发光金属Salen配合物作为检测细胞内微黏度的荧光成像探针

尹昊琰, 唐娟, 张俊龙*

北京分子科学国家实验室(筹); 稀土材料化学及应用国家重点实验室; 北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871

*通讯作者, E-mail: zhangjunlong@pku.edu.cn

收稿日期: 2016-07-28; 接受日期: 2016-11-16; 网络版发表日期: 2016-12-27

国家重点基础研究发展计划(编号: 2015CB856301)和国家自然科学基金(编号: 21271013, 21571007)资助项目

摘要 细胞内微黏度是描述细胞状态的重要物理参数, 与物质转运和信号转导等一系列扩散控制的生理过程密切相关. 构筑对细胞内微黏度响应灵敏的荧光探针是原位实时检测细胞状态的重要手段之一. 我们设计含有D- π -A推拉电子结构 N,N' -双水杨醛缩乙二胺类配体(N,N' -thiophene-3,4-bis-4'-(diethylamino)-salicylimine, Salen)的 Zn^{2+} 和 Al^{3+} 配合物, 考察了其光物理性质, 发现该类配合物具有对溶液黏度依赖的荧光增强性质. 同时, 相比于配合物 $ZnSalen$, $[AlSalen]^+Cl^-$ 具有检测灵敏度高、荧光成像信号增强倍数高等优点. 利用激光扫描共聚焦荧光成像和荧光寿命成像, $[AlSalen]^+Cl^-$ 同样表现出在培养温度降低或细胞自噬下的荧光增强和发光寿命延长等变化, 显示其作为检测细胞内微黏度荧光探针的潜在应用价值.

关键词 发光金属配合物, 荧光探针, 细胞内微黏度, 细胞成像, 荧光寿命成像

1 引言

细胞内微黏度是表征细胞状态的重要物理参数, 与蛋白质等生物大分子的浓度呈正相关, 对细胞内的物质转运以及信号转导具有重要影响, 并借此调控膜蛋白的功能以及膜蛋白的代谢过程^[1,2]. 因此, 细胞质基质的微黏度成为研究细胞病理学过程的重要指标^[3,4]. 发展活细胞内微黏度敏感的实时、原位监测手段, 特别是荧光成像技术, 对细胞生物学的研究具有重要意义.

设计对细胞内微黏度变化响应的荧光探针是实现荧光成像检测的重要研究内容. 目前, 这类探针主要

基于分子转子(molecular rotor)原理设计^[5-7]. 这一类分子具有以单键连接的D- π -A推拉电子结构, 光激发后会表现出平面型的定域激发态(local excitation, LE)和扭曲型分子内电荷转移激发态(twisted intramolecular charge transfer, TICT) (图1(a)). 平面型的LE态主要通过辐射跃迁弛豫回到基态, 而扭曲的TICT态通过非辐射跃迁弛豫回到基态. TICT激发态的结构受溶剂黏度影响, 大的溶剂黏度一方面阻碍扭曲的TICT态的形成, 另一方面稳定平面型LE激发态, 因此溶剂黏度会改变分子的荧光性质^[8,9]. Förster和Hoffmann最早对这类分子的发光进行了细致的理论研究, 得出其LE态的荧光量子产率 Φ_f 随黏度 η 的变化满足式(1).

引用格式: 尹昊琰, 唐娟, 张俊龙. 发光金属Salen配合物作为检测细胞内微黏度的荧光成像探针. 中国科学: 化学, 2017, 47: 267-276
Yin HY, Tang J, Zhang JL. Luminescent metal salen complex as intracellular microviscosity fluorescent sensor. *Sci Sin Chim*, 2017, 47: 267-276, doi: 10.1360/N032016-00154

图1 (a) 分子转子类荧光探针受激发后形成LE态和TICT态示意图^[8]; (b) ZnSalen作为分子转子型荧光探针的结构特点(网络版彩图)

$$\log \Phi_f = C + x \log \eta \quad (1)$$

Φ_f 与 η 的对数之间存在线性关系, 其中 C , x 是分别只与溶剂和荧光团自身性质相关的常数. 这为利用荧光成像检测细胞内黏度提供了理论基础. 与此同时, 荧光寿命也会随量子产率的变化发生相应变化^[10]. 因此, 用于测定细胞内微黏度的荧光探针可分为: 比例型荧光探针^[11~14]、荧光寿命成像探针^[15~18]以及双模式检测荧光探针^[19~22].

