

## 一种用于活体细胞 $\text{Zn}^{2+}$ 检测的高灵敏度比例计量荧光探针

张长丽\* 徐 鉴 黄 芳 赵海荣 陈昌云

(南京晓庄学院环境科学学院, 新型功能材料南京市重点实验室, 南京 211171)

**摘要:** 无论是在水溶液还是乙腈溶液中, 2-PBI(2-(2'-吡啶基)苯并咪唑)的发射光谱都表现出一定的红移, 但由于该分子对  $\text{Zn}^{2+}$  低的结合能力以及多变的配位比例, 2-PBI 不能作为一个比例计量型的  $\text{Zn}^{2+}$  荧光探针。本研究通过在 2-PBI 的 5 位引入推电子基团 *N,N*-二甲基, 增加探针的配位原子数同时促进探针的 ICT 效应, 设计合成比例计量型  $\text{Zn}^{2+}$  荧光探针 **DBITA**。实验结果表明, 除了 172 nm 的大斯托克斯位移外, **DBITA** 还表现出特定的  $\text{Zn}^{2+}$  诱导的红移, 发射波长从 534 nm 红移到 609 nm, **DBITA** 与  $\text{Zn}^{2+}$  以 1:1 比例结合。此外, **DBITA** 对  $\text{Zn}^{2+}$  表现出极高的亲和力, 配合物 **DBITA**/ $\text{Zn}^{2+}$  结合的  $K_d$  值为  $0.16 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在 HeLa 细胞中, **DBITA** 完成了细胞内的  $\text{Zn}^{2+}$  的定量造影。

**关键词:** 锌离子; 荧光探针; 比例计量; 定量; 细胞造影

中图分类号: O614.14<sup>1</sup>

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2020)01-0097-09

DOI: 10.11862/CJIC.2020.009

## A Highly Sensitive Ratiometric Fluorescence Probe for $\text{Zn}^{2+}$ Detection in Living Cells

ZHANG Chang-Li\* XU Jian HUANG Fang ZHAO Hai-Rong CHEN Chang-Yun

(School of Environmental Science, Key Laboratory of Advanced Functional Materials of Nanjing,  
Nanjing Xiaozhuang University, Nanjing 211171, China)

**Abstract:** The emission spectra of 2-PBI (2-(2'-pyridyl) benzimidazole) show a red shift at a specific wavelength in both aqueous and acetonitrile solutions. However, 2-PBI cannot be used as ratiometric fluorescent probe for  $\text{Zn}^{2+}$  because of its low binding ability and variable coordination ratio to  $\text{Zn}^{2+}$ . In this study, in order to add coordination atoms and promote the ICT effect of the probe by introducing *N,N*-dimethyl group at its 5-position of 2-PBI, design and synthesize a new ratiometric  $\text{Zn}^{2+}$  fluorescent probe **DBITA**. The results show that, besides large Stokes shift of 172 nm, **DBITA** exhibits the specific  $\text{Zn}^{2+}$ -induced emission red-shift from 534 nm to 609 nm. **DBITA** combines with  $\text{Zn}^{2+}$  as 1:1 binding ratio. Moreover, **DBITA** displays the extremely high affinity toward  $\text{Zn}^{2+}$  of  $0.16 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ . In HeLa cells, **DBITA** can be used to quantitatively detect intracellular  $\text{Zn}^{2+}$ .

**Keywords:** zinc ions; fluorescence probe; ratiometric; quantitative; cell imaging

过渡金属在生命体系中是一个矛盾的存在, 一方面这些金属在许多蛋白质中担任必需的辅因子, 另一方面游离的或者水合形式的过渡金属具有一定毒性。 $\text{Zn}^{2+}$  是许多参与水解和基团转移反应酶中的一种辅因子<sup>[1]</sup>, 也为蛋白质(如转录因子)提供了结构稳定性<sup>[2-3]</sup>, 并被认为是神经传递中的一种信号分子。

然而, 不稳定的  $\text{Zn}^{2+}$  会干扰许多生物过程, 如缺血或癫痫发作后以及头部损伤后锌稳态被破坏, 不稳定的  $\text{Zn}^{2+}$  增加从而导致神经损伤<sup>[4-6]</sup>, 由锌摄入不足是导致肠肢端皮炎重要原因<sup>[7]</sup>, 因此在生命体系中  $\text{Zn}^{2+}$  被要求维持在低游离浓度<sup>[8-9]</sup>。为了更好地了解锌在生物系统中的作用, 实时监测细胞中不稳定锌的分

收稿日期: 2019-06-27。收修改稿日期: 2019-10-26。

国家自然科学基金(No.21401106)和江苏省自然科学基金(No.20140090)资助项目。

\*通信联系人。E-mail: carbon314@163.com

布和浓度是非常重要的。

光致发光技术以其高灵敏度、高选择性、高时空分辨率被认为是检测  $\text{Zn}^{2+}$  最有效的手段之一。在过去的几十年中,人们报道了大量具有不同特性的光致发光  $\text{Zn}^{2+}$  探针<sup>[10-16]</sup>。尤其是比例计量型探针,可以避免光散射和探针浓度引起的伪影,达到定量检测活体样本中  $\text{Zn}^{2+}$  目的。广泛应用于构建比例计量探针的机理有光诱导电荷转移(PCT)<sup>[17-25]</sup>、荧光共振能量转移(FRET)<sup>[26-35]</sup>、金属离子配位抑制激发态分子内质子转移(ESIPT)<sup>[36-43]</sup>、荧光团互变异构<sup>[44-45]</sup>和双荧光团方法<sup>[46-48]</sup>等。

除了上述一些机理以外,利用  $\text{Zn}^{2+}$  配位诱导芳环共面化引起分子荧光光谱的改变这一特性<sup>[49]</sup>设计  $\text{Zn}^{2+}$  比例计量型荧光探针。基于此机理,Ajayaghosh 等构建了含 5,5'-二乙烯基-2,2'-联吡啶衍生物的比例  $\text{Zn}^{2+}$  探针,该探针与  $\text{Zn}^{2+}$  配位后, $\text{Zn}^{2+}$  诱导的芳香共平面增加了荧光分子的共轭,导致发射波长红移<sup>[50]</sup>。该小组后来又设计多个  $\text{Zn}^{2+}$  探针,进一步证明了这一结论<sup>[51-53]</sup>。然而,基于这一机制构造的比例计量型探针很少<sup>[54-56]</sup>。我们课题组基于此机理设计  $\text{Zn}^{2+}$  荧光探针 PBITA,其分子模型研究表明, $\text{Zn}^{2+}$  诱导的 PBITA 的红光发射位移可能与 2-PBI 的 2 个异芳族平面的共面有关<sup>[57]</sup>。虽然 PBITA 的发射在与  $\text{Zn}^{2+}$  结合后呈现 38 nm 的红移,但  $\text{Zn}^{2+}$  诱导的荧光增强完全覆盖了自由 PBITA 的发射。因此,PBITA 更被认为是一个增强型的  $\text{Zn}^{2+}$  探针。为了进一步证实该机理,将探针 PBITA 进行修饰,研制了新的  $\text{Zn}^{2+}$  探针 DBITA。在 DBITA 中,在 PBI 的 5-位修饰供电子基  $N,N$ -二甲基,通过分子内电荷转移促进探针的 ICT (intramolecular charge transfer, ICT) 效应,一方面使新  $\text{Zn}^{2+}$ /探针配合物发生较长波长的红移,探针在与  $\text{Zn}^{2+}$  结合前后显示出 2 个发射带,并成为真正的比例计量型  $\text{Zn}^{2+}$  探针;另一方面,提高探针本身的发光效率,有利于 DBITA 在生物体系中的应用。

