

功能材料

比率型过氧化氢荧光探针的合成及成像应用

胡伟¹, 王旭梅², 柴丽¹, 翟浩³, 宋新建^{2*}

(1. 忻州师范学院 化学系, 山西 忻州 034000; 2. 湖北民族大学 生物资源保护与利用湖北省重点实验室, 湖北 恩施 445000; 3. 山西惟健医疗科技有限公司, 山西 忻州 034000)

摘要: 以 6-甲氧基苯并噻唑-2-羟基喹啉为双光子荧光团、硼酸酯为过氧化氢 (H₂O₂) 识别基团, 合成了比率型检测 H₂O₂ 的双光子荧光探针 {6-甲氧基-2-[6-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧硼杂环戊烷-2-基)噻唑-2-基]苯并[d]噻唑} (MQH₂O₂)。利用 ¹HNMR、¹³CNMR、HRMS 确定了其结构, 利用荧光光谱和双光子荧光光谱对探针 MQH₂O₂ 进行了 H₂O₂ 响应能力的评估。结果表明, 探针 MQH₂O₂ 具有良好的 H₂O₂ 比率 [30 min 内比率 (I₅₃₅/I₄₆₅, 其中, I₅₃₅ 和 I₄₆₅ 分别为波长为 535 和 465nm 处的荧光强度) 响应信号比未加 H₂O₂ 增强约 25.4 倍、检出限低至 38.6 nmol/L] 和双光子性质 (最大双光子荧光活性截面为 150 GM)。通过双光子共聚焦成像完成了细胞和大脑组织成像。该探针能够实现脑卒中诱导细胞氧化应激的原位成像分析。

关键词: 比率型荧光探针; 过氧化氢; 双光子激光共聚焦成像; 脑卒中; 氧化应激; 功能材料

中图分类号: O657.3; R313 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2023) 11-2421-09

Synthesis and imaging application of ratiometric fluorescent probe for hydrogen peroxide

HU Wei¹, WANG Xumei², CHAI Li¹, ZHAI Hao³, SONG Xinjian^{2*}

(1. Department of Chemistry, Xinzhou Normal University, Xinzhou 034000, Shanxi, China; 2. Hubei Key Laboratory of Biological Resources Protection and Utilization, Hubei Minzu University, Enshi 445000, Hubei, China; 3. Shanxi Weijian Medical Technology Co., Ltd., Xinzhou 034000, Shanxi, China)

Abstract: Two-photon fluorescence probe, 6-methoxy-2-[6-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)quinolin-2-yl]benzo[d]thiazole (MQH₂O₂), was synthesized from 6-methoxybenzothiazol-2-hydroxyquinoline as fluorescence moiety and borate ester as hydrogen peroxide (H₂O₂) recognition moiety, and characterized by ¹HNMR, ¹³CNMR and HRMS. The response sensitivity of MQH₂O₂ to H₂O₂ was evaluated by fluorescence spectroscopy and two-photon fluorescence spectroscopy. The results revealed that the probe MQH₂O₂ displayed good H₂O₂ ratio [(I₅₃₅/I₄₆₅, herein, I₅₃₅ and I₄₆₅ are fluorescence intensity at wavelength 535 and 465 nm, respectively) response enhancement of about 25.4-fold than that within 30 min and detection limit as low as 38.6 nmol/L] and proficient two-photon properties, with a maximum two-photon fluorescence active cross-section of 150 GM. Finally, data from cell and brain tissue analysis conducted by two-photon confocal imaging proved that the probe was capable of accomplishing *in situ* imaging analysis of oxidative stress caused by stroke.

Key words: ratiometric fluorescent probes; hydrogen peroxide; two-photon ratiometric fluorescence imaging; stroke; oxidative stress; functional materials

作为全球主要的疾病致死和致残因素之一, 缺血性脑卒中现已获得广泛关注。H₂O₂ 作为细胞氧化应激代谢产生的重要活性氧 (ROS), 在生命系统中发挥着重要的生理和病理作用^[1-3]。KUMARI 等^[4]

和 CHEN 等^[5]研究发现, H₂O₂ 在缺血性和出血性脑卒中的脑血管中产生, 并参与脑卒中引起的脑损伤过程。因此, 在体内和原位监测脑卒中疾病中脑组织微血管中的 H₂O₂ 对于脑卒中早期诊断和治疗具

收稿日期: 2022-12-06; 定用日期: 2023-04-17; DOI: 10.13550/j.jxhg.20221116

基金项目: 国家自然科学基金项目 (22166017)

作者简介: 胡伟 (1990—), 男, 讲师, E-mail: huwchem@163.com。联系人: 宋新建 (1975—), 男, 教授, E-mail: whxjsong@163.com。

有重要意义。

双光子共聚焦成像技术作为现阶段最受欢迎的成像模式之一,不仅成像深度大,还具有背景荧光低、高时空分辨率以及光损伤小的特点^[6-10]。近年来,研究发现,比率型荧光探针具有自校准能力,能够克服由激发光波动、探针浓度变化、不均匀分布和区室定位产生的基于强度的荧光探针的系统误差^[11-12]。

为此,本文拟利用分子内电荷转移(ICT)机理设计一例用于检测 H₂O₂ 的比率型双光子荧光探针{6-甲氧基-2-[6-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂环戊烷-2-基)喹啉-2-基]苯并[d]噻唑}(MQH₂O₂), MQH₂O₂以 6-甲氧基苯并噻唑-2-羟基喹啉为双光子荧光团,硼酸酯为 H₂O₂ 识别基团,用于细胞和小鼠大脑组织水平的成像,以期实现脑卒中诱导细胞氧化应激的精准原位成像。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

H₂O₂ (质量分数 30%)、双(频哪醇合)二硼、乙酸钾(KOAc)、1,1'-双二苯基膦二茂铁二氯化钯[Pd(dppf)Cl₂]、三溴化硼(BBr₃)、罗丹明 6G、罗丹明 B、噻唑蓝(MTT)、佛波酯(PMA)、N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC)、Apocynin(APO),分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;DMEM 细胞培养基, Gibco 公司;PC12 细胞(肾上腺嗜铬细胞瘤细胞),厦门逸漠生物技术有限公司;C57BL/6 雄性小鼠,湖南斯莱克京达实验动物有限公司;柱层析硅胶(200~300 目),上海皓鸿生物医药科技有限公司;所有溶剂均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司。所有试剂使用前未经进一步纯化,实验所需溶液均使用超纯水配制。

UV-2550 型紫外-可见分光光度计、RF-6000 型荧光分光光度计,日本 Shimadzu 公司;LSM780 NLO 型双光子激光共聚焦显微镜,德国 Carl Zeiss 公司;6230 TOF 型电喷雾-高分辨时间质谱仪(ESI-TOF),美国 Agilent 公司;Ascend 400 MHz 型核磁共振波谱仪,德国 Bruker 公司;Vector 22 型傅里叶变换红外光谱仪、Multiskan FC 型酶标仪,美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 制备方法

1.2.1 2-氨基-5-甲氧基苯硫醇(I)、6-溴-2-甲基喹啉(II)和 6-溴-2-甲醛基喹啉(III)的制备
化合物 I~III 制备过程参照文献[13]方法。