已报道的细胞内黏度敏感荧光探针大多是有机小分子, 发光金属配合物在该领域应用较少. 发光金属配合物通常具有较大的Stokes位移、较长的荧光寿命(可达 μs)等优势, 可以在细胞荧光成像应用中减少自发荧光的影响^[23,24]. 本课题组^[25]曾报道, 含有大共轭结构和D- π -A推拉电子结构的 N,N' -双水杨醛缩乙二胺配体(Salen, N,N' -ethylenedibis-salicylimine)的系列发光 Zn^{2+} 配合物, 可以用于单、双光子活细胞荧光成像. 用取代基不同的乙二胺和水杨醛以“组合化学”的方式建立的Zn-Salen配合物探针库为实现不同的亚细胞器的多色定位奠定了基础^[26]. 在此基础上, 我们设计了一

系列具有生物功能的Zn-Salen配合物探针, 可用于细胞内光活化^[27]、活性氧物种检测^[28]、以及细胞自噬检测^[29]等. 而另一方面, Zn-Salen配合物在水溶液中易发生 $\text{Zn} \cdots \text{O}$ 轴向配位诱导的聚集^[30]使配合物的发光变弱, 并且我们之前的研究还发现聚集的发生会影响其细胞摄取及亚细胞器定位^[31]. 针对这一现象, 我们通过使用刚性类穴醚型三聚Salen配体^[32]或引入水溶性硫鎓离子^[33], 探索Zn-Salen配合物聚集和去聚集与细胞摄取、定位等生物行为的构效关系. 为了进一步拓展金属Salen配合物在生物成像中的应用, 我们逐渐将研究的重心从配体的结构修饰转移到金属上, 试图通过金属种类的变化以及不同金属的反应性调节金属配合物探针的检测生物分子的能力.

基于此, 本工作尝试利用同为Lewis酸闭壳层金属离子的 Al^{3+} 取代 Zn^{2+} , 希望比较带有不同电荷的金属离子产生的光物理和生物成像的不同. 以细胞内微黏度为研究对象, 使用本课题组之前报道过的由3,4-噻吩二胺和4- N,N' -二乙基氨基水杨醛所构成的Salen配体. 该配体的 Zn^{2+} 配合物ZnSalen满足作为分子转子型探针的结构要求(图1(b)). 前期结果表明, ZnSalen在水溶液中易发生聚集导致荧光量子产率低, 阻碍了它作为细胞荧光成像探针的进一步应用^[26]. 我们保留配体分子转子的结构, 通过中心金属置换的手段合成了具有相同配体结构的 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$, 以解决ZnSalen聚集的问题. $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 在溶液中以正离子形式存在, 在一定程度上减小聚集导致的荧光量子产率降低, 同时具有响应黏度变化的荧光性质改变. 通过比较 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 与ZnSalen在不同溶剂条件下的光物理性质, 发现 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 具有更高的量子产率和更大的响应黏度变化的检测灵敏度. 最后, 将 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 作为探针, 利用激光扫描共聚焦荧光成像和荧光寿命成像观察其在细胞自噬条件下细胞内发光的差别, 展示它在检测自噬的细胞中微黏度的应用.

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

3,4-二氨基噻吩盐酸盐购自百灵威试剂公司(中国); 4-二乙基氨基水杨醛购自安耐吉试剂公司(中国); 二水合醋酸锌购自上海沪试化工(中国); 无水氯化铝购自广东西陇化工(中国). 实验所用化学试剂纯度均

在化学纯以上. 核磁共振氢谱和碳谱(^1H 和 ^{13}C NMR)采用Bruker400 M核磁共振波谱仪(瑞士)测得; 高分辨率质谱用Bruker ApexIV傅里叶变换离子回旋共振质谱仪(瑞士)测得; 光物理性质相关结果使用Agilent 8453紫外可见分光光谱仪(美国)、Hitachi F7000荧光光谱仪(日本)以及Edinburgh LifeSpec Red皮秒寿命荧光光谱仪(英国)测得.

细胞实验所用均为人宫颈癌细胞HeLa细胞系, 在37℃恒温、含有5% CO_2 以及饱和水蒸气气氛的细胞培养箱内进行培养. 培养基和抗生素购自Corning公司(美国); 胎牛血清、LysoTracker Green DND-26以及MitoTracker Green FM购自ThermoFisher公司(美国); 雷帕霉素购自成都鑫诺医药科技有限公司(中国). 活细胞荧光成像所用仪器为Nikon A1R-si激光扫描共聚焦荧光显微镜(日本), 成像时使用488 nm激光激发, 585/65检测器通道检测.

