C, 维持 8 h 后结束反应^[31]。减压蒸干溶剂, 用二氯甲烷洗涤得到深蓝色固体, 产率 90%。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) $\delta=1.37(\text{s}, 3\text{H}), 1.41(\text{s}, 3\text{H}), 2.58(\text{s}, 3\text{H}), 3.99(\text{s}, 3\text{H}), 4.90(\text{s}, 4\text{H}), 5.99(\text{s}, 1\text{H}), 6.59(\text{s}, 1\text{H}), 6.73(\text{d}, J=12\text{ Hz}, 2\text{H}), 7.20(\text{m}, J=42\text{ Hz}, 3\text{H}), 7.26(\text{d}, J=12\text{ Hz}, 2\text{H}), 7.46(\text{m}, J=42\text{ Hz}, 5\text{H}), 7.67(\text{t-d}, J=24\text{ Hz}, 6\text{ Hz}, 2\text{H}), 8.19(\text{d}, J=12\text{ Hz}, 2\text{H}), 8.67(\text{d}, J=6\text{ Hz}, 2\text{H})$ ppm。¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃): $\delta=14.44, 14.64, 14.80, 29.71, 55.37, 56.49, 112.87, 115.59, 117.87, 120.99, 121.90, 126.46, 128.76, 129.38, 130.26, 130.71, 130.90, 132.49, 136.99, 138.73, 140.18, 141.17, 142.40, 148.11, 148.36, 154.45, 154.20, 157.40, 166.53$ 。HRMS(EI)(positive mode, m/z): Calcd. 668.300 3, Found 668.301 5 for [M+H]⁺。

1.3 BDP-*m*-BPA 的荧光、吸收光谱及其 Zn²⁺滴定测试

取 BDP-*m*-BPA 的乙醇储备液加入到 100 mL 的容量瓶中并用 Tris-HCl 缓冲溶液 (20 mmol·L⁻¹, pH=7.20) 和乙醇定容, 配成浓度为 10 μmol·L⁻¹ 的 ($V_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}:V_{\text{water}}=1:1$) 溶液进行吸收和荧光光谱测量。吸收光谱和荧光光谱滴定均通过向 3 mL BDP-*m*-BPA 溶液中分别加入等分体积的 Zn (NO₃)₂ 水溶液 (1.2 mmol·L⁻¹) 完成。每次加 3 μL, 充分混匀后进行紫外和荧光测试。

1.4 BDP-*m*-BPA 对不同金属离子的荧光响应

探针对金属离子选择性荧光响应能力测试及 Zn²⁺ 在其他金属离子存在下的竞争性荧光响应实验均在前述介质中进行。实验中向 3 mL 探针 (10 μmol·L⁻¹) 溶液中加入 15 μL 浓度为 12 mmol·L⁻¹ 的金属离子水溶液 (金属离子总浓度为探针浓度的 6

倍), 充分混匀后进行测试。竞争响应研究中向 3 mL 探针 (10 μmol·L⁻¹) 溶液中加入 15 μL 浓度为 12 mmol·L⁻¹ 的 Zn(NO₃)₂ 水溶液, 充分混匀后记录光谱。然后再向此溶液中加入 15 μL 浓度为 12 mmol·L⁻¹ 的其他金属离子或 6 μL 浓度为 1 mol·L⁻¹ 的碱金属或碱土金属离子溶液, 混匀后记录光谱。

1.5 BDP-*m*-BPA 的线性响应范围及检测限测定

测试在含 1 μmol·L⁻¹ BDP-*m*-BPA 的 Tris-HCl 缓冲溶液 (20 mmol·L⁻¹, pH=7.20, $V_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}:V_{\text{water}}=1:1$) 中进行。向 3 mL 探针溶液中分别加入 Zn²⁺ 水溶液 (0.12 mmol·L⁻¹), 每次加 3.0 μL, 充分混匀后进行荧光测试。检测限测试先扫描背景 11 遍, 获得标准偏差 σ 。检测限利用 $3\sigma/S$ 求出, 其中 S 为线性响应范围内的斜率。

1.6 BDP-*m*-BPA 量子产率的测定

配体溶液为 1 μmol·L⁻¹ 的 Tris-HCl 溶液 (20 mmol·L⁻¹, pH=7.20, $V_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}:V_{\text{water}}=1:1$)。罗丹明 B 作为基准物 ($\Phi=0.97$, C₂H₅OH), 把基准物的吸光度和待测物激发波长处的吸光度调整到 0.1 以下, 以 527 nm 为共同激发波长, 对各溶液分别进行紫外吸收测定与荧光光谱测定, 结果取 3 次平均值。所得数据代如下列公式进行计算^[32]:

$$\Phi_{\text{IS}} = \Phi_{\text{IR}} \frac{F_{\text{S}} A_{\text{R}} n_{\text{S}}^2}{F_{\text{R}} A_{\text{S}} n_{\text{R}}^2}$$

公式中 F 为荧光发射光谱的积分面积, A 表示所用激发波长的吸光度, n 为样品溶液的折射系数, 下标 R 与 S 分别代表基准物与样品。

1.7 BDP-*m*-BPA 与 Zn²⁺ 的结合常数测定

结合常数的测定实验在含不同 Zn²⁺ 浓度的溶液中进行。溶液中探针 BDP-*m*-BPA 的浓度固定为 10 μmol·L⁻¹。BDP-*m*-BPA 的 Zn²⁺ 结合常数可根据下式进行拟合^[33]:

$$\frac{1}{I-I_0} = \frac{1}{k_a(I_{\text{max}}-I_0)} \cdot \frac{1}{c_{\text{Zn}^{2+}}} + \frac{1}{I_{\text{max}}-I_0} \cdots \cdots \quad (1)$$

其中 I_0 是不加 Zn²⁺ 时 BDP-*m*-BPA 在 580 nm 处荧光强度, I 是不同 Zn²⁺ 浓度时 BDP-*m*-BPA 在 580 nm 处荧光强度。

