

基于模块化设计的香豆素-查尔酮探针 用于谷胱甘肽的可逆比率检测

王超, 曾令涛, 张文青, 曹辛慧, 代方方, 刘玉霞, 陈光

(陕西科技大学化学与化工学院, 西安 710021)

摘要 基于模块化设计策略, 以7-氨基香豆素为荧光母核, 2'-羟基查尔酮为谷胱甘肽(GSH)的反应中心, 并通过在查尔酮苯环5-位引入不同取代基(硝基、甲氧基)作为调控模块, 系统调控探针的光物理性质及其与GSH反应的动力学特性, 开发了一系列香豆素-查尔酮类可逆型比率荧光探针(探针1~3)。实验结果表明, 所有探针均在生理浓度(0~10 mmol/L)范围内对GSH有良好的比率荧光响应, 其解离常数(K_d)=4.61~8.25 mmol/L)适用于细胞内的GSH检测。其中, 探针1的硝基与酮羰基的协同吸电子效应使其不仅具有最高的灵敏度与最显著的比率信号变化, 对GSH的响应也最迅速, 约5 min即可达平衡, 反应速率常数为 $2.54 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。可逆实验结果证实探针1对GSH响应具有突出的可逆循环特性; 荧光成像研究验证了其对于活细胞内GSH比率成像的可行性。本研究通过理性的调控模块设计, 为活细胞GSH动态变化的荧光成像研究提供了性能优异的工具。

关键词 荧光探针; 香豆素; 查尔酮; 谷胱甘肽

中图分类号 O657.3; TQ617.3

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20260023

Coumarin-chalcone Probes with Modular Design for Reversible Ratiometric Detection of Glutathione

WANG Chao*, ZENG Lingtao, ZHANG Wenqing, CAO Xinhui,

DAI Fangfang, LIU Yuxia, CHEN Guang

(College of Chemistry and Chemical Engineering,

Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 710021, China)

Abstract Based on a modular design strategy, this study developed a series of coumarin-chalcone-based reversible ratiometric fluorescent probes (Probes 1~3), using 7-aminocoumarin as the fluorophore and 2'-hydroxychalcone as the glutathione (GSH) reaction center. Different substituents (nitro, methoxy) were introduced at the 5-position of the chalcone phenyl ring as modulating modules to systematically tune the photophysical properties and reaction kinetics of the probes towards GSH. The results demonstrated that all probes exhibited good ratiometric fluorescence responses within the physiological concentration range of GSH (0–10 mmol/L), with dissociation constants (K_d)=4.61–8.25 mmol/L) suitable for intracellular GSH detection. Among them, Probe 1, by virtue of the synergistic electron-withdrawing effect of its nitro group and ketone carbonyl, not only displayed the highest sensitivity and the most significant ratiometric signal change, but also responded to GSH most rapidly, reaching equilibrium in approximately 5 min with a reaction rate constant of $2.54 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Reversibility experiments confirmed that Probe 1 also possessed the most prominent reversible cycling characteristics. Fluorescence imaging studies demonstrated the feasibility of ratiometric fluorescent imaging of GSH within live cells. The rational modular design in this work

收稿日期: 2026-01-10. 网络首发日期: 2026-04-23.

联系人简介: 王超, 男, 博士, 副教授, 主要从事荧光标记与检测方面的研究. E-mail: wangchao@sust.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 22174090)和陕西省自然科学基金基础研究计划项目(批准号: 2024JC-YBMS-138)资助。

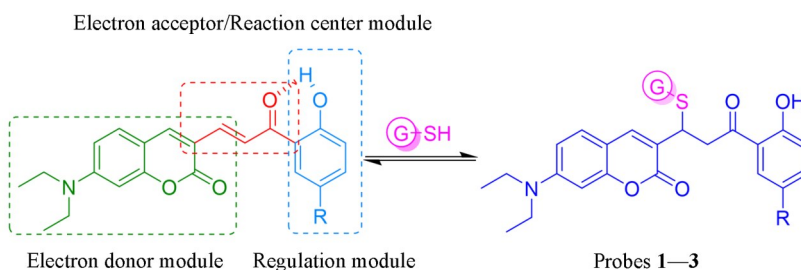
Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 22174090) and the Natural Science Basic Research Plan in Shaanxi Province, China (No. 2024JC-YBMS-138).

provides a high-performance tool for fluorescent imaging studies of dynamic GSH changes in living cells.