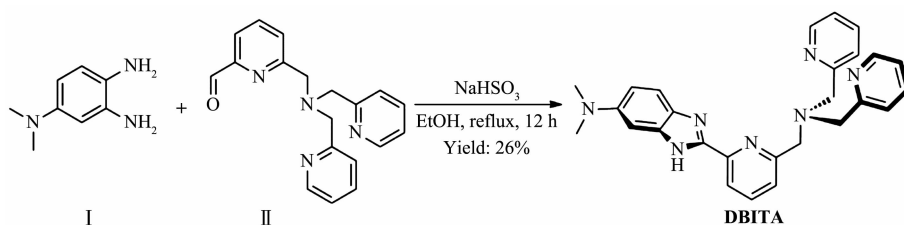
## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

$\text{KNO}_3$ ,  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ , HEPES (2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethanesulfonic acid), EGTA (ethylenedis(oxyethylenenitrilo)tetraacetic acid), 2,6-二羟甲基吡啶和 5-氯-2-硝基苯胺购自 Alfa 公司。常用药品(如邻苯二胺,三乙胺,对甲基苯磺酰氯,酸碱,常规溶剂如甲醇、氯仿、乙酸乙酯、乙醇等)均为市售国产试剂,使用前未做进一步纯化。乙腈分别经  $\text{P}_2\text{O}_5$  回流,无水  $\text{K}_2\text{CO}_3$  干燥,  $\text{CaH}_2$  回流蒸出后使用。 $N,N$ -二甲基甲酰胺(DMF)、二氯甲烷和二甲基亚砜(DMSO)经  $\text{CaH}_2$  干燥后减压蒸出使用。四氢呋喃(THF)经钠/二苯甲酮回流蒸出后使用。二(2-甲基吡啶基)胺(BPA)参照文献方法合成<sup>[58]</sup>。光谱性质测试中,所用溶剂如 DMSO 等为光谱纯试剂,购自 Aldrich 公司,水为 MILIPORE 处理过的超纯水。电喷雾质谱用 LCQ 电喷雾质谱仪(ESMS, Finnigan)测定,并用 ISOPRO 3.0 程序模拟其同位素分布模式。 $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR 在 Bruker DRX-500 或 Bruker DRX-300 核磁仪上用标准脉冲序列测定(298 K)。紫外光谱在 Perkin-Elmer Lambda 35 紫外可见光谱仪上测定。荧光光谱在 AMINCO Bowman series 2 发光光谱仪上测定。pH 值用 PHS-3 精密 pH 计记录。紫外和荧光光谱数据用 Origin 软件包处理。

### 1.2 DBITA 的合成

化合物 I (4- $N,N$ -二甲氨基-邻苯二胺)和 II (二(2-吡啶甲基)(6-醛基-2-吡啶甲基)胺)根据文献方法合成<sup>[59-60]</sup>。DBITA 合成路线<sup>[61]</sup>见 Scheme 1。在装有搅拌磁子、恒压滴液漏斗和回流冷凝管的 100 mL 三颈烧瓶中加入新制的化合物 I (0.070 mg 0.46 mmol)、 $\text{NaHSO}_3$  (0.053 g, 0.51 mmol) 和乙醇(5 mL)。加热至回流,用恒压滴液漏斗缓慢向反应液中滴加化合物 II (0.156 mg, 0.46 mmol) 的乙醇溶液 10 mL, 20 min 滴加完毕。保持回流反应 12 h 后停止。减压蒸馏去除



Scheme 1 DBITA 合成线路图

Scheme 1 Synthesis of DBITA

溶剂,将所得油状物用  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  和水溶解,分出有机相,饱和  $\text{NaHCO}_3$  溶液和饱和食盐水洗涤,无水  $\text{MgSO}_4$  干燥,滤除干燥剂,减压蒸馏去除溶剂,柱层析分离(中性氧化铝,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \sim \text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}(200:1, V/V)$ )得产品 0.054 g, 收率 26%。棕黄色油状物,  $R_f=0.3$  ( $V_{\text{EtOAc}}:V_{\text{MeOH}}=20:1$ )。 $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.04 (s, 6H, -N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.91 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>), 4.03 (s, 4H, -CH<sub>2</sub>), 6.93 (s, 1H, BI-H), 7.23 (t, 2H,  $J=6.0$ , Py-H), 7.29 (d, 2H,  $J=7.5$ , Py-H), 7.66~7.78 (m, 6H, BI-H and Py-H), 8.20 (d, 1H,  $J=7.5$ , BI-H), 8.65 (d, 2H,  $J=4.5$ , Py-H)。 $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  41.56, 58.23, 59.90, 93.99, 111.16, 118.95, 119.22, 119.79, 122.17, 122.99, 123.43, 135.77, 136.52, 137.17, 148.09, 148.57, 148.74, 149.69, 156.93, 158.98。MALDI-TOF( $m/z$ ): Calcd. 450.23, Found: 450.4 for  $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。Element analysis(%) Calcd. for  $\text{C}_{27}\text{H}_{27}\text{N}_7$ : C, 72.14; H, 6.05; N, 21.81。Found: C, 72.89; H, 6.54; N, 21.03。

### 1.3 DBITA 的光谱性质测试

DBITA 用光谱纯 DMSO 配成  $1.18 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。取 DBITA 的 DMSO 储备液加入到 100 mL 的容量瓶中并用 HEPES 缓冲溶液( $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{KNO}_3$ , pH=7.2) 和 DMSO 定容, 配成浓度为  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的( $V_{\text{DMSO}}:V_{\text{HEPES}}=1:99$ )溶液, 然后分别进行紫外以及荧光光谱的测量。

DBITA 的  $\text{Zn}^{2+}$  紫外和荧光滴定实验在 DMSO- $\text{H}_2\text{O}$  (1:99,  $V/V$ ,  $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  HEPES,  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{KNO}_3$ , pH=7.20) 体系中进行, 紫外滴定参比溶液为空白的 DMSO- $\text{H}_2\text{O}$  溶液。向 3 mL DBITA ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的配体溶液中分别加入不同体积的  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  水溶液( $1.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 每次加 25  $\mu\text{L}$ , 充分混匀后进行紫外和荧光测试。

