羧酸酯酶比率型双光子荧光探针的构建及生物成像研究

张培盛^{1,2†}, 黄勇^{1†}, 曾钊¹, 夏细桃¹, 吴水珠^{1*}

1. 华南理工大学发光材料与器件国家重点实验室, 华南理工大学材料科学与工程学院, 广州 510640

2. 理论有机化学与功能分子教育部重点实验室, 精细聚合物可控制备及功能应用湖南省重点实验室, 分子构效关系湖南省普通高等学校重点实验室, 功能材料研究所, 湖南科技大学化学化工学院, 湘潭 411201

†同等贡献

*通讯作者, E-mail: shzhwu@scut.edu.cn

收稿日期: 2017-01-16; 接受日期: 2017-03-02; 网络版发表日期: 2017-07-17

广州市科技计划项目(编号: 201607020015)、国家自然科学基金(编号: 21474031, 21574044, 51603067)和广东省高性能与功能高分子材料重点实验室开放基金(编号: 2016005)资助项目

摘要 羧酸酯酶(CaE)水平的异常与脂肪肝、高血脂等多种疾病的发生密切相关, 发展用于快速、准确地检测CaE含量的荧光探针对于上述疾病的早期诊断具有重要意义. 本文基于分子内电荷转移原理, 设计合成了一种对CaE具有高选择性识别的红光比率型双光子荧光探针DCM-CE. CaE催化水解断裂探针分子的酯键, 导致酶促反应前后探针的荧光光谱性能发生显著的改变, 以此实现对CaE的比率荧光检测. 该探针具有较好的选择性、较低的检测下限以及较宽的pH响应范围. 此外, 我们成功地将DCM-CE应用于活细胞中对内源性CaE的双光子荧光成像.

关键词 红光, 比率型, 双光子, 羧酸酯酶, 荧光成像

1 引言

羧酸酯酶(EC 3.1.1.1, carboxylesterase, CaE)是 α/β 折叠水解酶家族中的一种酶, 能够催化包括脂肪酸酯、环境毒素、含酯药物在内的许多内源性和外源性含酯物质^[1,2]. 此外, CaE被确定为代谢活化前药过程中的一个关键性酶, 在抑制药物和活化前药方面发挥着重要作用^[3]. 然而, CaE水平的异常变化与脂肪肝、高血脂、癌症等多种疾病的发生密切相关^[4,5]. 因此, 建立一种准确、灵敏、简便、特异性且能在活细胞、组织和有机体水平上实时原位检测CaE的方法在相关

疾病诊断和治疗方面有着重要的意义.

近年来, 荧光检测法因其具有操作简便、灵敏度高、可实时快速分析以及时空分辨率高等优点, 被广泛应用于生物检测、光学成像等领域. 利用特异性荧光探针易实现细胞乃至活体组织的原位、可视化检测和示踪成像^[6-24]. 迄今为止, 绝大多数用于CaE检测的荧光探针都属于荧光增强型(turn-on)^[25-28], 这类探针的荧光信号为单一发射波长, 易受探针浓度、环境、仪器设备等因素的干扰, 从而影响最终测定结果的准确性和灵敏度^[20]. 与单一发射波长的荧光探针相比, 比率型荧光探针具有双波长发射特征, 其荧光强度比

引用格式: 张培盛, 黄勇, 曾钊, 夏细桃, 吴水珠. 羧酸酯酶比率型双光子荧光探针的构建及生物成像研究. 中国科学: 化学, 2017, 47: 986-993
Zhang P, Huang Y, Zeng F, Xia X, Wu S. A ratiometric two-photon fluorescent probe for detecting carboxylesterase in living cells. *Sci Sin Chim*, 2017, 47: 986-993, doi: 10.1360/N032017-00009

值的变化与分析物的浓度存在定量关系,且受环境因素影响小、响应范围宽、准确度高^[29].因此,开发CaE的比率型荧光探针显得尤为重要.