2.2 合成与表征

MSalen (ZnSalen 和 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$) 的合成路线如图2所示.

2.2.1 ZnSalen

将50 mg (0.27 mmol) 3,4-二氨基噻吩盐酸盐, 103.3 mg (0.53 mmol) 4-二乙基氨基水杨醛以及44.9 mg (0.53 mmol) 碳酸氢钠加入到8 mL乙醇中, 室温下搅拌1 h后, 加入88.0 mg (0.40 mmol) 二水合醋酸锌, 90℃下回流反应16 h. 停止反应时体系为棕黄色浑浊. 旋去溶剂后, 5 mL甲醇充分溶解后过滤, 取滤液, 旋去部分溶剂后,

图2 ZnSalen 和 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 的合成路线. (i) NaHCO_3 , EtOH, r.t., 2 h; (ii) $\text{Zn}(\text{OAc})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, EtOH, 90℃, 16 h; (iii) AlCl_3 , EtOH, 90℃, 2 d

溶液中析出沉淀. 过滤, 分别用乙醇、乙酸乙酯和石油醚洗涤沉淀, 得到棕黄色固体36.03 mg, 产率25.5%. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8.63 (s, 2H), 7.48 (s, 2H), 7.03 (d, 2H, $J=8.9\text{ Hz}$), 6.06 (dd, 2H, $J_1=8.9\text{ Hz}$, $J_2=2.4\text{ Hz}$), 5.82 (d, 2H, $J=2.4\text{ Hz}$), 3.36 (q, 8H, $J=7.1\text{ Hz}$), 1.14 (t, 12H, $J=7.1\text{ Hz}$). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 173.80, 161.11, 152.34, 141.78, 136.93, 111.00, 104.88, 101.39, 101.32, 43.80, 12.89. HR MS (ESI⁺, DMSO , FT-ICR): m/z calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_4\text{O}_2\text{SZn}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 527.14537, found 527.14606.

2.2.2 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$

将16.2 mg (0.031 mmol) ZnSalen和4.60 mg (0.035 mmol) AlCl_3 加入到6 mL乙腈中, 90℃下回流反应2 d. 停止反应时体系为棕黄色浑浊. 旋去部分溶剂后, 过滤, 分别用乙醇、乙酸乙酯和石油醚洗涤沉淀, 得到棕黄色固体8.75 mg, 产率54.1%. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 8.65 (s, 2H), 7.61 (s, 2H), 7.23 (d, 2H, $J=8.7\text{ Hz}$), 6.29 (d, 2H, $J=8.6\text{ Hz}$), 3.43 (q, 8H, $J=7.1\text{ Hz}$), 1.16 (t, 12H, $J=7.1\text{ Hz}$). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 167.19, 158.09, 145.68, 139.93, 136.50, 110.38, 104.85, 99.53, 95.80, 44.17, 12.66. HR MS (ESI⁺, DMSO , FT-ICR): m/z calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_2\text{SAl}$ ($[\text{M}-\text{Cl}]^+$) 489.19049, found 489.19140; for $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{AlN}_4\text{O}_3\text{S}_2$ ($[\text{M}-\text{Cl}+\text{DMSO}]^+$) 567.20442, found 567.20277.

2.3 光物理性质

采用不同体积比混合的甲醇-甘油配制不同黏度的溶液. 黏度测量使用Brookfield DV-II+旋转黏度计以及相应小量样品适配器(美国), 在20.00℃恒温条件下进行, 最终得到的混合液黏度范围为0.585~1251 cP.

用于光物理性质测量的测试溶液浓度为10 μM . 使用不同黏度的混合液配制MSalen溶液进行发光与黏度关系的实验, 测量前经过超声处理5 min以消除混合溶液中的气泡, 并在20.0℃水浴中恒温10 min, 防止环境温度对溶液黏度造成影响.