### 1.4 金属离子选择性实验

金属离子选择性及  $\text{Zn}^{2+}$  与碱金属、碱土金属的竞争性实验都在上述 DMSO- $\text{H}_2\text{O}$  体系中进行。实验中, 向 3 mL DBITA ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的溶液中加入 25  $\mu\text{L}$  浓度为  $1.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的金属离子水溶液, 使金属离子浓度与 DBITA 浓度相等, 充分混匀后进行测试。竞争性实验中, 向 3 mL DBITA ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的溶液中加入 25  $\mu\text{L}$  浓度为  $1.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  水溶液, 充分混匀后记录光谱。然后再向此溶液中分别加 30  $\mu\text{L}$  浓度为  $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的碱金属或碱土金属离子水溶液, 使溶液中碱金属或碱土金属的量达到  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 即  $\text{Zn}^{2+}$  浓度的 1 000 倍, 充分混匀后

再次记录光谱。

### 1.5 DBITA 对生物细胞内 $\text{Zn}^{2+}$ 的造影研究

造影实验中所用 HeLa 细胞在含有 10% 胚胎小牛血清(FBS, Invitrogen), 青霉素( $100 \text{ units} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和链霉素( $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, Invitrogen) 中,  $37^\circ\text{C}$ , 5%( $V/V$ )  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养。为了便于成像, HeLa 细胞培养在玻璃底的培养皿中。当去掉介质后, 细胞用不含金属的 PBS 溶液( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 洗涤 3 次, 加入  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DBITA 溶液在室温下孵育 20 min; 吸掉溶液, 再用 PBS 溶液洗涤 3 次, 然后用激光共聚焦荧光显微镜进行观测。细胞外源锌的引入通过在  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ /巯基吡啶硫酮(pyrrithone(2-mercaptopyridine-*N*-oxide)) 的 1:1 的 PBS 溶液( $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 中孵育 10 min, 用激光共聚焦荧光显微镜进行造影。造影完毕后, 细胞再用  $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  TPEN(由 TPEN 的浓储液通过 PBS 稀释得到)处理 20 min 后, 再用 PBS 洗涤一次后造影。

成像在 Olympus FV10-ASW 激光共聚焦荧光显微镜上完成。激发波长为 488 nm, 观察波长在 500~540 nm 和 580~620 nm 之间。

## 2 结果与讨论

### 2.1 DBITA 的光谱性质

为了便于比较, 将 PBITA 与 DBITA 光谱数据列于表 S1。紫外光谱实验结果表明, 与 PBITA 相比, 由于在 PBI 的 5 位引入供电子基团 *N,N*-二甲基, 使 DBITA 的最大吸收峰红移到 340 nm ( $\epsilon=1.3 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), 最大吸收峰归属于 DBITA 中苯并咪唑部分  $\pi-\pi^*$  跃迁引起的。荧光光谱中(图 S1), DBITA 在水溶液中的荧光较强, 荧光强度大约是 PBITA 的 3.5 倍, 量子产率为 0.18。其最大激发和发射波长为 362 和 534 nm, 与 PBITA 相比分别红移了约 26 和 149 nm。与 PBITA 类似, 在 DBITA 的激发以及发射光谱中除了最大激发和发射峰外, 在 392 和 493 nm 处还同时存在一个激发和发射峰。以上结果表明, 具有供电子作用的 *N,N*-二甲基的引入, 使 DBITA 的紫外及发射波长发生了红移, 量子产率大幅度提高, 达到了预期的设计目的。

### 2.2 DBITA 荧光对 pH 的依赖性

由于生命体内 pH 值不会偏离中性太多, 因此发射光谱在近中性条件下不随 pH 变化是  $\text{Zn}^{2+}$  荧光探针能够在生命体系的应用必要条件之一。检测了 pH 值对 DBITA 荧光发射谱的影响。实验在含 5

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  **DBITA** 的  $\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O}(1:99, \text{V}/\text{V})$  溶液中进行, 溶液 pH 值用  $5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{HNO}_3$  及  $5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{NaOH}$  水溶液调节。

如图 S2 所示, **PBITA** 的荧光发射光谱受 pH 的影响较大。而 **DBITA** 中 5 位 N 原子、吡啶以及苯并咪唑的 N 原子在酸性条件下都容易发生质子化, 减弱了分子的 ICT 效应, 所以 **DBITA** 的荧光发射强度在 pH 2~6 的范围内随酸性的增强荧光强度逐渐减弱, 并且在 pH 2~3 时发射波长会发生一定的红移。在 pH 6~10 的范围内 **DBITA** 的荧光强度受 pH 变化较小, 都体现出较强的荧光。这说明螯合团与荧光团之间的 PET 效应很弱, 即使 BPA 单元中的 N 原子质子化以后也不会使探针的荧光有明显增强, 这与 *N,N*-二甲基的推电子效应密切相关。随 pH 增大到 10 以上, 探针的荧光强度有所减弱, 这可能是由于咪唑脱质子后使 5 位的 *N,N*-二甲基到咪唑以及吡啶的推拉电子效应 (ICT 效应) 减弱导致的。结果表明, **DBITA** 则在近中性条件下荧光强度较为稳定, 具有适合应用于生命体内造影的潜力。

### 2.3 **DBITA** 与 $\text{Zn}^{2+}$ 的荧光响应行为

在 HEPES 溶液中的  $\text{Zn}^{2+}$  荧光滴定表明 (图 1a), 随着  $\text{Zn}^{2+}$  的加入, **DBITA** 在 493 和 534 nm 处的发

射峰逐渐降低, 同时在 609 nm 处出现一个新的发射峰, 并且荧光强度逐渐增强。当  $c(\text{Zn}^{2+})_{\text{total}}/c(\text{DBITA})$  的值达到 1 后, 2 个发射峰的荧光强度不再发生改变, 这说明  $\text{Zn}^{2+}$  与 **DBITA** 的方式结合为 1:1 结合。用 609 和 534 nm 处的荧光强度的比值 ( $F_{609}/F_{534}$ ) 与  $c(\text{Zn}^{2+})/c(\text{DBITA})$  作图可知,  $F_{609}/F_{534}$  比值与  $c(\text{Zn}^{2+})_{\text{total}}$  呈线性关系 (图 1a 插图), 比值大约从 0.3 增强到 1.5。由于 **DBITA** 存在由从推电子基团 *N,N*-二甲基到咪唑以及吡啶单元的 ICT 效应, 当 **DBITA** 与  $\text{Zn}^{2+}$  结合后, **PBI** 与  $\text{Zn}^{2+}$  配位后不仅会使芳环平面性增强, 共轭程度增加, 波长发生红移, 而且由于  $\text{Zn}^{2+}$  的拉电子作用导致拉电子单元拉电子能力增强, 使分子内的 ICT 效应进一步增强, 同样也会导致波长发生红移。这两种效应的叠加是导致 **DBITA** 与  $\text{Zn}^{2+}$  结合后波长红移要比 **PBITA** 与  $\text{Zn}^{2+}$  结合所导致的波长红移大的主要原因。另外, 在含 EGTA/ $\text{Zn}^{2+}$  的 HEPES 缓冲溶液中对 **DBITA** 的  $\text{Zn}^{2+}$  配合物的  $K_d$  值进行了测定。实验结果表明 **DBITA** 与  $\text{Zn}^{2+}$  的结合能力要远高于 **PBITA** (表 S1), 配合物 **DBITA**/ $\text{Zn}^{2+}$  的  $K_d$  值为  $0.16\text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (图 S3), 原因可能是因为 *N,N*-二甲基较强的供电子能力增强了咪唑 N 原子的配位能力。