最近,已有几例有关检测CaE的比率型荧光探针的报道^[30-33].例如,Liu等^[32]设计合成了一种基于激发态分子内质子转移(ESIPT)原理的CaE荧光探针,实现了对CaE的高选择性比率荧光检测.Wu等^[33]以聚集诱导发光(AIE)的生色团为给体,荧光素二乙酯为受体,构建了荧光共振能量转移(FRET)的检测体系,实现了在缓冲液和血清样本中对CaE选择性的荧光比率检测.但上述荧光探针的检测光均低于600 nm,在体内的穿透深度浅、易受到背景荧光干扰的特点严重阻碍了其在生物体中的应用.另外,近年发展起来的双光子荧光成像技术^[34-36]或红光荧光染料(≥ 600 nm)^[37,38],由于具有组织穿透深、细胞损伤低、生物组织自荧光干扰小等特点,已被开发并应用于深层组织或活体成像.尽管最近有两例CaE比率型双光子荧光探针的报道^[39,40],但同时具有红光发射性能和双光子特性的CaE比率型荧光探针却尚未见报道.

为了克服上述CaE荧光探针的不足,本实验设计合成了一种以吡喃酮衍生物(DCM)作为双光子荧光报告基团、基于分子内电荷转移原理(ICT)的红光比率型双光子CaE荧光探针DCM-CE.荧光探针的设计策略如图1所示.在CaE存在时,探针发生水解反应,末端羧酸酯键断裂,裸露出的4-羟基苯甲醇不稳定,发生1,6-消除反应,使氨基甲酸酯断裂,释放出DCM染料分

子.由于探针水解前后DCM的荧光性能不同,以此可实现对CaE的比率荧光检测.此外,该探针DCM-CE还可在人体宫颈癌细胞(HeLa)中对内源性CaE进行双光子荧光成像.

2 实验部分

2.1 材料与仪器

4-氨基苯甲醇、二氧化锰(MnO_2)、丙二腈、二碳酸二叔丁酯($(\text{Boc})_2\text{O}$)、4-羟基苯甲醇、乙酰氯、2-甲基-4*H*-1-苯并咪唑-4-酮、哌啶(piperidine)、三光气(triphosgene)购自TCI试剂公司(日本);酯酶(猪酯酶, carboxylesterase (CaE), 浓度为6000 U/mL)、4-(2-氨基乙基)苯磺酰氯盐酸盐(AEBSF, 酯酶抑制剂)、MTT盐(3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐)、二甲基亚砜(DMSO, 生物级)购于Sigma-Aldrich试剂公司(美国);吡啶(pyridine)、乙腈(CH_3CN , HPLC级)、三乙胺(TEA)、磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)、磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)、冰醋酸(CH_3COOH)、葡萄糖(glucose)、丝氨酸(serine, Ser)、谷氨酸(glutamic acid, GA)、精氨酸(arginine, Arg)、谷氨酰胺(glutamine, Glu)、牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)、抗坏血酸(ascorbic acid, AA)、过氧化氢(H_2O_2)、次氯酸钠(NaClO)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、KCl、NaCl、 CaCl_2 、 MgCl_2 、乙酸酐(acetic anhydride)、三氟乙酸(TFA, CF_3COOH)均为分析纯试剂(阿拉丁试剂, 中国);HeLa细胞株购于南京凯基生物有限公司(中国), 复苏

图1 细胞对DCM-CE的摄取及随后的酯酶催化荧光变化机理示意图(网络版彩图)

后直接使用; 杜尔伯科改良伊格尔培养基(DMEM, 葡萄糖含量为4.5 g/L)、双抗(青霉素/链霉素, 浓度为 10^4 U/mL)、胰蛋白酶(0.25% trypsin-EDTA)购于Gibco (美国); 胎牛血清(FBS)购于HyClone (美国); 去离子水、二次蒸馏水均由实验室自制(Millipore装置净化制得)。

U-3010型紫外-可见分光光度计(日本Hitachi公司), F-4600型荧光光谱仪(日本Hitachi公司), Multiskan MK3酶标仪(美国Thermo公司), Avance Digital 400 MHz超导核磁共振仪(德国Bruker公司), LCQ DECA XP型质谱仪(美国Thermo公司), TCS-SP2型激光共聚焦显微镜(德国Leica公司), 倒置荧光显微镜(日本Olympus IX 71, DP72彩色 CCD), 双光子激光共聚焦显微镜(蔡司LSM 710 NLO, 德国卡尔蔡司光学有限公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 化合物3的制备