3 结果与讨论

3.1 金属Salen配合物的结构表征

ZnSalen和 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 均可通过一步反应直接合成得到, 并利用 ^1H , ^{13}C NMR和高分辨质谱(HR MS)进

行结构表征. 通过 ^1H NMR谱可以看到, 有相同配体结构的ZnSalen和 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 具有相似的谱图, 但与ZnSalen比较, $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 各个峰的化学位移整体向低场移动(图3), ^{13}C NMR也表现出相同的趋势. 这是由于 Al^{3+} 比 Zn^{2+} 更高的正电荷令其具有更强的吸电子能力, 从而使配体外围氢原子受到的去屏蔽作用更加显著. 由HR MS谱图可知, 以二甲基亚砜(DMSO)作为溶剂, 电喷雾电离(ESI)条件下, ZnSalen信号最强的峰是分子离子峰 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 而 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 则是有一分子DMSO配位的 $[\text{M}\cdot\text{Cl}+\text{DMSO}]^+$ 峰. 这说明 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 轴向 Cl^- 的配位并不稳固, 在溶液中会被配位型溶剂分子取代, 从而主要以 $[\text{AlSalen}]^+$ 离子的形式存在.

3.2 光物理性质及其溶剂效应

ZnSalen和 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 在甲醇中具有相似的光物

理性质(图4). 两者的紫外-可见吸收光谱(UV-Vis)均在300~500 nm范围内呈现出一个形状不规则的宽峰, 这是由于Salen配体的 $\pi\text{-}\pi^*$ 跃迁以及配体分子内电荷转移等因素造成. 相应地, 它们的荧光发射光谱也均在450~650 nm范围内表现出形状相似的宽峰. 这些配合物具有60~70 nm的Stokes位移. 二者在甲醇中的荧光量子产率均低于0.01 (ZnSalen: 0.0012; $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$: 0.0056), 荧光寿命也仅约0.1 ns (ZnSalen: 0.08 ns; $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$: 0.24 ns), 显示出MSalen的激发态具有较大的非辐射跃迁速率常数. 对比这两种配合物, 可以看到 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 的吸收和发射谱峰比ZnSalen整体稍有红移, 且具有略高的荧光量子产率和荧光寿命. 总的来看, 同为闭壳层结构的 Al^{3+} 和 Zn^{2+} 配位后, 对光物理性质的影响并没有太大差别.

对MSalen在不同溶剂中的发光行为进行了研究,

图3 ZnSalen和 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 在DMSO- d_6 中的 ^1H NMR谱的芳香区比对(网络版彩图)

图4 (a) ZnSalen和(b) $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 在甲醇中的UV-Vis吸收和荧光发射光谱(网络版彩图)

相应测量结果见表1. 在多种黏度 <2 cP (20.0 °C)的溶剂中, $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 具有相似的吸收峰形和消光系数, 且最大发射波长均在470 nm附近, 但荧光量子产率表现出了较大的差别. 在小极性的溶剂中, $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 的荧光量子产率和亮度均显著更高(二氯甲烷中 $\Phi_f=0.084$), 而在大极性的溶剂中则明显较低(甲醇中 $\Phi_f=0.0056$), 在水中的发光甚至被完全猝灭($\Phi_f<0.0001$). 这显示出

$[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 的荧光受溶剂极性的影响, 其荧光量子产率随溶剂极性的增大有明显下降的趋势. 通过对溶剂介电常数作图, 可以看到 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 的荧光量子产率随介电常数的增加呈现指数型衰减的趋势(图5(a)).

3.3 溶剂黏度对光物理性质的影响

利用不同体积比的甲醇-甘油混合溶液考察了溶

表1 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 在不同溶剂中的光物理性质总结

溶剂	$\lambda_{\text{ab}}(\text{nm})/\epsilon(\text{lg M}^{-1} \text{cm}^{-1})$	$\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$	$\Phi_f^{\text{a)}}$	$\epsilon \cdot \Phi_f^{\text{b)}} (\times 10^2 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})$
水	392/4.56	472	<0.0001	0.033
乙二醇	416/4.56	477	0.0058	2.1
甲醇	410/4.59	473	0.0056	2.2
二甲亚砜	416/4.57	477	0.0081	3
丙酮	408/4.56	472	0.016	5.9
乙酸乙酯	408/4.55	470	0.05	18
甲苯	419/4.39	473	0.073	18
1,4-二氧六环	410/4.56	469	0.068	25
二氯甲烷	416/4.58	476	0.084	32

a) 相对荧光量子产率通过参比法测定(20.0 °C, 376 nm激发, 样品吸光度OD=0.05). 参比为0.1 N H_2SO_4 溶液中的硫酸奎宁, $\Phi_f=0.53$. b) $\epsilon \cdot \Phi_f$ 用于表示荧光分子的发光亮度.

