

荧光传导机理构建 β -半乳糖苷酶探针的研究进展

李 苗¹, 马秀琴¹, 金潇仪¹, 杨 帆¹, 田 野^{2*}

(1. 大连工业大学 生物工程学院, 辽宁 大连 116034; 2. 大连海洋大学 海洋科技与环境学院, 辽宁 大连 116023)

摘要: β -半乳糖苷酶 (β -Gal) 是细胞溶酶体中的一种糖苷水解酶, 在催化糖苷键水解以及维持正常生命活动等起着至关重要的作用。开发能精确、快速检测 β -Gal 活性的方法对于卵巢癌、细胞衰老引发疾病的早期诊断和分子生物学领域的研究是十分重要的。考虑到荧光探针具有检测灵敏、响应迅速和时空分辨率高等特性, 该综述对近年来报道的 β -Gal 荧光探针研究进展及其疾病诊断效果进行了总结, 介绍了依据分子内电荷转移、荧光共振能量转移、聚集诱导发光和光诱导电子转移等信号传导机理构建 β -Gal 荧光探针的分子设计策略及应用特点, 并重点介绍了二维检测体系能够突破探针使用单一信号传导机理进行检测时常遇到的局限。指出合理应用荧光信号传导机理构建具有灵敏性、空间分辨率高, 化学稳定性好和细胞蓄积能力强等特点的 β -Gal 荧光探针, 能够推进 β -Gal 荧光探针在卵巢癌诊断及治疗效果评价, 细胞衰老程度评估和个体健康寿命预测等生物领域的高效应用。

关键词: 荧光探针; β -半乳糖苷酶; 卵巢癌; 细胞衰老

中图分类号: O657.3; Q503 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2022) 09-1767-14

Research progresses on β -galactosidase probes based on fluorescence signal transduction mechanisms

LI Miao¹, MA Xiuqin¹, JIN Xiaoyi¹, YANG Fan¹, TIAN Ye^{2*}

(1. School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian 116034, Liaoning, China; 2. College of Marine Technology and Environment, Dalian Ocean University, Dalian 116023, Liaoning, China)

Abstract: β -Galactosidase (β -Gal), a glycoside hydrolase in cellular lysosomes, plays a crucial role in hydrolyzing glycoside bonds and even maintaining normal life activities. Development of rapid and accurate identification methods for β -Gal activity is of great importance for the early diagnosis of ovarian cancer and diseases triggered by cellular senescence as well as researches in molecular biology. Fluorescent probes show advantages of sensitive detection, rapid response, and high temporal-spatial resolution. Therefore, the research progresses on β -Gal fluorescence probes reported in recent years and their effects on disease diagnosis was firstly summarized, followed by introduction of the molecular design strategies and application characteristics of β -Gal fluorescence probes based on intramolecular charge transfer, fluorescence resonance energy transfer, aggregation-induced emission, and photoinduced electron transfer fluorescence-signal transduction mechanisms, especially the two-dimensional detection system which could break through the limitation of single signal transduction mechanism for probe detection. Finally, it was pointed out that development of β -Gal fluorescent probes with high sensitivity, spatial resolution, good chemical stability and strong cell accumulation capacity based on fluorescence signal transduction mechanism could advance the highly efficient applications of β -Gal fluorescent probes in biomedical fields, such as diagnosis and therapeutic evaluation of ovarian cancer, cellular senescence assessment, and individual life-span prediction.

收稿日期: 2022-05-11; 定用日期: 2022-07-13; DOI: 10.13550/j.jxhg.20220456

基金项目: 国家自然科学基金 (22108024, 31901775); 辽宁省自然科学基金 (2021-BS-226); 大连市青年科技之星项目 (2021RQ113); 设施渔业教育部重点实验室 (大连海洋大学) 资助项目 (202224)

作者简介: 李 苗 (1991—), 女, 讲师, E-mail: limiao@dlpu.edu.cn. 联系人: 田 野 (1988—), 男, 副教授, E-mail: tianye@dlou.edu.cn.

Key words: fluorescence probes; β -galactosidase; ovarian cancer; cell senescence

β -半乳糖苷酶 (β -Gal) 是由蛋白质亚基组成的四聚体酶,能水解 β -半乳糖苷键^[1-2]。溶酶体中的 β -Gal 是参与卵巢癌发生和转移的重要生物标记物^[3-4]。研究发现,人卵巢浆液性囊腺癌细胞 (SHIN3)、人卵巢浆液性囊腺癌细胞 (SKOV3)、人卵巢浆液性腺癌细胞 (OVCAR3、OVCAR4、OVCAR5、OVCAR8) 和卵巢子宫内膜样腺癌细胞 (OVK18) 等卵巢癌细胞中 β -Gal 活性远远高于正常细胞^[5-7]。因此,内源性 β -Gal 活性评估是卵巢癌临床诊断及治疗效果评价的常见方法。除了卵巢癌细胞, β -Gal 在衰老细胞中也存在过表达的现象。衰老是一种时间依赖性生理功能衰退现象,也是引起许多非传染性疾产生关键因素^[8-10]。其中,人类衰老相关的 β -半乳糖苷酶 (SA- β -Gal) 是目前衰老检测应用最广泛的生物标志物,是评估细胞衰老程度和预测个体健康寿命的重要工具^[3,8-12]。

荧光分析法是通过检测探针荧光强度、荧光寿命、比例荧光或其他荧光参数的变化,对离子、小分子、生物大分子浓度或生物微环境参数进行检测的有效方法,具有灵敏度高、响应迅速、时空分辨率高和技术简便等特性。考虑到监测 β -Gal 活性可以对卵巢癌细胞 (或衰老细胞) 进行特异性识别,开发 β -Gal 荧光探针是评估卵巢癌发生、转移及治疗效果和预测细胞衰老程度、个体健康寿命等生命监测活动的关键核心内容,而如何进一步区分卵巢癌细胞和衰老细胞对 β -Gal 荧光探针的设计提出了更高的要求。此外,在对人源性 β -Gal 进行研究时,大肠杆菌 β -半乳糖苷酶 (*E. coli* β -Gal) 或通过 β -半乳糖苷酶基因 *Z* (*lacZ*) 转染细胞产生的内源性 β -Gal 常被用作人源性 β -Gal 体外替代酶。然而,人源性 β -Gal 是由半乳糖苷酶 $\beta 1$ (*GLB1*) 基因表达的内源性溶酶体酶,其催化结构域与 *lacZ* 基因编码的 *E. coli* β -Gal 有很大不同^[1,10-11,13]。因此,设计能够区分不同种属来源的 β -Gal 荧光探针,有利于研究人员对 β -Gal 相关生理、病理过程进行精准研究^[11]。

近年来,用于检测 β -Gal 活性的荧光探针被广泛报道, β -Gal 荧光探针是基于探针被 β -Gal 特异性催化活性位点后,产生荧光变化这一理念进行设计的。本文根据荧光信号传导机理的不同,对依据分子内电荷转移 (ICT)、荧光共振能量转移 (FRET)、聚集诱导发光 (AIE) 和光诱导电子转移 (PET) 等机理构建的 β -Gal 荧光探针分子结构和应用特点进行了归纳和总结。依据不同荧光信号传导机理构建的探针分子有各自的应用局限,综合应用多荧光传导机理共同构建的二维 β -Gal 检测体系,能突破探

针使用单一信号传导机理进行检测时常遇到的局限,进一步实现具有低检测限 (DL)、高空间分辨率、良好化学稳定性和强细胞蓄积能力等特点的 β -Gal 荧光探针的设计和开发,推进卵巢癌精确诊断及其治疗效果评价、细胞衰老程度准确评估和个体健康寿命预测等生物检测领域的发展。

1 基于 ICT 机理构建的 β -Gal 荧光探针

ICT 荧光探针一般由供电子基团和吸电子基团通过 π 电子连接而成。探针 D- π -A (Donor- π -Acceptor) 结构的形成,有利于探针形成电子跃迁,释放荧光^[14]。探针 β -半乳糖苷键响应 β -Gal 催化,水解产生具有 D- π -A 分子构型的发色团并释放荧光是用于 β -Gal 检测 ICT 荧光探针设计的基本策略。

1.1 检测 β -Gal 菁染料 ICT 荧光探针

菁染料因具有良好的生物相容性、高摩尔消光系数和荧光量子产率以及结构易修饰性而被广泛应用于荧光成像^[15-16]。REDY-KEISAR 等^[17]开发了一例中位 β -半乳糖基团修饰的 β -Gal 激活型近红外菁染料探针 QCy7- β Gal (图 1a)。 β -Gal 能够催化探针 QCy7- β Gal 先后释放 β -半乳糖和对亚甲基苯醌保护基团,继而引发电子重排形成具有 ICT 体系的 QCy7 并释放荧光。探针 QCy7- β Gal 不但可以对溶液中 β -Gal 产生灵敏响应,而且可以识别小鼠体内 β -Gal 活性的变化。酶替代疗法能够治疗 β -Gal 缺失导致的半乳糖唾液酸症或莫尔基奥氏综合征, QCy7- β Gal 有望对酶替代疗法的治疗效果进行实时报道。

ZHANG 等^[18]通过糖苷键结合 β -D-半乳糖残基和半菁-氧杂蒽缩合荧光骨架,设计、合成了一例近红外探针 Gal-Pro,用于 SA- β -Gal 活性的检测 (图 1b)。与探针 QCy7- β Gal 相比, Gal-Pro 被 β -Gal 催化,不需经历电子重排即可形成明显的 ICT 体系,产生荧光发射。上述结构特点使探针 Gal-Pro 具有 β -Gal 快速响应能力 (DL=5.7 \times 10⁻¹¹ mol/L), Gal-Pro 能够灵敏检测衰老细胞内 SA- β -Gal 的活性。

ZHEN 等^[19]通过季铵盐反应,将亲水性聚乙二醇 (PEG) 连接到探针 CyGal 半菁-氧杂蒽缩合骨架上,合成了具有肿瘤靶向性和高肾脏清除率的 β -Gal 激活型近红外诊疗剂 CyGal-P (图 1c)。与 CyGal 相比, CyGal-P 被 β -Gal 催化释放 β -D-半乳糖的同时,产生更明显的近红外荧光 (NIRF)、光声 (PA) 和光热信号。除了具有多模式成像能力,探针 CyGal-P 被 β -Gal 激活后产生的光热效应能够对小鼠肿瘤进行光热治疗 (PTT),有效抑制肿瘤体积的增长。