1.8 BDP-*m*-BPA 的胞内分布和胞内 Zn²⁺ 造影

造影实验中所用 HeLa 细胞在含有 10% 胚胎小牛血清 (FCS, Invitrogen)、青霉素 (100 units·mL⁻¹) 和链霉素 (100 mg·mL⁻¹) 的 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen) 培养基中培养, 环境为 37

℃含 5% CO₂ 的空气。HeLa 细胞培养在涂有多聚赖氨酸的盖玻片上, 去掉介质后, 细胞用不含金属的 PBS 溶液洗涤 3 次。细胞染色及胞内 Zn²⁺ 成像实验步骤如下: 把 BDP-*m*-BPA 乙醇储备液稀释到不含金属的 PBS 溶液中, 使其最终浓度为 10 μmol·L⁻¹。以此溶液室温孵育 HeLa 细胞 30 min。去除探针溶液后再用不含金属的 PBS 溶液洗涤 3 次, 然后用激光共聚焦荧光显微镜进行造影。细胞外源锌的引入利用 ZnSO₄/吡啶硫酮(10 μmol·L⁻¹, 通过 PBS 稀释相应 5 mmol·L⁻¹ 储备液获得) 溶液孵育 30 min 完成, 随后再次进行荧光造影。造影完毕后, 细胞再用 50 μmol·L⁻¹ TPEN(由 TPEN 的浓储液通过 PBS 稀释得到) 处理 30 min 后, 再用 PBS 洗涤一次后进行造影。造影均在 Olympus IX81 激光共聚焦荧光显微镜上完成。激发波长为 543 nm, 成像通道为 560~590 nm。

2 结果与讨论

2.1 BDP-*m*-BPA 的 Zn²⁺ 荧光和吸收光谱滴定

荧光光谱测定发现自由 BDP-*m*-BPA 发射光谱显示 2 个以 575 和 660 nm 为中心的发射峰, 其中后一发射峰较宽。随化合物浓度的增大, 前一发射峰几乎不变, 而后一发射峰增强明显, 具有受激缔合发射峰的特点 (图 2), 在无 α-(4-羟基) 苯乙烯结构的 BODIPY 荧光团中无此发射峰, 显示该结构的引入促进了分子间的缔合作用。前一发射峰可指认为 BODIPY 母体的本征荧光发射。探针的激发光谱显示化合物具有多个激发峰, 其中以 527 nm 为中心的激发峰波长较长, 激发效率适中且不与发射干扰, 在后续光谱研究中被选为激发波长。该探针的本征发射峰较普通 BODIPY 荧光团红移了近 60 nm, 而受激缔合发射已靠近近红外发射窗口。激发和发射的向红变化, 这与 α-(4-羟基) 苯乙烯结构引入扩展了共轭体系、促进分子内 ICT 效应以及分子缔合有关^[26], 有利于降低造影中的自发荧光干扰和光毒性。另外本征发射的 Stokes 位移达到 53 nm, 也远大于普通 BODIPY 的 Stokes 位移(<20 nm)。对受激缔合发射来说 Stokes 位移更达到 133 nm。Stokes 位移的增大也有利于减少激发光的干扰。除了 300~450 nm 间若干个小的吸收峰外, BDP-*m*-BPA 的最大吸收峰出现在 596 nm, 相对摩尔吸光系数为 6.30×10⁴ L·mol⁻¹·cm⁻¹。该吸收带还存在一个位于 566 nm 的不明显的肩峰。BDP-*m*-BPA 在 596 nm 处的最大吸收峰可归属为 ICT 效应导致的吸收峰, 比

较一般 *meso*-苯基-1,3,5,7-四甲基取代的 BODIPY 的最大吸收(~500 nm)^[34], 探针将近 100 nm 的吸收峰红移同样可以认为源于 α-位的对羟基苯乙烯基取代增强了分子的 ICT 效应^[26,30]。

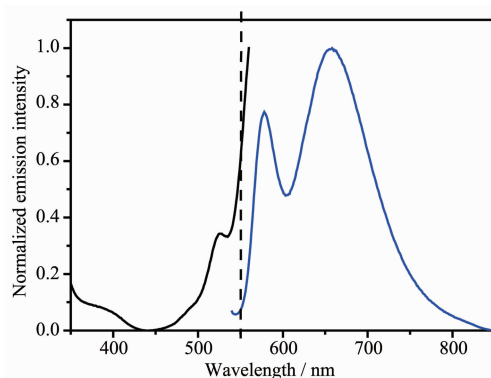
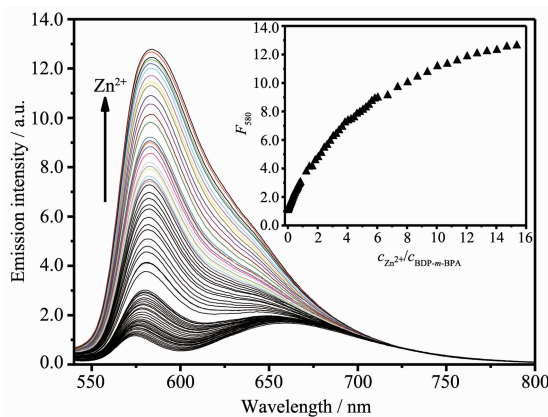


图 2 BDP-*m*-BPA(10 μmol·L⁻¹) 在 Tris-HCl 缓冲溶液 (20 mmol·L⁻¹, pH=7.20, V_{CH₃OH}:V_{H₂O}=1:1) 中的荧光激发(λ_{em}=580 nm)和发射光谱(λ_{ex}=527 nm)

Fig.2 Excitation (λ_{em}=580 nm) and emission (λ_{ex}=527 nm) spectra of BDP-*m*-BPA (10 μmol·L⁻¹) in Tris-HCl buffer (20 mmol·L⁻¹, pH=7.20, V_{CH₃OH}:V_{H₂O}=1:1)