Keywords Fluorescent probe; Coumarin; Chalcone; Glutathione(GSH)

谷胱甘肽(GSH)是细胞内重要的非蛋白质硫醇,其在细胞内较高的浓度(1~10 mmol/L)对维持细胞氧化还原动态平衡至关重要^[1]. GSH水平异常会破坏这一平衡,进而与癌症、帕金森病等多种疾病的发生发展密切相关^[2,3]. 因此,实现对活细胞内GSH浓度的实时、原位与动态监测具有重要意义.

在诸多检测方法中,荧光探针技术因其高灵敏度、优良的时空分辨率及无损实时成像能力,已成为研究细胞内GSH的有力工具^[4-6]. 目前,常用的GSH识别单元有醛、硫醚、烯醚、丙烯酸酯、烯炔和卤素原子等^[7-11],但其对GSH的响应大多为不可逆过程,这极大地限制了荧光探针对于GSH动态、实时定量检测的应用. 相比之下,基于烯炔与GSH巯基发生的可逆迈克尔加成反应,为构建可逆型探针提供了理想策略. 该反应的反应活性、动力学及响应浓度范围,可通过在烯炔上引入不同吸电子能力的基团(如羧基、酯基、酰胺、酮羰基、氰基和硝基等)进行精确调控^[12-19]. 其中, α,β -不饱和酮(查尔酮)结构因具有强吸电子能力及可进一步引入电荷调控基团而备受关注^[20-25]. 当该结构与香豆素荧光团相连时,不仅能通过增强“推-拉”电子效应显著提高烯炔的反应活性,还能使探针的光谱发生红移,更适于生物成像. 受此启发,本研究设计合成了一系列基于香豆素-查尔酮骨架的可逆比率型荧光探针. 合成过程采用模块化设计理念(Scheme 1): (1) 电子供体模块(D): 以7-氨基香豆素为荧光母核,确保良好的光学性能; (2) 电子受体/反应中心模块(A): 以查尔酮的 α,β -不饱和酮为关键结构,实现与GSH的可逆迈克尔加成; (3) 调控模块: 通过在查尔酮苯环的2-位引入羟基,以利用其与羰基之间的激发态分子内质子转移(ESIPT)效应以增强荧光性能及对GSH的响应性能; 在查尔酮苯环5-位引入硝基或甲氧基等取代基,系统调控反应中心的电子效应与其与GSH的反应动力学.



Scheme 1 Molecular design of probes 1—3

结果表明,3个探针(查尔酮苯环5-位硝基取代的探针1、甲氧基取代的探针2及无取代的探针3)均表现出适用于检测细胞内GSH浓度范围的解离常数(K_d). 探针与GSH反应后,其共轭体系发生断裂,导致吸收与发射光谱蓝移,从而实现可逆的比率荧光检测. 其中,查尔酮苯环5-位硝基取代的探针1因硝基的强吸电子效应,展现出最快的响应速度与最显著的比率荧光信号变化. 本文为开发用于活细胞内GSH动态定量检测的高性能探针提供了参考.

1 实验部分

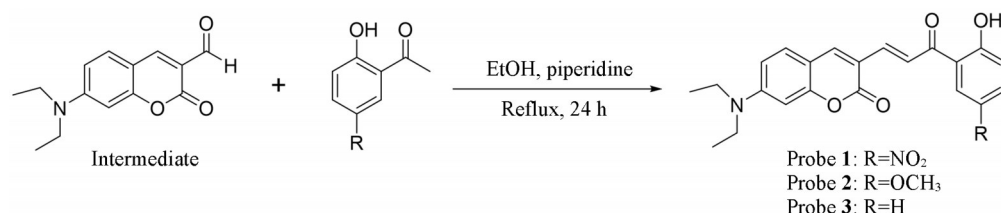
1.1 试剂与仪器

4-(二乙氨基)-2-羟基苯甲醛(纯度98%)、丙二酸二乙酯(纯度98%)、2-羟基-5-硝基苯乙酮(纯度98%)、2-羟基-5-甲氧基苯乙酮(纯度98%)和邻羟基苯乙酮(纯度98%),阿达玛斯贝塔(上海)化学试剂有限公司;谷胱甘肽(纯度98%)和N-乙基马来酰亚胺(纯度98%),安徽泽升科技有限公司;二氯甲烷和石油醚等合成、测试用溶剂均为市售分析纯.