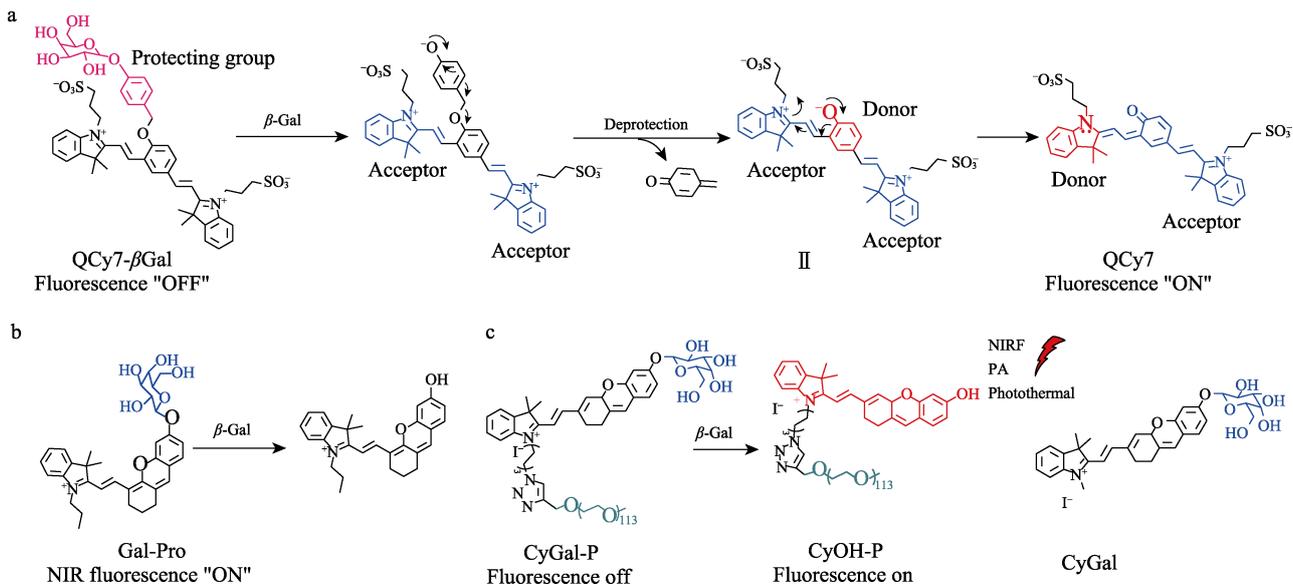


图 1 探针 QCy7- β -Gal (a)^[17]和 Gal-Pro (b)^[18]分子结构及对 β -Gal 的传感机理; 探针 CyGal-P 和 CyGal 分子结构以及 CyGal-P 荧光、光声和光热信号响应 β -Gal 的传感机理 (c)^[19]

Fig. 1 Molecular structures and β -Gal sensing mechanisms of QCy7- β -Gal (a)^[17] and Gal-Pro (b)^[18]; Molecular structures of CyGal-P and CyGal and β -Gal sensing mechanisms of CyGal-P fluorescence, photoacoustic and photothermal signals (c)^[19]

GARDNER 等^[20]以硫原子取代半萹-氧杂蒽缩合骨架 (O-HD) 的氧原子, 构建了光声成像基团光声半萹染料 (PA-HD), 合成了 β -Gal 激活型近红外光声探针 PA-HD-Gal (图 2a)。与荧光团 O-HD 相比, β -Gal 催化 PA-HD-Gal 生成的 PA-HD 吸收波长 (λ_{abs}) 从 690 nm 红移至 745 nm, 并且因激发态平面程度较高, 有利于电子分离, PA-HD 具有光声成像能力。PA-HD-Gal 骨架上具有吸电子特性的氯原子削弱了邻位酚氧负离子的电子云密度, 降低了

PA-HD 的 $\text{p}K_{\text{a}}$ 。同时, 与去质子化 PA-HD 的吸收峰相比, 质子化 PA-HD 的吸收峰发生了明显蓝移。因此, 生物微环境 pH 的变化对 PA-HD-Gal 响应 β -Gal (生成去质子化 PA-HD) 释放光声信号的强度不产生干扰。由于生理组织对超声信号的散射程度要比对光信号散射程度低 2~3 个数量级, 应用 PA-HD 母体构建的光声成像探针可以实现组织深层穿透 (最高可达约 5 cm) 和高分辨率成像。

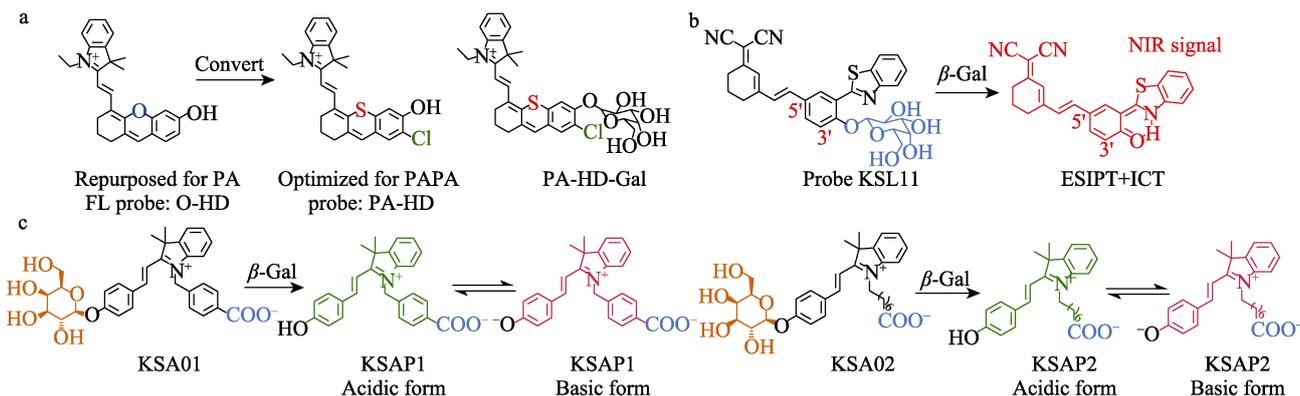


图 2 探针 O-HD、PA-HD 和 PA-HD-Gal 的分子结构 (a)^[20]; 探针 KSL11 分子结构及其响应 β -Gal 催化产生的 ESIPT+ICT 传感机理 (b)^[11]; 探针 KSAP1 与 KSAP2 分子结构及不同 pH 条件下识别 β -Gal 的传感机理 (c)^[12]

Fig. 2 Molecular structures of O-HD, PA-HD and PA-HD-Gal (a)^[20]; Molecular structure of KSL11 and its β -Gal sensing mechanism based on ESIPT+ICT (b)^[11]; Molecular structures of KSAP1 and KSAP2 and their β -Gal sensing mechanism under different pH conditions (c)^[12]

人源性 β -Gal 是由 *GLB1* 表达的一种内源性溶酶体酶, 其催化结构域与 *lacZ* 编码的 *E. coli* β -Gal 有很大不同^[1,10-11,13]。然而, *E. coli* β -Gal 常被用于人源性 β -Gal 替代酶进行探针荧光滴定实验, 因此,

探针特异性响应人源性 β -Gal 的能力不能被准确评估。通过 Pymol 软件计算的均方根偏差 (RMSD) 值可知, 相比于 *E. coli* β -Gal, *A. oryzae* 真菌 β -Gal 与人源性 β -Gal 催化结构域的结构更接近^[21]。因此,

A. oryzae β -Gal 更适合被用作人源性 β -Gal 探针体外实验的替代酶。LI 等^[11]构建了 2-(2'-羟苯基)苯并噻唑探针骨架 KSL，合成了用于人源性 β -Gal 检测的荧光探针 KSL11 (图 2b)。KSL11 响应人源性 β -Gal 催化释放半乳糖后，探针 2-(2'-羟苯基)苯并噻唑 (HBT) 骨架产生激发态分子内电子转移 (ESIPT)。ESIPT 是一种光异构化现象，通过烯醇 (E) 与酮 (K) 光互变异构过程实现四级光循环 (E \rightarrow E* \rightarrow K* \rightarrow K)。ESIPT 荧光团在基态时通常以顺式烯醇 (E) 形式存在，形成分子内氢键。在光激发下，烯醇形式以单重激发态 (E*) 存在，ESIPT 荧光团电子重新分配，质子供体的酸性和受体的碱性增强。质子转移反应 (从质子供体到受体) 沿着激发态势能表面通过分子内氢键快速发生，导致烯醇式的单重激发态 (E*) 迅速转变为激发态酮式 (K*) 互变异构体。当辐射跃迁回到电子基态后，K 发生反向质子转移 (RPT) 产生最初的 E 型结构。其中，2-(2'-羟苯基)苯并咪唑 (HBI)、2-(2'-羟苯基)苯并噻唑 (HBO) 和 HBT 是最为常见的 ESIPT 荧光团。光激活 HBT 诱导酚羟基质子与氮原子成键形成胺基，引发电子重排，从而生成酮式结构。ESIPT 发生后，胺基与氧之间氢键的形成阻止了苯并噻唑的旋转，激发态 HBT 不再通过非辐射跃迁途径释放能量，荧光得以释放。同时，探针骨架 5'位修饰的吸电子基团促进分子 ICT 体系形成，实现对 β -Gal 的近红外荧光检测。综上，KSL11 荧光探针综合应用 ICT 和 ESIPT 二维检测机理首次实现了对 β -Gal 的种属选择，提高了检测人源性 β -Gal 活性的可靠性，同时为人源性 β -Gal 相关生理、病理过程的发生、发展提供了有效的评估工具。

人细胞中表达的 β -Gal 由 *GLB1* 基因编辑，并在衰老细胞和原发性卵巢癌等肿瘤细胞溶酶体中过表达^[22-23]。细胞溶酶体 V-ATP 酶活力随着衰老进程的逐渐减弱，衰老细胞的溶酶体 pH 高于正常细胞溶酶体 pH^[24-25]。与衰老细胞不同的是，癌细胞溶酶体 pH 低于正常细胞^[26]。因此，合成具有 pH 响应能力的 β -Gal 探针有望对衰老细胞和卵巢癌相关 β -Gal 进行分类识别。GAO 等^[12]首次提出了 β -Gal-pH 二维响应策略，构建了能够区分衰老细胞 SA- β -Gal 和

卵巢癌细胞 β -Gal 的荧光探针 KSA01 和 KSA02 (图 2c)。探针 KSA01 和 KSA02 响应 β -Gal 催化释放 β -D-半乳糖，恢复 ICT 体系 (生成 KSAP1 和 KSAP2) 的同时，能够发射荧光。因探针骨架 KSA 上通过季铵盐反应修饰的羧基质子化能力不同，KSA 染料响应 pH 变化的能力存在差异 ($pK_{a, KSAP1}=5.8$, $pK_{a, KSAP2}=6.2$)。质子化 KSAP1 和 KSAP2 发射绿色荧光，而非质子化 KSAP1 和 KSAP2 发射红色荧光。因此，监测 KSAP1 和 KSAP2 比例荧光强度 (红光/绿光) 的大小，可以对溶酶体 pH 进行准确表征。由于分子的 pK_a 不同，探针 KSAP1 和 KSAP2 能够在不同酸度范围内对 pH 的变化产生灵敏响应。探针 KSA02 在衰老细胞溶酶体 (pH 较高) 中响应 SA- β -Gal 催化释放红色荧光，而在卵巢癌 SKO-V3 细胞溶酶体 (pH 较低) 中响应 β -Gal 催化发射绿色荧光，通过分析、比较 KSA02 比例荧光强度的大小，能够对衰老细胞和卵巢癌相关 β -Gal 进行准确区分和检测。

1.2 检测 β -Gal 苯并吡喃脲 ICT 荧光探针

苯并吡喃脲 (DCMB) 是具有高荧光量子产率和光稳定性的近红外荧光染料^[16,27]。苯并吡喃脲是典型 D- π -A 分子体系，具有 ICT 荧光效应。调节苯并吡喃脲 2 位取代基的给电子能力，可以调控苯并吡喃脲吸收和荧光发射波长。GU 等^[4]报道了一例 β -Gal 激活型近红外比率荧光探针 DCM- β Gal (图 3a)。绿色荧光探针 DCM- β Gal 响应 β -Gal 催化后糖苷键断裂，形成 DCM-O⁻并发射近红外荧光，不但实现了对体外 β -Gal 浓度的比例荧光检测，同时可以对高表达 β -Gal 的小鼠肿瘤部位进行实时近红外荧光成像。