1.2.2 2-(6-溴喹啉-2-基)-6-甲氧基苯并[d]噻唑(IV)的制备

向 25 mL 单口圆底烧瓶中加入 468 mg (2.0 mmol) III、236 μL (2.2 mmol) I、5.0 mL 二甲亚砜(DMSO),升温至 130 °C 反应 2 h,薄

层色谱法(TLC)[展开剂 V(石油醚):V(乙酸乙酯)=3:1 混合溶剂]实时监测至反应完全。将反应液冷却至室温,二氯甲烷萃取,合并有机相并干燥 12 h,减压浓缩,采用 V(石油醚):V(乙酸乙酯)=8:1 混合溶剂为洗脱剂,柱层析分离得到白色固体 200 mg,产率 29%。熔点:101 °C。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 8.19 (dd, *J* = 8.0、2.2 Hz, 1H), 8.08 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.94 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.77 (dd, *J* = 8.3、1.9 Hz, 1H), 7.68 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.96 (dd, *J* = 7.8、1.9 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H)。¹³CNMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 166.06, 156.73, 148.39, 148.02, 146.88, 135.83, 134.98, 132.48, 129.96, 129.83, 129.80, 122.87, 120.19, 116.13, 114.20, 107.34, 54.73。HRMS (ESI), C₁₇H₁₂BrN₂O₃S⁺, *m/z*: [M+H]⁺ 计算值 370.9854; 测试值 370.9813。

1.2.3 化合物 MQH₂O₂ 的制备

将 200 mg (0.54 mmol) IV、280 mg (1.1 mmol) 混合双(频哪醇合)二硼、100 mg (1.82 mmol) 乙酸钾、39.51 mg (0.054 mmol) Pd(dppf)Cl₂ 和 20 mL 无水 1,4-二氧六环置于 50 mL 单口反应瓶中,升高温度至 80 °C,反应 24 h, TLC[展开剂 V(石油醚):V(乙酸乙酯)=2:1 混合溶剂]实时监测,待原料点消失,停止反应,将反应液冷却至室温,减压浓缩,采用 V(石油醚):V(乙酸乙酯)=8:1 混合溶剂为洗脱剂,柱层析分离得白色固体 119 mg,产率 60%。熔点:133~134 °C。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 8.69 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.50~8.35 (m, 2H), 8.19~7.99 (m, 3H), 7.78 (s, 1H), 7.20 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 1.32 (s, 12H)。¹³CNMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 198.00, 155.75, 154.99, 153.95, 143.24, 136.15, 128.45, 127.88, 123.76, 122.44, 121.41, 119.89, 66.00, 47.19, 29.73, 26.96, 26.87。HRMS (ESI), C₂₃H₂₄BN₂O₃S⁺, *m/z*: [M+H]⁺ 计算值 419.1601; 测试值 419.1643。FTIR (ν/cm⁻¹): 1250~1750 (喹啉和苯并噻唑中 C—N 键的伸缩振动); 1350~1310 (硼酸酯中 B—O 键的伸缩振动); 1225~1060 (甲氧基中 C—O—C 键的伸缩振动)。

1.2.4 2-[6-(苄氧基)喹啉-2-基]-6-甲氧基苯并[d]噻唑(VIII)的制备

化合物 V~VII 制备过程参照文献[14]方法。

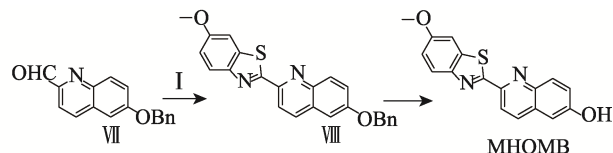
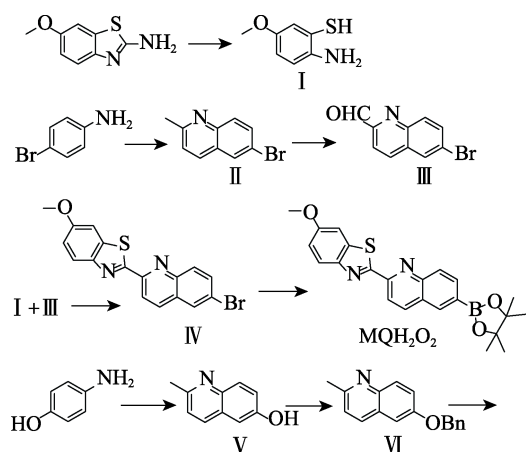
向 25 mL 单口圆底烧瓶中加入 530 mg (2.0 mmol) I、370 mg (2.4 mmol) VII 和 5.0 mL DMSO,升温至 130 °C 反应 2 h, TLC[展开剂 V(石油醚):V(乙酸乙酯)=2:1 混合溶剂]实时监测至反应完全。将反应液冷却至室温,二氯甲烷萃取,合并有机相并干燥 12 h,减压浓缩,采用 V(石油醚):V(乙酸乙酯)=8:1 混合溶剂为洗脱剂,用柱层析分离得淡黄色固体 495 mg,产率 63%。熔点:117 °C。¹HNMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 8.10 (dd,

$J = 8.0, 2.3$ Hz, 1H), 7.98 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.87 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.56 (t, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.42 (dd, $J = 7.1, 1.2$ Hz, 2H), 7.37~7.27 (m, 4H), 7.19 (dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz, 1H), 6.96 (dd, $J = 7.8, 1.9$ Hz, 1H), 5.07 (t, $J = 1.0$ Hz, 2H), 3.82 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6), δ : 166.06, 156.73, 155.92, 148.39, 148.31, 143.56, 136.75, 135.83, 134.73, 130.76, 130.14, 128.55, 128.38, 128.23, 122.87, 120.22, 119.40, 114.20, 110.16, 107.34, 70.18, 54.73。HRMS (ESI), $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}^+$, m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 计算值 399.1167; 测试值 399.1179。

1.2.5 2-(6-甲氧基苯并[d]噻唑-2-基)喹啉-6-醇 (MHQMB) 的制备

在 0 °C 下, 向 100 mL 单口烧瓶中加入 20 mL 无水二氯甲烷和 520 mg (1.40 mmol) VIII, 并在搅拌条件下缓慢将 5.20 mL 1 mol/L BBr₃ 的二氯甲烷溶液滴加至上述反应液中, 升温至室温反应 12 h, TLC [展开剂 V (石油醚): V (乙酸乙酯) = 2:1 混合溶液] 实时监测至反应完全。冰水浴下缓慢加入过量的饱和 NaHCO₃ 溶液将反应液调至中性, 二氯甲烷萃取并干燥, 减压旋干二氯甲烷, 采用 V (石油醚): V (乙酸乙酯) = 6:1 混合溶剂为洗脱剂, 柱层析分离得黄色固体 301 mg, 产率 71%。熔点: 158~159 °C。 ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), δ : 8.38 (s, 1H), 8.06 (dd, $J = 7.9, 2.1$ Hz, 1H), 7.98 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.83 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.34~7.28 (m, 2H), 7.13 (dd, $J = 8.7, 1.9$ Hz, 1H), 6.96 (dd, $J = 7.8, 1.9$ Hz, 1H), 3.82 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6), δ : 166.06, 156.73, 155.76, 148.39, 148.37, 142.44, 135.83, 134.46, 131.78, 131.19, 122.87, 120.26, 119.89, 114.20, 111.88, 107.34, 54.73。HRMS (ESI), $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}^+$, m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ 计算值 309.0698; 测试值 309.0679。FTIR (ν/cm^{-1}): 3607 (O—H 键的伸缩振动); 1250~1750 (喹啉和苯并噻唑中 C—N 键的伸缩振动); 1225~1060 (甲氧基中 C—O—C 键的伸缩振动)。