首先按文献方法合成得到化合物1^[36]和2^[41]。分别称取0.58 g (2.8 mmol) 1和0.62 g (2.8 mmol) 2加入100 mL圆底烧瓶中, 随后加入30 mL乙腈溶解, 在室温下剧烈搅拌均匀, 加入2.8 g (23.38 mmol)硫酸镁, 2.2 mL哌啶和1.1 mL冰醋酸, 搅拌加热至70℃并继续反应24 h, 通过薄层色谱(TLC)监测反应进程。待反应结束后, 冷却至室温过滤, 用乙腈洗涤滤饼3次, 收集滤饼。将上述滤饼加入到三氟乙酸和二氯甲烷(1:1, V/V)的混合溶液中, 室温下搅拌反应2 h。反应完全后, 旋转蒸发除去溶剂, 所得粗产物经硅胶柱层析提纯, 石油醚和二氯甲烷(2:3, V/V)为洗脱剂得到固体产物3。质量为0.79 g, 产率为90%。¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.70 (d, *J*=8.1 Hz, 1H), 7.87 (t, *J*=7.7 Hz, 1H), 7.73 (d, *J*=8.2 Hz, 1H), 7.61 (d, *J*=15.7 Hz, 1H), 7.56 (t, *J*=7.6 Hz, 1H), 7.47 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.05 (d, *J*=15.7 Hz, 1H), 6.83 (s, 1H), 6.61 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 6.01 (s, 2H)。ESI-MS (*m/z*) 360.19 [M+CH₃OH+H₂O]⁺。

2.2.2 化合物4的制备

称取2.23 g (18 mmol) 4-羟基苯甲醇于100 mL的圆底烧瓶中, 加入30 mL乙酸乙酯, 冷却到0℃, 在氮气保护下, 再加入2.5 mL三乙胺和1.28 mL 14 M乙酰氯的乙酸乙酯溶液, 搅拌反应5 h。反应完毕后, 减压蒸馏除去溶剂, 所得粗产物经硅胶层析提纯, 石油醚和乙酸乙酯(3:2, V/V)为洗脱剂得到固体产物4。质量为1.2 g, 产率为40%。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 7.33

(dt, *J*=9.2, 2.2 Hz, 2H), 7.08~7.03 (m, 2H), 4.60 (d, *J*=2.6 Hz, 2H), 2.76 (s, 1H), 2.29 (t, *J*=2.5 Hz, 3H)。

2.2.3 探针DCM-CE的制备

分别称取0.14 g (0.45 mmol) 3和0.34 g (1.13 mmol) 三光气加入50 mL的圆底烧瓶中, 随后加入10 mL二氯甲烷溶解; 在氮气保护下, 逐滴加入0.325 mL 12.4 M吡啶的二氯甲烷溶液, 搅拌并控制温度在0℃反应1 h, 然后升至室温继续反应2 h, 减压旋干溶剂。在氮气保护下, 将含有0.06 g (0.36 mmol) 4和1.5 mL三乙胺的二氯甲烷(5 mL)溶液用注射器缓慢滴加到圆底烧瓶中, 继续在室温下搅拌反应12 h。反应完全后, 旋干溶剂, 所得粗产物经硅胶层析柱提纯, 石油醚和乙酸乙酯(5:1, V/V)为洗脱剂得到探针DCM-CE。质量为0.14 g, 产率为79%。¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.11 (s, 1H), 8.73 (d, *J*=8.3 Hz, 1H), 7.92 (t, *J*=7.8 Hz, 1H), 7.79 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 7.70 (t, *J*=10.6 Hz, 3H), 7.61 (t, *J*=7.7 Hz, 1H), 7.56 (t, *J*=9.4 Hz, 2H), 7.49 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 7.37 (d, *J*=16.0 Hz, 1H), 7.16 (d, *J*=8.5 Hz, 2H), 6.98 (s, 1H), 5.18 (s, 2H), 2.27 (s, 3H)。¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz, ppm): δ 169.67, 158.97, 153.61, 153.40, 152.52, 150.78, 141.71, 139.01, 135.86, 134.40, 130.00, 129.74, 129.61, 126.62, 125.12, 122.41, 119.53, 118.66, 118.08, 117.77, 117.60, 116.43, 106.73, 65.97, 60.16, 21.32。ESI-MS (*m/z*) 581.83 [M+H₂O+K]⁺。

