胆碱酯酶荧光探针的研究进展

熊浩¹, 杨文超^{1*}, 杨光富^{1,2*}

1. 农药与化学生物学教育部重点实验室, 华中师范大学化学学院, 武汉 430079

2. 化学化工协同创新中心(天津), 天津 300071

*通讯作者, E-mail: tomyang@mail.ccnu.edu.cn; gfyang@mail.ccnu.edu.cn

收稿日期: 2017-03-27; 接受日期: 2017-04-24; 网络版发表日期: 2017-07-14

国家自然科学基金(编号: 21332004, 21372094, 21672079)和广东省科技厅(编号: 2015A010107002)资助项目

摘要 作为生物体中一类重要的糖蛋白水解酶, 胆碱酯酶主要有乙酰胆碱酯酶(AChE)和丁酰胆碱酯酶(BChE)两种同工酶. 它们分布在大脑、血液和其他组织中, 广泛参与人和动物体内的多种生理代谢过程. 因此, 胆碱酯酶在神经生物学、药理学、临床医学和毒理学等研究领域发挥着重要的作用. 胆碱酯酶的活性分析对于药物发现以及相关疾病的诊断和治疗具有重要的指导意义. 本文简要评述了胆碱酯酶荧光探针的研究进展, 包括抑制剂型探针、底物型探针以及整合纳米技术等所建立的荧光定量分析方法.

关键词 胆碱酯酶, 荧光探针, 纳米材料, 生物分析

1 引言

1.1 胆碱酯酶的结构与功能

胆碱酯酶(cholinesterase, ChE)是生物体内的一种重要水解酶, 主要是对相应酯类化合物起水解作用. ChE主要包括乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE, EC 3.1.1.7)和丁酰胆碱酯酶(butyrylcholinesterase, BChE, EC 3.1.1.8)^[1], 具体结构如图1所示. ChE对维持生物体正常生理功能具有至关重要的作用. AChE最早在1968年由哥伦比亚大学的Leuzinger等^[2,3]从电鳗体中提取并经重结晶纯化得到, 其三维(3D)结构在1991年由Sussman等^[4]通过电子衍射的方法确定. 研究表明, 在人脑中, AChE广泛分布于各种神经肌肉组织内, 如尾状核、黑质、海马和小脑等. 在人的成长和发育过程中, AChE不仅对神经系统的调控有促进作用, 它与损坏的神经组织的修复或再生有着密不可

分的联系. BChE主要分布在人体的肝脏和血液中, 因而也被称为血清胆碱酯酶. 作为乙酰胆碱酯酶的一种同工酶, 它也常被称为假性胆碱酯酶. 在肝脏发生损伤或病变时, BChE的活性和合成会受到影响, 因此它在药理学和毒理学研究方面均具有重要意义.

如图2所示, AChE将乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)水解成胆碱和乙酸, 从而可以抑制或调控神经信号在突触中的传递^[5,6]. AChE也可以水解ACh类似物, 如硫代乙酰胆碱(acetylthiocholine, ATC)等. 需要指出的是, ATC常被用作测定AChE活性时的一种理想参照底物, 并由此建立了著名的Ellman方法^[7-9]. BChE与AChE的差异主要体现在对水解底物的选择性方面. BChE的活性空腔要大一些, 可以水解位阻更大的底物, 如丁酰胆碱、琥珀酰胆碱以及可卡因等^[10,11]. 目前, BChE在很大程度上是作为对有毒化学品(如有机磷农药和可卡因等)的预防和解毒剂而被研究, 这也是当前的一

引用格式: 熊浩, 杨文超, 杨光富. 胆碱酯酶荧光探针的研究进展. 中国科学: 化学, 2017, 47: 933-944

Xiong H, Yang WC, Yang GF. Recent progress in fluorescent probes for cholinesterase. *Sci Sin Chim*, 2017, 47: 933-944, doi: 10.1360/N032017-00044

图1 人体中的乙酰胆碱酯酶(a)和丁酰胆碱酯酶(b)的三维结构(网络版彩图)

图2 ChE水解胆碱的示意图(网络版彩图)

个热门研究领域^[12,13]。两种ChE与阿尔兹海默症(Alzheimer's Disease, AD)都有非常密切的关系。AChE在AD轻度到中度患者的大脑中活性很高,并且与淀粉样蛋白的形成也存在一定的联系。与AChE不同,BChE在AD中度以后的患者大脑中呈活性上升的趋势,而且能减少体外淀粉样蛋白原纤维形成。有关ChE抑制剂如多奈哌齐等已经被成功开发成为临床上治疗AD的药物,用于延缓AD患者的症状,因为它们能增强乙酰胆碱利用度^[14-16]。

1.2 胆碱酯酶的检测方法

AChE和BChE的活性测试及其抑制剂的筛选是药物研发和临床诊断中所面临的关键性技术。迄今为止,尽管文献报道的检测手段较多,但主要集中在AChE的活性测试及其抑制剂筛选。Kuca等^[17]5年前对此进行了较为详细的总结。简而言之,主要分为以下几类^[18]。(1)基于生物抗体的方法。基于AChE和BChE的抗体,采用酶联免疫方法或分子印迹方法对生物样品中的ChE进行检测。一般来说,这种方法的检测结果是酶的总浓度,比活性酶的实际浓度要高。(2)基于电信号的分析方法。利用天然底物ACh被酶水解后体系的pH变化(ΔpH)来完成活性检测,即测压法(manometric methods)^[19];同样也可以利用电位法(potentiometric methods)^[20]测出非天然底物ATC被AChE水解后的乙酸与磷酸盐/碳酸氢盐反应后体系的 ΔpH 。(3)基于滴定的方法(titrimetric

methods)^[21]。该方法起初是利用AChE抑制剂来调控乙酰胆碱的水解进度,从而实现AChE活性的监测;随着科技的发展,自动滴定仪将这种方法的灵敏度和效率大大提升^[22,23]。(4)光度法(photometric methods)^[24,25]。该方法近期研究比较热门,主要是在ACh与AChE反应的体系中加入一些显色剂(如酚红、石蕊、溴百里酚蓝等),通过观察颜色变化来判断其活性变化情况^[26,27]。近年来,荧光方法以其高灵敏度、快速、易操作和原位检测等优点受到研究者的广泛关注。目前,已有许多报道采用荧光方法来完成胆碱酯酶的活性检测和抑制剂筛选等工作,本文将集中围绕这方面的研究进展进行综述。