目标化合物的合成路线如下所示。



1.3 双光子荧光活性截面

采用双光子诱导荧光法测定 MQH₂O₂ 在反应前后的双光子吸收截面。首先, 以 10 $\mu\text{mol/L}$ 罗丹明 B 乙醇溶液为参比溶液, 按式 (1) 计算探针 MQH₂O₂ 及 MHQMB 的荧光量子产率:

$$\Phi_s = \frac{A_r n_s F_s \Phi_r}{A_s n_r F_r} \quad (1)$$

式中: Φ_s 为量子产率; A 为最大吸收波长处的吸光度, $A \leq 0.05$; n 为溶剂的折射率; F 为利用最大吸收波长激发后的荧光光谱积分面积; 下标 s, r 分别为待测样品和参比溶液; Φ_r 为罗丹明 B 溶液 (参比溶液) 的量子产率 (0.71)。

再以罗丹明 6G 的甲醇溶液 (5 $\mu\text{mol/L}$) 为参比溶液, 测定 MQH₂O₂ 与 H₂O₂ 反应前后在甲醇溶液中的双光子吸收截面 δ (激发波长 710~800 nm), 再通过式 (2) 计算双光子荧光活性截面:

$$\delta_s = \frac{S_s \Phi_r n_s^2 c_r \delta_r}{S_r \Phi_s n_r^2 c_s} \quad (2)$$

式中: δ_s 为双光子荧光活性截面, GM ($1 \text{ GM} = 1 \times 10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s} \cdot \text{photons}^{-1} \cdot \text{molecule}^{-1}$); S 为双光子荧光光谱积分面积; Φ 为量子产率; c 为溶液浓度, $\mu\text{mol/L}$; n 为溶剂的折射率; 下标 s, r 分别为待测样品和参比溶液; δ_r 为参比溶液罗丹明 6G 在甲醇溶液中的双光子吸收截面, 为 70 GM。

1.4 生物模型的构建

1.4.1 细胞培养

将密度为 1×10^6 个/mL PC12 细胞接种于含有体积分数为 1% 青霉素和链霉素和 10% 胎牛血清的 DMEM 细胞培养基中, 于 37 °C 培养箱 (体积分数为 5% CO₂、体积分数为 95% 空气) 中培养。成像前一天将细胞转移至 T25 细胞培养瓶中使其贴壁生长至适当密度。成像前使用磷酸盐缓冲溶液 (PBS, pH=7.4) 将细胞清洗 2 次, 成像时使用双光子激发波长 730 nm, 荧光收集范围为 420~480 nm (蓝色通道) 及 530~600 nm (绿色通道)。

1.4.2 细胞毒性实验

采用 MTT 法测定 MQH₂O₂ 的细胞毒性。将 PC12 细胞接种于 96 孔板中 (接种密度 4.5×10^4 个/mL), 将不同浓度 MQH₂O₂ (0、2、5、10、20、30 $\mu\text{mol/L}$) 分别加到 100 μL 含体积分数 10% DMSO 的 DMEM 细胞培养基中 (每个浓度设 3 组平行实验)。将不同浓度 MQH₂O₂ 标记的 PC12 细胞孵育 24 h 后, 在每

孔中加入 MTT 溶液 (20 μL , 质量浓度为 5 g/L) 孵育 4 h。完成后除去上清液, 接着加入 150 μL DMS, 低速振荡 10 min, 用酶标仪测试各体系在 490 nm 处的吸光度。通过式 (3) 计算细胞存活率:

$$\text{CR}/\% = \frac{A}{A_0} \times 100 \quad (3)$$

式中: CR 为细胞存活率, %; A 和 A_0 分别为 MQH₂O₂ 实验组 (细胞孵育探针组) 和对照组 (细胞未孵育探针组) 的吸光度。

1.4.3 细胞外源性 H₂O₂ 的检测

使用不同浓度 (0、10、50、100 $\mu\text{mol/L}$) 的 H₂O₂ 分别孵育细胞 30 min 后, PBS (pH=7.4) 洗涤除去残留的 H₂O₂, 利用 10 $\mu\text{mol/L}$ 探针 MQH₂O₂ 孵育 10 min。成像时双光子激发波长设置为 730 nm, 荧光收集范围为 420~480 nm (蓝色通道) 及 530~600 nm (绿色通道)。

1.4.4 OGD/R 细胞模型的建立

在无糖及无血清的 DMEM 细胞培养基中, 将 PC12 细胞置于三气培养箱中 (37 $^{\circ}\text{C}$, 赋予细胞无氧环境) 孵育不同时间 (0、3、6、12 h) 后, 使用含有葡萄糖和血清的 DMEM 细胞培养液替换原培养液, 并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中常氧培养 PC12 细胞 12 h 建立细胞 OGD/R 模型。Sham 组 (假手术组) 指细胞未进行 OGD/R 处理, 只用 MQH₂O₂ (10 $\mu\text{mol/L}$) 孵育 20 min; 对照组为细胞进行 OGD/R 12 h 处理后孵育 MQH₂O₂ (10 $\mu\text{mol/L}$) 20 min。NOX-2KD 组为利用病毒法将胞内 NOX-2 (ROS 合成蛋白) 基因敲击 (NOX-2KD) 后进行 OGD/R 处理并孵育 MQH₂O₂ (10 $\mu\text{mol/L}$) 20 min; 阴性对照组 (Negative) 与 NOX-2KD 组对应, 为阴性对照组, 通过孵育未有 DNA 结构的病毒, 由于无法干扰细胞正常 DNA 序列导致无法实现 NOX-2 蛋白的敲除。细胞成像前将 PC12 细胞用 PBS (pH=7.4) 清洗 2 次, 成像时双光子激发波长设置为 730 nm, 荧光收集范围为 420~480 nm (蓝色通道) 及 530~600 nm (绿色通道)。

1.4.5 MCAO 模型的建立

取 8~10 周龄的 C57BL/6 雄性小鼠饲养在 (22 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 50% \pm 10% 条件下, 统一喂食标准饮食 (AIN-93M), 12 h 光/暗周期进行 2 周的适应性喂养。所有的实验步骤遵循实验动物护理和使用指南: 第八版, ISBN-10: 0-309-15396-4, 由武汉大学动物伦理委员会批准 (No. WDRM-20170504)。MCAO 模型的建立根据文献[15]操作。