图5 ZnSalen和 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 在不同溶剂条件下的光物理性质. (a) MSalen在不同溶剂中的荧光量子产率随溶剂介电常数的变化关系; (b) $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 在不同比例的甲醇-甘油混合溶剂中荧光强度随溶剂黏度的变化; (c) $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 瞬态荧光衰减随溶剂黏度增长的变化; (d) MSalen荧光随溶剂黏度增强的对数增长曲线; (e) MSalen荧光强度与溶剂黏度取对数后的线性拟合(蓝色曲线是 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 在小黏度偏离线性关系的示意); (f) $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 的荧光寿命与溶剂黏度取对数后的线性拟合(网络版彩图)

剂黏度对MSalen发光性质的影响,发现在实验条件下,MSalen的荧光强度随黏度的增大而逐渐增强,其发射峰强度随黏度呈现对数增长的关系(图5),符合分子转子的理论模型满足的式(1).在0.585~1251 cP的黏度范围内, $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 表现出了接近10倍的发光强度的增强,其中,在>10 cP的黏度范围内,其荧光发射峰值强度的对数值与黏度的对数值表现出线性关系($R^2=0.998$).我们认为, $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 的分子中存在推拉电子结构,使其在受激发后存在LE和TICT两种激发态模式.基态下由于配体分子具有大共轭结构,整个 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 分子拥有一个平面的构型,二乙基氨基的氮原子的孤对电子参与共轭.而在TICT激发态下,为了更好地维持D $^+$ - π -A-的电荷分离结构,二乙基氨基的氮原子在给出电子后,会发生碳氮键的扭转,使其从大共轭体系中脱离出来.TICT态分子构型下基态和第一激发态之间的能量差更小,使其回到基态的跃迁采用非辐射型跃迁的形式.在大黏度的溶剂环境中, $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 碳氮单键的旋转受到阻碍,激发态分子通过TICT以非辐射跃迁的形式回到基态的概率减小,从LE态通过辐射跃迁返回基态的概率增加,从而使荧光量子产率升高.

ZnSalen发光随溶剂黏度的增长表现出了与 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 类似的趋势,其发射峰强度的对数值与溶剂黏度的对数值之间也存在线性关系(图5(d, e)).相比ZnSalen, $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 的线性斜率更大,表明 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 对体系的黏度变化具有更高的检测灵敏度.值得注意的是,在体系黏度小于10 cP时,这种线性关系对ZnSalen仍然适用,但对 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 却向发光强度较大的一侧偏移.这可能是由于利用Förster-Hoffman方程进行数据拟合时忽略了除黏度外其他环境因素的影响,而混合溶剂在黏度变化的同时也随着溶剂混合比例的变化有一定的极性变化.体系黏度小于10 cP时,混合溶剂中甲醇占总体积的百分比的变化范围是30%~100%,极性变化对荧光强度影响大于混合溶剂黏度变化的影响,因此在小黏度范围内向发光强的方向偏离线性.而ZnSalen发光受溶剂极性影响小,因此在测试的全黏度范围内都能维持较好的线性.从图5(e)中可以看到, $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 的线性范围是10~1000 cP,这与常见亚细胞器在不同的生理状态下,微黏度的变化范围一致(50~500 cP)^[17,34].

黏度对 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 荧光的影响也表现在荧光寿命上.环境的大黏度在阻碍单键扭转的同时降低了发荧

光的LE态的非辐射跃迁速率,从而延长LE态的荧光寿命.实验证明,在黏度逐渐增大的条件下, $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 的荧光寿命有明显的增长趋势(图5(c)).混合溶剂中 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 会与两种质子溶剂组分形成不同的氢键物种,使其时间分辨荧光光谱符合双指数衰减^[35],拟合得到的两个寿命数值的变化范围分别为0.01~0.15 ns以及0.24~0.59 ns,且分别对应黏度的增加呈现对数增长趋势,将寿命和黏度分别取对数后可以得到符合得较好的线性拟合结果(图5(f)).这些结果显示, $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 可以作为检测体系黏度的荧光寿命探针.

3.4 对细胞内微黏度的检测

我们进一步探究了利用MSalen作为检测细胞内黏度探针的可能性.首先,用CCK-8试剂盒考察了MSalen的细胞毒性^[36],结果显示在0.6~20.0 μM 的浓度范围内,经过 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 处理的细胞始终保持了80%以上的细胞存活率,显示其较小的细胞毒性.另一方面,ZnSalen则表现出了S型细胞毒性曲线以及7.8 μM 的半数致死浓度,这说明ZnSalen具有相对较高的细胞毒性.另一方面,细胞成像实验中可以看到2 μM 的浓度下, $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 可以表现出较强的细胞内荧光信号,而ZnSalen基本上无法检测到细胞内的发光(图6).因此细胞成像实验只针对细胞毒性低、荧光量子产率高的 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 展开.本文后续成像实验均使用2 μM $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 处理细胞2 h.