2 靶向胆碱酯酶探针的设计和應用

根据文献调研,目前已报道的靶向胆碱酯酶的探针及荧光分析方法仍以AChE为主,有关BChE探针的文献相对较少。这些ChE探针的设计原理主要分为以下3类:将AChE抑制剂与荧光团结合构建抑制型探针;基于光诱导电子转移(photo induced electron transfer, PET)和荧光能量共振转移(Förster resonance energy transfer, FRET)设计为能够被ChE水解的底物型探针;采用偶联策略,先用ChE催化ATC生成硫代胆碱,随后使用有机染料或先进纳米材料(如金属纳米颗粒、量子点、聚集诱导发光材料等)发展识别硫代胆碱的荧光探针并建立测试ChE活性的间接分析方法。

2.1 AChE的荧光探针和应用实例

2.1.1 以“抑制剂-荧光团”为结构单元的AChE荧光探针

在针对酶或其他生物大分子设计靶向探针时,研究者通常从靶标自身的抑制剂或化学配体出发,连接合适的荧光团做成抑制剂型探针。这种探针对于靶标通常具有良好的特异性识别性能和一定的亲和力。对于AChE体系,不少研究者将现有的AChE抑制剂与荧光染料通过化学方法整合在一起形成新的探针分子,这样的探针具有识别和标记AChE的双重功效。如图3所示,Chao等^[28]设计了抑制剂型的AChE荧光探针HupNIR1与HupNIR2。这两个探针是将近红外荧光基团Cy5.0和经典抑制剂石杉碱甲衍生物Hup1与Hup2通过缩合反应得到,它们的主要差别在于荧光团与抑制剂的距离。实验结果显示,这两个探针对AChE和BChE表现出不

图3 AChE抑制剂型探针HupNIR1和HupNIR2^[28] (网络版彩图)

同的选择性, 其中HupNIR2对AChE的选择性要高于HupNIR1. 不仅如此, 探针HupNIR2对人源AChE的半抑制浓度(IC_{50})值为31 nM (石杉碱甲的 IC_{50} 值为71 nM), 显示出与商品化抑制剂相当的活性, 这说明荧光团的引入并没有影响抑制剂本身对酶的抑制活性. 在对肌肉神经接点部位进行成像时, HupNIR2能对神经元细胞中的AChE起到识别作用并呈现近红外的荧光信号(发射波长作为650 nm, 磷酸盐缓冲溶液(PBS)缓冲体系), 其荧光量子产率高达0.43, 相比单独的荧光团Cy5.0提高了0.23. 值得一提的是, 该探针在小鼠神经肌肉接头部位(neuromuscular junctions)对AChE与BChE进行了区分, 这也是目前首例报道使用抑制型探针将AChE与BChE区分的方法. 另外, 近红外荧光团能有效消除细胞成像时本底荧光的干扰, 充分展示出探针HupNIR2对于AChE的成像和检测具有良好的应用潜力. 不过, HupNIR2对AChE的 IC_{50} 值比传统抑制剂还要低, 虽然有助于AChE的定位, 但在一定程度上对生物体内靶酶的活性产生影响.

与上述探针的设计思路不同, Schena等^[29]设计了一种基于FRET机理的AChE抑制剂型探针. 如图4所示, 探针分子采用了Cy5和Cy3两个荧光团, 这两个荧光团分别连在AChE的融合蛋白不同位置, Cy5通过烷基链与AChE配体(L, 采用十烷双铵作为胆碱酯酶配体)结合, 抑制剂再与AChE的活性位点结合, 这时由于烷基链的限制, Cy5与Cy3之间距离较近, 当Cy3受到相应波长的光的激发后, 其发射光被Cy5吸收, 导致Cy3不呈现荧光信号. 当在体系中加入抑制剂(A, 采用依酚氯铵类化合物作为胆碱酯酶抑制剂)后, Cy5上连有的配体(L)脱离AChE, 导致Cy5与Cy3距离变远, 其FRET效应大大减弱, 此时激发Cy3后体系能呈现出一种强烈的近红外荧光信号. 基于HEK293细胞的成像

图4 基于FRET机理的AChE抑制剂型探针^[29] (网络版彩图)

实验表明, 该探针嵌入细胞膜上, 主要是通过SNAP部分嵌入到细胞的外膜上进行胞外AChE的检测. 因此, 该探针不适用于胞内AChE的检测与成像, 存在一定的局限性.

以上两例充分显示了AChE抑制剂对于抑制型荧光探针的设计带来的便利. 显然, 由于抑制剂对靶标表现出优越的选择性和亲和力, 抑制剂型探针的识别和定位效果也是出类拔萃. 然而, 并不是靶酶的所有抑制剂都可以被改造为抑制型荧光探针. 我们还需要充分考虑荧光团与抑制剂偶联后所生成的探针分子的各项性质, 如荧光性质、酯水分配系数及其与靶标的亲和力等. 值得注意的是, 抑制型探针与酶的结合势必会降低酶分子的生物活性, 进而影响原位检测和生物学事件的研究. 因此, 基于底物的直接或间接荧光分析方法具有更加广阔的应用前景, 也引起了研究者的广泛关注.