ADVANCE III 600 MHz型核磁共振波谱仪(NMR),瑞士Bruker公司;Cary 60型紫外-可见(UV-Vis)光谱仪,安捷伦科技中国有限公司;Lumina型荧光分光光度计,赛默飞世尔科技中国有限责任公司;RE-52型系列旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂;LSM800激光共聚焦荧光显微镜,德国蔡司公司.

1.2 实验过程

探针 **1~3** 的合成路线如 Scheme 2 所示, 7-二乙氨基香豆素-3-醛(中间体)参照文献[26]方法制备.



Scheme 2 Synthetic route of probes **1—3**

1.2.1 探针 **1~3 的合成** 称取 3 份中间体 (500 mg, 2.04 mmol) 分别置于 100 mL 茄形烧瓶中, 平行设置 3 个反应, 向其中分别加入 2-羟基-5-硝基苯乙酮 (370 mg, 2.04 mmol)、2-羟基-5-甲氧基苯乙酮 (272 mg, 2.00 mmol) 及邻羟基苯乙酮 (332 mg, 2.00 mmol). 向各反应瓶中分别加入 8 mL 无水乙醇使固体溶解, 再分别滴加 3 滴哌啶作为催化剂, 于 65 °C 回流反应 24 h. 反应结束后, 将所得粗产物以二氯甲烷为洗脱剂, 经柱层析分离纯化, 分别得到橙红色粉末状目标产物探针 **1~3**.

探针 **1**: 260 mg, 产率 32%. ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3), δ : 13.81 (s, 1H), 8.89 (s, 1H), 8.31 (d, $J=8.82$ Hz, 1H), 8.23 (d, $J=14.88$ Hz, 1H), 7.95~7.72 (m, 2H), 7.33 (d, $J=8.76$ Hz, 1H), 7.05 (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 6.60 (d, $J=8.22$ Hz, 1H), 6.47 (s, 1H), 3.44 (dd, $J=13.62, 6.6$ Hz, 4H), 1.22 (t, $J=6.9$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ : 143.36, 130.75, 130.71, 126.54, 119.47, 119.34, 110.04, 97.15, 77.37, 76.95, 45.35, 12.64. HRMS, m/z : $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 431.1214; found: 431.1216.

探针 **2**: 230 mg, 产率 29%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ : 12.64 (s, 1H), 8.32 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.69 (d, $J=15.0$ Hz, 1H), 7.44 (d, $J=3.04$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J=8.92$ Hz, 1H), 7.11 (dd, $J=9.0, 3.0$ Hz, 1H), 6.94 (d, $J=9.04$ Hz, 1H), 6.61 (dd, $J=8.9, 2.4$ Hz, 1H), 6.49 (d, $J=2.32$ Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.45 (q, $J=7.16$ Hz, 4H), 1.24 (t, $J=7.08$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ : 194.12, 160.26, 158.07, 156.81, 152.25, 151.83, 147.07, 140.97, 130.33, 124.26, 121.30, 119.96, 119.18, 114.62, 112.79, 109.80, 109.07, 96.98, 77.37, 76.95, 56.20, 45.20, 12.60. HRMS, m/z : $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 416.1468; found: 416.1472.

探针 **3**: 150 mg, 产率 20%. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3), δ : 13.01 (s, 1H), 8.36 (d, $J=15.0$ Hz, 1H), 8.02 (d, $J=8.0$ Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.69 (d, $J=15.0$ Hz, 1H), 7.47 (t, $J=7.3$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J=8.9$ Hz, 1H), 6.99 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 6.97~6.89 (m, 1H), 6.61 (d, $J=8.9$ Hz, 1H), 6.50 (s, 1H), 3.45 (q, $J=7.1$ Hz, 4H), 1.24 (t, $J=7.0$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (151 MHz, CDCl_3), δ : 194.53, 163.63, 160.27, 156.81, 152.25, 147.17, 140.84, 136.24, 130.36, 121.39, 120.41, 118.96, 118.39, 114.69, 109.81, 109.09, 97.02, 77.37, 76.95, 45.23, 12.61. HRMS, m/z : $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 386.1363; found: 386.1367.