2 结果与讨论

2.1 探针 MQH₂O₂ 的合成方法、响应机理及密度泛函理论 (DFT) 分子轨道图

MQH₂O₂ 与 H₂O₂ 的识别机理如图 1a 所示。由

图 1a 可知, MQH₂O₂ 中硼酸酯部分与 H₂O₂ 反应后硼酸酯脱落, 释放荧光团 MHQMB (离子状态)。为了解 MQH₂O₂ 对 H₂O₂ 响应的机理, 在 B3LYP/6-31G(d) 水平, 利用 DFT 完成了 MHQMB (包括中性状态和离子状态, 在水环境中) 和 MQH₂O₂ 的计算 (图 1b)。结果显示, MQH₂O₂ 与 MHQMB (中性状态) 分子能隙 [最高占据分子轨道 (HOMO) 向最低未占有分子轨道 (LUMO) 激发所需要的能量] 可忽略不计, 且均比 MHQMB (离子状态) 分子能隙高, 表明该分子发生分子内电荷转移 (ICT), 最终导致分子能极差发生变化, 光物理性质随之改变。此外, 苯并噻唑上的甲氧基增加了 MQH₂O₂ 电子云密度, 提高了探针 HOMO 和 LUMO 的对称性, 从而保证其较高的荧光量子产率。

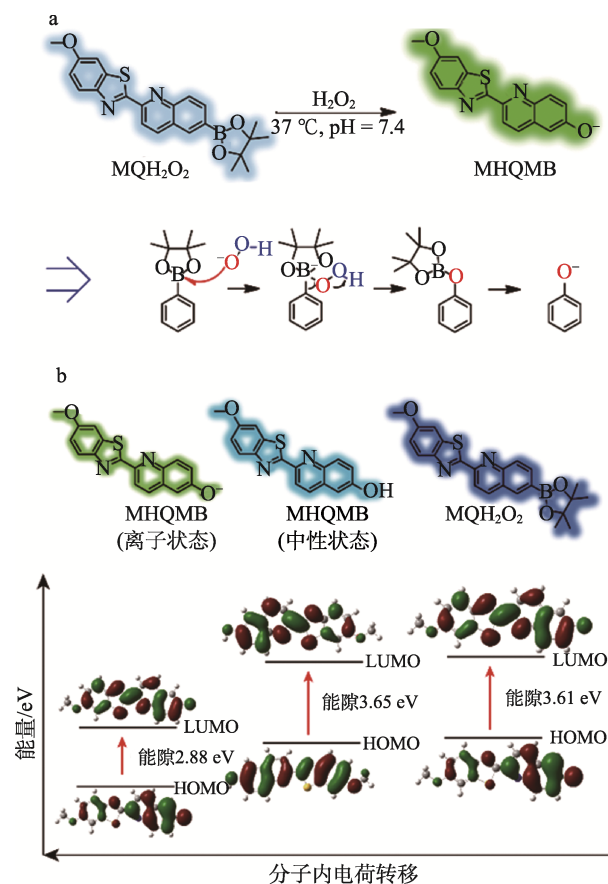


图 1 探针 MQH₂O₂ 与 H₂O₂ 的响应机理 (a); 优化 MHQMB (离子状态)、MHQMB (中性状态) 及 MQH₂O₂ 的 DFT 分子轨道图 (b)

Fig. 1 Response mechanism of probe MQH₂O₂ and H₂O₂ (a); DFT molecular orbital diagrams of optimized MHQMB (anion form), MHQMB (neutral form) and MQH₂O₂ (b)

2.2 探针荧光响应

2.2.1 双光子荧光活性截面

按照 1.3 节实验方法, 通过双光子诱导荧光法测定并计算 MQH₂O₂ (10 $\mu\text{mol/L}$) 与 H₂O₂ (200 $\mu\text{mol/L}$) 在反应前后的双光子荧光活性截面, 结果如图 2 所示。

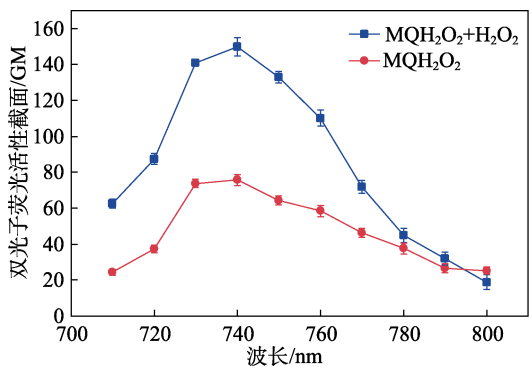


图 2 MQH₂O₂ 与 H₂O₂ 反应前后的双光子荧光活性截面
Fig. 2 Two-photon fluorescence active cross section of MQH₂O₂ before and after reaction with H₂O₂

由图 2 可知, 在 710~800 nm 范围内, MQH₂O₂ 与 H₂O₂ 反应前双光子荧光活性截面较小, 在 740 nm 处仅有 76 GM, 而与 H₂O₂ 反应后在 740 nm 处出现最大的双光子荧光活性截面, 可达 150 GM, 增加了 74 GM, 表明该荧光染料双光子荧光活性截面较大, 具有较好的双光子性能, 可将其应用于双光子共聚焦成像中。

2.2.2 MQH₂O₂ 与 H₂O₂ 荧光响应检测

MQH₂O₂ 与不同浓度 H₂O₂ 响应后的荧光发射谱图见图 3。

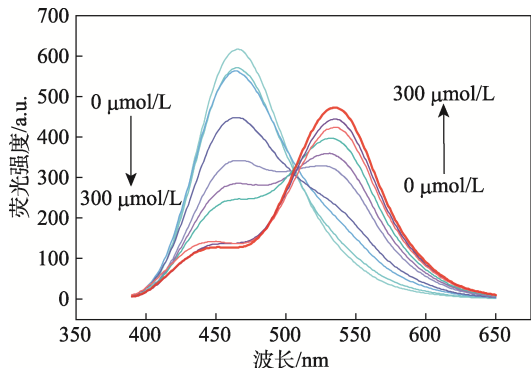


图 3 MQH₂O₂ 与不同浓度 H₂O₂ 反应后的荧光发射光谱
Fig. 3 Fluorescence emission spectra after reaction of MQH₂O₂ with H₂O₂ with different concentrations

由图 3 可知, 随着 H₂O₂ 浓度的不断增加, 反应体系在 535 nm 处的荧光强度 (I_{535}) 不断增强, 465 nm 处的荧光强度 (I_{465}) 不断降低, 形成比率型响应, 加入 H₂O₂ (300 μmol/L) 比未加 H₂O₂ 的检测液的荧光强度比值 (I_{535}/I_{465}) 在 30 min 内增加了 25.4 倍。H₂O₂ 浓度 (y , 0~300 μmol/L) 与 I_{535}/I_{465} (x) 的关系曲线为 $y=0.02534x+0.01356$, 相关系数 (R^2) 为 0.998。由 $3\sigma/k$ 计算得出检出限 (LOD) 为 38.6 nmol/L, 其中: σ 为 11 组 MQH₂O₂ 溶液在 I_{535}/I_{465} 的标准偏差; k 为 MQH₂O₂ 滴定光谱曲线在线性范围内的斜率。结果表明, 探针 MQH₂O₂ 具有较高的灵敏度和准确性。