用488 nm的激光器激发,可以在552~617 nm的检测器通道内收集到较强的 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 的细胞内发光,共定位实验显示, $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 的发光与溶酶体荧光示

图6 (a) $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 和ZnSalen在24 h的孵育条件下对HeLa细胞的细胞毒性曲线. (b) $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 和(c) ZnSalen在HeLa细胞内的发光. (i) MSalen的发光. 488 nm激光器激发, 585/65检测器通道检测. (ii) (i)通道信号与微分干涉相差(differential interference contrast, DIC)信号的合并图(网络版彩图)

图7 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 在HeLa细胞中的亚细胞器共定位成像. (a) 与溶酶体荧光示踪剂LysoTracker Green DND-26的共定位; (b) 与线粒体荧光示踪剂MitoTracker Green FM的共定位. (i) $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 的发光. 488 nm激光器激发, 585/65检测器通道检测. (ii) 荧光示踪剂的发光. 488 nm激光器激发, 515/30检测器通道检测. (iii) (i)和(ii)通道发光信号的合并图. (iv) DIC信号(网络版彩图)

踪剂LysoTracker Green DND-26以及线粒体荧光示踪剂MitoTracker Green FM均有部分共定位, 反映了 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 在细胞内呈多亚细胞器分布(图7).

细胞内的微黏度会随着所处环境温度的降低而升高^[19,22,37]. 为了证明 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 可以检测细胞内的微黏度变化, 用2 μM $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 预处理2 h的HeLa细胞被分别置于4和37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养0.5 h, 并利用荧光寿命成像的方法对细胞内 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 的寿命进行表征(图8). 可以看到, 与在37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养的细胞相比, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下培养的细胞内 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 的发光强度和寿命均略有增加, 其平均寿命从2.74 ns上升至2.98 ns. 由此可见, $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 具有作为检测细胞内微黏度的荧光寿命探针的能力. 值得注意的是, 荧光寿命成像所给出的平均寿命的值并不在图5(f)所示的寿命范围内. 这可能是由于黏度并不是影响 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 荧光寿命的唯一因素, 甲醇-甘油体系无法很好地还原细胞内的环境, 因此不能利用 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 对细胞内特定区域的黏度作定量表征.

使用自噬诱导剂雷帕霉素^[38]或者血清饥饿^[29]诱导细胞发生细胞自噬的情况下, $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 的细胞内荧光信号发生了明显的增强(图9). 统计细胞内发光强度, 可以看到在发生自噬的细胞中 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 荧光强度整体有2~3倍的提升, 表明自噬过程可能发生了微黏度的上升. 通过荧光寿命成像可以看到, 在用血清饥饿条件诱导发生自噬的HeLa细胞中, $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 的荧光寿命要明显长于未经处理的正常细胞, 平均寿命

图8 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 的荧光寿命成像结果. (a) 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养的HeLa细胞; (b) 4 $^{\circ}\text{C}$ 下培养的HeLa细胞; (c) 用血清饥饿条件诱导自噬的HeLa细胞. (i) $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 的共聚焦荧光成像. 488 nm激光器激发, 585/65检测器通道检测. (ii) $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 的荧光寿命成像. (iii) DIC信号. (iv) 荧光寿命成像图中 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 的荧光寿命分布曲线, 左上角的数值是该条件下 $[\text{AlSalen}]^+\text{Cl}^-$ 荧光的平均寿命(网络版彩图)

图9 [AlSalen]⁺Cl⁻在不同细胞状态的HeLa细胞中的成像情况。(a) 正常未处理的细胞。(b) 用雷帕霉素诱导自噬的细胞。(c) 用血清饥饿条件诱导自噬的细胞。(i) [AlSalen]⁺Cl⁻的发光。488 nm激光器激发, 585/65检测器通道检测; (ii) DIC信号。(d) 正常细胞和诱导发生自噬的细胞中[AlSalen]⁺Cl⁻细胞内发光的强度统计对比($n=3$, $*P<0.001$) (网络版彩图)