2.1.2 具有“off-on”响应模式的底物型AChE荧光探针

前面提到, 抑制剂型探针对于靶酶具有良好的特异识别效果和定位功能, 但是会影响到靶酶的活性及靶酶与周围环境的相互作用. 因此, 使用能够直接被酶催化或识别酶促反应产物的底物型荧光探针就能很好地解决这一困扰. 一般来说, 底物型荧光探针的设计策略是将荧光团与猝灭基团(或识别基团)通过“桥基”(一般为酯键、酰胺键或醚键等)相连, 而靶标可以选择性地将“桥基”水解释放出荧光团以产生荧光, 其过程如图5所示. 与抑制剂型探针不同的是, 底物型探针在识别靶标前后会有比较明显的荧光性质变化, 这使得探针在识别中不需要像抑制剂型探针那样进行洗脱操作, 以去除未标记的部分. 显然, 底物型探针在操作性上要显得更为方便、灵活, 而且不会对样品中靶酶的活性产生影响.

在设计靶向生物大分子的底物型探针时, 不仅要

图5 具有“off-on”荧光响应的底物型荧光探针设计思路(网络版彩图)

考虑到识别基团与靶标的反应活性和特异性问题,还要根据一定的机理(如PET机理等)选择合适的荧光团来完成最终的探针分子设计,这也常是底物型探针的设计难点之一。于聪等^[30]在此基础上以芘(Py)作为荧光团,将ACh部分的胆碱部分作为识别基团并通过酯键与Py连接,进而得到探针Py-Ch(图6)。随后该课题组在体外对探针进行了相关测试,当溶液中只有Py-Ch存在时,分子之间由于正电荷排斥作用,Py-Ch变得较为分散,这时能在体系中检测到396 nm的荧光信号(375 nm激发),而当向体系中加入带有负电荷基团的聚乙烯磺酸钠(PVS)后,探针Py-Ch便因为正负电荷的相互吸引而发生聚集荧光猝灭效应(aggregation-caused quenching, ACQ),进而导致其荧光强度变弱。而当向该溶液中加入AChE后,Py-Ch被水解使其电荷发生反转,又会与本身带负电的PVS解聚,荧光因此再现,其最大发射波长为396 nm。探针聚集和解聚集的过程可以通过Py-Ch与AChE的水解反应来控制。这就为实时定量测定AChE活性和筛选抑制剂提供了比较直接简单的方式。

吴朝阳等^[31]近期研究出一种新型的具有“off-on”荧光响应模式的底物型AChE探针Indigo。探针在被AChE水解后还需进一步氧化偶联才能产生比较明显的荧光信号。如图7所示,该课题组是以吲哚乙酸酯作为AChE的水解底物,得到的初产物在有氧条件下发生偶联得到靛蓝色的产物,这一检测方法具有可视化的优势。

可以看出,上述几种探针都是针对底物的类似物来设计的,从而使这些物质可以被AChE直接水解,进而进行AChE的活性检测。然而,相比于最常见的底物ACh和ATC,AChE对上述探针的催化水解能力都显著

降低。因此,以Ellman方法为出发点,以ATC为底物,设计能够识别产物硫代胆碱的荧光探针是底物型AChE探针研究的又一个热门领域。张德清等^[32]以及吴朝阳等^[33]便从AChE水解ATC的产物为出发点,分别设计了对硫代胆碱有特异性识别作用的两个荧光探针,从而间接地反映出AChE的活性情况,如图8(a)所示,采用试卤灵作为荧光团,2,4-二硝基苯磺酰基作为巯基的识别基团,在与硫代胆碱反应时完成了“off-on”的荧光

图6 具有“off-on”荧光响应的底物型AChE探针^[30](网络版彩图)

图7 以吲哚为基本结构设计的底物型AChE探针^[31](网络版彩图)

图8 基于硫代胆碱特异性识别的AChE探针^[32,33](网络版彩图)

响应; 探针(图8(b))采用偶联策略, 该课题组在PBS缓冲溶液中进行探针的识别实验, 发现该探针前后能呈现出“on-off”的荧光响应. 和前面两种探针相比, Py-Ch只停留在短激发波长处, 细胞内成像会产生细胞本底值的干扰. 另外, Py-Ch和Indigo目前也只进行了细胞外AChE检测, 尚未对比较复杂的体系进行更加深入的研究. 而图8(a), (b)两种探针的水解产物的发射波长分别为585和615 nm, 其荧光性质较为良好, 具有在生物体内成像的潜力.

2.1.3 以量子点作为信号基团设计的AChE荧光分析方法

半导体量子点(quantumdot, QDs)是非常小的半导体颗粒, 尺寸仅为几纳米, 因此, QDs的光学和电子性质不同于较大颗粒的分子, 被广泛用于荧光传感和生物分析. 其中, 碳量子点(CQs)以其无毒、环保等优点, 成为医学成像、生物传感器等设备中最具理想的应用材料之一. 钱兆生等^[34]便以CQs为出发点, 在4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES 10.0 mM, pH 7.4)缓冲液中基于ATC底物建立了AChE活性分析的间接法. 如图9所示, 将CQDs通过与铜离子(溶液中铜离子浓度为10.4 μM , 接近人体血清正常铜离子浓度)聚集起来得到探针分子. CQDs未被聚集前在518 nm处(446 nm激发)呈现出最强荧光发射信号, 聚集之后不发射荧光, 而当ATC被水解后生成的硫代胆碱与探针中的二价铜离子发生配位后, CQDs的聚集效应消失, 此时体系呈现出荧光信号; 另外, 该课题组还将AChE抑制剂Tacrine加入体系中作为对照实验. 当AChE活性受到影响时, ATC便不能被水解成硫代胆碱, 从而没有巯基与二价铜离子参与配位, 故此条件下不会产生荧光信号. 除此之外, Pavlov等^[35]研究了CdS量子点(CdS QDs)来识别硫代胆碱, 效果也比较理想. 需要说明的是, 该方法采用的CdS QDs本身存在的 Cd^{2+} 能提高量子点本身在原位的稳定性^[36], 这在一定程度上也保证了探针在复杂体系如细胞中具有更长的半衰期. 但是, 类似Cd这样的重金属存在一定的生物毒性, 使得该类检测方法在实际应用中要考虑剂量带来的安全性问题.