2.2.3 MQH₂O₂ 与 H₂O₂ 响应时间检测

MQH₂O₂ 与 H₂O₂ 响应时间的测定结果如图 4 所示。

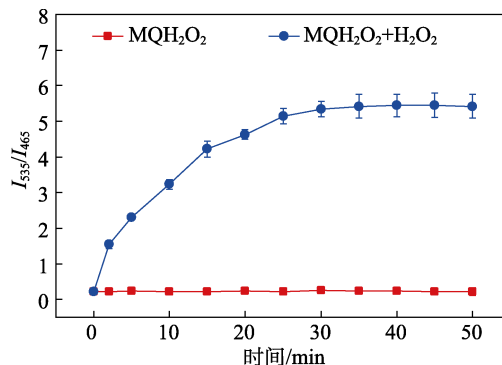


图 4 不同时间 MQH₂O₂ 与 H₂O₂ 反应前后 I_{535}/I_{465} 的变化
Fig. 4 Change of I_{535}/I_{465} before and after reaction of MQH₂O₂ and H₂O₂ at different times

由图 4 可见, MQH₂O₂ 与 H₂O₂ 在 30 min 内反应完全, 表明探针具有较快的响应能力, 适用于 H₂O₂ 的原位成像分析。

2.2.4 MQH₂O₂ 对 H₂O₂ 的选择性和 pH 稳定性

探讨了 10 μmol/L MQH₂O₂ 对 14 种不同干扰物 (浓度均为 100 μmol/L 的 Fe²⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Zn²⁺、Cu²⁺; 浓度均为 300 μmol/L 的 HClO、ONOO⁻、单线态氧 (¹O₂)、•O₂; 浓度均为 500 μmol/L 的 NO₂、NO; 浓度均为 1.0 mmol/L 的半胱氨酸 (Cys)、谷胱甘肽 (GSH)、高半胱氨酸 (Hcy); 300 μmol/L H₂O₂) 的响应, 结果如图 5a 所示。

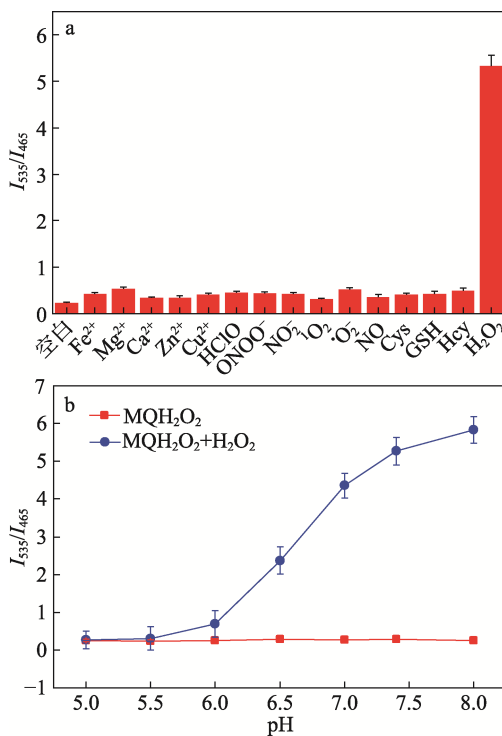


图 5 MQH₂O₂ 对 H₂O₂ 的选择性 (a); MQH₂O₂ 与 H₂O₂ 在不同 pH 下反应前后 I_{535}/I_{465} 的变化 (b)
Fig. 5 Selectivity of MQH₂O₂ to H₂O₂ (a); Change of I_{535}/I_{465} before and after reaction MQH₂O₂ with H₂O₂ at different pH (b)

由图 5a 可见, 除 H_2O_2 外, 干扰物均未使 MQH_2O_2 的 I_{535}/I_{465} 发生明显变化, 表明该探针对 H_2O_2 可进行特异性识别。此外, 探究了 MQH_2O_2 与 H_2O_2 (300 $\mu\text{mol/L}$) 在不同 pH 下反应 30 min 前后 I_{535}/I_{465} 的变化, 结果见图 5b。由图 5b 可以看出, 随着 pH 的不断增加, $MQH_2O_2+H_2O_2$ 体系的 I_{535}/I_{465} 显著增加, 这是由于在中性或弱碱性条件下 MQH_2O_2 更多以离子状态存在, 而通过上述分析可知, 离子形式的 $MHQMB$ 具有更高的 ICT 能力, 从而在长波长处展现出更高的荧光强度。更为重要的是, 本文研究对象均为中性环境, 因此, 保证了 MQH_2O_2 在检测 H_2O_2 时具有合适的灵敏度。

2.3 细胞毒性

在生物成像之前, 考察了探针 MQH_2O_2 的细胞毒性, 结果如图 6 所示。

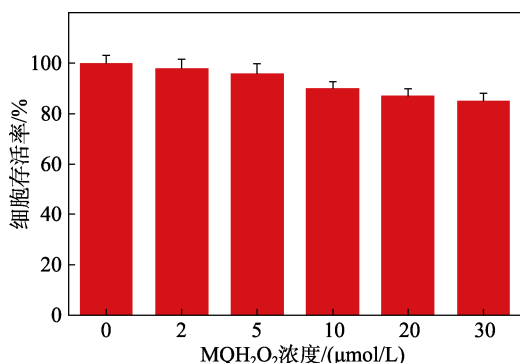


图 6 细胞在不同浓度 MQH_2O_2 孵育后的细胞存活率
Fig. 6 Cell survival rate of cells incubated with different concentrations of MQH_2O_2

由图 6 可见, 探针 MQH_2O_2 浓度达 30 $\mu\text{mol/L}$ 时, 仍有 >83% 的细胞可以存活, 表明该探针毒性较小, 可用于较长时间观察细胞内 H_2O_2 的水平变化。

2.4 细胞外/内源性 H_2O_2 的检测

2.4.1 细胞外源性 H_2O_2 的检测

按 1.4.3 节实验方案, 探究探针 MQH_2O_2 对细胞外源性 H_2O_2 的成像分析, 结果如图 7 所示。

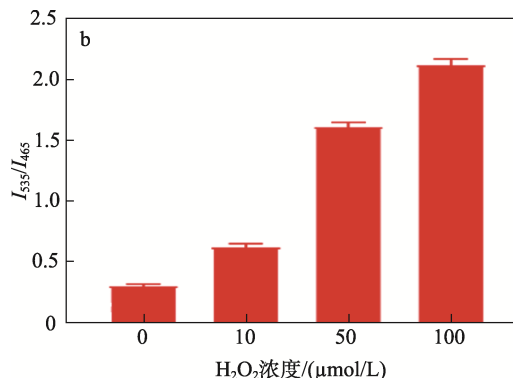
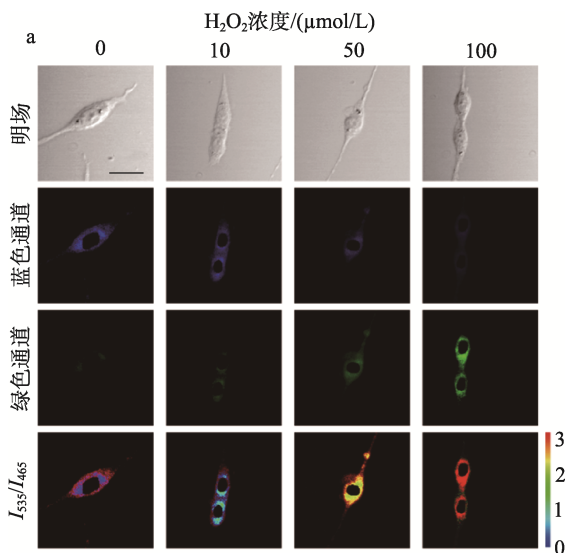