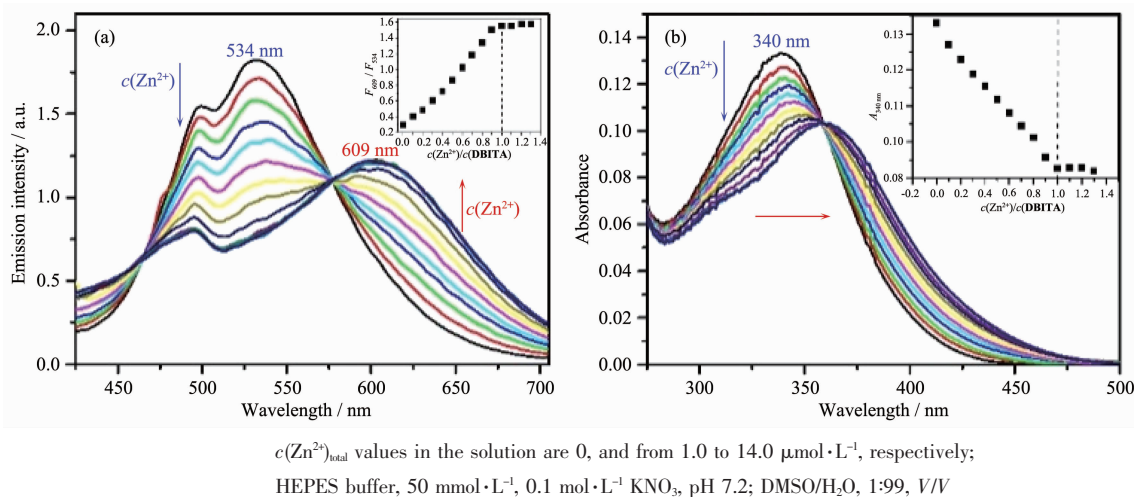


图 1  $\text{Zn}^{2+}$  对  $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  **DBITA** 在 HEPES 溶液中的荧光 (a) 和紫外 (b) 滴定光谱图; (a) 中插图为  $F_{609}/F_{534}$  滴定曲线, (b) 中插图为 340 nm 波长处的紫外滴定曲线

Fig.1 (a) Emission spectra of  $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  **DBITA** ( $\lambda_{\text{ex}}$ , 362 nm) in HEPES buffer solution; Inset in the titration profile based on the emission ratio at 609 and 543 nm,  $F_{609}/F_{543}$ ; (b) Absorption spectra of  $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  **DBITA** in HEPES buffer when titrated with  $\text{Zn}^{2+}$  ( $1.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) solution; Inset in  $\text{Zn}^{2+}$  titration profile according to the absorbance at 340 nm

### 2.4 **DBITA** 与 $\text{Zn}^{2+}$ 结合方式

#### 2.4.1 紫外滴定实验

进一步采用紫外滴定、核磁滴定和质谱研究了

**DBITA** 与  $\text{Zn}^{2+}$  结合方式。紫外滴定实验结果表明当在 **DBITA** 的 HEPES 溶液中滴加  $\text{Zn}^{2+}$  以后, **DBITA** 在 340 nm 处的吸收峰逐渐降低, 并伴随有明显的红

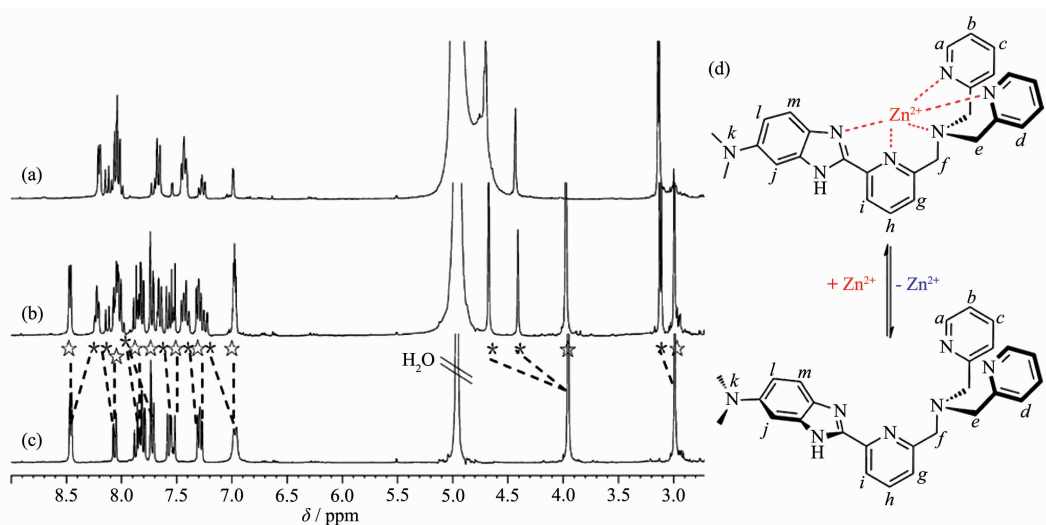
移,移动到 364 nm 处(图 1b)。PBITA 吸收峰的红移是  $\text{Zn}^{2+}$  诱导的芳环共面导致的结果。而对于 DBITA 来说,由于同时存在  $\text{Zn}^{2+}$  诱导的芳环共面以及 ICT 效应的改变,使其吸收峰的红移距离( $\Delta\lambda_{\text{abs}}=24$  nm)要大于 PBITA( $\Delta\lambda_{\text{abs}}=15$  nm)。DBITA 的滴定光谱中在 359 nm 处出现了等消光点,这表示自由配体已完全转化为一种锌的配合物。用 340 nm 处的吸收峰吸收强度对  $c(\text{Zn}^{2+})_{\text{total}}/c(\text{DBITA})$  作图可知:当  $c(\text{Zn}^{2+})_{\text{total}}/c(\text{DBITA}) \leq 1$  时,紫外吸光度的降低与总锌浓度呈线性关系;而当  $c(\text{Zn}^{2+})_{\text{total}}/c(\text{DBITA}) > 1$  时,更高的总锌浓度也不会再使光谱发生明显的改变。这表明所生成的  $\text{Zn}^{2+}$  配合物的化学计量比为 1:1。