YUE 等^[28]通过 4-羟基-3-硝基苯连接 DCM-NH₂ 和 β -D-半乳糖合成了 β -Gal 激活型近红外荧光探针 DCMCA- β Gal (图 3b)。 β -Gal 催化探针 DCMCA- β Gal 反应前，酰胺键的形成抑制了 DCM-NH₂ 荧光团氨基的给电子能力； β -Gal 催化后，探针糖苷键断裂诱导 4-羟基-3-硝基苯自消除，生成 ICT 荧光化合物 DCM-NH₂，实现了近红外荧光的“关-开”。探针 DCMCA- β Gal (DL=1.26 \times 10⁻³ U/mL) 能够对 *lacZ* 转染的 293T 细胞、SKOV-3 卵巢癌细胞和小鼠肿瘤中 β -Gal 的活性进行动态研究。

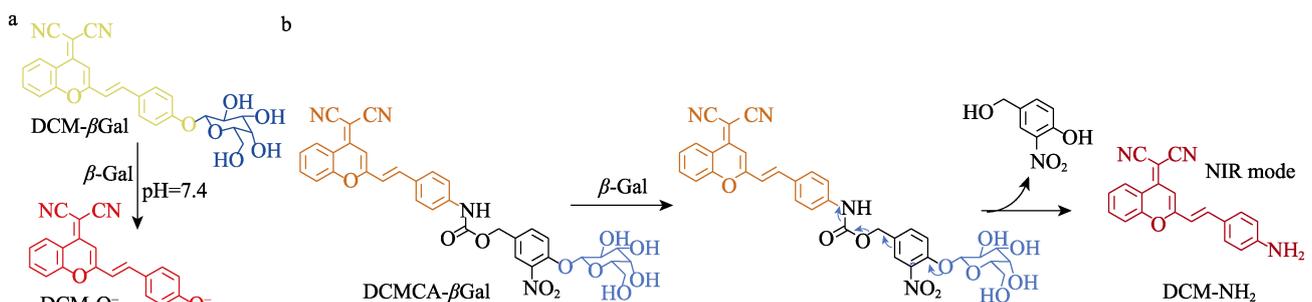


图 3 探针 DCM- β Gal (a)^[4]和 DCMCA- β Gal (b)^[28]分子结构及对 β -Gal 的传感机理
Fig. 3 Molecular structures and β -Gal sensing mechanisms of DCM- β Gal (a)^[4] and DCMCA- β Gal (b)^[28]

1.3 检测 β -Gal 萘酰亚胺 ICT 荧光探针

萘酰亚胺因具有刚性平面结构和 π 共轭体系、Stokes 位移较大且易被修饰等特点, 常被用于构建生物环境参数检测荧光探针^[29]。萘酰亚胺 4 位引入供电子基团能够增强电子共轭程度, 有利于萘酰亚胺释放 ICT 荧光。ZHANG 等^[30]设计了一例 β -Gal 响应型萘酰亚胺荧光探针 NI- β Gal (图 4a)。响应 β -Gal 催化后, 探针 NI- β Gal (最大吸收/发射波长 $\lambda_{\text{abs/em}}=365/440$ nm) 反应生成 4 位羟基取代的萘酰亚胺并释放荧光。在 pH=7.4 的生理环境下, 羟基去质子化生成的氧负离子增强了萘酰亚胺电子推拉体系, 促进了分子吸收和荧光发射峰的红移 (反应后分子的最大吸收/发射波长 $\lambda_{\text{abs/em}}=445/545$ nm)。因此, 随着 β -Gal 滴定, NI- β Gal 产生了双吸收和双荧光发射峰, 能够对 β -Gal 活性进行比例荧光检测。探针孵育细胞后, 双光子激光激发 C6 细胞中 NI- β Gal 发射绿色荧光, 激发 C6/lacZ7 细胞中 NI- β Gal 同时发射绿色和黄色荧光, 能够对细胞内 β -Gal 活性进行实时检测。

通过引入吗啉定位基团, HUANG 等^[31]设计、合成了一例具有溶酶体靶向能力的 β -Gal 激活型萘酰亚胺荧光探针 FC- β Gal (图 4b)。在 pH=7.4 生理

环境下, β -Gal 催化探针 FC- β Gal ($\lambda_{\text{abs/em}}=360/450$ nm) 4 位 β -D-半乳糖基团反应生成氧负离子, 促进探针分子吸收峰和荧光发射峰的红移 ($\lambda_{\text{abs/em}}=460/560$ nm)。随着 β -Gal 的滴定, 探针分子在 $\lambda_{\text{em}}=450$ nm 处荧光强度不断减弱, 而在 $\lambda_{\text{em}}=560$ nm 处荧光强度不断增强。荧光探针 FC- β Gal 可以对 β -Gal 进行灵敏检测, 检测限低至 4×10^{-5} U/mL。同时, FC- β Gal 具有细胞溶酶体靶向性, 能够检测 SKOV-3 细胞溶酶体中的 β -Gal 活性。

CHEN 等^[32]设计了一例 β -Gal 响应型萘酰亚胺比率荧光探针 AM-RP-G (图 4c)。AM-RP-G 识别基团 β -D-半乳糖的酯化反应增强了分子的脂溶性, 提高了探针进入细胞的能力。探针 AM-RP-G 进入细胞后, 被细胞内酯酶水解生成 RP-G, 增强了自身水溶性和细胞蓄积能力。当 β -Gal 催化 RP-G 糖苷键断裂, 诱导 4-羟基苯连接臂自消除时, 萘酰亚胺 4 位氨基的给电子特性不再被酰基抑制, 荧光发射峰产生红移 ($\lambda_{\text{em, 催化前}}=490$ nm; $\lambda_{\text{em, 催化后}}=530$ nm)。随着 β -Gal 的滴定, 探针 AM-RP-G 产生双吸收和双荧光发射峰, 应用 AM-RP-G 进行比例荧光成像可以对 SKOV-3 细胞内 β -Gal 活性进行准确检测。

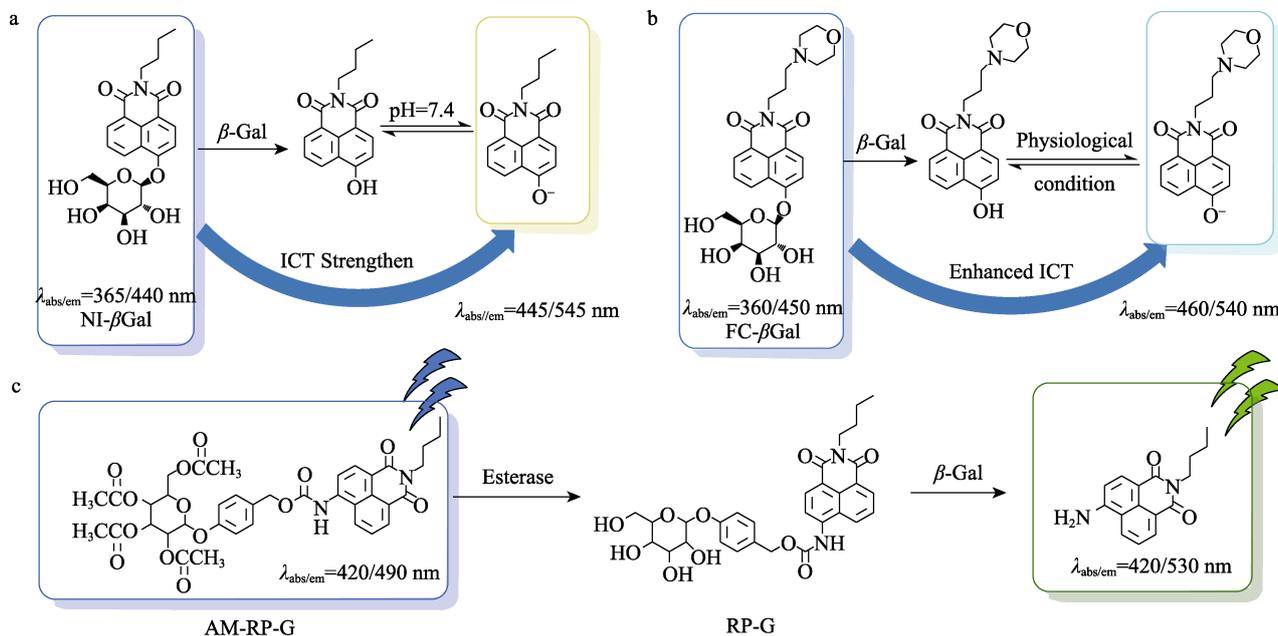


图 4 探针 NI- β Gal (a)^[30]、FC- β Gal (b)^[31]和 AM-RP-G (c)^[32]分子结构及响应 β -Gal 的传感机理
Fig. 4 Molecular structures and β -Gal sensing mechanisms of NI- β Gal (a)^[30], FC- β Gal (b)^[31] and AM-RP-G (c)^[32]

1.4 检测 β -Gal 氟硼二吡咯 ICT 荧光探针

近年来, 氟硼二吡咯染料 (BODIPY) 因具有结构易修饰性、吸收及发射波长近红外光区可调性、光热稳定性、荧光量子产率高、荧光寿命长、荧光强度对溶剂极性和 pH 变化不敏感等优点, 在荧光检测领域受到研究人员的广泛关注^[33]。SHI 等^[34]报

道了一例 β -Gal 激活型近红外比率荧光探针 BODIPY- β Gal ($\lambda_{\text{abs/em}}=560/575$ nm) (图 5)。

与 β -Gal 反应后, BODIPY 荧光骨架 3 位 β -D-半乳糖基团被 4'-氧负离子苯乙基取代, 具有给电子能力的氧负离子增强了 BODIPY 电子推拉体系, 进而促进了分子吸收峰、荧光发射峰的红移 ($\lambda_{\text{abs/em}}=$

620/730 nm)。通过近红外探针 BODIPY-βGal 比例荧光成像,对卵巢癌细胞内 β-Gal 活性的检测结果具有低信噪比和不受背景荧光干扰等特性。

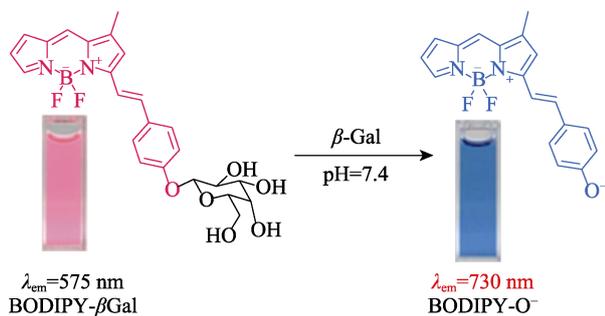


图 5 探针 BODIPY-βGal 分子结构及其响应 β-Gal 传感机理^[34]

Fig. 5 Molecular structure and β-Gal sensing mechanism of BODIPY-βGal^[34]

不同于可见光区和近红外-I 区荧光成像,近红外-II 区荧光成像 (1000~1700 nm) 能有效抑制光子

散射,具有更强组织穿透能力和更高空间分辨率,为生物深层组织研究开辟了一条新的途径^[16]。CHEN 等^[35]在 BODIPY 荧光骨架 6 位上修饰吸电子基团,开发了两例 β-Gal 激活型近红外荧光探针 BOD-M-βGal 和 BOD-K-βGal,用于卵巢癌成像(图 6)。β-Gal 催化探针糖苷键断裂,产生自消除反应,生成硫醇取代产物 BOD-M-SH (或 BOD-K-SH),并伴有荧光强度的增加。与 1,2-二甲基-5-咪唑酮相比,1,1-二甲基苯并咪唑具有更强的吸电子能力,BOD-M-βGal 荧光发射波长较 BOD-K-βGal 从近红外-I 区红移到了近红外-II 区。皮下移植 SKOV3 肿瘤裸鼠的近红外成像结果显示,与 NIR-I 探针 BOD-K-βGal 相比,NIR-II 探针 BOD-M-βGal 具有更深的组织穿透能力(2 mm),实现了对深层组织中 β-Gal 活性的检测。BODIPY 荧光团 6 位修饰吸电子基团的合成策略为近红外-II 区荧光探针的设计提供了有效途径。