探针 **1~3** 的 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱图及其它信息见本文支持信息图 S1~图 S9.

1.2.2 溶液配制与光谱测试 分别以 DMSO 为溶剂配制探针 **1~3** 的储备液 (10 mmol/L), 并进一步用相应测试溶剂稀释为测试工作液 (10 $\mu\text{mol/L}$). 探针 **1~3** 对 GSH 响应的紫外-可见吸收光谱和荧光光谱测试使用 DMSO/HEPES (体积比 4:1) 混合溶剂和 HEPES 缓冲溶液 (100 mmol/L, pH=7.4). 探针 **1~3** 及 GSH 响应荧光光谱的激发波长为 410 nm, 激发/发射狭缝宽度为 5 nm/10 nm.

1.2.3 探针对 GSH 的选择性测试 为考察 3 种探针对 GSH 的选择性, 分别取半胱氨酸 (Cys)、同型半胱氨酸 (Hcy)、甲硫氨酸 (Met)、甘氨酸 (Gly)、丝氨酸 (Ser)、*N*-乙酰半胱氨酸 (NAC), 以及 Na_2S , Na_2SO_4 , Na_2SO_3 , NaNO_2 , NaClO , NaCl , KCl , ZnCl_2 , MgCl_2 , AlCl_3 , FeSO_4 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, H_2O_2 和 *t*-BuOOH 等可能的干扰物质, 以超纯水配制成 10 mmol/L 储备液, 测试时稀释至 100 $\mu\text{mol/L}$, 分别加入探针 **1~3** (10 $\mu\text{mol/L}$) 并进行荧光光谱测试.

1.2.4 探针对GSH的响应浓度和时间的测试 首先以DMSO/HEPES(体积比4:1)混合溶剂配制成GSH的储备液(50 mmol/L). 分别取探针**1~3**的储备液(10 mmol/L)、不同量的GSH的储备液(50 mmol/L)加入DMSO/HEPES混合溶剂中,使探针**1~3**的浓度为10 $\mu\text{mol/L}$, GSH浓度为0~40 mmol/L,分别反应2 h后进行紫外-可见吸收光谱和荧光光谱测定,并拟合蓝光通道和红光通道的荧光强度比率与GSH浓度的关系. 探针**1~3**(10 $\mu\text{mol/L}$)对GSH(20 mmol/L)的响应时间在DMSO/HEPES混合溶剂中测试,加入GSH后分别在不同时间点测试紫外-可见吸收光谱和荧光光谱,并拟合蓝光通道和红光通道的荧光强度比率与GSH响应时间的关系.

1.2.5 探针对GSH响应的DFT计算 采用Gaussian 09进行了密度泛函理论(DFT)计算. 在M06-2X/6-31G(d)水平上对反应物、过渡态和产物进行几何优化和频率分析. 采用SMD连续溶剂化模型模拟水溶液环境(溶剂 H_2O). 为简化计算,参考文献[17]方法使用甲硫醇(CH_3SH)作为GSH的模型化合物.

1.2.6 蛋白质环境对探针GSH响应行为的影响 在纯水溶液中配制探针**1~3**的工作液(终浓度为10 $\mu\text{mol/L}$),分别加入不同浓度的牛血清白蛋白(BSA, 0, 5, 10 mg/mL)和GSH(10 mmol/L),混合均匀后于室温孵育20 min. 设置对照组:仅加BSA(5 mg/mL),不加GSH. 分别测试上述测试溶液的荧光光谱,并统计随时间响应的荧光峰值强度变化.

1.2.7 探针对GSH响应的动态平衡测试 向探针溶液(10 $\mu\text{mol/L}$)中加入GSH溶液至终浓度为2 mmol/L,测试不同时间的紫外-可见吸收光谱和荧光光谱,待吸收或荧光强度达到平衡时,再次加入GSH溶液至终浓度为5和10 mmol/L,每次加入后计时测试.