2.2.4 光谱实验

称取一定量的DCM-CE溶于DMSO中得到浓度为 1×10^{-3} M的探针母液, 密封保存在4℃冰箱中。CaE母液用二次双蒸水配制, 现配现用。除非另有说明, 文章中所有的测试均在10 mM PBS (pH 7.4, 含20% DMSO)中进行, 具体步骤如下: 分别量取1 mL PBS, 适量体积的DCM-CE母液于5 mL离心管中, 接着加入适量体积的CaE母液, 最后加入适量PBS稀释至总体积为2 mL, 摇匀(DCM-CE的最终浓度为5 μ M), 在37℃搅拌30 min后测定其光谱。

2.2.5 细胞毒性测试

将HeLa细胞在37℃、含5% CO₂的恒温恒湿培养箱下培养24 h后, 用无菌的PBS缓冲溶液洗涤细胞2~3次, 加入含不同探针(10、20、30、40、50 μ M)的DMEM培养基(含10%胎牛血清, FBS), 继续培养24 h。细胞毒性按照ISO10993-5标准采用MTT实验进行测试。

2.2.6 单光子和双光子细胞成像研究

实验中选取HeLa细胞来考察探针对活细胞的荧光成像. 细胞培养环境为37℃、含5% CO₂的恒温恒湿培养箱, 所使用培养基是添加了双抗(青霉素与链霉素)和10%血清(FBS)的DMEM. 成像前一天, 将消化后的HeLa细胞接种至经过聚赖氨酸处理过的盖玻片表面上, 放置于30 mm的玻璃培养皿中在细胞培养箱中培养24 h后, 除去培养皿中的液体并用DMEM培养基冲洗2~3次, 然后再分别加入含10 μM探针的DMEM培养基培养30和60 min. 酶抑制实验是将HeLa细胞先用含100 μM 4-(2-氨基乙基)苯磺酰氯盐酸盐(AEBSF, 抑制剂)的DMEM培养基培养30 min后, 再加入含10 μM探针的DMEM培养基培养60 min. 对照组细胞只用DMEM培养基培养. 成像前, 将细胞用PBS清洗3次, 接着, 将盖玻片放置于显微镜下进行单光子和双光子荧光成像. 单光子荧光成像用Olympus IX 71倒置荧光显微镜观察. 观察样品荧光的激发波长为480 nm, 检测波长范围为≥650 nm. 双光子荧光成像用蔡司LSM 710 NLO激光共聚焦显微镜观察, 观察样品荧光的激发波长为800 nm (双光子), 检测波长范围为650~750 nm, 其成像被标记为红色. 单光子图像使用Image J (美国国家健康研究院(NIH))软件分析, 双光子图像采集与分析使用ZEN 2009 Light Edition软件处理. 为确保实验中相对荧光强度的可比性, 测试过程中激光强度和检测器的各参数均保持一致.

3 结果与讨论

3.1 荧光探针DCM-CE的合成

荧光探针DCM-CE的合成路线如图2所示. 首先根据文献合成化合物1和2, 化合物1和2通过Knoevenagel缩合反应和在三氟乙酸作用下经脱-t-Boc保护反应得到3. 进而以4-羟基苯甲醇为原料, 以三乙胺作碱与乙酰氯反应得到化合物4. 最后, 化合物3的氨基通过三光气与化合物4的羟基进行氨基甲酸酯化反应得到目标探针DCM-CE. 对荧光探针化合物进行了相关氢谱、碳谱和质谱的表征(实验部分及图S1~S3, 见网络版补充材料). 此外, 我们也考察了目标探针DCM-CE的光谱性质, 测试结果如图S4所示. 从图中可以看出, 探针在较大的波长范围内都有吸收, 并且455 nm处有最大吸收峰. 以455 nm为激发波长, 所得到的荧光发射光

图2 探针DCM-CE的合成路线

谱在约606 nm有较强的发射峰. 探针DCM-CE具有较大的stocks位移(约151 nm), 从而有效避免细胞内的自发荧光干扰.