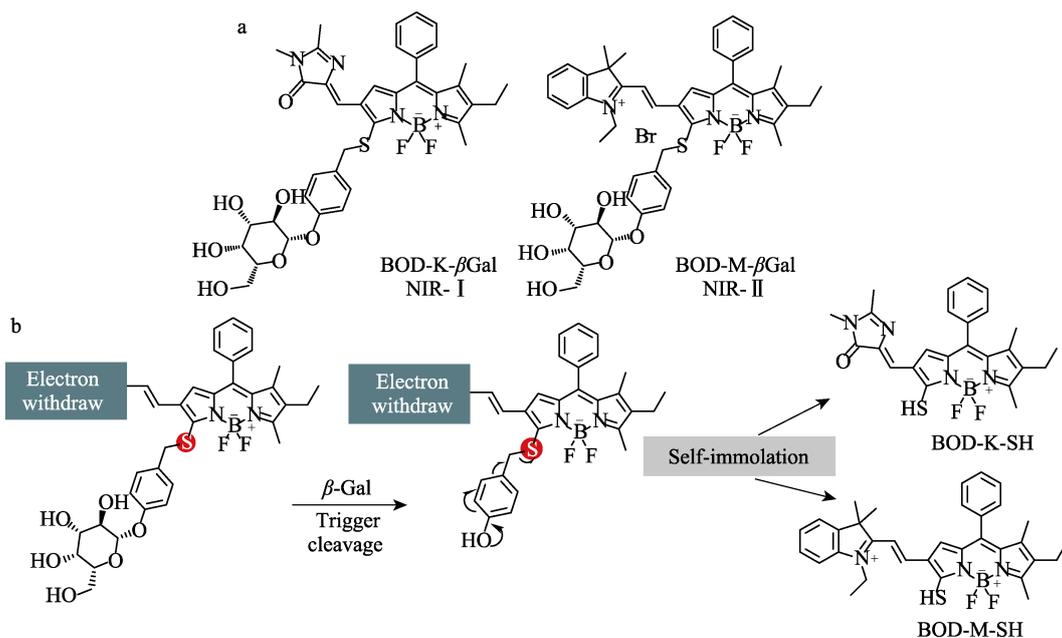


图 6 探针 BOD-K-βGal 与 BOD-M-βGal 分子结构 (a) 和响应 β-Gal 的传感机理 (b) ^[35]
Fig. 6 Molecular structures (a) and β-Gal sensing mechanisms (b) of BOD-K-βGal and BOD-M-βGal^[35]

1.5 检测 β-Gal 罗丹明 ICT 荧光探针

罗丹明是典型的氧杂蒽荧光染料,具有高荧光量子产率和光稳定性^[36]。罗丹明染料能够进行醌式和内酯式结构互变:碱性条件下,罗丹明染料以闭环形式(内酯结构)存在,螺环结构破坏了氧杂蒽电子共轭体系使染料没有明显的荧光发射;中性和酸性条件下,罗丹明染料以开环形式(醌式结构)存在,产生明显的荧光发射峰^[37]。综上可知,识别基团响应外界刺激后能够诱导螺环开环是罗丹明荧光探针的设计基础。

KAMIYA 等^[38]合成了羟甲基取代 N,N'-二乙基

罗丹明 (HMDER) 与其甲醚衍生物 HMDER-Me (图 7a、b)。

HMDER-Me 的 $pK_{a, \text{开环}}=6.6$,与 HMDER 相比 ($pK_{a, \text{开环}}=11.3$),更容易在生理环境下保持闭环结构。因此,KAMIYA 等^[38]在 HMDER-Me 结构基础上设计、合成了能够避免质子干扰的 β-Gal 荧光探针 HMDER-βGal (图 7c、d)。响应 β-Gal 催化,HMDER-βGal 形成开环结构,释放 ICT 荧光。同时,探针 HMDER-βGal 具有良好细胞通透性、细胞蓄积能力和光稳定性,能够被用作稳定输出信号的 β-Gal 检测工具。

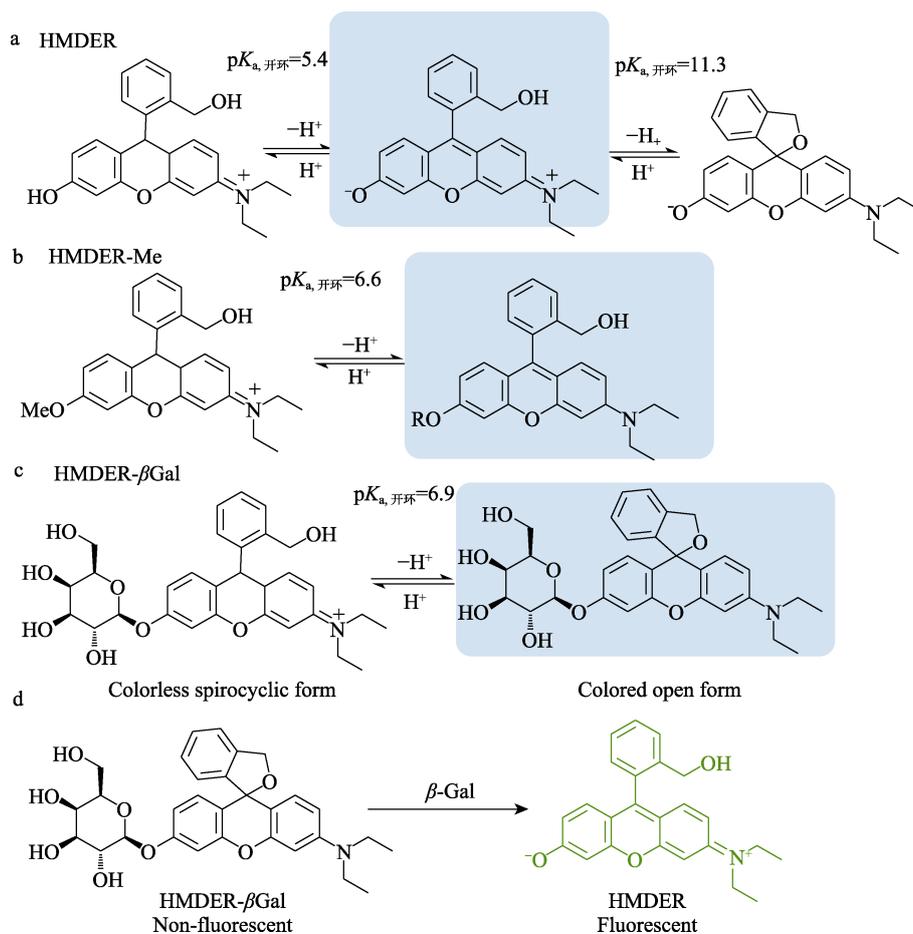


图 7 HMDER (a), HMDER-Me (b) 和 HMDER- β Gal (c) 分子结构及其响应 pH 变化开-闭环机理; 探针 HMDER- β Gal 检测 β -Gal 的传感机理 (d) [38]

Fig. 7 Molecular structures of HMDER (a), HMDER-Me (b) and HMDER- β Gal (c) and their open-close loop mechanisms for responding to pH changes; β -Gal sensing mechanism of HMDER- β Gal (d) [38]

SAKABE 等^[39]在羟甲基罗丹明 (HMRs) 结构上构建了乙酰化羟甲基罗丹明绿 (Ac-HMRG) 作为全新荧光骨架 (图 8a)。在生理 pH 条件下, 不同于 HMRs 开环释放荧光, Ac-HMRG 仍以闭环形式存在, 不产生背景荧光信号。因此, SAKABE 等^[39]以 Ac-HMRG 为基础设计、合成 β -Gal 荧光探针 β Gal-HMRG (图 8a)。 β Gal-HMRG 能够对 *lacZ* 转染细胞表达 β -Gal 的水平进行了灵敏表征。除了在荧光检测领域具有广阔的应用前景, ICHIKAWA 等^[40]用硒原子取代 β Gal-HMRG 氧杂蒽骨架的氧原子, 为 β -Gal 检测荧光探针引入了光敏剂特性, 实现了 β -Gal 激活型肿瘤诊断与光动力治疗的一体化。在 pH=7.4 生理条件下, 摩尔分数约 25% 的 HMDER- β Gal ($pK_{a, \text{开环}}=6.6$) 开环释放荧光, 对 β -Gal 检测信号产生干扰。ASANUMA 等^[7]在 HMDER- β Gal 骨架上修饰了具有吸电子能力的三氟乙基, 设计、合成 β -Gal 激活型荧光探针 HMRref- β Gal (图 8b)。与探针 HMDER- β Gal 相比, HMRref- β Gal 分子轨道能级低, 具有稳定的环化结构 ($pK_{a, \text{开环}}=4.5$), 不受生理

环境中质子的影响。HMRref- β Gal 能够灵敏检测 SHIN3、SKOV3、OVK18、OVCAR3、OVCAR4、OVCAR5 和 OVCAR8 等卵巢癌细胞内 β -Gal 的活性, 并通过内窥镜荧光活体检测, 对小鼠卵巢癌微小肿瘤转移病灶进行精确定位。

KIM 等^[41]通过在 HMDER- β Gal 骨架上引入哌嗪基团, 开发了一例具有溶酶体靶向性, 用于衰老细胞 β -Gal 检测的罗丹明荧光探针 SRP (图 9a)。在 pH=6.0 (衰老细胞溶酶体 pH) 缓冲溶液中, 探针响应 β -Gal (0.1 U/mL) 催化开环后, 释放 ICT 荧光 ($\lambda_{em}=545 \text{ nm}$) 且信号强度在 30 min 内显著增强 27 倍。根据孵育后细胞荧光强度的不同, SRP 能够对 H_2O_2 诱导衰老产生的人脐静脉细胞 (HUVECs) 与正常细胞进行区分。LI 等^[42]在罗丹明氧杂蒽骨架上拓展了苯环共轭结构, 设计、合成了一例近红外双光子荧光探针 TR-G, 并且将其成功应用于小鼠活体中 β -Gal 的活性检测 (图 9b)。探针 TR-G 发射橙红色荧光, 而当 β -Gal 催化探针开环生成 TR-O⁻后, 形成的增强型 ICT 体系使探针荧光发射波长红移到 NIR 区域。

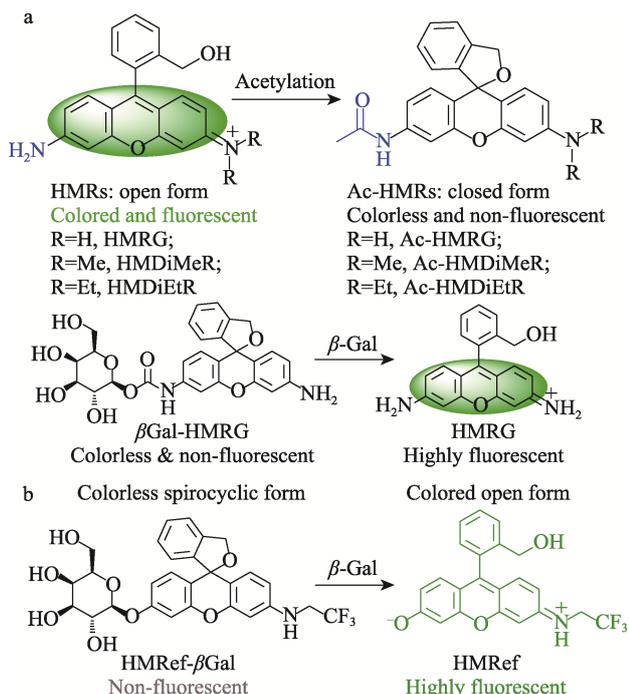


图 8 生理 pH 条件下, HMRs 和 Ac-HMRs 分子结构及荧光对比以及 β Gal-HMRG 分子结构与其响应 β -Gal 传感机理 (a)^[39]; HMRef- β Gal 分子结构及 β -Gal 传感机理 (b)^[7]