2.1.4 基于金属等纳米材料构建的AChE荧光分析方法

除了前面介绍的量子点以外, 近年来利用金属纳米材料制成的各种靶向AChE的荧光探针器件也发展

图9 基于CQDs间接检测AChE的荧光分析方法^[34] (网络版彩图)

迅速. 如图10所示, 杨秀荣等^[37]以Au-Cu纳米材料设计了靶向AChE荧光探针AuNCs-MUA-Cu. 该探针是通过11-巯基十一烷酸(11-mercaptopundecanoic acid, MUA)将纳米材料AuNCs与 Cu^{2+} 连接在一起, 由于AuNCs的荧光能选择性地被 Cu^{2+} 猝灭掉, 此时的AuNCs-MUA- Cu^{2+} 体系是没有明显荧光的. 该课题组采用Tris-HCl缓冲溶液(pH 8.0)作为探针的孵育环境, 并以ATC作为AChE水解底物. 反应生成的硫代胆碱能与纳米探针上的 Cu^{2+} 发生反应, 随后探针上的 Cu^{2+} 被释放, 裸露的AuNCs能呈现一个比较显著的“off-on”荧光响应过程.

基于类似的设计策略, 李庄等^[38]和张耀东等^[39]也相继开展了Ag和Cu的纳米探针分子对AChE活性测试的相关研究. 这两种探针均可在纯水相中进行AChE的相关表征实验, 表现出良好的水溶性. 图10中探针分子Poly T-CuNPs与dC₁₂-AgNCs均是ATC水解后的产物硫代胆碱反应, 产生一个“off-on”荧光变化. 前者荧光最大吸收波长和最大发射波长分别为340和600 nm, 后者分别为575和640 nm, 并且这两个探针检测限均为0.05 mU/mL, 都属于比较理想的近红外荧光探针.

夏云生等^[40]也研制出了一种由金纳米棒得到的荧光探针AuNRs. 如图11所示, 在Tris-HCl缓冲溶液(pH 7.5)中, 由于金纳米棒与半胱氨酸(Cys)末端的S原子之间反应成键后, 每个半胱氨酸上质子化的氨基和去质子化的羧基间发生静电吸引作用. 这种静电作用促使体系中的金纳米棒自发地进行线性组装, 进而导致体系中的AuNRs的荧光信号无法释放. 一旦ATC水解生成硫代胆碱后, 金纳米棒与硫代胆碱的巯基配位, 就不再与体系中的Cys反应而产生原有的组装过程. 此时金纳米棒之间无相互作用, 使得AuNRs之间都是游离的, 这样体系中便会有荧光信号. 但是, 对于失活的胆碱酯酶来说, ATC不能转化为硫代胆碱, 最终与金纳米

图10 具有“off-on”响应的AChE金属纳米荧光探针^[37-39](网络版彩图)

图11 金纳米荧光探针用于检测AChE活性的示意图^[40](网络版彩图)

棒反应的还是Cys中的S原子,因此体系无显著的荧光变化.该探针的激发和发射波长分别为742和1030 nm,这种远红外的荧光探针能更加有效地避免生物背景信号的干扰,表现出一定的应用潜力.

另外,Eom等^[41]也曾报道过一种用于监测AChE活性的金纳米荧光探针.该课题组将三磷酸腺苷(ATP)与纳米金(AuNPs)结合在一起得到比较稳定的构型,即AuNPs-ATP.在磷酸缓冲溶液(pH 7.0)中,随着探针的反应,AuNPs的光学性质会发生明显的变化.实验现象显示,AuNPs在10 μM ATP的条件下具有相当好的稳定性,并不会与硫酯反应,进而对巯基表现出优异的专一性.另外,该探针最大吸收波长在680 nm,这巧妙地避开了在使用Ellman试剂进行高通量检测(high throughput assay)时产生的在415 nm的吸收带的干扰,从而使得探针在可见区的信噪比显著提高.

另外,张耀东等^[42]还进一步发现,荧光团和纳米金属之间的距离对探针的荧光强度具有重要的影响.究其本质,这种影响主要是与纳米金属周围电场微妙的变化有关.如图12所示,该课题组将荧光染料吡啶酮

衍生物(7-hydroxy-9H-1,3-dichloro-9,9-dimethylacridin-2-one, DDAO)与固定在AuNP上的AChE结合,导致DDAO的荧光增强.当加入AChE抑制剂后,抑制剂阻碍了DDAO接近AChE,DDAO的荧光强度相比之前明显减弱.基于上述原理实现了AChE抑制剂的筛选和表征.

除了上述的金属纳米材料,Gütschow等^[43]也构建了一种以聚氰基丙烯酸丁酯(polybutylcyanoacrylate, PBCA)为纳米材料的AChE荧光探针,该探针由PBCA包裹AChE的一种抑制剂PE154,该抑制剂本身在特定波长下能被激发产生荧光,故自身也可以作为一种荧光团.该类型探针相比金属纳米探针,PBCA更为廉价与环保.与前面提到的几种探针相比,该探针成功用于Triple-transgenic型老鼠体内进行成像实验,展示出良好的应用前景.