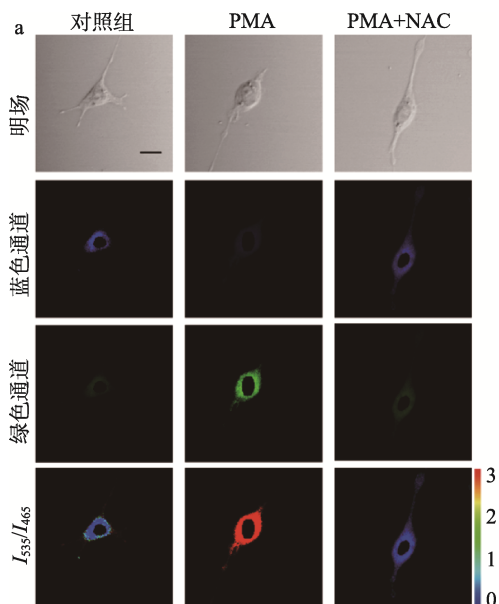
图 7 MQH_2O_2 与不同浓度 H_2O_2 (0、10、50、100 $\mu\text{mol/L}$) 在细胞中的双光子激光共聚焦成像 (a); 图 7a 各组细胞中绿色通道与蓝色通道的 I_{535}/I_{465} (b)

Fig. 7 Two-photon laser confocal imaging of MQH_2O_2 and different concentrations of H_2O_2 (0, 10, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$) in cells (a); I_{535}/I_{465} of green channel and blue channel in each group of cells in Fig. 7a (b)

由图 7 可知, 随着 H_2O_2 浓度的增加, 绿色通道荧光逐渐增强, 而蓝色通道荧光逐渐减弱, 绿色通道与蓝色通道的 I_{535}/I_{465} 呈梯度增加, 表明该探针可实现高灵敏检测细胞外源性 H_2O_2 。

2.4.2 细胞内源性 H_2O_2 的检测

为了探讨探针 MQH_2O_2 检测细胞内源 H_2O_2 的能力, 利用 PMA 刺激细胞产生 H_2O_2 , 并用 NAC 清除细胞内 H_2O_2 , 评估探针对于内源性 H_2O_2 的检测能力, 结果如图 8 所示。由图 8 可知, 未处理的细胞 (对照组) 使用探针 MQH_2O_2 孵育后蓝色通道荧光较强, 绿色通道几乎没有荧光; 而使用质量浓度为 2 mg/L PMA 预处理后, 观察到细胞内绿色通道荧光显著增强, 蓝色通道荧光却几乎消失, 说明 PC12 细胞在 PMA 刺激下产生大量 H_2O_2 。因此, 绿色通道与蓝色通道的 I_{535}/I_{465} 有明显增加。



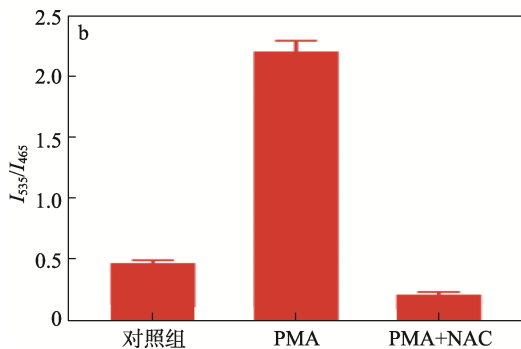


图 8 MQH₂O₂ 与细胞内源性 H₂O₂ 的双光子激光共聚焦成像 (a); 图 8a 各组细胞中绿色通道与蓝色通道的 I_{535}/I_{465} (b)

Fig. 8 Two-photon laser confocal imaging of MQH₂O₂ and endogenous H₂O₂ in cells (a); I_{535}/I_{465} of green channel and blue channel in each group of cells in Fig. 8a (b)

当细胞使用质量浓度为 2 mg/L 的 PMA 预处理细胞 1 h 后,用质量浓度为 2 mg/L 的 NAC (H₂O₂ 清除剂) 处理细胞,绿色通道荧光再次消失,绿色通道与蓝色通道的荧光强度比值明显降低,且低于对照组 (PC12 细胞未孵育 PMA 和 NAC,直接与 MQH₂O₂ 孵育),说明 NAC 可清除掉包括 PMA 刺激下产生的所有内源性 H₂O₂,充分证实探针 MQH₂O₂ 可检测细胞中内源性 H₂O₂ 的水平变化。

2.5 OGD/R 模型中的细胞成像

使用 OGD/R 来模拟脑卒中过程,考察脑卒中过程中 H₂O₂ 含量的变化。结果如图 9 所示。

由图 9 可知,相比于 Sham 组,对照组 I_{535}/I_{465} 增加明显;阴性对照组的 I_{535}/I_{465} 相比于 NOX2KD 组有明显升高,结果清晰显示基因沉默后 H₂O₂ 的含量急剧降低。进一步证实探针 MQH₂O₂ 可以检测 OGD/R 过程中 H₂O₂ 的含量变化。

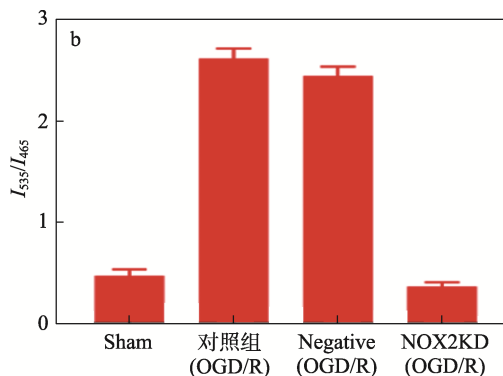
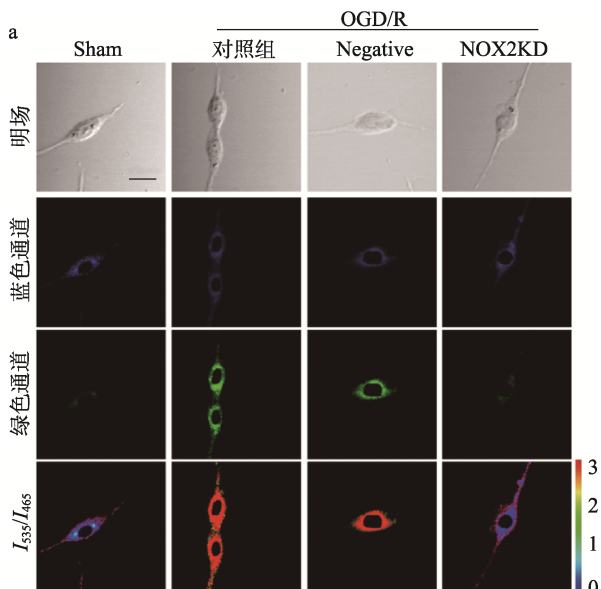