3.2 光谱性能研究

3.2.1 探针DCM-CE对CaE的光谱性质

首先测试了探针分子DCM-CE的吸收光谱和荧光发射光谱, 如图S4, S5所示. 探针分子DCM-CE (5 μM)本身在约455 nm处有一个强吸收峰(图S5(a)), 且在约606 nm发出强的荧光发射峰(图S5(b)). 当向探针溶液中加入0.2 U/mL的CaE时, 在455 nm处的吸收峰红移至470 nm (图S5(a)); 606 nm处的荧光峰消失, 同时在666 nm处呈现出较强的荧光, 这和化合物3的荧光峰(666 nm)位置一致(图S5(b)), 表明探针DCM-CE能够与CaE发生酶促化学反应, 并最终转化为化合物3.

接着对探针DCM-CE和CaE之间的反应条件进行了优化, 以获得适宜反应条件. 固定探针分子DCM-CE的浓度(5 μM), 在加入CaE前后, 考察了不同pH (10 mM PBS缓冲溶液)对探针荧光强度比值(I_{666}/I_{606})的影响. 如图3(a)所示, 探针分子DCM-CE本身的荧光强度比值在pH 3.0~10.0基本保持不变, 即探针分子在较宽的pH范围内都保持稳定. 当加入CaE后, 探针分子DCM-CE的荧光强度比值(I_{666}/I_{606})在pH 3.0~10.0明显增加, 并且在生理环境(pH 7.0~9.0)具有良好的稳定性. 此外, 考察了探针分子DCM-CE对CaE时间依赖性实验, 如图3(b)所示. 从图中可以得知, 随着响应时间的增加, 606 nm处的发射峰强度不断降低, 同时666 nm处的发射峰强度不断增加; 在约25 min时荧光比值达最大(图3(d)), 表明该探针能够快速地对CaE进行检测. 综上所述, 选择10 mM PBS (pH 7.4)和30 min作为后续测试条件.

3.2.2 DCM-CE对CaE的检测性能研究

图4(a)为探针分子DCM-CE对CaE的浓度依赖性实验. 从图中可以看出, 随着CaE的浓度不断增加(激发波长为470 nm), 探针分子DCM-CE在606 nm处的荧光强度逐渐减弱, 而在666 nm处的荧光强度逐渐增强; 并且由666和606 nm处的荧光强度比值(I_{666}/I_{606})可以看出, 随着CaE浓度的增加, 两者的比值(I_{666}/I_{606})逐渐增大(图4(a)插图); 并且在0.002~0.03 U/mL的范围内, 荧光强度比值和CaE浓度呈现很好的线性关系(图S6), 由此得到探针DCM-CE的检测下限为 1.10×10^{-3} U/mL, 表明探针能够灵敏地检测CaE.

对于荧光探针来说, 检测的选择性是一项重要指标. 为了探索探针DCM-CE对CaE的选择性, 考察了DCM-CE的缓冲溶液在一些常见的离子(K^+ 、 Na^+ 、

Ca^{2+} 、 Mg^{2+})、活性氧物质(H_2O_2 、 ClO^-)和其他常见生物物质(glucose、Ser、GA、Arg、Glu、BSA、AA、ALP)存在时的荧光强度比值的变化, 如图4(b)所示. 加入0.2 U/mL CaE后, 探针分子DCM-CE的荧光强度比值(I_{666}/I_{606})明显增大, 而其他上述物质的加入基本上都不会导致荧光强度比值(I_{666}/I_{606})的增大. 该结果证明探针分子DCM-CE对CaE表现出良好的选择性.