#### 2.4.2 核磁滴定实验

$\text{Zn}^{2+}$  对 DBITA 的核磁滴定实验在  $\text{CD}_3\text{OD}$  体系

中进行。由图 2 可以看出,随着  $\text{Zn}^{2+}$  的加入,除了自由的 DBITA 的信号峰外(图 2c),还出现了另一组  $\text{Zn}^{2+}/\text{DBITA}$  配合物的信号峰。当  $c(\text{Zn}^{2+})_{\text{total}}/c(\text{DBITA}) = 0.5$  时,两组信号峰的强度基本相同(图 2b);然而其比值达到 1 时,则只能观察到  $\text{Zn}^{2+}$  配合物的信号峰(图 2a)。加入更多的  $\text{Zn}^{2+}$  也不会引起核磁谱的进一步变化。这同样也证实了 DBITA 与  $\text{Zn}^{2+}$  的结合比为 1:1。

详细的信号峰的指认结果列于表 S2。 $\text{Zn}^{2+}$  的配位使得探针的所有质子的信号都发生了改变,这表明吡啶环上的氮原子以及咪唑环的氮原子都可能参与了  $\text{Zn}^{2+}$  的直接配位。因此,我们推测  $\text{Zn}^{2+}$  与 DBITA 的结合模式可能如图 2d 所示。



(a) Spectrum obtained when the ratio of  $c(\text{Zn}^{2+})_{\text{total}}/c(\text{DBITA})$  is 1:1, (b) Spectrum obtained when the ratio of  $c(\text{Zn}^{2+})_{\text{total}}/c(\text{DBITA})$  equals 0.5:1, (c) Spectrum of free sensor, (d) The proposed  $\text{Zn}^{2+}$  binding mode; Signals marked with  $\star$  and  $\star\star$  are for the protons from free sensor and zinc-bound sensor, respectively

图 2  $\text{Zn}^{2+}$  对 DBITA 在  $\text{CD}_3\text{OD}$  中的  $^1\text{H}$  核磁滴定谱图

Fig.2  $^1\text{H}$  NMR spectra of DBITA in  $\text{CD}_3\text{OD}$  upon  $\text{Zn}^{2+}$  titration

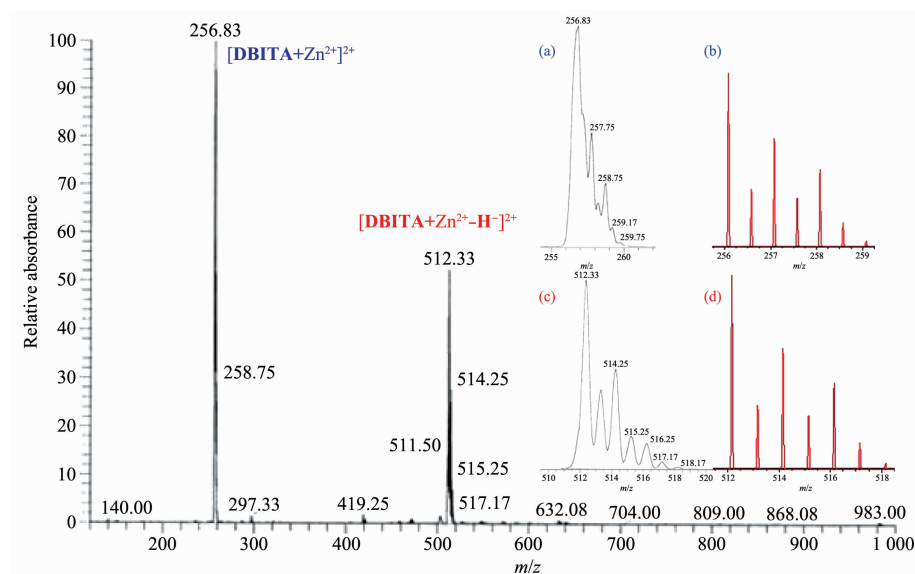
#### 2.4.3 配合物质谱研究

DBITA 的  $\text{Zn}^{2+}$  配合物的电喷雾质谱结果如图 3 所示,在 DBITA/ $\text{Zn}^{2+}$  配合物的正离子电喷雾质谱中可以观察到 2 个峰:256.83 处较低的峰为配合物的二价峰  $[\text{DBITA}+\text{Zn}^{2+}]^{2+}$ ;512.33 处的峰可以归属为配合物的一价峰  $[\text{DBITA}+\text{Zn}^{2+}-\text{H}]^+$ 。这些离子峰的同位素分布方式与 ISOPRO 3.0 模拟的结果基本一致,这进一步表明了 DBITA 与  $\text{Zn}^{2+}$  结合方式为 1:1 结合。

#### 2.5 DBITA 与 $\text{Zn}^{2+}$ 结合的选择性研究

对金属离子的选择性荧光响应是一个合格探针所必须具有的重要的光学性质。因此我们在 DMSO-

$\text{H}_2\text{O}$  体系中对 DBITA 与  $\text{Zn}^{2+}$  结合的选择性进行了研究。实验结果(图 4a)表明,在生命体相关的金属离子存在下,DBITA 对  $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Cd}^{2+}$  有较好的选择性比例计量响应( $F_{609}/F_{534}$ ),其它的金属阳离子,如等浓度的  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{CO}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  以及 1 000 倍的碱金属和碱土金属离子等都对配体荧光强度无明显影响。由各种离子存在下 DBITA 在 609 和 534 nm 处的荧光强度的比值可知, $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Cd}^{2+}$  在 2 个波长下强度的比值都在 1.6 左右,而其余金属离子的比值都在 0.3 左右,因此 DBITA 对  $\text{Zn}^{2+}$  的比例计量行为不会受到除  $\text{Cd}^{2+}$  外其他金属离子的干扰。以上



Determined isotopic distribution patterns of the peaks with  $m/z$  of 256.83 and 512.33 are shown as insets (a) and (c); Corresponding simulated ones for  $[M+Zn^{2+}]^{2+}$  and  $[M+Zn^{2+}-H]^{2+}$  are shown as insets (b) and (d)