2.1.5 以聚集诱导发光为原理设计的AChE荧光探针

聚集诱导发光(aggregation-induced emission, AIE)效应^[44-47]是近年来的一个研究热点,其中四苯乙烯(tetraphenylethylene, TPE)结构是最具有代表性的一种荧光团.许多荧光材料在接入四苯乙烯结构后在特定的条件下都会产生明显的“off-on”荧光响应信号.如图13(a)所示,张德清等^[48]报道了一种在HEPES缓冲溶液(pH 7.35)中完成AChE识别的“off-on”荧光探针.该探针由两部分组成:第一部分是在四苯乙烯对位的两个苯环的4号位上接入磺酸酯基,该部分带负电;第二部分是硫代胆碱与马来酰亚胺基团发生迈克尔加成反应后的产物,胆碱部位4价氮原子而使该部分显正电性.当第二部分形成后,由于两部分的正负电荷吸引,第一部分的四苯乙烯分子开始变得拥挤,即产生了AIE效应,最终探针产生荧光并间接地完成对AChE活性的检测,其最大发射波长在490 nm.

图12 纳米金材料对探针的荧光强度增强示意图^[42](网络版彩图)

图 13 基于ATC底物的AIE型AChE荧光探针^[48,49] (网络版彩图)

在另一项研究中, 张德清等^[49]保留了与上述四苯乙烯结构相同的第一部分, 用肉豆蔻酰胆碱(myristoylcholine, Myr)代替ATC做底物(PBS缓冲体系)。如图13(b)所示, 由于该底物本身就有很长的烷基链, 便免去了组成上例中与第二部分类似结构的一些过程, 探针识别AChE的原理与上例相同, 但是后者在实验操作上显得更为简单。同理, 李峰等^[50]在TPE的一个苯环上直接连上马来酰亚胺形成探针分子TPE-M, 硫代胆碱的巯基与马来酰亚胺发生迈克尔加成反应后形成的TPE-M-S导致AIE现象; 而当AChE活性被抑制时, TPE-M无法进一步反应生成TPE-M-S, 从而探针不表现出明显的荧光。

最近, 张德清等^[51]基于AIE效应设计了一种新的“on-off” AChE荧光探针。如图14所示, 以四苯乙烯为单元的部分被集聚到一起产生很强的荧光。当向其中加入AChE的一种底物化合物2 (dabcyl-ACh)后, 由于Si颗粒促使TPE和Dabcyl-ACh发生电子和能量的转移而引起荧光的猝灭。将该探针孵育在具有AChE的PBS缓冲溶液中, dabcyl-ACh被AChE水解导致TPE重新聚集, 进而会渐渐观察到荧光信号增强的现象, 其最大荧光发射强度在470 nm附近。而被抑制剂处理后的AChE体系, 则无法观察到荧光信号增强的现象。此实验从另外的角度提供了间接筛选AChE抑制剂的新方法。然而, 与上述两例利用TPE作为荧光团设计的探针类似, 该探针荧光发射波长较短, 不太适用于生物组织成像分析, 这也是目前此类探针在细胞甚至活体成像中的一大障碍。

需要注意的是, 以上基于AIE效应设计的AChE荧光探针中, AIE现象的产生都是通过分子之间的静电吸引作用发生分子间的聚集现象来实现的。因此, 在设计这类探针时, 静电吸引作用的优化是一个重要的考虑因素。

2.1.6 以聚合物为载体设计的AChE荧光探针

聚合物是一种高分子化合物材料, 也是研究比较热门的一个方向。于聪等^[52]利用Ag的金属聚合物实现了AChE的检测及其抑制剂的筛选。如图15所示, 在Tris-HAc缓冲液中, 反应生成的硫代胆碱与Ag(I)结合的产物显正电性, 而聚乙烯基磺酸盐(PVS)与探针结合的部分显负电性。由于PVS部分对正电荷部分的静电作用, 这两部分相互吸引并不断靠近, 直至探针被释放出来。这个被释放的过程使得探针的聚集效应变弱, 即ACQ效应变小, 因而可以产生比较明显的荧光强度变化。

Yoon等^[53]则采用另一种底物Myr, 设计了一种检测AChE活性的高分子化合物探针, 其中是以聚二乙炔超分子(PDAs)这种特殊的光学材料为聚合物。如图16所示, PDAs在HEPES缓冲体系中发生变化时会引起自身荧光发生明显的红移(蓝色→红色)。具体来说, 当有Myr时会产生红移, 而当Myr被AChE水解后, PDAs不会发生变化。当AChE抑制剂存在时, Myr不会被水解, 因而PDAs也能呈现644 nm处的红色荧光。

与上例使用的材料不同, 张德清等^[54]使用两端被氨基取代的PDAs作为载体最后改造成为一种脂质体,

图 14 基于DabcyI-ACh底物的AIE型AChE荧光探针^[51] (网络版彩图)

图 15 基于聚合物PVS的AChE活性测定方法^[52] (网络版彩图)

图 16 PDAs脂质体对AChE活性监测及抑制剂筛选模型^[53] (网络版彩图)

该脂质体能在pH变化时发生颜色的改变. 因此, 该课题组直接使用天然底物ACh建立了AChE的活性测试方法. ACh被AChE水解后生成的乙酸能将脂质体上的氨基质子化, 引起脂质体的颜色变化, 从而可以通过比色法完成AChE活性的监测.

除了上述所介绍的聚合物分子材料, 还有一种由阴离子聚噻吩衍生物(PT-COO⁻)和阳离子表面活性剂

组合而成的复合物探针^[55]. 如图17所示, Myr首先与这种复合材料结合, 使其空间结构发生变化. 随后, AChE在中性磷酸缓冲液中对Myr的水解使得该复合物的空间结构恢复原样. PT-COO⁻的水溶性较好, 在激发光500 nm处有最大吸收, 其空间骨架被Myr“拆卸”后最大吸收波长蓝移到368 nm. 该荧光分析方法思路比较新颖, 而且可以实现对AChE抑制剂的筛选和动力学表征.