3.2.3 探针分子DCM-CE对CaE的响应机理

据文献报道, CaE通过酶催化水解反应可断裂酯键^[25-28]. 基于以上机理及探针分子DCM-CE对CaE的荧光响应, 可推断, CaE存在时, 探针DCM-CE中的酯键可被断裂, 最终转化为化合物3(图S5(b)). 为了进一步证明酯键断裂是由于CaE的酶促反应所致, 对探

图3 (a) 探针分子DCM-CE (5 μ M)与CaE反应前(黑线)和反应后(红线)的荧光强度比值(I_{666}/I_{606})与pH之间的关系图; (b) 探针DCM-CE (5 μ M)加入CaE (0.2 U/mL)后随时间变化的荧光发射光谱图, 插图为探针DCM-CE的荧光比率值(I_{666}/I_{606})与时间的关系图(网络版彩图)

图4 (a) 探针DCM-CE (5 μ M)随CaE (0~0.3 U/mL)浓度变化的荧光发射光谱图, 插图为探针DCM-CE的荧光比率值(I_{666}/I_{606})与CaE浓度的关系图; (b) 探针DCM-CE (5 μ M)对CaE或其他干扰物的荧光强度比值(I_{666}/I_{606})的变化: 1, 1.0 mM Na^+ ; 2, 1.0 mM Ca^{2+} ; 3, 1.0 mM Mg^{2+} ; 4, 1.0 mM K^+ ; 5, 0.5 mM H_2O_2 ; 6, 0.5 mM ClO^- ; 7, 1.0 mM 葡萄糖; 8, 1.0 mM Ser; 9, 1.0 mM GA; 10, 1.0 mM Arg; 11, 1.0 mM Glu; 12, 1.0 mM BSA; 13, 0.2 mM AA; 14, 100 U/L ALP; 15, 0.2 U/mL CaE (网络版彩图)

图5 探针(a)和探针与CaE反应所得产物(b)的质谱图

针分子DCM-CE与CaE反应前后的物质进行了质谱测试. 探针分子DCM-CE的溶液中加入CaE反应后, 理论上探针分子应转变为化合物3; 如图5所示, 质谱图中的两个峰328.35 $[M+H_2O]^+$ 和361.17 $[M+CH_3OH+H_2O]^+$ 对应于化合物3. 由此表明, CaE的酶促反应可使探针水解、酯键断裂.

3.3 细胞毒性与细胞成像

首先, 考察了探针分子DCM-CE的细胞毒性, 选取6组浓度为0、10、20、30、40、50 μM 的探针浓度进行测试, 通过MTT法得到加入不同浓度探针分子DCM-CE的细胞存活率, 其结果如图S7所示. 从图中可知, 加入不同浓度的探针分子DCM-CE的两种细胞的存活率都在82%以上, 说明探针分子DCM-CE的细胞毒性小, 适用于对活细胞内源性CaE的检测与成像.

其次, 以HeLa细胞来评价探针分子DCM-CE对内源性CaE的荧光成像. 如图6所示, 在单光子激发下, 随着与探针共培养的HeLa细胞的培养时间的延长, 红色荧光相应增强(图6(b, c)). 这是因为DCM-CE被细胞摄取后, 经细胞内CaE的催化作用, 酯键断裂, 释放出荧光团DCM, 其发出强烈的红色荧光. 为了进一步证明HeLa细胞内的红色荧光是由CaE的酶促作用引起的, 先用AEBSF (CaE的抑制剂)与HeLa细胞共培养30 min, 然后再将探针DCM-CE加入到HeLa细胞的培养液中继续培养60 min, 发现细胞内无明显的红色荧光出现

图6 单光子(上图, 荧光显微镜)和双光子(下图, 双光子激光共聚焦)荧光成像图. (a, e) 对照组; (b, f) 细胞与探针共培养30 min; (c, g) 细胞与探针共培养60 min; (d, h) 细胞先和100 μM AEBSF (CaE抑制剂)共培养30 min, 然后加入探针继续培养60 min. 单光子激发波长: 480 nm, 收集发射信号: ≥ 650 nm; 双光子激发波长: 800 nm, 收集发射信号: 650~750 nm; 插图为明场图(网络版彩图)

(图6(d)), 表明HeLa细胞内的荧光变化确实是由细胞内的CaE对探针分子的酶促反应引起的. 双光子激光共聚焦荧光显微镜下获得的荧光图(图6(f-h))和在单光子激发的结果相似. 因此, 上述结果表明, 探针分子DCM-CE可用于细胞内源性CaE的检测和成像.