在 Tris-HCl 溶液中的 Zn²⁺ 荧光滴定结果表明 (图 3), 不断加入 0.1 倍量的 Zn²⁺ 将导致 BDP-*m*-BPA 发射光谱中相对较弱的 575 nm 处的发射峰不断增强, 并且出现微小的红移。Zn²⁺ 的加入对其 ICT 发射峰影响不明显。Zn²⁺ 对本征发射峰和 ICT 发射峰的

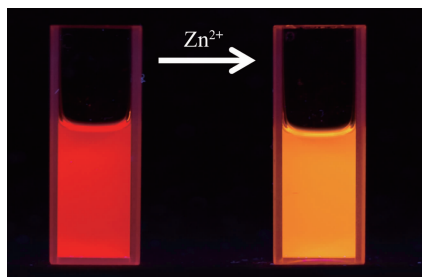


Inset is the titration profile according the emission at 580 nm; λ_{em}=527 nm

图 3 BDP-*m*-BPA(10 μmol·L⁻¹) 在 Tris-HCl 缓冲溶液 (20 mmol·L⁻¹, pH=7.20, V_{C₆H₅OH}:V_{H₂O}=1:1) 中的荧光滴定图谱

Fig.3 Emission spectra of BDP-*m*-BPA (10 μmol·L⁻¹) obtained upon Zn²⁺ titration in Tris-HCl buffer (20 mmol·L⁻¹, pH=7.20, V_{C₆H₅OH}:V_{H₂O}=1:1)

不同影响显示该化合物对 Zn^{2+} 有一定的比例计量响应行为。然而 Zn^{2+} 加入量较大时本征发射峰增强后会导致与 ICT 发射峰明显交叠,使得后者逐渐成为不明显的肩峰,因此比例计量效应受到干扰,探针主要体现 Zn^{2+} 增强响应。根据 580 nm 处探针荧光强度给出的 Zn^{2+} 滴定曲线表明探针的荧光随着 Zn^{2+} 的加入持续增强,虽然荧光增长率在加入 6 倍探针量的 Zn^{2+} 后已较小,但未达平衡,这也表明 Zn^{2+} 与探针的结合能力不强。在紫外光照射下 BDP-*m*-BPA 溶液发出红色荧光,加入 6 倍探针量的 Zn^{2+} 之后溶液立即转为发出黄色荧光,这一现象也表明探针分子对 Zn^{2+} 的荧光识别可以通过肉眼观察来实现(图 4)。研究表明探针分子在 527 nm 光源激发下的量子产率为 0.023,而加入 6 倍 Zn^{2+} 后可导致 BDP-*m*-BPA 的量子产率升高到约为 0.16。



Left: BDP-*m*-BPA; right: BDP-*m*-BPA in the presence of 6 equiv Zn^{2+}

图 4 紫外灯照射下 BDP-*m*-BPA($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 在 Tris-HCl 缓冲溶液($20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH}=7.20$, $V_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}:V_{\text{H}_2\text{O}}=1:1$) 中对 Zn^{2+} 的荧光响应

Fig.4 Photograph of BDP-*m*-BPA ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in Tris-HCl buffer ($20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH}=7.20$, $V_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}:V_{\text{H}_2\text{O}}=1:1$) upon irradiation by UV lamp of 365 nm

Zn^{2+} 荧光滴定结果表明 BDP-*m*-BPA 与 Zn^{2+} 结合主要诱导本征发射强度的增强并逐渐覆盖基本不变的受激缔合发射峰, BDP-*m*-BPA 主要表现为荧光增强型探针。一般在 BODIPY 衍生物中, *meso*-位芳环与 BODIPY 荧光团既不共面也不共轭有关^[35], 因此 Zn^{2+} 离子与 *meso*-芳香氨基配位并不会影响探针分子的受激缔合作用。同时由于 *meso*-芳香氨基与 BODIPY 的隔离使得 BPA 螯合团对 BODIPY 存在 PET 淬灭效应, 因此 Zn^{2+} 导致的探针本征荧光发射增强应源于 BPA 与 Zn^{2+} 配位阻断 PET 效应。

紫外滴定实验表明 Zn^{2+} 的加入对 596 和 566 nm 两处的吸收峰仅有非常微小的影响(图 5)。由于 *meso*-位芳香取代基与 BODIPY 母体结构既不共面

也不参与共轭, 因此 Zn^{2+} 与 *meso*-苯环对位 BPA 配位不会明显影响 BODIPY 母体中的 ICT 效应。

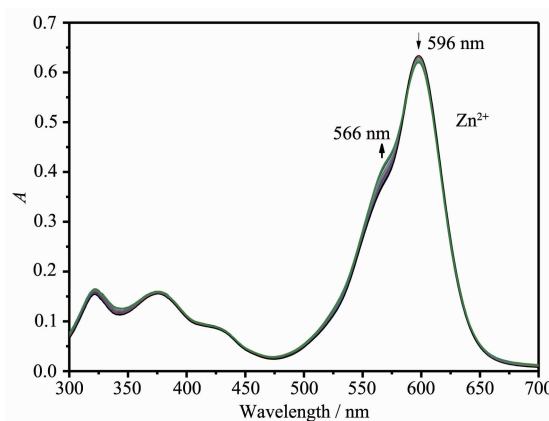


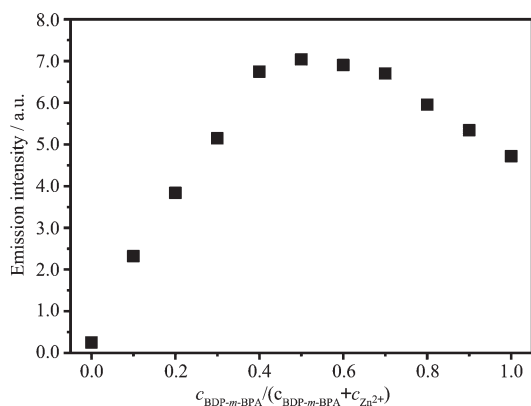
图 5 BDP-*m*-BPA($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 在 Tris-HCl 缓冲溶液($20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH}=7.20$, $V_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}:V_{\text{H}_2\text{O}}=1:1$) 中的紫外-可见吸收光谱滴定图