NEM滴定实验:在探针**1~3**(10 $\mu\text{mol/L}$)与10 mmol/L GSH反应达到平衡后,分别加入不同浓度的NEM(0, 2, 4, 6, 8和10 mmol/L),继续反应20 min后测量荧光光谱并计算荧光强度比率(I_{565}/I_{466})变化.

1.2.8 探针对GSH响应的可逆性测试 探针**1~3**对GSH响应的可逆性通过加入巯基清除剂N-乙基马来酰亚胺(NEM)来验证. 向探针溶液(10 $\mu\text{mol/L}$)中加入GSH(终浓度2 mmol/L),计时测试紫外-可见吸收光谱和荧光光谱,待吸收或荧光强度达到平衡时再次加入NEM(终浓度2 mmol/L)并计时测试直至吸收或荧光强度达平衡,重复以上步骤获得2次循环的结果.

1.2.9 细胞荧光成像 将HeLa细胞用含青霉素-链霉素(1%)及胎牛血清(10%)的DMEM培养基培养,接种于共聚焦成像皿中,置于37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养24 h. 弃去培养基,分别用20 mmol/L的GSH预孵育细胞60 min和20 $\mu\text{mol/L}$ 的NEM预孵育30 min后,再加入探针(10 $\mu\text{mol/L}$)孵育30 min. 将细胞用PBS缓冲液洗涤后用共聚焦显微镜成像,蓝色通道(420~520 nm)用405 nm波长光激发,绿色通道(520~700 nm)选用488 nm波长光激发,激发电压为720 V.

2 结果与讨论

2.1 探针的光谱性质及其对GSH的浓度与时间依赖性荧光响应

测试了探针**1~3**在不同溶剂中的紫外-可见吸收光谱和荧光光谱(图S10,见本文支持信息),可见探针**1~3**均在450~500 nm波长范围内有明显的吸收峰. 探针**1**的荧光峰集中在约630 nm处,探针**2**和**3**的荧光峰则集中在550~600 nm处. 为评估探针**1~3**对GSH的定量检测性能,考察了其在缓冲溶液中与不同浓度GSH(0~40 mmol/L)反应后的紫外-可见吸收光谱和荧光光谱变化. 如图1(A)~(F)所示,所有探针均表现出明显的比率型响应,随着GSH浓度增加,其在长波长(约565 nm)处的荧光发射强度逐渐降低,而在短波长(约466 nm)处的荧光发射强度则同步增强,此变化可归因于GSH的巯基与查尔酮烯烃结构发生迈克尔加成反应,导致原有的 π -共轭体系被破坏,进而引起光谱的蓝移. 相应的吸收光谱也呈现一致趋势,表现为长波长吸收带(约488 nm)逐渐减弱,而短波长吸收带(约395 nm)逐渐增强(图S11~S12,见本文支持信息),进一步印证了上述共轭结构破坏的机制.

通过对浓度-响应曲线[图1(G)和(H)]的拟合分析发现,3种探针的吸收强度和荧光比率值变化与GSH浓度在0~40 mmol/L范围内均呈现良好的线性关系(图S13,见本文支持信息),表明其可用于GSH的定量分析. 进一步计算得到探针**1~3**与GSH反应的解离常数(K_d)分别为5.41, 8.25和4.61 mmol/L,