图 9 各组细胞的双光子激光共聚焦成像 (a); 图 9a 各组细胞中绿色通道与蓝色通道的 I_{535}/I_{465} (b)

Fig. 9 Two-photon laser confocal imaging of cells in each group (a); I_{535}/I_{465} of green channel and blue channel in each group of cells in Fig. 9a (b)

2.6 MCAO 模型的组织成像

利用 Z-Stack 技术,观察探针 MQH₂O₂ 在脑组织中不同深度的成像,结果如图 10 所示。

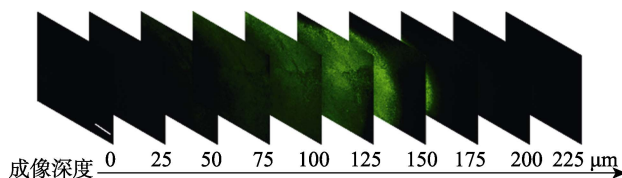
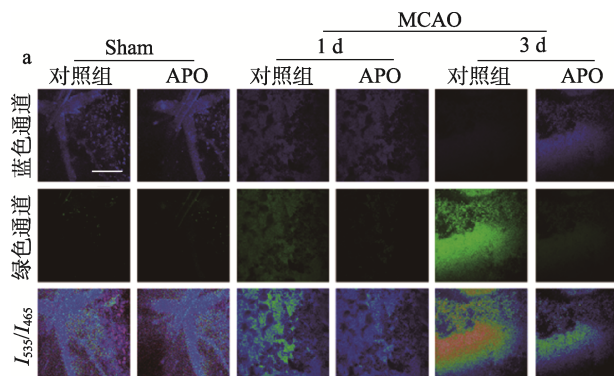


图 10 探针 MQH₂O₂ 的组织成像穿透深度

Fig. 10 Tissue imaging penetration depth of probe MQH₂O₂

由图 10 可知,该探针的成像深度可达 225 μm ,充分证明该探针可实现利用双光子激光显微镜对深部组织中的 H₂O₂ 进行成像分析。

随后按照 1.4.5 节实验方案,通过 MCAO 成功建立小鼠脑卒中模型,分为正常小鼠脑组织、卒中 1 及 3 d 3 种小鼠模型。将小鼠模型分为两组,对照组和 APO (Apocynin, NADPH 氧化酶抑制剂) 组,对照组为小鼠模型建好后直接尾静脉注射探针 MQH₂O₂; APO 组在小鼠模型建好后,先注射 APO (10 mg/L, 200 μL),30 min 后再注射探针 MQH₂O₂ (10 $\mu\text{mol/L}$),并分别对其进行双光子激光共聚焦成像。脑组织切片成像如图 11 所示。



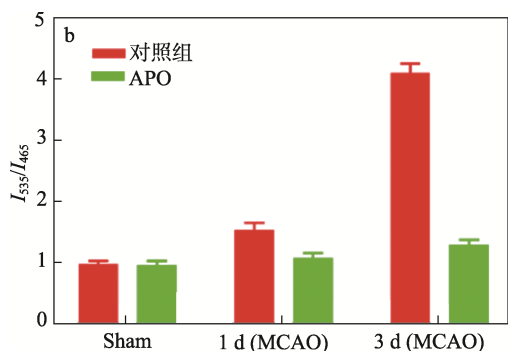


图 11 探针 MQH₂O₂ 在脑卒中过程中的双光子组织成像 (a); 图 11a 各组细胞中绿色通道与蓝色通道的 I₅₃₅/I₄₆₅ (b)

Fig. 11 Two-photon tissue imaging of probe MQH₂O₂ during stroke (a); I₅₃₅/I₄₆₅ of green channel and blue channel in each group of cells in Fig. 11a (b)

由图 11 可知,随着卒中时间的推移,对照组蓝光通道荧光逐渐减弱,而绿色通道荧光逐渐增强,比率 (I₅₃₅/I₄₆₅) 响应信号也随之增加,而注射 APO 后,绿色通道荧光明显减弱,而比率响应信号变化较小。该实验结果与细胞实验相一致,均是由于 H₂O₂ 浓度的降低而引起的变化,表明探针 MQH₂O₂ 可实现小鼠脑卒中过程中的原位成像分析。

2.7 探针性能比较

从是否为比率型荧光探针、比率型荧光探针双发射峰对应的最大发射波长 λ_{em1}/λ_{em2}、线性范围、相关系数和检出限 5 方面将探针 MQH₂O₂ 与近年来合成的一些较经典 H₂O₂ 荧光探针进行对比,对比结果和探针结构如表 1 和图 12 所示。由表 1 可见,本研究探针线性范围最大,相关系数最高,且检出限足够低,因此检测的准确度更高。

表 1 H₂O₂ 探针的对比结果

Table 1 Comparison results of probes for H₂O₂

探针	是否比率	λ _{em1} /λ _{em2} /nm	线性范围/(μmol/L)	相关系数	LOD/(nmol/L)	参考文献
1	否	667	0~50	0.995	370	[16]
2	否	625	0~40	—	21	[17]
3	否	550	1~40	—	15000	[18]
4	是	520/610	0~50	0.997	7000	[19]
5	否	470	0.4~10	—	68	[20]
6	否	699	0~25	0.996	72.48	[21]
7	是	484/562	0~200	—	570	[22]
8	是	593/642	0~100	—	32	[23]
9	否	665	0~30	—	1670	[24]
MQH ₂ O ₂	是	465/535	0.04~300	0.998	38.6	本文