Fig.5 UV-Vis spectra of BDP-*m*-BPA ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) obtained upon Zn^{2+} titration in Tris-HCl buffer ($20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH}=7.20$, $V_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}:V_{\text{H}_2\text{O}}=1:1$)

2.2 BDP-*m*-BPA 与 Zn^{2+} 的结合方式

由于探针与 Zn^{2+} 的结合能力较弱, 不易通过简单的荧光滴定曲线获得 Zn^{2+} 结合比例的有效信息。实际研究中首先通过测定 Tris-HCl 缓冲溶液中 Zn^{2+} 与探针的荧光工作曲线来确定探针的 Zn^{2+} 结合比例。固定 BDP-*m*-BPA 和 Zn^{2+} 的总浓度为 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 通过改变 Zn^{2+} 与 BDP-*m*-BPA 的比例得到不同比值下体系的荧光光谱图(图 6)。根据 580 nm 处荧光强度得到的工作曲线显示荧光强度最大值出现在 Zn^{2+} 与总浓度比值为 0.5 处。这一结果表明 BDP-*m*-BPA 与 Zn^{2+} 是以 1:1 的计量比结合的。

研究同时还用电喷雾质谱对 BDP-*m*-BPA 与 Zn^{2+} 的配合物进行了研究。如图 7 所示, 等物质的量混合的 BDP-*m*-BPA 和 Zn^{2+} 混合液的正离子电喷雾质谱显示两个主要信号峰, 其最高丰度质荷比分别为 668.50 和 790.33。两信号的同位素分布模式分别与 ISOPRO 3.0 给出的物种 $[\text{BDP-}m\text{-BPA}]^+$ 和 $[\text{BDP-}m\text{-BPA}+\text{Zn}^{2+}+\text{AcO}]^+$ 的质谱同位素分布模式基本一致, 因此可将这两个质谱信号分别指认为这两个物种。该结果一方面证实探针 BDP-*m*-BPA 与 Zn^{2+} 是以 1:1 的计量比配位结合的, 另一方面虽然电喷雾质谱信号丰度不能完全对应溶液中的浓度, 但探针本身明显的质谱信号表明溶液中还存在较多的自由探针分子, 这也暗示探针与 Zn^{2+} 的结合能力一般。



Total concentration of sensor and Zn^{2+} was $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

图 6 根据 580 nm 处荧光强度测定的 BDP-*m*-BPA 与 Zn^{2+} 结合的工作曲线

Fig.6 Job plot of BDP-*m*-BPA- Zn^{2+} complex in Tris-HCl buffer ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.20; $V_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}:V_{\text{H}_2\text{O}}=1:1$) according to the emission at 580 nm upon excitation at 527 nm

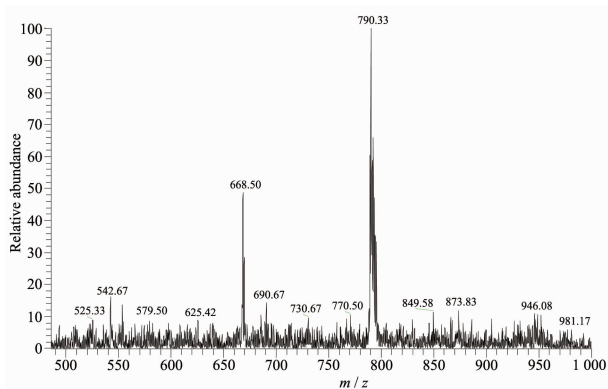


图 7 BDP-*m*-BPA 与 Zn^{2+} 1:1 混合液的电喷雾质谱图

Fig.7 ESI-MS spectrum of mixture solution of BDP-*m*-BPA and Zn^{2+} (1:1)

为测定 BDP-*m*-BPA 与 Zn^{2+} 的结合常数, 根据 580 nm 处的荧光强度研究中测定了探针结合 Zn^{2+} 的 Benesi-Hildebrand 图(图 8)。利用公式 1 对测得的 Benesi-Hildebrand 图进行线性拟合, 获得拟合直线的斜率和截距, 由此计算得到 K_a 值为 $\sim 5.4 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ($K_a, \sim 1.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。在已报道的以 BPA 为 Zn^{2+} 螯合团的 Zn^{2+} 探针中, 以荧光素为荧光团的 NG-PDX 的 K_d 值 $30 \sim 40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ [36], 以简单 BODIPY 为荧光团的 BDA 的 K_d 值为 $0.1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ [37], 以七甲川菁为荧光团的 DPA-Cy 的 K_d 值为 $60 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ [18]。显然不同的结构组合可以导致 BPA 螯合团具有不同的 Zn^{2+} 结合能力。与 BDA 探针(BPA 螯合团氨基氮原子直接连接在 *meso*-C 位) 相比, BDP-*m*-BPA 中 *meso*-位

苯环与 BPA 氨基氮共轭, 降低了其氨基的配位能力, 也导致了整个分子的 Zn^{2+} 结合能力降低。不过由于人体内不同环境的自由 Zn^{2+} 浓度范围较大, 从 $\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 一直跨到 $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ [1], 需要 Zn^{2+} 结合能力不同的探针来检测不同浓度的 Zn^{2+} , 而 BDP-*m*-BPA 正好可以满足 $\sim \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水平 Zn^{2+} 的检测。