Fig. 8 Molecular structures and fluorescence contrast of HMRs and Ac-HMRs under physiological pH conditions, molecular structure and β -Gal sensing mechanism of β Gal-HMRG (a)^[39]; Molecular structure and β -Gal sensing mechanism of HMRef- β Gal (b)^[7]

探针 TR-G 检测限为 4.13×10^{-4} U/mL, 同时作为双光子荧光探针, TR-G 具有卓越的组织穿透能力, 能够对深层组织中肿瘤 β -Gal 的活性进行灵敏示踪。

ICT 荧光探针响应 β -Gal 催化后, 其电子推拉体系增强并伴随荧光强度的增强, 实现对 β -Gal 的检测。同时, ICT 荧光探针吸收、发射波长可通过荧光团共轭体系长度进行调节, 用于具有高空间分辨率近红外 β -Gal 荧光探针的设计。然而, ICT 探针荧光发射峰为单峰, 其荧光强度常受 pH, 背景荧光和仪器参数变化等因素影响, 检测限较高, 难以对 β -Gal 活性进行准确检测。

2 基于 FRET 机理构建的 β -Gal 荧光探针

FRET 荧光探针的能量供体荧光光谱与能量受体吸收光谱波长范围具有一定程度的重叠。FRET 探针受光激发时, 能量供体产生荧光发射 ($\lambda_{em,1}$), 并通过偶极-偶极相互作用将能量传递给受体荧光团, 激发受体荧光 ($\lambda_{em,2}$)^[43-44]。通过 β -Gal 调节能量供体、受体之间的能量传递效率, FRET 荧光探针比例荧光强度 ($I_{\lambda_{em,1}}/I_{\lambda_{em,2}}$) 与 β -Gal 活性密切相关。与单发射荧光探针相比, FRET 探针比例荧

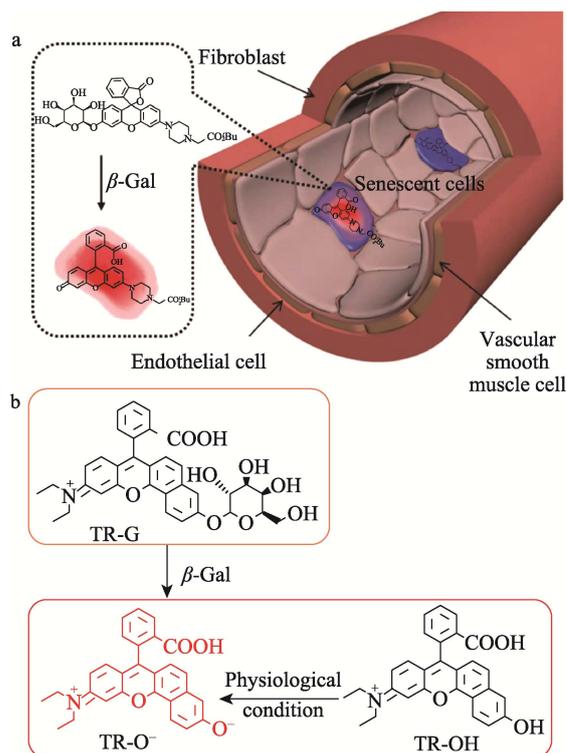


图 9 探针 SRP 分子结构及其监测衰老血管内皮细胞内 β -Gal 的传感机理 (a)^[41]; TR-G 分子结构及其对 β -Gal 的传感机理 (b)^[42]

Fig. 9 Molecular structure and β -Gal sensing mechanism in senescent vascular endothelial cell of SRP (a)^[41]; Molecular structure and β -Gal sensing mechanism of TR-G (b)^[42]

光不受仪器参数、背景荧光等因素干扰, 能够对 β -Gal 活性进行准确检测。

香豆素母体苯并吡喃酮荧光量子产率低, 而在香豆素骨架上修饰 7 位供电子基团 (羟基或者氨基) 或 3 位吸电子基团后, 能够增强香豆素荧光。香豆素荧光团具有良好的光化学性质、光稳定性及荧光量子、斯托克斯位移大等特性, 常被用作能量供体构建 FRET 荧光探针^[45]。KOMATSU 等^[46]报道了一例由香豆素、荧光素共同构建的 β -Gal 响应型 FRET 荧光探针 CMF- β Gal (图 10a)。当探针响应 β -Gal 催化后, 亲核氨基酸取代 FRET 能量受体, 荧光素荧光逐步减弱, 能量供体 (7-羟基香豆素) 的荧光强度不断增强。探针 CMF- β Gal 可以实时监控 *lacZ* 转染后细胞内 β -Gal 表达水平。然而, CMF- β Gal 检测活体内 β -Gal 荧光信号强度的大小, 受靶向位置蛋白质结构及氨基酸亲核特性等因素的影响, 存在一定应用局限性。KONG 等^[47]报道了一例香豆素-萘酰亚胺 β -Gal 响应型 FRET 荧光探针 CG, 用于生物环境中 β -Gal 活性检测 (图 10b)。不同于探针 CG 只发射能量供体 (香豆素) 蓝色荧光, β -Gal 催化后, 探针 CG 萘酰亚胺荧光团 4 位半乳糖基团被供电子

羟基取代反应生成产物 CN, 香豆素荧光通过 FRET 效应进一步激活萘酰亚胺 (能量受体) 的黄色荧光。探针 CG 是结合 ICT 和 FRET 机理构建的二维检测体系, 其比例荧光强度能够灵敏响应 β -Gal 活性 (<20 s, $DL=8.1 \times 10^{-2}$ U/mL), 通过计算 OVCAR-3 卵巢癌细胞中探针比例荧光强度的大小, 能够对细胞 β -Gal 的活性进行实时检测。

2020 年, WEI 等^[48]设计了一例双光子 FRET 荧光探针 FTR- β Gal (图 10c)。 β -Gal 催化反应前, 探针 FTR- β Gal 发射萘环荧光 ($\lambda_{em,1}=450$ nm), 同时萘环作为能量供体, 赋予了探针双光子激活特性。当

β -Gal 催化罗丹明 (能量受体) 开环生成反应产物 Np-Rhod 后, 萘环荧光通过 FRET 效应激活罗丹明, 释放强烈的受体荧光 ($\lambda_{em,2}=540$ nm)。测试体系中 β -Gal 活性从 0 增加到 25 U/L 时, 探针 FTR- β Gal 荧光强度比 (I_{540}/I_{450}) 能灵敏响应 β -Gal 活性变化 (0.15~5.90, 增强约 40 倍)。探针 FTR- β Gal 的双光子激发特性使其具有极强的组织穿透能力。研究人员通过监测探针分子能量给体 (绿色通道) 和能量受体 (红色通道) 荧光强度比的大小, 能够对深层组织 (30~150 μ m) 中 *lacZ* 转染细胞 β -Gal 的表达水平进行监控。

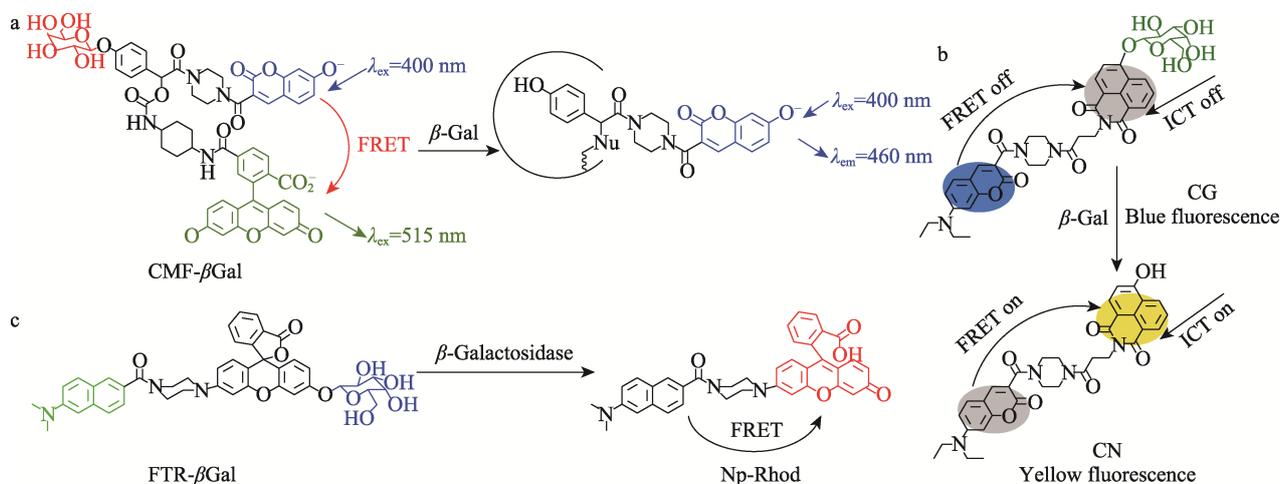


图 10 探针 CMF- β Gal (a)^[46]、CG (b)^[47]和 FTR- β Gal (c)^[48]分子结构及其响应 β -Gal 催化的传感机理
Fig. 10 Molecular structures and β -Gal sensing mechanisms of CMF- β Gal (a)^[46], CG (b)^[47] and FTR- β Gal (c)^[48]

FRET 荧光探针响应 β -Gal 催化前后, 能量受体和供体荧光团之间能量传递产生“开-关”(或“关-开”)切换, 产生双荧光发射峰。FRET 探针荧光强度比不受背景荧光和仪器参数等因素影响, 能够对 β -Gal 活性进行准确检测。然而, 比例荧光探针往往激发或荧光发射波长较短, 难以对深层组织进行成像检测, 增加了探针设计和应用的局限性。

3 基于 AIE 机理构建的 β -Gal 荧光探针

传统荧光团浓度过高时会发生聚集引起荧光的猝灭 (ACQ)。与 ACQ 荧光团不同, AIE 分子聚集程度越大, 荧光发射越强, 在生命检测领域具有广阔的应用前景^[49-50]。当 AIE 荧光团处于分散状态时, 分子通过非辐射跃迁途径 (振动或旋转) 猝灭分子激发态; 而当 AIE 荧光团产生聚集时, 分子振动或旋转受到分子间距缩短的限制, 同时 AIE 分子结构扭曲不产生充分的 π - π 堆积, 激子从非辐射跃迁转化为辐射跃迁, 释放荧光。

3.1 检测 β -Gal 四苯乙烯 AIE 荧光探针

四苯乙烯是 AIE 荧光探针常用的发色团。

CERÓN 等^[51]设计了一例 AIE 荧光探针 TPE-Gal, 用于 β -Gal 的检测 (图 11a)。 β -Gal 催化探针 TPE-Gal 释放 β -D-半乳糖生成的化合物 1 能够产生自消除反应, 其吡啶环上的氮原子去季铵盐化生成化合物 2。与探针 TPE-Gal 相比, 化合物 2 水溶性低促进了四苯乙烯基团聚集发射荧光。TPE-Gal ($DL=0.33$ U/mL) 能够对内源性 β -Gal 活性进行实时监控, 在卵巢癌诊断及治疗效果评估方面具有很大的应用潜力。