2.1.7 其他检测AChE的荧光探针

前面介绍了有关使用铜离子来间接检测AChE活性的分析方法, 黄燕等^[56]根据类似的思路设计了一种绿色荧光蛋白探针H₃₉GFP-Cu²⁺. 该课题组利用的是Cu²⁺与硫代胆碱特有的反应来完成AChE的活性监测的. 如图18所示, H₃₉GFP在未与Cu²⁺作用时, 荧光呈on的状态, 与Cu²⁺接触后呈off的状态, 将此状态记为H₃₉GFP-Cu²⁺, 当Cu²⁺与AChE水解ATC的产物发生作用后, H₃₉GFP-Cu²⁺的结构被瓦解, 荧光信号得以恢复. 该探针的检测限为0.015 mU/mL.

Willner等^[57]利用硫醇被氧化为二硫化物的机理, 设计了如图19所示的监测AChE活性的方案. 其大致识别过程为: 在磷酸缓冲液(pH 7.4)中, 被AChE水解的ATC产物能使偶联试剂5,5-二硫二硝基苯甲酸(DTNB)氧化为过硫化物, 与此同时伴随着凝血酶催化下的“血红素/G-四联体”发生氧化反应, 这使得试卤灵上取代的乙酰基被水解, 荧光团在相应激发光下表现出强烈的荧光信号. 不难发现, 这种检测方法使用的底物不仅局限于硫代胆碱, 其他类似含有巯基的分子如Cys,

图 17 PT-COO⁻探针用于检测AChE活性的示意图^[55] (网络版彩图)

图 18 H₃₉GFP-Cu²⁺用于检测AChE活性的示意图^[56] (网络版彩图)

图 19 利用DTNB的氧化反应对AChE活性检测的示意图^[57] (网络版彩图)

也有可能被氧化生成过硫化物,从而会对检测结果造成干扰。

2.2 BChE探针的设计与发现

BChE作为AChE的一种同工酶,有关其探针的报

道很少。最近, Han等^[58]根据丁酰胆碱的结构,将胆碱部分引入到探针当中得到BChE-FP1。如图20所示,该探针本身存在荧光,但当其被BChE水解后分子上的羧基与共轭基团酞亚胺产生PET荧光猝灭效应,此时体系一个呈“off”的状态,从而可以实现Tris缓冲溶液体系中BChE活性的监测。不过,他们并未考虑该探针

对BChE的特异性,尤其是对AChE的响应效果,也未尝试复杂体系中BChE的检测,这也是目前有关BChE荧光探针设计的难点所在。

同工酶是广泛存在于高等生物的催化相同反应而分子结构不同的酶。同工酶的鉴别或者特异性识别同工酶的某一种形态,对于临床研究和早期诊断具有重要的意义。然而,针对同工酶的某一种类型,发展快速、灵敏、高选择性的检测方法一直都是一个挑战。BChE和AChE是同工酶,功能和生物化学性质高度类似。我们尝试从酶活性空腔的结构差异性入手寻找突破点。通过深入分析比较这两种酶的活性空腔,尤其是它们对底物的动态响应机制,发现两者结构上的差异性主要体现在AChE活性空腔中部的两个芳香氨基酸残基(Tyr124和Phe337,人源序列)。这两个芳香残基使得AChE的活性空腔中部狭窄,不能允许位阻过大的基团通过。鉴于此,我们保留天然底物的酯键,在酸部分和醇部分分别引入荧光团和识别基团,随后开展系统性的结构优化(图21)。当R基团为环丙基,荧光团为荧光素时,成功设计出对BChE能够高响应的荧光探针BChE-FP2^[59]。另外,我们还对探针的细胞(PANC-1细

图 20 基于酞亚胺的“on-off”型BChE荧光探针^[58] (网络版彩图)

图 21 基于荧光素的“off-on”型BChE探针(网络版彩图)

胞)成像性质以及内源性BChE活性的定量检测进行了研究. 然而, 考虑到荧光素细胞成像不如近红外探针效果好, 并且探针的选择性还有待进一步的提高, 诸如此类的优化工作还将在后续工作中陆续展开.

近期, Lin等^[60]报道了一种检测BChE活性的荧光纳米材料, 该探针主要是与BChE水解ATC后产物硫代胆碱相作用. 如图22所示, 该课题组基于FRET机理, 利用CQDs与纳米材料AuNPs之间的能量传递实现BChE检测. 在Tris-HCl缓冲溶液中, 当BChE未被抑制时, ATC的水解产物能引起AuNPs的聚集而使CQDs解离出来, FRET效应也因此消失, 使得CQDs在520 nm处呈现较强的荧光信号; 而当使用有机磷杀虫剂(OPs)将BChE抑制时, 反应体系中便不能观测到520 nm处的荧光信号. 鉴于此, 该探针实现了BChE的检测与其活性的检测. 但是, AChE能以更高的效率将ATC水解, 该方法并不适用与AChE与BChE同时存在的体系, 无法排除同工酶的干扰.