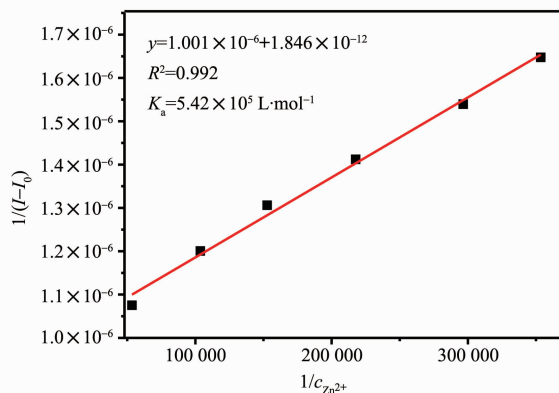


图 8 BDP-*m*-BPA 在 Tris-HCl 缓冲液中($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.20; $V_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}:V_{\text{H}_2\text{O}}=1:1$)结合 Zn^{2+} 的 Benesi-Hildebrand 图; 根据 580 nm 处荧光测定, 激发波长 527 nm

Fig.8 Benesi-Hildebrand plot of BDP-*m*-BPA binding Zn^{2+} in Tris-HCl buffer ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.20; $V_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}:V_{\text{H}_2\text{O}}=1:1$) according to the emission at 580 nm; $\lambda_{\text{ex}}=527 \text{ nm}$

2.3 BDP-*m*-BPA 对不同金属离子的荧光响应

BDP-*m*-BPA 对不同金属离子的荧光选择性响应能力如图 9 所示。除 Zn^{2+} (6 equiv) 对 BODIPY 本征发射峰有明显的荧光增强响应外, 同族 Cd^{2+} 和 Hg^{2+} (6 equiv) 的荧光增强响应非常微弱, 而其他测试金属离子 Pb^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cr^{3+} 、 Ag^+ (6 equiv each) 以及 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} (200 equiv each) 均对探针的荧光光谱无明显影响。 Cu^{2+} 仅显示对受激缔合发射峰的淬灭效应, 对本征发射峰无明显影响。这些结果表明该探针对 Zn^{2+} 具有较好的特异性增强响应能力。

为研究 BDP-*m*-BPA 在复杂环境中对 Zn^{2+} 的荧光检测的能力, 我们还测试了在其他金属离子存在时探针对 Zn^{2+} 的增强响应能力。结果发现共存金属离子如 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cr^{3+} 、 Ag^+ (6 equiv each) 以及 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} (200 equiv each, 图 10 中 mix) 均对探针的 Zn^{2+} 荧光增强响应无明显干扰。 Cu^{2+} 的存在导致 Zn^{2+} 诱导的荧光增强效应很小, 这可能是由于 Cu^{2+} 与 BPA 的结合能力较强, Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 共存时 Zn^{2+} 与探针分子的 BPA 难以有效结合。以上结

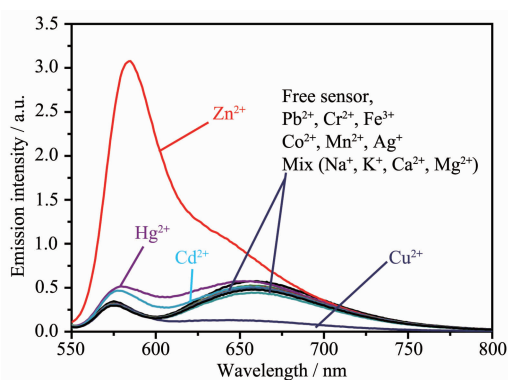


图 9 BDP-*m*-BPA($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)在 Tris-HCl 缓冲溶液 ($20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH}=7.20$, $V_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}:V_{\text{H}_2\text{O}}=1:1$)中对不同金属离子的荧光响应; Zn^{2+} 、 Ag^+ 、 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cr^{3+} 、 Hg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 各自量是探针的 6 倍, Mix 是指 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 混合加入, 其中各离子的量为探针的 200 倍, $\lambda_{\text{ex}}=527 \text{ nm}$

Fig.9 Emission spectra of BDP-*m*-BPA ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in Tris-HCl buffer ($20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH}=7.20$, $V_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}:V_{\text{H}_2\text{O}}=1:1$) in the presence of different metal cations; $\lambda_{\text{ex}}=527 \text{ nm}$

果表明 BDP-*m*-BPA 可以在含水溶液环境中对 Zn^{2+} 实现荧光选择性响应。由于生命体系中“自由” Cu^{2+} 的浓度远低于“自由” Zn^{2+} 浓度, 因此造影中不会对 Zn^{2+} 检测造成明显的干扰。

低浓度下 ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的锌离子荧光滴定实验表明 BDP-*m*-BPA 在 Tris-HCl 缓冲溶液中对 Zn^{2+} 的检测限 (LOD) 为 $0.18 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 其线性检测范围为 $0.12\sim 1.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。由于人体自由锌离子浓度范围为 $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 到 $0.3 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 目前显示的检测性能表明探针 BDP-*m*-BPA 具有合适的灵敏度和良好的线性响应范围, 适合于 $\sim \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水平自由 Zn^{2+} 的检测。

2.4 BDP-*m*-BPA 荧光对 pH 的依赖性

为探讨 BDP-*m*-BPA 在生物造影中的适用性, 我们还进一步研究了其荧光对 pH 的依赖性。为此分别测定了探针在不同 pH 值的 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, V/V) 混合溶液中的荧光强度。图 11(a) 显示了探针在不同 pH 介质中在 580 nm 处荧光强度。BDP-*m*-BPA 在 $\text{pH} 7.0\sim 12.4$ 范围内荧光强度较弱也比较稳定。当 $\text{pH}<7.0$ 时, 探针的荧光随 pH 降低略有增强, 然而在 $\text{pH} 6.0$ 以上 pH 对荧光的影响仍然较小。在 $\text{pH} 6.0$ 以下 pH 降低诱导的荧光逐渐变得明显, 表明 BPA 氨基质子化导致 BPA 对 BODIPY 荧光母体的 PET 淬灭效应被阻止。上述 pH 荧光响应行为表明