较正常条件下的2.74 ns增长至3.20 ns, 荧光强度也相

对更强(图8)。这排除了细胞单纯对[AlSalen]⁺Cl⁻的摄取量增加的可能性。结合光物理性质的测试结果, 可以认为在细胞自噬的条件下, HeLa细胞发生了微黏度增大的变化。我们推断在细胞自噬的过程中, 细胞内形成自噬小体包裹包括部分线粒体在内的细胞器、蛋白质和一些其他的细胞质组分与溶酶体融合, 形成自噬溶酶体。在这个过程中[AlSalen]⁺Cl⁻所定位的线粒体和溶酶体由于自噬行为造成了局部蛋白质浓度升高, 从而提高了[AlSalen]⁺Cl⁻所处亚细胞环境的微黏度, 使得[AlSalen]⁺Cl⁻的发光增强, 荧光寿命增加。

4 结论

本文合成了ZnSalen和[AlSalen]⁺Cl⁻两种配合物, 并考察了其在不同溶剂条件下的光物理性质。实验发现, 由3,4-噻吩二胺和4-*N,N'*-二乙基氨基水杨醛构成的Salen配体与Zn²⁺和Al³⁺形成的配合物在溶液中的发光随黏度的增大而增大。这一性质与Salen配体所具有的D- π -A推拉电子结构以及激发态下的扭曲型分子内电荷转移密切相关。而通过中心金属从Zn²⁺到Al³⁺的置换, 可以增强其光物理性质随环境变化的灵敏度。同时, 金属置换增加了水溶性, 减小了细胞毒性, 构成了一类新型的细胞成像荧光探针。我们通过改变培养温度, 证明了[AlSalen]⁺Cl⁻具有检测细胞内微黏度的能力, 并进一步发现在诱导细胞发生自噬的条件下, [AlSalen]⁺Cl⁻的细胞内发光的强度和寿命均有所增加, 显示出了利用[AlSalen]⁺Cl⁻研究细胞自噬过程中细胞内微黏度变化的可能性。

参考文献

- 1 Yang Z, Cao J, He Y, Yang JH, Kim T, Peng X, Kim JS. *Chem Soc Rev*, 2014, 43: 4563–4601
- 2 Zubenko GS, Kopp U, Seto T, Firestone LL. *Psychopharmacology*, 1999, 145: 175–180
- 3 Ohnishi ST, Ohnishi T. *Membrane Abnormalities in Sickle Cell Disease and in Other Red Blood Cell Disorders*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994
- 4 Shinitzky M. *Physiology of Membrane Fluidity*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1984
- 5 Kuimova MK. *Phys Chem Chem Phys*, 2012, 14: 12671–12686
- 6 Sasaki S, Drummen GPC, Konishi G. *J Mater Chem C*, 2016, 4: 2731–2743
- 7 Haidekker MA, Theodorakis EA. *Org Biomol Chem*, 2007, 5: 1669–1678
- 8 Haidekker MA, Theodorakis EA. *J Biol Eng*, 2010, 4: 11
- 9 Grabowski ZR, Rotkiewicz K, Rettig W. *Chem Rev*, 2003, 103: 3899–4032
- 10 Förster T, Hoffmann G. *Z Phys Chim*, 1971, 75: 63–76
- 11 Kuimova MK, Botchway SW, Parker AW, Balaz M, Collins HA, Anderson HL, Suhling K, Ogilby PR. *Nat Chem*, 2009, 1: 69–73