3 总结与展望

鉴于ChE在疾病发生发展和化学品中毒等方面的重要性, 以其为靶标发展新的荧光探针和生物分析方法

图22 基于FRET机理设计的BChE探针CQDs-AuNPs^[60] (网络版彩图)

法具有重要的意义. 本文主要总结了近年来靶向ChE的荧光探针研究进展情况. 从中可以看出, 目前有关ChE探针的报道多以纳米型探针(量子点、金属纳米颗粒、聚合物等)为主, 荧光响应性能虽好, 但由于其原料昂贵、细胞相容性问题等因素却很少用于胞内或生物体内检测; 而抑制剂型探针在成像时需要进行复杂的洗脱操作, 也常会影响到活细胞内酶的活性. 此外, 研究工作主要集中在AChE探针的设计及应用方面, 而有关BChE探针的研究报道还很少. 总体上来看, 目前ChE探针的设计思路主要体现在3方面: (1) 将AChE抑制剂与荧光团结合构建抑制型探针; (2) 基于PET等原理设计能够直接被ChE水解的底物型探针; (3) 采用偶联策略, 使用有机染料或先进纳米材料发展识别硫代胆碱的荧光探针间接测试ChE活性的分析方法. 对于AChE探针的设计而言, 大多是直接或间接检测AChE的水解产物. 常见的AChE底物包括天然底物ACh, 类似物ATC和Myr等. BChE和AChE是同工酶, 其分布和功能均具有交叉. 近年来, 靶向生物大分子研究如火如荼, 已有不少文献报道利用底物型探针对人体细胞中的酶和蛋白(如硝基还原酶、糜蛋白酶等^[61-63])进行识别, 以及利用这类探针开展如生物硫醇等^[64,65]活性小分子的胞内代谢过程研究. 因此, 采用类似的策略发展靶向ChE的荧光探针和生物分析方法, 是一个重要的研究领域, 将会吸引越来越多科研工作者的关注. 不仅如此, 如何在复杂生物体系中实现BChE和AChE的特异性检测和时空分辨, 是重大疾病(如AD等)及相关生物学事件机理研究的一大难点, 也是今后ChE探针设计的另一个重要方向. 一旦实现ChE同工酶的生物成像和活体内定量检测, 不仅有助于临床上的疾病诊断和加速药物研发, 而且可以为更加深入研究重大疾病的分子机理提供有效工具.

参考文献

- 1 Pohanka M. *Int J Mol Sci*, 2014, 15: 9809–9825
- 2 Leuzinger W, Baker AL, Cauvin E. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1968, 59: 620–623
- 3 Leuzinger W, Baker AL. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1967, 57: 446–451
- 4 Sussman JL, Harel M, Frolow F, Oefner C, Goldman A, Tokor L, Silman I. *Science*, 1991, 253: 872–879
- 5 Khan MTH. *New Biotech*, 2009, 25: 331–346
- 6 Silman I, Sussman JL. *Curr Opin Pharmacol*, 2005, 5: 293–302
- 7 Holman MS, Knight GJ, Haddow JE. *Lancet*, 1980, 316: 651
- 8 Bucur MP, Bucur B, Radu GL. *Sensors*, 2013, 13: 1603–1613

- 9 Xia N, Wang Q, Liu L. *Sensors*, 2015, 15: 499–514
- 10 Ballard C, Perry E, Giacobini E. *Butyrylcholinesterase its Function and Inhibitors*. Boca Raton: CRC Press, 2003. 199
- 11 Peng H, Brimijoin S, Hrabovska A, Krejci E, Blake TA, Johnson RC, Masson P, Lockridge O. *Chem-Biol Interact*, 2016, 243: 82–90
- 12 Saxena A, Sun W, Dabisch PA, Hulet SW, Hastings NB, Jakubowski EM, Mioduszewski RJ, Doctor BP. *Biochem Pharmacol*, 2011, 82: 1984–1993
- 13 Chen VP, Gao Y, Geng L, Parks RJ, Pang YP, Brimijoin S. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: E1510
- 14 Sheeja Malar D, Beema Shafreen R, Karutha Pandian S, Pandima Devi K. *Pharm Biol*, 2017, 55: 381–393
- 15 Shah MS, Khan SU, Ejaz SA, Afridi S, Rizvi SUF, Najam-UI-Haq M, Iqbal J. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 482: 615–624
- 16 Luo W, Wang T, Hong C, Yang YC, Chen Y, Cen J, Xie SQ, Wang CJ. *Eur J Med Chem*, 2016, 122: 17–26
- 17 Holas O, Musilek K, Pohanka M, Kuca K. *Expert Opin Drug Discov*, 2012, 7: 1207–1223
- 18 Augustinsson KB. *Methods Biochem Anal*, 1971, 1: 217–273
- 19 Witter RF. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1962, 4: 313–323
- 20 Michel HO. *J Lab Clin Med*, 1949, 34: 1564–1568
- 21 Schwartz M, Myers TC. *Anal Chem*, 1958, 30: 1150–1151
- 22 Back P. *Zeitschrift Klin Chem Klin Biochem*, 1969, 7: 301–305
- 23 Kuca K, Cabal J, Kassa J. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2005, 20: 227–232
- 24 Pohanka M, Musilek K, Kuca K. *Curr Med Chem*, 2009, 16: 1790–1798
- 25 Caraway WT. *Am J Clin Pathol*, 1956, 26: 945
- 26 Reinhold JG, Gambescia Tourigny L, Yonan VL. *Am J Clin Pathol*, 1953, 23: 645–653
- 27 Molander DW, Friedman MM, Ladue JS. *Ann Int Med*, 1954, 41: 1139–1151
- 28 Chao S, Krejci E, Bernard V, Leroy J, Jean L, Renard PY. *Chem Commun*, 2016, 52: 11599–11602
- 29 Schena A, Johnsson K. *Angew Chem Int Ed*, 2014, 53: 1302–1305
- 30 Chen J, Liao D, Wang Y, Zhou H, Li W, Yu C. *Org Lett*, 2013, 15: 2132–2135
- 31 Wu Y, Sun Y, Xiao F, Wu Z, Yu R. *Talanta*, 2017, 162: 174–179
- 32 Cui K, Chen Z, Wang Z, Zhang G, Zhang D. *Analyst*, 2011, 136: 191–195
- 33 Liao S, Han W, Ding H, Xie D, Tan H, Yang S, Wu Z, Shen G, Yu R. *Anal Chem*, 2013, 85: 4968–4973
- 34 Qian Z, Chai L, Tang C, Huang Y, Chen J, Feng H. *Sensor Actuat B-Chem*, 2016, 222: 879–886
- 35 Saa L, Virel A, Sanchez-Lopez J, Pavlov V. *Chem Eur J*, 2010, 16: 6187–6192
- 36 Garai-Ibabe G, Saa L, Pavlov V. *Analyst*, 2014, 139: 280–284
- 37 Sun J, Yang X. *Biosens Bioelectron*, 2015, 74: 177–182
- 38 Ni P, Sun Y, Jiang S, Lu W, Wang Y, Li Z, Li Z. *Sensor Actuat B-Chem*, 2017, 240: 651–656
- 39 Zhang Y, Cai Y, Qi Z, Lu L, Qian Y. *Anal Chem*, 2013, 85: 8455–8461
- 40 Lu L, Xia Y. *Anal Chem*, 2015, 87: 8584–8591
- 41 Eom MS, Kim SD, Yi SJ, Choi SK, Han MS. *Bull Korean Chem Soc*, 2011, 32: 329–331
- 42 Zhang Y, Hei T, Cai Y, Gao Q, Zhang Q. *Anal Chem*, 2012, 84: 2830–2836
- 43 Härtig W, Kacza J, Paulke BR, Grosche J, Bauer U, Hoffmann A, Elsinghorst PW, Gütschow M. *Eur J Neurosci*, 2010, 31: 99–109
- 44 Mei J, Leung NLC, Kwok RTK, Lam JWY, Tang BZ. *Chem Rev*, 2015, 115: 11718–11940
- 45 Dong YQ, Lam JWY, Tang BZ. *J Phys Chem Lett*, 2015, 6: 3429–3436
- 46 Qin A, Lam JWY, Tang BZ. *Macromolecules*, 2010, 43: 8693–8702
- 47 Liu J, Lam JWY, Tang BZ. *Chem Rev*, 2009, 109: 5799–5867
- 48 Peng L, Zhang G, Zhang D, Xiang J, Zhao R, Wang Y, Zhu D. *Org Lett*, 2009, 11: 4014–4017
- 49 Wang M, Gu X, Zhang G, Zhang D, Zhu D. *Anal Chem*, 2009, 81: 4444–4449
- 50 Chang J, Li H, Hou T, Li F. *Biosens Bioelectron*, 2016, 86: 971–977
- 51 Shen X, Liang F, Zhang G, Zhang D. *Analyst*, 2012, 137: 2119–2123
- 52 Liao D, Chen J, Zhou H, Wang Y, Li Y, Yu C. *Anal Chem*, 2013, 85: 2667–2672
- 53 Zhou G, Wang F, Wang H, Kambam S, Chen X, Yoon J. *ACS Appl Mater Interf*, 2013, 5: 3275–3280
- 54 Xue WX, Zhang DQ, Zhang GX, Zhu DB. *Chin Sci Bull*, 2011, 56: 1877–1883
- 55 Li Y, Bai H, Li C, Shi G. *ACS Appl Mater Interf*, 2011, 3: 1306–1310
- 56 Lei C, Wang Z, Nie Z, Deng H, Hu H, Huang Y, Yao S. *Anal Chem*, 2015, 87: 1974–1980
- 57 Golub E, Freeman R, Willner I. *Anal Chem*, 2013, 85: 12126–12133