图 3 DBITA/ $Zn^{2+}$ 配合物的正离子电喷雾质谱

Fig.3 MS spectrum of DBITA/ $Zn^{2+}$  complex

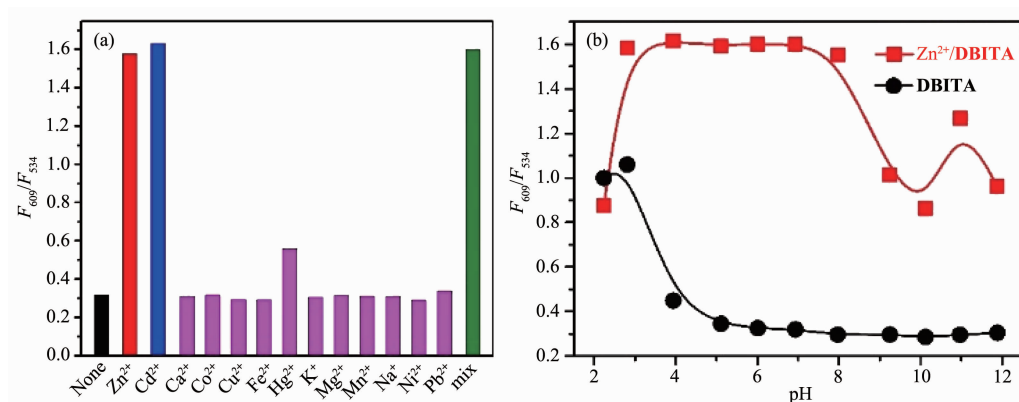


图 4 (a) HEPES 缓冲溶液中( $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{pH } 7.2$ ,  $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ KNO}_3$ ), 金属离子对  $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  DBITA 的荧光选择性响应柱状图( $F_{609}/F_{534}$ ,  $\lambda_{\text{ex}}=362\text{ nm}$ ); 其中  $Zn^{2+}$ 、 $Cd^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Hg^{2+}$ 、 $Pb^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$  的含量与 DBITA 含量相同,  $Na^{+}$ 、 $K^{+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  的含量是 DBITA 含量的 1000 倍; (b) DBITA 及其  $Zn^{2+}$  配合物( $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 在 609 和 543 nm 波长下的荧光强度比值随 pH 变化曲线

Fig.4 (a) Emission ratio at 609 and 543 nm of DBITA ( $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\lambda_{\text{ex}}=362\text{ nm}$ ) induced by different metal cations in HEPES buffer ( $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{pH } 7.2$ ,  $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ KNO}_3$ ); Final concentration for  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  and  $Pb^{2+}$  is  $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , for  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$ ,  $Ca^{2+}$ , and  $Mg^{2+}$  is  $0.10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , (b) Emission ratio  $F_{609}/F_{534}$  of DBITA and DBITA/ $Zn^{2+}$  complex ( $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) in aqueous solutions with different pH values,  $\lambda_{\text{ex}}=362\text{ nm}$

结果表明, DBITA 与大部分  $Zn^{2+}$  探针类似, 难以排除处同一族性质极为相似的  $Cd^{2+}$  对其增强以及比例计量行为的干扰。但由于正常细胞或生命体内没有  $Cd^{2+}$ , 所以不会对  $Zn^{2+}$  的响应带来干扰。

进一步研究了 pH 变化对 DBITA 的  $Zn^{2+}$  比例计量响应行为的影响。如图 4b 所示, DBITA 在 609 和 534 nm 处的荧光强度的比值只在酸性条件下才

会增强, 而在  $\text{pH} \geq 5$  的范围内基本保持不变, 而 DBITA/ $Zn^{2+}$  配合物的比值在 pH 4~8 之间稳定, 因此可以认为 DBITA 对  $Zn^{2+}$  比例计量行为不受 pH 干扰, 非常适合于生理环境下  $Zn^{2+}$  的响应。

## 2.6 DBITA 对细胞内 $Zn^{2+}$ 的造影性能研究

由于 DBITA 对  $Zn^{2+}$  发射波长红移的比例计量响应, 因此我们利用双通道对 DBITA 在细胞内的

$\text{Zn}^{2+}$  造影能力进行了研究。虽然 **DBITA** 的最大激发波长在 362 nm, 但从激发光谱上可以看出在 405 nm 处仍可以对 **DBITA** 进行激发。因此, 为了减小紫外激发对细胞带来的光损伤, 我们选用了波长相对较长的 405 nm 作为激发波长对 **DBITA** 进行了造影研究。根据图 S4 可知, 用 405 nm 作为激发波长对 **DBITA** 的金属离子选择性以及  $\text{Zn}^{2+}$  的比例计量响应几乎没有影响, 在荧光增强的作用上  $\text{Zn}^{2+}$  导

致的荧光增强 4.95 倍增加到 6.35 倍, 而  $\text{Cd}^{2+}$  导致的荧光增强 5.12 倍增加到 5.31 倍。

**DBITA** 溶液对 HeLa 细胞造影结果如图 5 所示。绿色通道收集 500~540 nm 荧光, 红色通道收集 580~620 nm 荧光; 荧光比值为绿色通道荧光与红色荧光通道比值。HeLa 细胞经 **DBITA** 溶液染色后, 2 个通道的比值非常低, 约为  $0.098 \pm 0.011$  (图 5i); 这表明细胞中的游离  $\text{Zn}^{2+}$  相对较低, **DBITA** 主要以游离