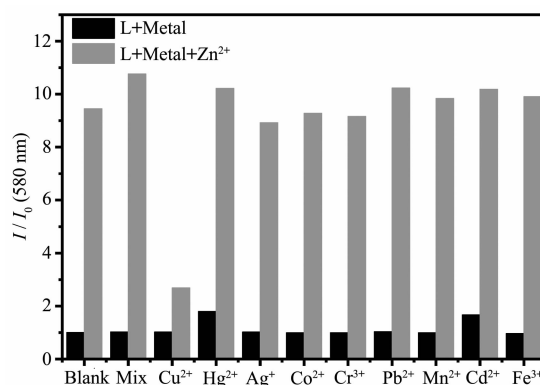


图 10 金属离子共存时 Tris-HCl 缓冲溶液 ($20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH}=7.20$, $V_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}:V_{\text{H}_2\text{O}}=1:1$) 中 BDP-*m*-BPA ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对 Zn^{2+} 的增强响应; Zn^{2+} 、 Ag^+ 、 Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Co^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cr^{3+} 、 Hg^{2+} 、 Mn^{2+} 的含量是探针的 6 倍, Mix 是指 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 混合加入, 各自含量分别是探针的 200 倍; I_{580} , 580 nm 处荧光强度。黑色为探针加标记金属离子时数据, 灰色为探针加标记金属和 Zn^{2+} 时数据; Blank 指探针及其加 Zn^{2+} 时数据

Fig.10 Fluorescent response of BDP-*m*-BPA ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in Tris-HCl buffer ($20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{pH} 7.20$; $V_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}:V_{\text{H}_2\text{O}}=1:1$) to Zn^{2+} in the presence of other metal cations; Final concentration for Zn^{2+} , Ag^+ , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{3+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} is $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ each, for Mix, Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , and Mg^{2+} were added simultaneously and the final concentration for each is $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; I_{580} , emission at 580 nm; black bar, data in the presence of the indicated metal cation; gray bar, data in the presence of Zn^{2+} and the indicated metal cation; Blank, the data for free sensor and sensor in the presence of Zn^{2+}

该探针是一个 PET 探针, 低 pH 值下氨基质子化诱导荧光增强是 PET 探针的典型表现^[27]。正是 BDP-*m*-BPA 探针的 PET 型响应特点导致 Zn^{2+} 配位的荧光增强效应。BDP-*m*-BPA/ Zn^{2+} 配合物在不同 pH 条件下的荧光测定 (图 11b) 表明该配合物在 $\text{pH} 6.33\sim 7.62$ 范围内显示相对稳定的荧光增强效应, pH 高于或低于该范围则荧光强度迅速降低。由于在近中性条件下探针荧光及其 Zn^{2+} 增强效应无 pH 依赖性。而生命体内大多数微环境的 pH 值不会偏离中性太多, 因此在多数细胞和生物体微环境中 BDP-*m*-BPA 将显示稳定的荧光, 不会干扰其 Zn^{2+} 响应, 因此 BDP-*m*-BPA 应较为适于细胞造影应用。

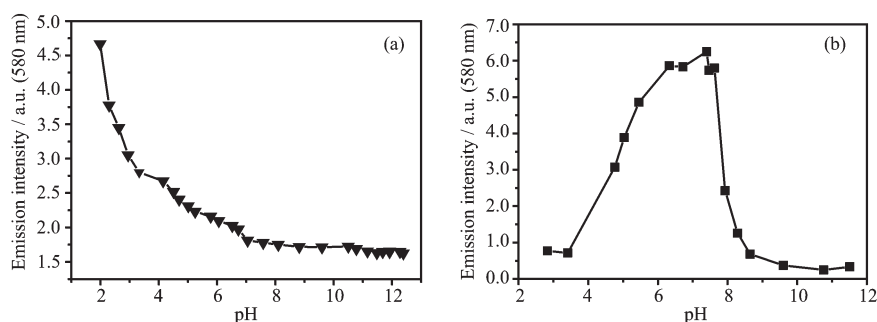
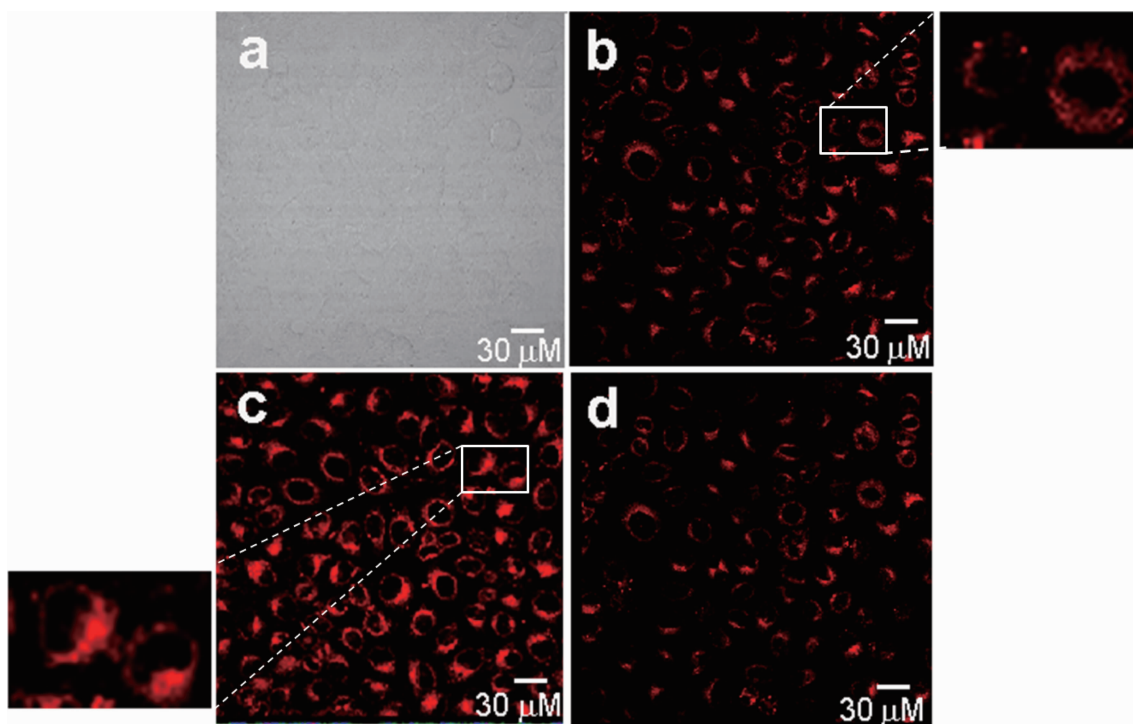