- 58 Kang S, Lee S, Yang W, Seo J, Han MS. *Org Biomol Chem*, 2016, 14: 8815–8820
- 59 Yang SH, Sun Q, Xiong H, Liu SY, Moosavi B, Yang WC, Yang GF. *Chem Commun*, 2017, 53: 3952–3955
- 60 Wu X, Song Y, Yan X, Zhu C, Ma Y, Du D, Lin Y. *Biosens Bioelectron*, 2017, 94: 292–297
- 61 Li Y, Sun Y, Li J, Su Q, Yuan W, Dai Y, Han C, Wang Q, Feng W, Li F. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 6407–6416
- 62 Chevalier A, Zhang Y, Khedour OM, Kaye JB, Hecht SM. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 12009–12012
- 63 Wu L, Yang SH, Xiong H, Yang JQ, Guo J, Yang WC, Yang GF. *Anal Chem*, 2017, 89: 3687–3693
- 64 Umezawa K, Yoshida M, Kamiya M, Yamasoba T, Urano Y. *Nat Chem*, 2016, 9: 279–286
- 65 Yue Y, Huo F, Ning P, Zhang Y, Chao J, Meng X, Yin C. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 3181–3185

Recent progress in fluorescent probes for cholinesterase

Hao Xiong¹, Wen-Chao Yang^{1*}, Guang-Fu Yang^{1,2*}

¹ Key Laboratory of Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, College of Chemistry, Central China Normal University, Wuhan 430079, China

² Collaborative Innovation Center of Chemical Science and Engineering, Tianjin 300071, China

*Corresponding authors (email: tomyang@mail.ccnu.edu.cn; gfyang@mail.ccnu.edu.cn)

Abstract: Cholinesterases, a series of glycoprotein hydrolases, mainly consist of acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) and they are isoenzymes. They mainly exist in brain, blood and many other tissues of human body, and they widely involve into many physiological metabolic processes like the metabolism, the nutritional synthesis and the energy transfer. Thus, cholinesterases play significant roles in multiple research areas, such as neurobiology, toxicology, clinical medicine and pharmacol. Therefore, the assay and analysis of cholinesterases activity is very important for the drug discovery and the clinical diagnosis of cholinesterases related diseases. In this review, we mainly focus on the recent advances in fluorescent probes and the development of the fluorometric methods for the biological analysis of cholinesterase, the inhibitor based probe, the substrate based probe, as well as the nanomaterial based fluorometric assays.

Keywords: cholinesterase, fluorescent probes, nanomaterial, biological analysis

doi: [10.1360/N032017-00044](https://doi.org/10.1360/N032017-00044)