3.2 检测 β -Gal 喹啉-丙二腈 AIE 荧光探针

不同于苯并吡喃具有 ACQ 特性, 氮原子被烷基链取代的喹啉-丙二腈 (QM) 常被用作 AIE 探针发色团。GU 等^[52]报道了一例 AIE 荧光探针 QM- β Gal, 实现了对 β -Gal 活性的灵敏检测 (图 11b)。QM- β Gal 被 β -Gal 催化释放亲水 β -D-半乳糖基团, 生成化合物 QM-OH。与探针 QM- β Gal 相比, QM-OH 的疏水性有利于喹啉-丙二腈基团聚集, 抑制氮原子上乙基旋转 (非辐射跃迁), 促进喹啉-丙二腈发射荧光。探针荧光强度能灵敏地响应 β -Gal 活性变化 (0~6 U), 并在短时间内达到稳定。探针 QM- β Gal 可被应用于 SKOV-3 等卵巢癌细胞内 β -Gal 活性的表征。

与 AIE 发色团非辐射跃迁被抑制产生荧光的机理相同, HBT 通过产生 ESIPT 效应也能够抑制非辐射跃迁进而产生荧光。FU 等^[53]通过缩合反应构建喹啉-丙二腈-HBT 近红外荧光骨架(QM-HBT), 设计、合成 β -Gal 响应型荧光探针 QM-HBT- β Gal(图 11c)。在生理环境中, QM-HBT- β Gal 响应 β -Gal 催化, 释放亲水性 β -D-半乳糖基团, 生成 QM-HBT-O⁻。与探针 QM-HBT- β Gal 相比, QM-HBT-O⁻质子化后形成的 QM-HBT-OH 具有疏水特性, 在水相测试体系中更易聚集。QM-HBT-OH 聚集后, 喹啉氮原子上乙基的旋转被抑制, 同时 HBT 产生的 ESIPT 效应, 共同促进了 QM-HBT 发射荧光。探针 QM-HBT- β Gal 依据 AIE 和 ESIPT 二维检测机理构建, 对 β -Gal 具有特异性响应能力, 检测卵巢癌细胞内 β -Gal 表达活性时不受其他竞争物种的影响。

3.3 检测 β -Gal 水杨醛吡嗪 AIE 荧光探针

与 HBT 类似, 水杨醛吡嗪(SA)也可以通过 ESIPT 效应产生荧光。PENG 等^[54]报道了一例 β -Gal 荧光探针 SA- β Gal(图 11d)。SA- β Gal 被 β -Gal 水解后释放亲水性 β -D-半乳糖, 生成化合物 SA。与探针 SA- β Gal 相比, SA 的疏水性促进了分子聚集; 同时 SA 产生的 ESIPT 效应(酚羟基质子转移给氮原子), 抑制了水杨醛苯环的旋转; 共同促进了探针荧光的发射。与细胞共孵育时, 探针 SA- β Gal 在水溶液中形成直径约为 173 nm 的纳米粒子, 通过内吞作用进入细胞。依据 AIE 和 ESIPT 二维检测机理构建的探针 SA- β Gal 在鼠胶质瘤 C6/*lacZ* 细胞中的荧光强度显著高于在对照组 HeLa 细胞中的荧光强度, 能够特异性检测 β -Gal 活性并具有极高检测信噪比。

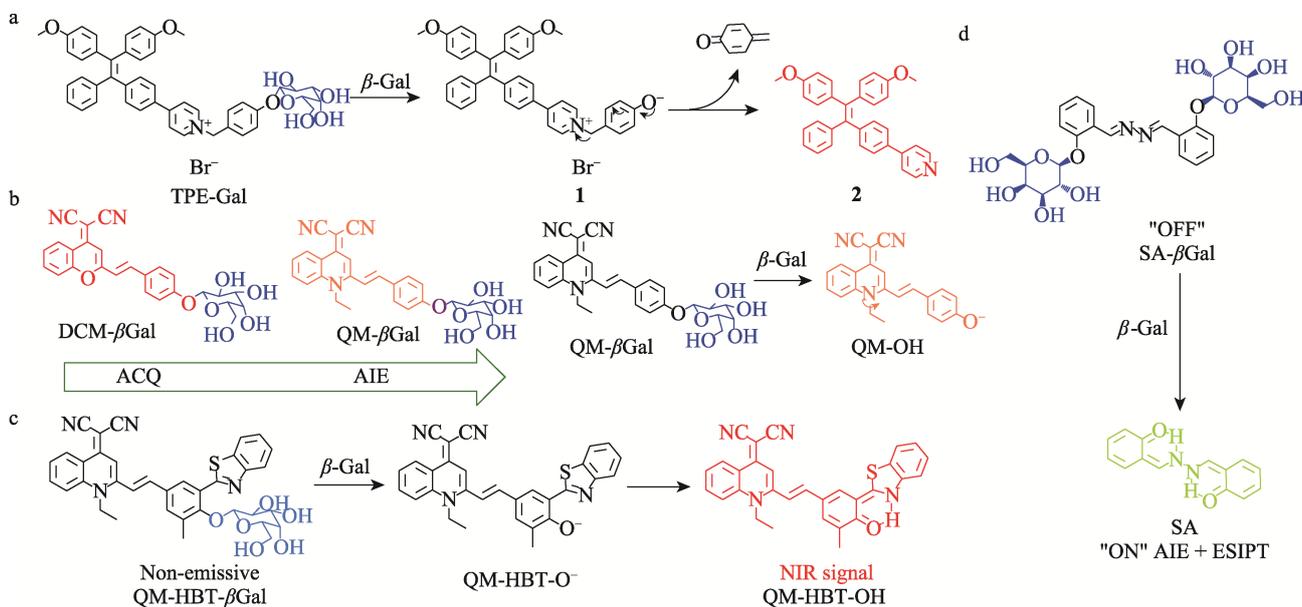


图 11 探针 TPE-Gal 分子结构及其响应 β -Gal 的传感机理 (a)^[51]; 探针 DCM- β Gal、QM- β Gal 分子结构和 QM- β Gal 响应 β -Gal 传感机理 (b)^[52]; 探针 QM-HBT- β Gal (c)^[53]和探针 SA- β Gal (d)^[54]分子结构及其响应 β -Gal 的传感机理

Fig. 11 Molecular structure and β -Gal sensing mechanism of TPE-Gal (a)^[51]; Molecular structures of DCM- β Gal and QM- β Gal and β -Gal sensing mechanism of QM- β Gal (b)^[52]; Molecular structures and β -Gal sensing mechanisms of probes QM-HBT- β Gal (c)^[53] and SA- β Gal (d)^[54]

β -Gal 催化 AIE 荧光探针反应释放亲水性 β -D-半乳糖, 生成疏水性发色团的同时, 诱导探针聚集(非辐射跃迁被抑制)产生荧光。AIE 荧光探针能够避免荧光团中普遍存在的聚集猝灭荧光现象, 保真 β -Gal 检测信号。然而, 构建 AIE 探针常用的四苯乙烯、喹啉丙二腈和水杨醛吡嗪荧光团波长较短, 难以对 β -Gal 进行近红外成像检测。

4 基于 PET 机理构建的 β -Gal 荧光探针

PET 是指电子供体与处于激发态的荧光电子受

体或电子受体与处于激发态的荧光电子供体之间的电子转移过程^[55-56]。PET 荧光探针一般由荧光团、连接基团和作为电子受体(或供体)的识别基团组成。PET 过程能够猝灭荧光团荧光, 而 PET 过程被抑制可以恢复荧光团荧光。荧光探针通过 β -Gal 催化, 调节荧光团(或识别基团)的电子密度, 抑制 PET 过程的发生, 释放荧光检测信号。

4.1 检测 β -Gal 荧光素 PET 荧光探针

URANO 等^[57]开发了烷氧基取代苯环为电子供体的荧光素 PET 检测体系, 设计、合成了一例用于

检测 β -Gal 的 PET 荧光探针 TG- β Gal (图 12a)。响应 β -Gal 催化后, TG- β Gal 反应生成氧杂蒽骨架 6 位氧负离子取代的 2-甲基-4-甲氧基东京绿(2-Me-4-OMe TokyoGreen)。与 TG- β Gal 相比, 2-Me-4-OMe TokyoGreen 氧杂蒽基团电荷密度提高, 2-甲基-4-甲氧基取代苯(电子给体)对激发态氧杂蒽的 PET 过程被抑制, 荧光得以释放。探针 TG- β Gal 对 β -Gal 的高灵敏响应性以及其良好的膜通透性等特点确保了探针可以被成功应用于细胞内 β -Gal 的活性检测, 能够对 *lacZ* 基因转染 GP293 细胞表达 β -Gal 的水平进行表征。

TG- β Gal 响应 β -Gal 催化后, 生成的疏水性产物易扩散到细胞膜上被洗掉, 从而降低了检测准确度。因此, KAMIYA 等^[58]在随后的研究中, 以探针 TG- β Gal 为基础, 延长了 2-甲基-4-烷氧基取代苯(PET 电子给体)烷氧基的碳链长度, 并在碳链末端修饰羧基引入乙酰羟甲基酯, 另合成了一例 β -Gal 响应型 PET 探针 AM-TG- β Gal (图 12b)。AM-TG- β Gal 响应细胞内 β -Gal 催化生成 AM-TG, 提高了氧杂蒽电荷密度, 进而抑制了 PET 过程并释放探

针荧光。而细胞内广泛存在的酯酶能够水解 AM-TG 的乙酰羟甲基酯, 生成具有亲水性羧基的化合物 **3**, 更易被细胞保留。与探针 TG- β Gal 相比, 探针 AM-TG- β Gal 不仅能对 HEK293 细胞内的 β -Gal 活性进行检测, 更能在细胞水洗后, 保持荧光信号强度的持续、稳定输出, 具有一定的临床应用价值。

4.2 检测 β -Gal 萘酰亚胺 PET 荧光探针

为了获得更高的空间分辨率和更深的组织穿透性, LOZANO-TORRES 等^[13]以萘二甲酰亚胺作为荧光团, 设计、合成了一例检测衰老细胞 β -Gal 水平的 PET 双光子探针 AHGa (图 12c)。AHGa 通过 L-组氨酸甲酯连接乙酰化 β -D-半乳糖(PET 电子给体)和萘酰亚胺荧光团构成, 并在被光激发后产生 PET 过程, 荧光猝灭。探针 AHGa 被 SA- β -Gal 催化反应生成 AH 后, PET 过程被抑制产生强烈的荧光发射。AHGa 作为双光子荧光探针能够避免组织深度的干扰, 对帕博西尼(Palbociclib)诱导产生的衰老 SK-MEL103 人黑色素瘤细胞中 β -Gal 表达水平进行高灵敏检测。