注:“—”代表未给出。

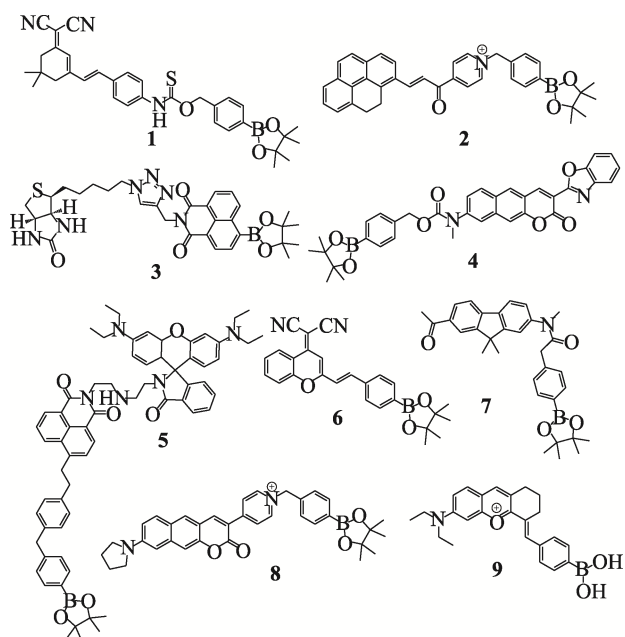


图 12 探针 1~9 的化学结构式

Fig. 12 Chemical structural formulas of probes 1~9

3 结论

以 6-甲氧基苯并噻唑-2-羟基喹啉作为双光子荧光团、硼酸酯作为过氧化氢的识别基团,成功构建了比率型双光子 H₂O₂ 荧光探针 MQH₂O₂。结果表明,MQH₂O₂ 不仅具有 30 min 内响应倍数为 25.4 倍,检出限低至 38.6 nmol/L,且具有高的选择性、生物相容性以及稳定性。更为重要的是,由于比率型荧光探针能够对环境影响进行内置校正,因此 MQH₂O₂ 在响应 H₂O₂ 过程中具有优异的线性范围 (38.6 nmol/L~300 μmol/L) 和相关系数 (R²=0.998),保证了探针能够实现更准确的荧光分析。该探针成功完成了脑卒中诱导细胞氧化应激过程的精准原位成像分析,通过使用 OGD/R 和 MCAO 分别处理细胞和小鼠用来模拟脑卒中过程,利用 APO 药物抑制和 NOX-2 基因沉默方式抑制氧化应激,证明脑卒中中可以诱导细胞氧化应激过程。为此,通过

脑卒中诱导细胞氧化应激过程这一原理, 探针 MQH₂O₂ 在脑卒中的早期精准诊断领域具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] AN B S, PANG S D, ZHANG Y R, *et al.* A novel near-infrared fluorescent probe for visualization of intracellular hydrogen peroxide[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2022, 10: 1025723.
- [2] SERRAMITO G R, SANTÍN A J M, ROMÁN P P, *et al.* Cerebral infarction after pituitary apoplexy: Description of a case and review of the literature[J]. *Neurocirugia*, 2016, 27(6): 310-314.
- [3] KIM J Y, BARUA S, JEONG Y J, *et al.* Adiponectin: The potential regulator and therapeutic target of obesity and Alzheimer's disease[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(17): 6419.
- [4] KUMARI S, SINGH R, CHANDRA S, *et al.* Association of paraoxonase-2 (C1053G) gene polymorphism with the expression of paraoxonase-2 gene in patients of ischemic stroke-A pilot study in Indian population[J]. *Neurology India*, 2022, 70(4): 1575.
- [5] CHEN L J, CHEN M J, ZHOU Y P, *et al.* NIR photosensitizer for two-photon fluorescent imaging and photodynamic therapy of tumor[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2021, 9: 629062.
- [6] CHAI L, LIANG T Y, AN Q, *et al.* Near-infrared in and out: Observation of autophagy during stroke *via* a lysosome-targeting two-photon viscosity-dependent probe[J]. *Analytical Chemistry*, 2022, 94(15): 5797-5804.
- [7] LU Q, WU C J, LIU Z Q, *et al.* Fluorescent AIE-active materials for two-photon bioimaging applications[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2020, 8: 617463.
- [8] DROBIZHEV M, MOLINA R S, HUGHES T E. Characterizing the two-photon absorption properties of fluorescent molecules in the 680~1300 nm spectral range[J]. *Bio-Protocol*, 2020, 10(2): e3498.
- [9] ZHONG H M, WU Y X, YU S R, *et al.* Two-photon CQDs-based dual-mode nanoprobe for fluorescence imaging and magnetic resonance imaging of intracellular wide pH[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(14): 5691-5699.
- [10] WANG X M, SUN Q, SONG X J, *et al.* Development of a ratiometric nitric oxide probe with baseline resolved emissions by an ES IPT and rhodol ring opened-closed integrated two-photon platform[J]. *RSC Advances*, 2022, 12(5): 2721-2728.
- [11] SHI L (石磊), HUANG L (黄玲), GONG S Z (龚盛昭), *et al.* A ratiometric fluorescent probe for hypochlorite ion recognition and its application [J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2019, 36(7): 1316-1320.
- [12] GE L H, LIU Z C, TIAN Y. A novel two-photon ratiometric fluorescent probe for imaging and sensing of BACE1 in different regions of AD mouse brain[J]. *Chemical Science*, 2020, 11(8): 2215-2224.
- [13] LIU T (刘涛), CHENG Z L (程忠玲), WU X N (吴效楠), *et al.* Synthesis and application of the ratiometric fluorescent sensor for cysteine[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2014, 31(7): 817-819.
- [14] YU H H, CHEN F, HE Y, *et al.* Theoretical modeling and analysis on the absorption cross section of the two-photon excitation in Rb[J]. *Optics Express*, 2018, 26(13): 17254-17263.
- [15] OGAWA Y, OKINAKA Y, TAKEUCHI Y, *et al.* Intravenous bone marrow mononuclear cells transplantation improves the effect of training in chronic stroke mice[J]. *Frontiers in Medicine*, 2020, 7: 535902.
- [16] TANG X Z, KREUK L S M, CHO C, *et al.* Bronchus-associated macrophages efficiently capture and present soluble inhaled antigens and are capable of local Th2 cell activation[J]. *Elife*, 2022, 11: e63296.
- [17] LIANG T Y, ZHANG D L, HU W, *et al.* A dual lock-and-key two photon fluorescence probe in response to hydrogen peroxide and viscosity: Application in cellular imaging and inflammation therapy[J]. *Talanta*, 2021, 235: 122719.
- [18] WANG K N, MA W, XU Y C, *et al.* Design of a novel mitochondria targetable turn-on fluorescence probe for hydrogen peroxide and its two-photon bioimaging applications[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2020, 31(12): 3149-3152.
- [19] REN M G, DONG D J, XU Q Y, *et al.* A biotin-guided two-photon fluorescent probe for detection of hydrogen peroxide in cancer cells ferroptosis process[J]. *Talanta*, 2021, 234: 122684.
- [20] WU Z, LIU M M, LIU Z C, *et al.* Real-time imaging and simultaneous quantification of mitochondrial H₂O₂ and ATP in neurons with a single two-photon fluorescence-lifetime-based probe[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(16): 7532-7541.
- [21] LI H D, YAO Q C, FAN J L, *et al.* A two-photon NIR-to-NIR fluorescent probe for imaging hydrogen peroxide in living cells[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 94: 536-543.
- [22] ZHAI B P, HU W, HAO R L, *et al.* Development of a ratiometric two-photon fluorescent probe for imaging of hydrogen peroxide in ischemic brain injury[J]. *Analyst*, 2019, 144(20): 5965-5970.
- [23] KIM H R, SARKAR S, AHN K H. A two-photon ratiometric sensing platform based on solid-state luminescent benzocoumarin: Application to prolonged bioimaging of hydrogen peroxide[J]. *Chemistry-An Asian Journal*, 2022, 17(4): e202101317.
- [24] ZHOU L Y, DING H Y, ZHAO W, *et al.* A mitochondria targetable two-photon excited near-infrared fluorescent probe for imaging of H₂O₂ in live cells and tissues[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2019, 206: 529-534.