4 结论

本研究成功制备了一种可对CaE灵敏和高选择性识别的红色比率型双光子荧光探针DCM-CE. CaE催化水解断裂探针分子的酯键, 导致酶促反应前后探针

的荧光光谱性能发生显著的改变, 由此实现对CaE的比率型荧光检测. 该探针具有较好的选择性、较低的检测下限以及较宽的pH响应范围. 此外, DCM-CE可

用于对细胞内源性CaE的双光子荧光成像. 研究结果可为设计其他生物分子的检测和成像提供一些有益的参考.

补充材料

本文的补充材料见网络版chemcn.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

参考文献

- 1 Satoh T, Hosokawa M. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1998, 38: 257–288
- 2 Redinbo MR, Potter PM. *Drug Discov Today*, 2005, 10: 313–325
- 3 Leinweber FJ. *Drug Metab Rev*, 1987, 18: 379–439
- 4 Xiao D, Shi D, Yang D, Barthel B, Koch TH, Yan B. *Biochem Pharm*, 2013, 85: 439–447
- 5 Quiroga AD, Li L, Trötzmüller M, Nelson R, Proctor SD, Köfeler H, Lehner R. *Hepatology*, 2012, 56: 2188–2198
- 6 Li P, Xiao H, Tang B. *Chin J Chem*, 2012, 30: 1992–1998
- 7 Chang CJ, Gunnlaugsson T, James TD. *Chem Soc Rev*, 2015, 44: 4176–4178
- 8 Li X, Gao X, Shi W, Ma H. *Chem Rev*, 2014, 114: 590–659
- 9 Guo S, Zheng F, Zeng F, Wu S. *Chin J Polym Sci*, 2016, 34: 830–837
- 10 Gao Y, Qu Y, Jiang T, Zhang H, He N, Li B, Wu J, Hua J. *J Mater Chem C*, 2014, 2: 6353–6361
- 11 Chen Y, Qiu T, Zhao W, Fan LJ. *Polym Chem*, 2015, 6: 1576–1583
- 12 Du F, Xu J, Zeng F, Wu S. *Acta Chim Sin*, 2016, 74: 241–250
- 13 Wang J, Wu Y, Sun L, Zeng F, Wu S. *Acta Chim Sin*, 2016, 74: 910–916
- 14 Du F, Min Y, Zeng F, Yu C, Wu S. *Small*, 2014, 10: 964–972
- 15 Zhang P, Li J, Li B, Xu J, Zeng F, Lv J, Wu S. *Chem Commun*, 2015, 51: 4414–4416
- 16 Yu C, Li X, Zeng F, Zheng F, Wu S. *Chem Commun*, 2013, 49: 403–405
- 17 Peng H, Tang H, Jiang J. *Sci China Chem*, 2016, 59: 783–793
- 18 Wu X, Shao A, Zhu S, Guo Z, Zhu W. *Sci China Chem*, 2016, 59: 62–69
- 19 Chen B, Nie H, Hu R, Qin A, Zhao Z, Tang BZ. *Sci China Chem*, 2016, 59: 699–706
- 20 Cao YT, Zhang H, Jiang T, Yang J, Li B, Hua JL. *Sci Chin Chim*, 2013, 43: 1206–1207
- 21 Zheng F, Zeng F, Yu C, Hou X, Wu S. *Chem Eur J*, 2013, 19: 936–942
- 22 Wang S, Fang Y. *Sci China Chem*, 2016, 59: 1–2
- 23 Zhang Y, Huang X, Liu W, Zhang G, Zhang D, Jiang X. *Sci China Chem*, 2016, 59: 106–113
- 24 Chen Z, Wang J, Miao H, Wang L, Wu S, Yang X. *Sci China Chem*, 2016, 59: 487–492
- 25 Hakamata W, Machida A, Oku T, Nishio T. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21: 3206–3209
- 26 Zhang Y, Chen W, Feng D, Shi W, Li X, Ma H. *Analyst*, 2012, 137: 716–721
- 27 Feng L, Liu ZM, Xu L, Lv X, Ning J, Hou J, Ge GB, Cui JN, Yang L. *Chem Commun*, 2014, 50: 14519–14522
- 28 Wang DD, Jin Q, Zou LW, Hou J, Lv X, Lei W, Cheng HL, Ge GB, Yang L. *Chem Commun*, 2016, 52: 3183–3186
- 29 Yuan L, Lin W, Zheng K, Zhu S. *Acc Chem Res*, 2013, 46: 1462–1473
- 30 Liu ZM, Feng L, Hou J, Lv X, Ning J, Ge GB, Wang KW, Cui JN, Yang L. *Sensor Actuat B-Chem*, 2014, 205: 151–157
- 31 Feng L, Liu ZM, Hou J, Lv X, Ning J, Ge GB, Cui JN, Yang L. *Biosens Bioelectron*, 2015, 65: 9–15
- 32 Liu ZM, Feng L, Ge GB, Lv X, Hou J, Cao YF, Cui JN, Yang L. *Biosens Bioelectron*, 2014, 57: 30–35
- 33 Wu Y, Huang S, Zeng F, Wang J, Yu C, Huang J, Xie H, Wu S. *Chem Commun*, 2015, 51: 12791–12794
- 34 Kim HM, Cho BR. *Chem Rev*, 2015, 115: 5014–5055
- 35 Zhou L, Zhang X, Wang Q, Lv Y, Mao G, Luo A, Wu Y, Wu Y, Zhang J, Tan W. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 9838–9841
- 36 Zhang P, Jiang XF, Nie X, Huang Y, Zeng F, Xia X, Wu S. *Biomaterials*, 2016, 80: 46–56
- 37 Yuan L, Lin W, Zheng K, He L, Huang W. *Chem Soc Rev*, 2013, 42: 622–661
- 38 Guo Z, Park S, Yoon J, Shin I. *Chem Soc Rev*, 2014, 43: 16–29