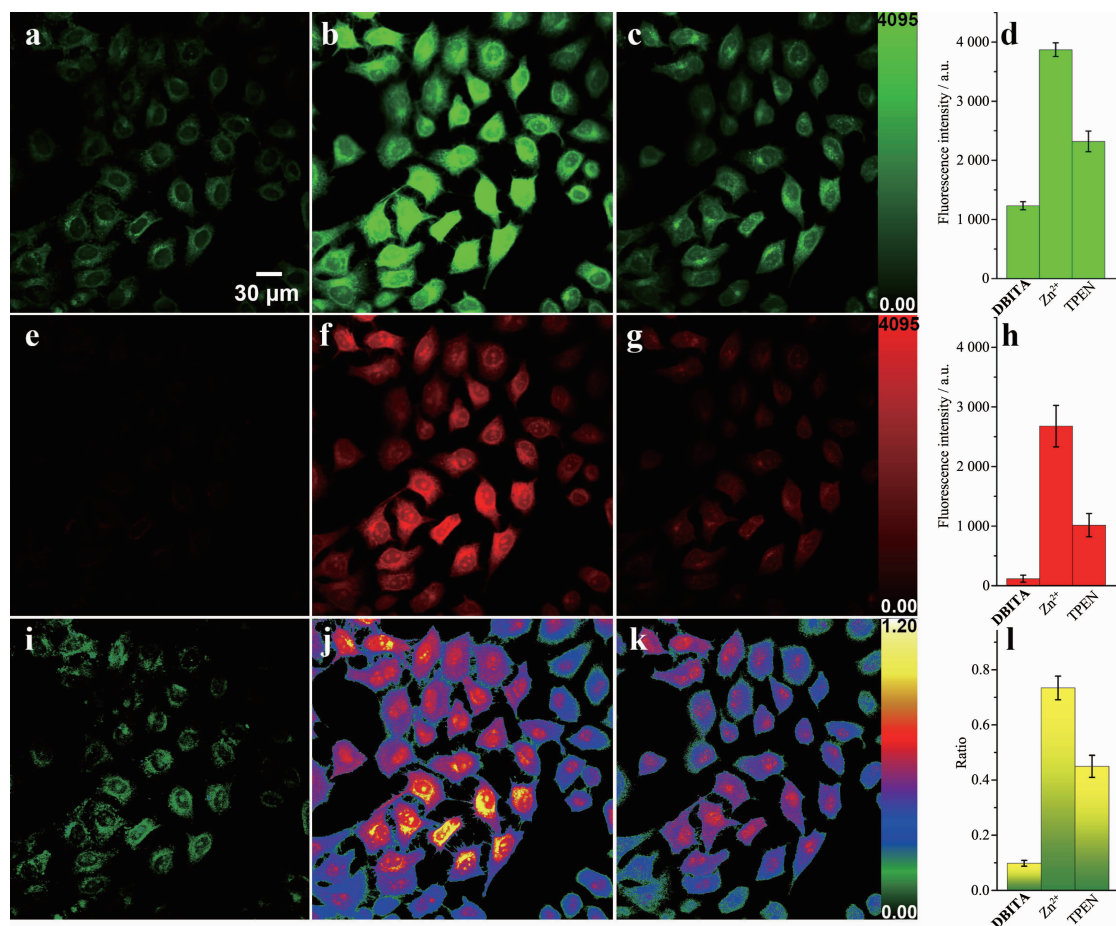


图 5 **DBITA** 对 HeLa 细胞内的激光共聚焦双通道成像: (a, e, i) HeLa 细胞用 **DBITA** ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 溶液 25  $^{\circ}\text{C}$  孵育 20 min; (b, f, j) 将染色细胞暴露于  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2/2$ -巯基吡啶-*N*-氧化物溶液中 5 min, 然后再用 **DBITA** 溶液孵育 20 min 成像; (c, g, k) 进一步用 TPEN 溶液 ( $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 20 min) 处理 (b, f, j) 中的细胞; (a, b, c) 500~540 nm 通道荧光图像; (e, f, g) 580~620 nm 通道荧光图像; (i, j, k) 由 (e, f, g) 和 (a, b, c) 生成的比例图像,  $\lambda_{\text{ex}}=405 \text{ nm}$ ; (d) 与 (a~c) 中所示图像对应的平均信号强度柱状图; (h) 与 (e~g) 中所示图像对应的平均信号强度柱状图; (l) 与 (i~k) 中所示图像对应的平均比值柱状图

Fig.5 Dual emission ratiometric imaging of intracellular  $\text{Zn}^{2+}$  in HeLa cells via **DBITA** ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 20 min) staining at 25  $^{\circ}\text{C}$ : (a, e, i) HeLa cells incubated with **DBITA** at 25  $^{\circ}\text{C}$  for 20 min; (b, f, j) the stained cells were exposed to  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2/2$ -mercaptopyridine-*N*-oxide solution at 25  $^{\circ}\text{C}$  for 5 min, followed by washing with **DBITA** solution; (c, g, k) the cells in (b, f, j) further treated by TPEN solution ( $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 20 min, bottom); (a, b, c) Fluorescence images obtained according to the emission collected at 500~540 nm; (e, f, g) Fluorescence images obtained according to the emission collected at 580~620 nm; (i, j, k) Ratiometric images generated from (e, f, g) and (a, b, c),  $\lambda_{\text{ex}}=405 \text{ nm}$ ; (d) Histogram of the average signal intensity corresponding to images shown in (a~c); (h) Histogram of the average signal intensity corresponding to images shown in (e~g); (l) Histogram of the average ratio value corresponding to images shown in (i~k)

形式存在。用  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2/\text{pyrithione}$  溶液孵育后,再加入 **DBITA** 溶液,红色通道的荧光强度信号由  $117 \pm 59$ (图 5e)增加到  $2\,678 \pm 348$ (图 5f),绿色通道的荧光强度信号由  $1\,232 \pm 69$ (图 5a)增加到  $3\,871 \pm 116$ (图 5b);因此,荧光信号的比值明显增加,大多数细胞的比值在  $0.73 \pm 0.04$  左右,少数细胞的比例增加到 1.0 左右(图 5j)。这表明外源性  $\text{Zn}^{2+}$  的加入增加了细胞中  $\text{Zn}^{2+}$  的浓度,**DBITA** 与  $\text{Zn}^{2+}$  结合后导致比值增大。继续将 HeLa 细胞用 TPEN 溶液孵育 20 min 后进行造影,结果如图 5k,细胞内两个通道的比值明显下降,约为  $0.45 \pm 0.04$ ,但仍高于细胞的初始比例。这是由于 **DBITA** 对  $\text{Zn}^{2+}$  有很强的螯合能力,即使在高浓度的 TPEN 存在下,**DBITA** 螯合的  $\text{Zn}^{2+}$  仍不能完全被去除。以上结果表明,**DBITA** 具有良好的细胞膜透性,实现了细胞中  $\text{Zn}^{2+}$  比值检测。根据文献报道,锌过量会对发育和成熟的神经系统产生深远的影响。例如,谷氨酸能突触释放过多的  $\text{Zn}^{2+}$  是导致缺血时神经元死亡的原因<sup>[4]</sup>,视神经损伤后  $\text{Zn}^{2+}$  的积累导致视网膜神经节细胞死亡<sup>[62]</sup>。同样,细胞内  $\text{Zn}^{2+}$  的激增也与对成熟少突胶质细胞的兴奋性毒性或硝化性损伤有关<sup>[63-65]</sup>。**DBITA** 具有体内  $\text{Zn}^{2+}$  过多的诊断和治疗潜力。

### 3 结 论

综上所述,以 2-PBI 为荧光团,通过在 PBI 的 5-位引入强的推电子基团 *N,N*-二甲基,设计了  $\text{Zn}^{2+}$  结合诱导发射光谱红移的比例计量型  $\text{Zn}^{2+}$  探针 **DBITA**。当探针与  $\text{Zn}^{2+}$  结合后,可发生  $\text{Zn}^{2+}$  诱导的芳环翻转/共面,从而使发射峰发生较大距离的红移。进一步用紫外-可见光谱、核磁共振氢谱和质谱研究了 **DBITA** 与  $\text{Zn}^{2+}$  的 1:1 结合行为。在 HeLa 细胞内的比例计量造影实验表明,**DBITA** 能够应用于细胞内  $\text{Zn}^{2+}$  的定量检测。本研究进一步证明,通过  $\text{Zn}^{2+}$  诱导的芳环翻转/共面是构筑比例计量型  $\text{Zn}^{2+}$  荧光探针的有效策略。这一策略应该适合于 2,2'-氮杂-1,1'-二芳基型荧光团的比例计量型探针的设计。