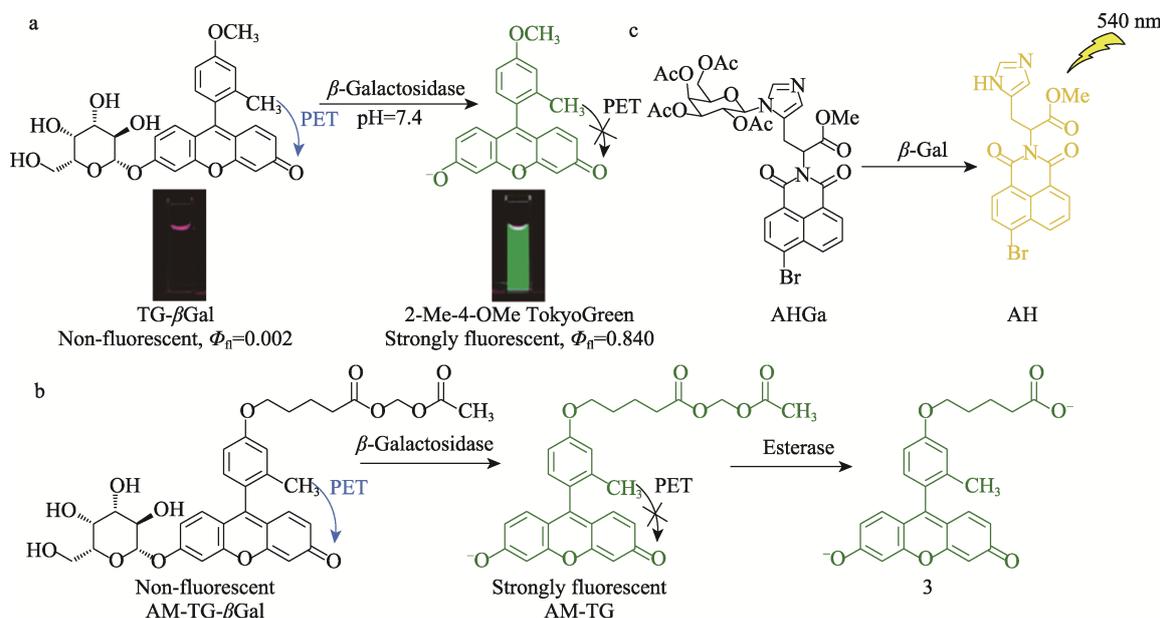


图 12 探针 TG- β Gal (a)^[57], 探针 AM-TG- β Gal (b)^[58]和探针 AHGa (c)^[13]分子结构及其响应 β -Gal 的传感机理
 Fig. 12 Molecular structures and β -Gal sensing mechanisms of probes TG- β Gal (a)^[57], AM-TG- β Gal (b)^[58] and AHGa (c)^[13]

PET 荧光探针在被 β -Gal 催化后, 其电子转移过程被抑制, 荧光得以释放。不同于 ICT 荧光探针, PET 荧光探针经合理设计检测 β -Gal 时, 其荧光信号强度可以不受 pH 影响。同时, 萘酰亚胺 PET 荧光探针能够被双光子激光激发, 实现 β -Gal 的深层组织成像。然而, 实现 β -Gal 催化探针 PET 过程的 on-off, 须筛选电子能级匹配的探针电子给体和荧光电子受体(或电子受体和荧光电子给体), 存在一定

的设计复杂性。

5 基于其他发光机理构建的 β -Gal 荧光探针

化学反应引起电子交换并释放能量, 进而激活发色团荧光的过程被称为化学引发电子交换发光(CIEEL)。GREEN 等^[59]首先在苯环上金刚烷-二氧环丁烷取代基的间位引入 β -D-半乳糖, 并在邻位引入苯并吡喃酮荧光团, 合成 β -Gal 响应型近红外荧

光探针 LP- β Gal (图 13a)。 β -Gal 催化 LP- β Gal 生成酚氧负离子, 诱导电子重排生成甲酯释放的能量激活苯并吡喃酮, 发射近红外荧光。与野生型 Heck293 细胞 (Heck293-wt) 相比, *lacZ* 转染 Heck293 细胞中的 LP- β Gal 产生了明显的化学发光效应, 能够实现对其表达水平的检测。

2020 年, CHAI 等^[60]设计、合成了一例 β -Gal 响应型荧光探针 NpG (图 13b)。探针 NpG 响应 β -Gal

催化后, 通过光致变色机理实现其部花菁 (NpM) 和螺吡喃 (NpS) 结构互变, 产生菁染料荧光信号的闪烁。同时, 探针 NpG 能够与人血清白蛋白 (HSA) 杂化成 NpG@HSA 纳米粒子, 提高了探针水溶性, 防止荧光 ACQ 现象的产生, 有利于探针在生物环境中的应用。此外, 通过随机重建光学显微术 (STORM), NpG@HSA 能够对衰老 WI-38 细胞内 β -Gal 表达水平进行检测。

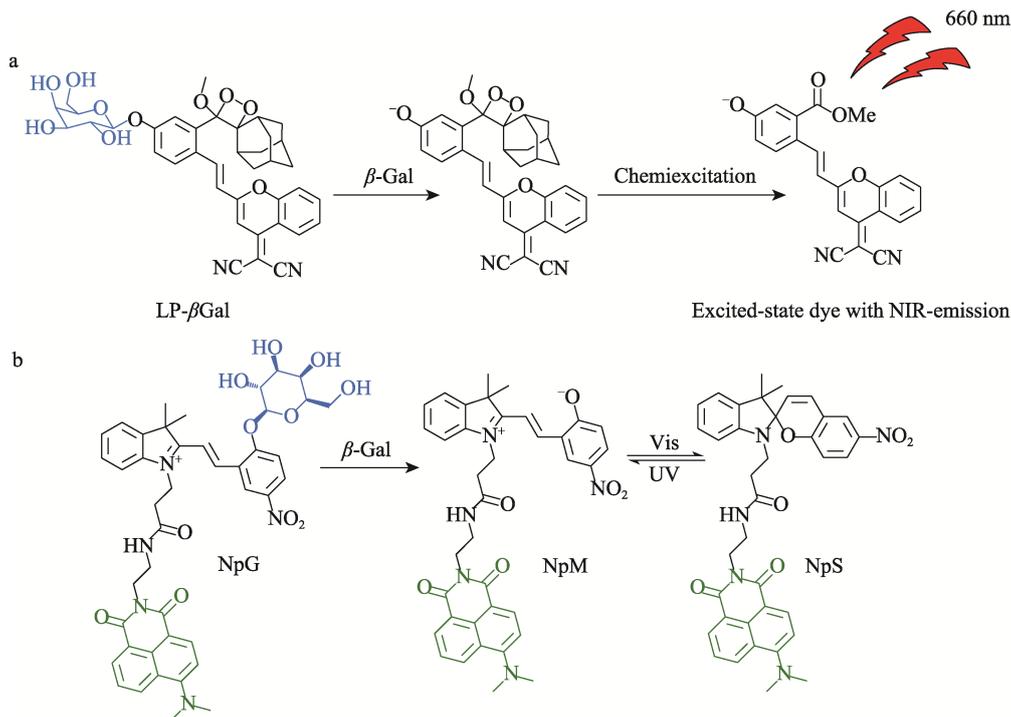


图 13 探针 LP- β Gal (a)^[59]和探针 NpG (b)^[60]分子结构及其响应 β -Gal 的传感机理
Fig. 13 Molecular structures and β -Gal sensing mechanisms of LP- β Gal (a)^[59] and NpG (b)^[60]

6 结束语与展望

活体中酶活性分析已成为疾病诊断的常见策略。 β -Gal 是细胞衰老和卵巢癌等生理、病理过程重要的生物标志物, 在过去的数十年里, 用于 β -Gal 活性检测荧光探针的研究取得了重大进展。已报道的 β -Gal 荧光探针检测限已达到 1×10^{-5} U/mL, 不但可以检测 SHIN3、SKOV3、OVK18、OVCAR3、OVCAR4、OVCAR5 和 OVCAR8 等卵巢癌细胞或衰老细胞内 β -Gal 的活性, 而且通过同时检测细胞微环境 pH, 能够对衰老和卵巢癌相关 β -Gal 进行准确区分、检测; 同时, 能够对不同种属 β -Gal 进行特异性识别, 提高了人源性 β -Gal 活性检测的可靠性。因此, 研究通过不同荧光信号传导机理构建的 β -Gal 荧光探针可为生物医学诊断和化学生物学研究提供坚实的理论基础。

本综述总结了近年来基于不同荧光信号传导机理构建的 β -Gal 探针, 并分析、比较了 ICT、FRET、

AIE 和 PET 型 β -Gal 荧光探针的分子结构、应用特点及使用局限, 如 ICT 型 β -Gal 荧光探针波长虽可被调节到近红外区, 然而其荧光强度常受质子和背景荧光等参数干扰, 产生假阳性信号; FRET 型 β -Gal 荧光探针比例荧光强度虽能够不受背景荧光和仪器参数等影响, 对 β -Gal 活性进行准确检测, 然而其波长较短, 难以对深层组织进行成像; AIE 型 β -Gal 荧光探针虽然能够避免因为染料聚集产生荧光猝灭导致的信号失真, 然而四苯乙烯等 AIE 荧光团波长较短, 难以对 β -Gal 进行长波长检测; 而设计 PET 型 β -Gal 荧光探针虽需要筛选能级匹配的电子给体和荧光电子受体 (或荧光电子给体和电子受体), 然而探针 PET 荧光信号传导通路与荧光团自身 ICT 荧光传导通路共同构建的二维检测体系, 能够避免探针检测 β -Gal 时 pH 的影响。综上可知, 结合 ICT、FRET、AIE 和 PET 等多信号传导机理共同构建的 β -Gal 荧光探针, 有望突破使用单一信号传导机理造成的检测局限。在此基础上, 开发同时具有低检测

限且波长位于近红外光区的 β -Gal 荧光探针不但可以提高临床检测灵敏度, 对早期卵巢癌或细胞衰老进行检测, 而且可以提高探针在深层组织成像的空间分辨率。同时, 开发具有细胞膜通透性、细胞保留性好以及化学稳定性高等特点的 β -Gal 荧光探针能够使检测信号稳定输出, 提高探针信号的保真度。

本综述为用于 β -Gal 相关疾病诊断和治疗效果评估荧光探针的研发奠定了坚实基础, 有助于推进荧光探针在疾病检测领域取得突破性进展。

参考文献:

- [1] JACOBSON R H, ZHANG X J, DUBOSE R F, *et al.* Three-dimensional structure of β -galactosidase from *E. coli*[J]. *Nature*, 1994, 369(6483): 761-766.
- [2] MATTHEWS B W. The structure of *E. coli* β -galactosidase[J]. *Comptes Rendus Biologies*, 2005, 328(6): 549-556.
- [3] DIMRI G P, LEE X, BASILE G, *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92(20): 9363-9367.
- [4] GU K Z, XU Y S, LI H, *et al.* Real-time tracking and *in vivo* visualization of β -galactosidase activity in colorectal tumor with a ratiometric near-infrared fluorescent probe[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138(16): 5334-5340.
- [5] ZHANG J J, CHENG P H, PU K Y. Recent advances of molecular optical probes in imaging of β -galactosidase[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2019, 30(8): 2089-2101.
- [6] YAO Y K, ZHANG Y T, YAN C X, *et al.* Enzyme-activatable fluorescent probes for β -galactosidase: From design to biological applications[J]. *Chemical Science*, 2021, 12(29): 9885-9894.
- [7] ASANUMA D, SAKABE M, KAMIYA M, *et al.* Sensitive β -galactosidase-targeting fluorescence probe for visualizing small peritoneal metastatic tumours *in vivo*[J]. *Nature Communications*, 2015, 6(1): 6463.
- [8] DI MICCO R, KRIZHANOVSKY V, BAKER D, *et al.* Cellular senescence in ageing: From mechanisms to therapeutic opportunities[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2020, 22(112): 75-95.
- [9] SHI D L, LIU W W, WANG G W, *et al.* Small-molecule fluorescence-based probes for aging diagnosis[J]. *Acta Materia Medica*, 2022, 1(1): 4-23.
- [10] PAEZ-RIBES M, GONZÁLEZ-GUALDA E, DOHERTY G J, *et al.* Targeting senescent cells in translational medicine[J]. *EMBO Molecular Medicine*, 2019, 11(12): 1-19.
- [11] LI X K, QIU W J, LI J W, *et al.* First-generation species-selective chemical probes for fluorescence imaging of human senescence-associated β -galactosidase[J]. *Chemical Science*, 2020, 11(28): 7292-7301.
- [12] GAO Y, HU Y L, LIU Q M, *et al.* Two-dimensional design strategy to construct smart fluorescent probes for the precise tracking of senescence[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(19): 10756-10765.
- [13] LOZANO-TORRES B, GALIANA I, ROVIRA M, *et al.* An off-on two-photon fluorescent probe for tracking cell senescence *in vivo*[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139(26): 8808-8811.
- [14] JHUN B H, OHKUBO K, FUKUZUMI S, *et al.* Synthetic control over intra- and intermolecular charge transfer can turn on the fluorescence emission of non-emissive coumarin[J]. *Journal of Materials Chemistry C*, 2016, 4(20): 4556-4567.
- [15] SUN W, GUO S G, HU C, *et al.* Recent development of chemosensors based on cyanine platforms[J]. *Chemical Reviews*, 2016, 116(14): 7768-7817.
- [16] GUO Z Q, PARK S, YOON J, *et al.* Recent progress in the development of near-infrared fluorescent probes for bioimaging applications[J]. *Chemical Society Reviews*, 2014, 43(1): 16-29.
- [17] REDY-KEISAR O, KISIN-FINFER E, FERBER S, *et al.* Synthesis and use of QCy7-derived modular probes for the detection and imaging of biologically relevant analytes[J]. *Nature Protocols*, 2014, 9(1): 27-36.
- [18] ZHANG J T, LI C, DUTTA C, *et al.* A novel near-infrared fluorescent probe for sensitive detection of β -galactosidase in living cells[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2017, 968: 97-104.
- [19] ZHEN X, ZHANG J J, HUANG J G, *et al.* Macrotheranostic probe with disease-activated near-infrared fluorescence, photoacoustic, and photothermal signals for imaging-guided therapy[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2018, 57(26): 7804-7808.
- [20] GARDNER S H, BRADY C J, KEETON C, *et al.* A general approach to convert hemicyanine dyes into highly optimized photoacoustic scaffolds for analyte sensing[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(34): 18860-18866.
- [21] MAKSIMAINEN M M, LAMPIO A, MERTANEN M, *et al.* The crystal structure of acidic β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 60: 109-115.
- [22] CHATTERJEE S K, BHATTACHARYA M, BARLOW J J. Glycosyltransferase and glycosidase activities in ovarian cancer patients[J]. *Cancer Research*, 1979, 39(6): 1943-1951.
- [23] BRUSUKER I, RHODES J M, GOLDMAN R. β -Galactosidase-An indicator of the maturational stage of mouse and human mononuclear phagocytes[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 1982, 112(3): 385-390.
- [24] HUGHES A L, GOTTSCHLING D E. An early age increase in vacuolar pH limits mitochondrial function and lifespan in yeast[J]. *Nature*, 2012, 492(7428): 261-265.
- [25] LIU J, LU W N, REIGADA D, *et al.* Restoration of lysosomal pH in RPE cells from cultured human and ABCA4/mice: Pharmacologic approaches and functional recovery[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2008, 49(2): 772-780.
- [26] DUAN W J, YUE Q, LIU Y, *et al.* A pH ratiometrically responsive surface enhanced resonance Raman scattering probe for tumor acidic margin delineation and image-guided surgery[J]. *Chemical Science*, 2020, 11(17): 4397-4402.
- [27] GUO Z Q, ZHU W H, TIAN H. Dicyanomethylene-4H-pyran chromophores for OLED emitters, logic gates and optical chemosensors[J]. *Chemical Communications*, 2012, 48(49): 6073-6084.
- [28] YUE H, YUAN L, ZHANG W W, *et al.* Macrophage responses to the physical burden of cell-sized particles[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2018, 6(3): 393-400.
- [29] BANERJEE S, VEALE E, PHELAN C M, *et al.* Recent advances in the development of 1,8-naphthalimide based DNA targeting binders, anticancer and fluorescent cellular imaging agents[J]. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42(4): 1601-1618.
- [30] ZHANG X X, WU H, LI P, *et al.* A versatile two-photon fluorescent probe for ratiometric imaging *E. coli* β -galactosidase in live cells and

- in vivo*[J]. Chemical Communications, 2016, 52(53): 8283-8286.
- [31] HUANG J X, LI N, WANG Q Q, *et al.* A lysosome-targetable and two-photon fluorescent probe for imaging endogenous β -galactosidase in living ovarian cancer cells[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2017, 246: 833-839.
- [32] CHEN M, MU L X, CAO X X, *et al.* A novel ratiometric fluorescent probe for highly sensitive and selective detection of β -galactosidase in living cells[J]. Chinese Journal of Chemistry, 2019, 37(4): 330-336.
- [33] LIU M D, MA S Y, SHE M Y, *et al.* Structural modification of BODIPY: Improve its applicability[J]. Chinese Chemical Letters, 2019, 30(10): 1815-1824.
- [34] SHI L M, YAN C X, MA Y Y, *et al.* *In vivo* ratiometric tracking of endogenous β -galactosidase activity using an activatable near-infrared fluorescent probe[J]. Chemical Communications, 2019, 55(82): 12308-12311.
- [35] CHEN J A, PAN H M, WANG Z J, *et al.* Imaging of ovarian cancers using enzyme activatable probes with second near-infrared window emission[J]. Chemical Communications, 2020, 56(18): 2731-2734.
- [36] WANG L L, DU W, HU Z J, *et al.* Hybrid rhodamine fluorophores in the visible-NIR region for biological imaging[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2019, 131(40): 14164-14181.
- [37] KENMOKU S, URANO Y, KOJIMA H, *et al.* Development of a highly specific rhodamine-based fluorescence probe for hypochlorous acid and its application to real-time imaging of phagocytosis[J]. Journal of the American Chemical Society, 2007, 129(23): 7313-7318.
- [38] KAMIYA M, ASANUMA D, KURANAGA E, *et al.* β -Galactosidase fluorescence probe with improved cellular accumulation based on a spirocyclized rhodol scaffold[J]. Journal of the American Chemical Society, 2011, 133(33): 12960-12963.
- [39] SAKABE M, ASANUMA D, KAMIYA M, *et al.* Rational design of highly sensitive fluorescence probes for protease and glycosidase based on precisely controlled spirocyclization[J]. Journal of the American Chemical Society, 2013, 135(1): 409-414.
- [40] ICHIKAWA Y, KAMIYA M, OBATA F, *et al.* Selective ablation of β -galactosidase-expressing cells with a rationally designed activatable photosensitizer[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2014, 126(26): 6890-6893.
- [41] KIM E J, PODDER A, MAITI M, *et al.* Selective monitoring of vascular cell senescence *via* β -galactosidase detection with a fluorescent chemosensor[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 274: 194-200.
- [42] LI Z H, REN M G, WANG L, *et al.* Development of a red-emissive two-photon fluorescent probe for sensitive detection of β -galactosidase *in vitro* and *in vivo*[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2020, 307: 127643.
- [43] FAN J L, HU M M, ZHAN P, *et al.* Energy transfer cassettes based on organic fluorophores: Construction and applications in ratiometric sensing[J]. Chemical Society Reviews, 2012, 42(1): 29-43.
- [44] YUAN L, LIN W Y, ZHENG K B, *et al.* FRET-based small-molecule fluorescent probes: Rational design and bioimaging applications[J]. Accounts of chemical research, 2013, 46(7): 1462-1473.
- [45] PORONIK Y M, GRYKO D T. Pentacyclic coumarin-based blue emitters-The case of bifunctional nucleophilic behavior of amidines[J]. Chemical Communications, 2014, 50(43): 5688-5690.
- [46] KOMATSU T, KIKUCHI K, TAKAKUSA H, *et al.* Design and synthesis of an enzyme activity-based labeling molecule with fluorescence spectral change[J]. Journal of the American Chemical Society, 2006, 128(50): 15946-15947.
- [47] KONG X Q, LI M, DONG B L, *et al.* An ultrasensitivity fluorescent probe based on the ICT-FRET dual mechanisms for imaging β -galactosidase *in vitro* and *ex vivo*[J]. Analytical Chemistry, 2019, 91(24): 15591-15598.
- [48] WEI X Z, HU X X, ZHANG L L, *et al.* Highly selective and sensitive FRET based ratiometric two-photon fluorescent probe for endogenous β -galactosidase detection in living cells and tissues[J]. Microchemical Journal, 2020, 157: 105046.
- [49] ZHAO Z, ZHANG H K, LAM J W Y, *et al.* Aggregation-induced emission: New vistas at the aggregate level[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2020, 59(25): 9888-9907.
- [50] MEI J, HUANG Y H, TIAN H. Progress and trends in AIE-based bioprobes: A brief overview[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2018, 10(15): 12217-12261.
- [51] CERÓN M R, IZQUIERDO M, ALEGRET N, *et al.* Reactivity differences of $\text{Sc}_3\text{N}@C_{2n}$ ($2n=68$ and 80). Synthesis of the first methanofullerene derivatives of $\text{Sc}_3\text{N}@D_{5h}\text{-C}_{80}$ [J]. Chemical Communications, 2016, 52(1): 64-67.
- [52] GU K Z, QIU W S, GUO Z Q, *et al.* An enzyme-activatable probe liberating AIE gens: On-site sensing and long-term tracking of β -galactosidase in ovarian cancer cells[J]. Chemical Science, 2019, 10(2): 398-405.
- [53] FU W, YAN C X, ZHANG Y T, *et al.* Near-infrared aggregation-induced emission-active probe enables *in situ* and long-term tracking of endogenous β -galactosidase activity[J]. Frontiers in Chemistry, 2019, 7: 291.
- [54] PENG L, GAO M, CAI X L, *et al.* A fluorescent light-up probe based on AIE and ES IPT processes for β -galactosidase activity detection and visualization in living cells[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2015, 3(47): 9168-9172.
- [55] DALY B, LING J, DE SILVA A P. Current developments in fluorescent PET (photoinduced electron transfer) sensors and switches[J]. Chemical Society Reviews, 2015, 44(39): 4203-4211.
- [56] DADASHI-SILAB S, DORAN S, YAGCI Y. Photoinduced electron transfer reactions for macromolecular syntheses[J]. Chemical Reviews, 2016, 116(17): 10212-10275.
- [57] URANO Y, KAMIYA M, KANDA K, *et al.* Evolution of fluorescein as a platform for finely tunable fluorescence probes[J]. Journal of the American Chemical Society, 2005, 127(13): 4888-4894.
- [58] KAMIYA M, KOBAYASHI H, HAMA Y, *et al.* An enzymatically activated fluorescence probe for targeted tumor imaging[J]. Journal of the American Chemical Society, 2007, 129(13): 3918-3929.
- [59] GREEN O, GNAIM S, BLAU R, *et al.* Near-infrared dioxetane luminophores with direct chemiluminescence emission mode[J]. Journal of the American Chemical Society, 2017, 139(37): 13243-13248.
- [60] CHAI X Z, HAN H H, SEDGWICK A C, *et al.* Photochromic fluorescent probe strategy for the super-resolution imaging of biologically important biomarkers[J]. Journal of the American Chemical Society, 2020, 142(42): 18005-18013.