- 39 Park SJ, Lee HW, Kim HR, Kang C, Kim HM. *Chem Sci*, 2016, 7: 3703–3709
- 40 Jin Q, Feng L, Wang DD, Dai ZR, Wang P, Zou LW, Liu ZH, Wang JY, Yu Y, Ge GB, Cui JN, Yang L. *ACS Appl Mater Interf*, 2015, 7: 28474–28481
- 41 Schadendorf T, Hoppmann C, Rück-Braun K. *Tetrahedron Lett*, 2007, 48: 9044–9047

A ratiometric two-photon fluorescent probe for detecting carboxylesterase in living cells

Peisheng Zhang^{1,2†}, Yong Huang^{1†}, Fang Zeng¹, Xitao Xia¹, Shuizhu Wu^{1*}

¹ State Key Laboratory of Luminescent Materials & Devices, College of Material Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China

² Key Laboratory of Theoretical Organic Chemistry and Functional Molecule of Ministry of Education, Hunan Provincial Key Laboratory of Controllable Preparation and Functional Application of Fine Polymers, Hunan Province College Key Laboratory of QSAR/QSPR, Institute of Functional Materials, School of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411201, China

†These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author (email: shzhwu@scut.edu.cn)

Abstract: Abnormal regulation or deficiency of carboxylesterase (CaE) is directly linked to human diseases such as hepatic steatosis, hyperlipidemia, and cancer. To understand the physiological and pharmacological roles of CaE, it is crucial to develop a simple and rapid method for CaE detection in biological samples. In this work, we report a red-light two-photon fluorescent probe for highly selective and ratiometric detection of CaE based on intramolecular charge transfer. CaE-mediated hydrolysis can produce the deacetylated derivative of the probe, and the fluorescence spectra of the sensing system were significantly changed due to enzymatic reaction, thus realizing the ratiometric detection of CaE. This ratiometric probe system showed several advantages including better selectivity, lower detection limit and a wide pH range. Moreover, intracellular two-photon fluorescence imaging experiments demonstrated that the probe DCM-CE was able to facilitate visualization of endogenous CaE in living cells.

Keywords: red light, ratiometric, two-photon, carboxylesterase, fluorescence imaging

doi: [10.1360/N032017-00009](https://doi.org/10.1360/N032017-00009)