- 12 Dakanali M, Do TH, Horn A, Chongchivivat A, Jarusreni T, Lichlyter D, Guizzunti G, Haidekker MA, Theodorakis EA. *Bioorgan Med Chem*, 2012, 20: 4443–4450
- 13 Liu F, Wu T, Cao J, Cui S, Yang Z, Qiang X, Sun S, Song F, Fan J, Wang J, Peng X. *Chem Eur J*, 2013, 19: 1548–1553
- 14 Xochitiotzi-Flores E, Jiménez-Sánchez A, García-Ortega H, Sánchez-Puig N, Romero-Ávila M, Santillan R, Farfán N. *New J Chem*, 2016, 40: 4500–4512
- 15 Kuimova MK, Yahioglu G, Levitt JA, Suhling K. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 6672–6673
- 16 López-Duarte I, Vu TT, Izquierdo MA, Bull JA, Kuimova MK. *Chem Commun*, 2014, 50: 5282–5284
- 17 Yang Z, He Y, Lee JH, Chae WS, Ren WX, Lee JH, Kang C, Kim JS. *Chem Commun*, 2014, 50: 11672–11675
- 18 Izquierdo MA, Vyšniauskas A, Lermontova SA, Grigoryev IS, Shilyagina NY, Balalaeva IV, Klapshina LG, Kuimova MK. *J Mater Chem B*, 2015, 3: 1089–1096
- 19 Peng X, Yang Z, Wang J, Fan J, He Y, Song F, Wang B, Sun S, Qu J, Qi J, Yan M. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 6626–6635
- 20 Yang Z, He Y, Lee JH, Park N, Suh M, Chae WS, Cao J, Peng X, Jung H, Kang C, Kim JS. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 9181–9185
- 21 Jiang N, Fan J, Zhang S, Wu T, Wang J, Gao P, Qu J, Zhou F, Peng X. *Sensor Actuat B-Chem*, 2014, 190: 685–693
- 22 Li J, Zhang Y, Zhang H, Xuan X, Xie M, Xia S, Qu G, Guo H. *Anal Chem*, 2016, 88: 5554–5560
- 23 Baggaley E, Weinstein JA, Williams JAG. *Coord Chem Rev*, 2012, 256: 1762–1785
- 24 Haas KL, Franz KJ. *Chem Rev*, 2009, 109: 4921–4960
- 25 Hai Y, Chen JJ, Zhao P, Lv H, Yu Y, Xu P, Zhang JL. *Chem Commun*, 2011, 47: 2435–2437
- 26 Xie D, Jing J, Cai YB, Tang J, Chen JJ, Zhang JL. *Chem Sci*, 2014, 5: 2318–2327
- 27 Jing J, Chen JJ, Hai Y, Zhan J, Xu P, Zhang JL. *Chem Sci*, 2012, 3: 3315–3320
- 28 Jing J, Zhang JL. *Chem Sci*, 2013, 4: 2947–2952
- 29 Chen JJ, Jing J, Chang H, Rong Y, Hai Y, Tang J, Zhang JL, Xu P. *Autophagy*, 2013, 9: 894–904
- 30 Consiglio G, Failla S, Finocchiaro P, Oliveri IP, Purrello R, Di Bella S. *Inorg Chem*, 2010, 49: 5134–5142
- 31 Tang J, Cai YB, Jing J, Zhang JL. *Chem Sci*, 2015, 6: 2389–2397
- 32 Lai J, Ke XS, Tang J, Zhang JL. *Chin Chem Lett*, 2015, 26: 937–941
- 33 Tang J, Xie D, Yin HY, Jing J, Zhang JL. *Org Biomol Chem*, 2016, 14: 3360–3368
- 34 Liu T, Liu X, Spring DR, Qian X, Cui J, Xu Z. *Sci Rep*, 2014, 4: 5418
- 35 Józefowicz M, Heldt JR, Karolczak J, Heldt J. *Z Naturforsch A*, 2003, 58: 144–156
- 36 Ishiyama M. *Talanta*, 1997, 44: 1299–1305
- 37 Wang X, Song F, Peng X. *Dyes Pigments*, 2016, 125: 89–94
- 38 Sarkar S, Ravikumar B, Floto RA, Rubinsztein DC. *Cell Death Differ*, 2009, 16: 46–56

Luminescent metal salen complex as intracellular microviscosity fluorescent sensor

Hao-Yan Yin, Juan Tang, Jun-Long Zhang*

Beijing National Laboratory for Molecular Sciences; State Key Laboratory of Rare Earth Materials Chemistry and Applications; College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China

*Corresponding author (email: zhangjunlong@pku.edu.cn)

Abstract: Microviscosity in living cells influences the diffusion of biomolecules and is an important physical parameter that related to cellular pathological processes. Although several fluorescent molecular rotors have been reported to work as intracellular microviscosity sensors, luminescent metal complexes have much less been studied. Herein we used zinc and aluminum complexes of Salen ligand (*N,N'*-thiophene-3,4-bis-4'-(diethylamino)-salicylimine) as fluorescent sensors for monitoring intracellular microviscosity. Although both of them showed enhanced fluorescence quantum yield along with increasing solvent viscosity, [AlSalen]⁺Cl[−] displayed higher sensitivity and stronger intracellular fluorescence signal, making it a better choice for intracellular application as microviscosity sensor. Moreover, the fluorescence lifetime of [AlSalen]⁺Cl[−] also increased in higher viscosity environment, which has been demonstrated in monitoring microviscosity raising during incubating temperature decrease or autophagy process of HeLa cell via fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM).

Keywords: luminescent metal complex, fluorescent sensor, intracellular microviscosity, cell imaging, FLIM

doi: [10.1360/N032016-00154](https://doi.org/10.1360/N032016-00154)