图 11 (a) BDP-*m*-BPA($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和(b) BDP-*m*-BPA/ Zn^{2+} 配合物($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)在 580 nm 处荧光强度随 pH 变化图($V_{\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}}:V_{\text{H}_2\text{O}}=1:1$); 激发波长为 527 nm

Fig.11 Fluorescent pH titration profile according to the fluorescence intensity at 580nm; λ_{ex} , 527 nm



(a) Bright-field transmission image of the stained cells; (b) fluorescence image of the stained cells; (c) fluorescence image of the cells in (b) treated further by ZnSO_4 /pyrithione incubation ($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ in PBS, 1:1, 25 °C, 30 min); (d) fluorescence image of the cells in (c) treated further by TPEN incubation ($50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ in PBS, 25 °C, 30 min); λ_{ex} , 543 nm

图 12 BDP-*m*-BPA 染色的 HeLa 细胞的激光共聚焦造影图; 经 BDP-*m*-BPA 染色($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ in PBS, 25 °C, 30 min)的细胞明场图

Fig.12 Confocal fluorescence imaging of living HeLa cells stained by BDP-*m*-BPA ($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ in PBS, 25 °C, 30 min)

2.5 BDP-*m*-BPA 对细胞内 Zn^{2+} 的造影性能

通过对探针染色的 HeLa 细胞进行激光共聚焦荧光成像进一步研究了 BDP-*m*-BPA 对细胞内 Zn^{2+} 的造影能力。造影选用单通道模式完成, 激发波长为 543 nm, 成像通道为 560~590 nm。将 HeLa 细胞在 BDP-*m*-BPA 溶液中($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)中 25 °C 下孵育 30 min, 以 PBS 洗去探针溶液进行细胞造影(图 12b)。荧光图像显示在细胞浆中存在点状分布的荧光区域,

一些靠近细胞核的区域具有更高强度的荧光。细胞核中未见明显的荧光分布。未经探针染色的细胞无论是胞浆还是细胞核中均未见明显的荧光分布。这表明 BDP-*m*-BPA 探针具有良好的细胞膜透过能力, $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 溶液 25 °C 孵育 30 min 可以有效实现细胞的染色。为确认探针在细胞中对 Zn^{2+} 的增强响应, 随后分别研究了染色细胞在导入外源 Zn^{2+} 和脱除 Zn^{2+} 时的造影效果。外源 Zn^{2+} 的导入是利用

ZnSO_4 /吡啶硫酮(1:1, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)溶液对染色细胞进行进一步孵化(30 min)实现的^[38]。造影发现胞浆中荧光发生明显增强(图 12c),表明胞浆中探针分子可有效对胞浆中 Zn^{2+} 水平的提高做出响应。荧光图片还显示细胞核中仍未有明显荧光分布,而已有研究表明 ZnSO_4 /吡啶硫酮孵育可以有效提高 HeLa 细胞核内的自由 Zn^{2+} 水平^[39],因此 ZnSO_4 /吡啶硫酮孵育后核中无荧光表明 BDP-*m*-BPA 探针在核中没有分布。负载有外源 Zn^{2+} 的 HeLa 细胞的 Zn^{2+} 脱除是利用具有胞内金属离子螯合能力的 TPEN 孵育完成的。荧光造影发现胞浆中荧光相比图 12c 中荧光明显降低(图 12d),总体荧光强度甚至略低于图 12b 中胞浆中荧光强度。这一结果不仅表明 TPEN 可有效降低胞浆中的自由 Zn^{2+} 水平,同时也表明 BDP-*m*-BPA 在胞浆中可以实现对 Zn^{2+} 的可逆响应。

3 结 论

本文通过在 BODIPY 荧光团的 *meso*-位引入 Zn^{2+} 螯合团和 α -位引入(4-羟基)苯乙烯基构建了一个增强型 Zn^{2+} 荧光探针 BDP-*m*-BPA。探针分子显示了特异性的 Zn^{2+} 荧光增强响应,可在 $0.12 \sim 1.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内线性响应 Zn^{2+} 。与普通 BODIPY 类探针相比其激发和发射均出现了明显的红移(激发红移近 $\sim 30 \text{ nm}$,发射红移 $\sim 70 \text{ nm}$),同时 Stokes 位移达到 $\sim 50 \text{ nm}$ (本征发射),有利于降低造影中的自发荧光干扰和光毒性,尤其有助于降低普通 BODIPY 类探针由于 Stokes 位移小造成的激发干扰。荧光共聚焦造影表明 BDP-*m*-BPA 具有良好的细胞膜通透性,可对胞浆中自由 Zn^{2+} 水平的变化实现可逆跟踪。本研究不仅发展了一个新的 BODIPY 类 Zn^{2+} 荧光探针,而且表明 α -(4-推电子基)苯乙烯取代是增强分子 ICT 效应实现探针激发/发射波长向红移动和增大 Stokes 位移的有效手段,有望进一步扩大 BODIPY 类荧光探针的应用。

参考文献:

- [1] Que E L, Domaille D W, Chang C J. *Chem. Rev.*, **2008**,**108**: 1517-1549
- [2] Vallee B L, Falchuk K H. *Physiol. Rev.*, **1993**,**73**:79-118
- [3] Watt N T, Whitehouse I J, Hooper N M. *J. Alzheimers Dis.*, **2010**,**2011**:971021-971031
- [4] Jayawardena R, Ranasinghe P, Galappaththy P, et al. *Diabetol. Metab. Syndr.*, **2012**,**4**:13-24
- [5] Ho E, Song Y. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **2009**,**12**: 640-645
- [6] Jiang P, Guo Z. *Coordin. Chem. Rev.*, **2004**,**248**:205-229
- [7] (a)Frederickson C J, Kasarskis E J, Ringo D, et al. *J. Neurosci. Methods*, **1987**,**20**:91-103
- (b)Nasir M S, Fahrni C J, Suhy D A, et al. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **1999**,**4**:775-783
- (c)Hendrickson K M, Geue J P, Wyness O, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**,**125**:3889-3895
- [8] (a)Walkup G K, Burdette S C, Lippard S J, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**,**122**:5644-5645
- (b)Burdette S C, Walkup G K, Spingler B, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**,**123**:7831-7841
- (c)Chang C J, Nolan E M, Jaworski J, et al. *J. Chem. Biol.*, **2004**,**11**:203-210
- (d)Burdette S C, Frederickson C J, Bu W, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**,**125**:1778-1787
- (e)Frederickson C J, Burdette S C, Frederickson C J, et al. *J. Neurosci. Methods*, **2004**,**139**:79-89
- (f)Nolan E M, Burdette S C, Harvey J H, et al. *Inorg. Chem.*, **2004**,**43**:2624-2635
- (g)Chang C J, Nolan E M, Jaworski J, et al. *Inorg. Chem.*, **2004**,**43**:6774-6779
- (h)Woodroffe C C, Masalha R, Barnes K R, et al. *Chem. Biol.*, **2004**,**11**:1659-1666
- (i)Nolan E M, Jaworski J, Racine M E, et al. *Inorg. Chem.*, **2006**,**45**:9748-9757
- [9] (a)Hirano T, Kikuchi K, Nagano T. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, **122**:12399-12400
- (b)Hirano T, Kikuchi K, Nagano T. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, **124**:6555-6562
- (c)Komatsu K, Kikuchi K, Kojima H, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**,**127**:10197-10204
- [10] Hirano T, Kikuchi K, Urano Y, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**,**122**:12399-12400
- [11]Hirano T, Kikuchi K, Urano Y, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**,**39**:1052-1054
- [12]Parkesh R, Clive Lee T, Gunnlaugsson T. *Org. Biomol. Chem.*, **2007**,**5**:310-317
- [13]Kim S Y, Hong J I. *Tetrahedron Lett.*, **2009**,**50**:2822-2824
- [14]Zhao L Y, Mi Q L, Wang G K, et al. *Tetrahedron Lett.*, **2013**,**54**:3353-3358
- [15]Mizukami S, Okada S, Kimura S, et al. *Inorg. Chem.*, **2009**, **48**:7630-7638
- [16]Li J, Zhang C F, Ming Z Z, et al. *Tetrahedron*, **2013**,**69**:4743-4748

- [17]Guo Z, Kim G H, Shin I, et al. *Biomaterials*, **2012**,**33**:7818-7827
- [18]Tang B, Huang H, Xu K, et al. *Chem. Commun.*, **2006**:3609-3611
- [19]Sasaki H, Hanaoka K, Urano Y, et al. *Bioorg. Med. Chem.*, **2011**,**19**:1072-1078
- [20]Du P, Lippard S J. *Inorg. Chem.*, **2010**,**49**:10753-10755
- [21]Sivaraman G, Anand T, Chellappa D. *Analyst*, **2012**,**137**:5881-5884
- [22]Cao J, Zhao C, Wang X, et al. *Chem. Commun.*, **2012**,**48**:9897-9899
- [23]Zhu S, Zhang J, Janjanam J, et al. *J. Mater. Chem. B*, **2013**,**1**:1722
- [24]Zhang S, Wu T, Fan J, et al. *Org. Biomol. Chem.*, **2013**,**11**:555-558
- [25]TIAN Mao-Zhong(田茂忠), PENG Xiao-Jun(彭孝军), FAN Jiang-Li(樊江莉). *Chin. J. Anal. Chem.*(分析化学), **2006**,**34**:S283-S288
- [26]Rurack K, Kollmannsberger M, Daub J. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**,**40**:385-387
- [27]Qian F, Zhang C L, Zhang Y M, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**,**131**:1460-1468
- [28]Ashokkumar P, Ramakrishnan V T, Ramamurthy P. *J. Phys. Chem. A*, **2011**,**115**:14292-14299
- [29]Peng X J, Du J J, Fan J L, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**,**129**:1500-1501
- [30]Bozdemir O A, Guliyev R, Buyukcakil O, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**,**132**:8029-8036
- [31]Dalpozzo R, De Nino A, Maiuolo L, et al. *Aust. J. Chem.*, **2007**,**60**:75-79
- [32]Dutta B, Bag P, Florke U, et al. *Inorg. Chem.*, **2005**,**44**:147-157
- [33]Chou C Y, Liu S R, Wu S P. *Analyst*, **2013**,**138**:3264-3270
- [34]Gibbs J H, Robins L T, Zhou Z, et al. *Bioorgan. Med. Chem.*, **2013**,**21**:5770-5781
- [35]Loudet A, Burgess K. *Chem. Rev.*, **2007**,**107**:4891-4932
- [36]Gee K R, Zhou Z L, Ton-That D, et al. *Cell Calcium*, **2002**,**31**:245-251
- [37]Wu Y K, Peng X J, Guo B C, et al. *Org. Biomol. Chem.*, **2005**,**3**:1387-1392
- [38]Liu Z, Zhang C, Chen Y, et al. *Chem. Commun.*, **2012**,**48**:8365-8367
- [39]Zhang C, Liu Z, Li Y, et al. *Chem. Commun.*, **2013**,**49**:11430-11432