Supporting information is available at <http://www.wjhxzb.cn>

### 参考文献:

- [1] Lipscomb W N, Sträter N. *Chem. Rev.*, **1996**,**96**:2375-2434
- [2] Laity J H, Lee B M, Wright P E. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2001**,**11**:39-46
- [3] Berg J M, Shi Y. *Science*, **1996**,**271**:1081-1085
- [4] Koh J Y, Suh S W, Gwag B J, et al. *Science*, **1996**,**272**:1013-1016
- [5] Weiss J H, Sensi S L, Koh J Y. *Trends Pharmacol. Sci.*, **2000**,**21**:395-401
- [6] Sheline C T, Behrens M M, Choi D W. *J. Neurosci.*, **2000**,**20**:3139-3146
- [7] Kury S, Dreno B, Bezieau S, et al. *Nat. Genet.*, **2002**,**31**:239-240
- [8] Bozym R A, Thompson R B, Stoddard A K, et al. *ACS Chem. Biol.*, **2006**,**1**:103-111
- [9] Hitomi Y, Outten C E, O'Halloran T V. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**,**123**:8614-8615
- [10] Chen Y, Bai Y, Han Z, et al. *Chem. Soc. Rev.*, **2015**,**44**:4517-4546
- [11] Liu Z, He W, Guo Z. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**,**42**:1568-1600
- [12] Xu Z, Yoon J, Spring D R. *Chem. Soc. Rev.*, **2010**,**39**:1996-2006
- [13] Nolan E M, Lippard S J. *Acc. Chem. Res.*, **2009**,**42**:193-203
- [14] Fan J, Hu M, Zhan P, et al. *Chem. Soc. Rev.*, **2013**,**42**:29-43
- [15] Carter K P, Young A M, Palmer A E. *Chem. Rev.*, **2014**,**114**:4564-4601
- [16] Wu D, Sedgwick A C, Gunnlaugsson T, et al. *Chem. Soc. Rev.*, **2017**,**46**:7105-7123
- [17] Gee K R, Zhou Z L, Qian W J, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**,**124**:776-778
- [18] Qian F, Zhang C L, Zhang Y M, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**,**131**:1460-1468
- [19] Komatsu K, Urano Y, Kojima H, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**,**129**:13447-13454
- [20] Xue L, Liu C, Jiang H. *Chem. Commun.*, **2009** (9):1061-1063
- [21] Xu Z C, Baek K H, Kim H N, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**,**132**:601-610
- [22] Xia S, Shen J J, Wang J B, et al. *Sens. Actuators B*, **2018**,**258**:1279-1286
- [23] Huang S, Yang B Z, Ren A M. *J. Mol. Struct.*, **2016**,**1114**:65-77
- [24] Ning P, Jiang J C, Li L C, et al. *Biosens. Bioelectron.*, **2016**,**77**:921-927
- [25] Fu Y L, Fan C B, Liu G, et al. *Dyes Pigm.*, **2016**,**126**:121-130
- [26] Hessels A M, Merckx M. *Metallomics*, **2015**,**7**:258-266
- [27] van Dongen EMWM, Dekkers L M, Spijker K, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**,**128**:10754-10762
- [28] van Dongen EMWM, Evers T H, Dekkers L M, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**,**129**:3494-3495

- [29]Vinkenborg J L, Nicolson T J, Bellomo E A, et al. *Nat. Methods*, **2009**,**6**:737-740
- [30]Yang J C, Rong H, Shao P, et al. *J. Mater. Chem. B*, **2016**, **4**:6065-6073
- [31]Liu Y Q, Qu X J, Guo Q S, et al. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2017**,**9**:4725-4732
- [32]Aper S J A, Dierickx P, Merckx M. *ACS Chem. Biol.*, **2016**, **11**:2854-2864
- [33]Mehta P K, Oh E T, Park H J, et al. *Sens. Actuators B*, **2017**,**245**:996-1003
- [34]Sreenath K, Allen J R, Davidson M W, et al. *Chem. Commun.*, **2011**,**47**:11730-11732
- [35]Sedgwick A C, Wu L, Han H H, et al. *Chem. Soc. Rev.*, **2018**,**47**:8842-8880
- [36]Henry M M, Fahrni C J. *J. Phys. Chem. A*, **2002**,**106**:5210-5220
- [37]Henry M M, Wu Y G, Fahrni C J. *Chem. Eur. J.*, **2004**,**10**: 3015-3025
- [38]Xu Y Q, Pang Y. *Chem. Commun.*, **2010**,**46**:4070-4072
- [39]Xu Y Q, Pang Y. *Dalton Trans.*, **2011**,**40**:1503-1509
- [40]Manna A, Jana K, Guchhait N, et al. *New J. Chem.*, **2017**, **41**:6661-6666
- [41]Azadbakht R, Koolivand M, Khanabadi J. *Anal. Methods*, **2017**,**9**:4688-4694
- [42]Tang L J, Dai X, Zhong K L, et al. *Sens. Actuators B*, **2014**, **203**:557-564
- [43]Taki M, Wolford J L, O'Halloran T V. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**,**126**:712-713
- [44]Chang C J, Jaworski J, Nolan E M, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2004**,**101**:1129-1134
- [45]Formica M, Favi G, Fusi V, et al. *J. Lumin.*, **2018**,**195**:193-200
- [46]Woodroffe C C, Lippard S J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**,**125**: 11458-11459
- [47]Woodroffe C C, Won A C, Lippard S J. *Inorg. Chem.*, **2005**, **44**:3112-3120
- [48]Yoon S A, Lee J, Lee M H. *Sens. Actuators B*, **2018**,**258**:50-55
- [49]Grabowski Z R, Rotkiewicz K, Rettig W. *Chem. Rev.*, **2003**, **103**:3899-4032
- [50]Ajayaghosh A, Carol P, Sreejith S. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, **127**:14962-14963
- [51]Younes A H, Zhang L, Clark R J, et al. *J. Org. Chem.*, **2009**,**74**:8761-8772
- [52]Kuang G C, Allen J R, Baird M A, et al. *Inorg. Chem.*, **2011**,**50**:10493-10504
- [53]Yuan Z, Younes A H, Allen J R, et al. *J. Org. Chem.*, **2015**,**80**:5600-5610
- [54]Philips D S, Sreejith S, He T, et al. *Chem. Asian J.*, **2016**, **11**:1523-1527
- [55]Bednarska J, Zalesny R, Arul Murugan N, et al. *J. Phys. Chem. B*, **2016**,**120**:9067-9075
- [56]Li W Y, Fang B Q, Jin M, et al. *Anal. Chem.*, **2017**,**89**: 2553-2560
- [57]Liu Z P, Zhang C L, Li Y L, et al. *Org. Lett.*, **2009**,**11**:795-798
- [58]Matouzenko G S, Bousseksou A, Lecocq S, et al. *Inorg. Chem.*, **1997**,**36**:2975-2981
- [59]He Z C, Chaimungkalanont P J, Craig D C, et al. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **2000**,**9**:1419-1429
- [60]Kim S J, Kool E T. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**,**128**:6164-6171
- [61]Liu Z P, Zhang C L, He W J, et al. *Chem. Commun.*, **2010**, **46**:6138-6140
- [62]Li Y Q, Anderegg L, Yuki K, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2017**,**114**:E209-E218
- [63]Mato S, Sánchez-Gómez M V, Bernal-Chico A, et al. *Glia*, **2013**,**61**:750-764
- [64]Zhang Y M, Wang H, Li J R, et al. *J. Biol. Chem.*, **2006**, **281**:9460-9470
- [65]Domercq M, Mato S, Soria F N, et al. *Glia*, **2013**,**61**:383-393