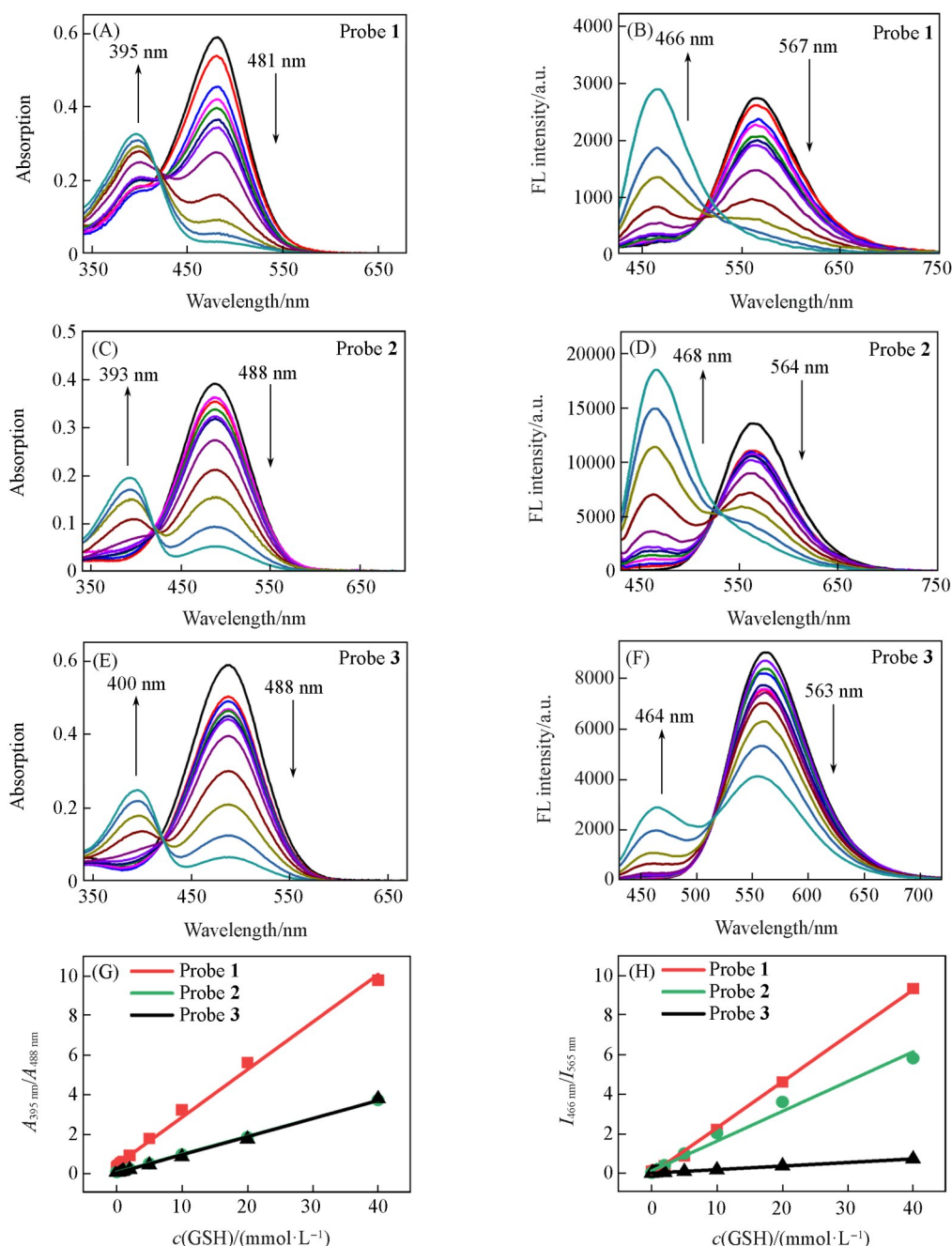


Fig. 1 Fluorescence spectra and ratio changes of probes 1–3 responding to different concentrations of GSH

这些数值均位于细胞内 GSH 生理浓度范围 (1~10 mmol/L) 内^[27], 表明三者均适用于胞内 GSH 的检测。值得注意的是, 在相同条件下, 探针 1 的吸收强度和荧光比率值变化均最为显著, 表明其对 GSH 浓度波动具有更高的检测灵敏度, 因而在监测胞内 GSH 动态波动方面展现出优势。

进一步研究了探针对 GSH 响应的时间依赖性动力学过程。实时荧光光谱监测结果(图 2)显示, 探针 1~3 在加入 20 mmol/L GSH 的条件下, 其短波长处(约 466 nm)的荧光均随反应时间延长而增强, 长波长处(约 565 nm)的荧光则相应减弱。其相应长波长吸收带(约 488 nm)减弱, 短波长吸收带(约 395 nm)增强; 通过对吸收强度和荧光强度比率值随时间变化的分析(图 S14~S15, 见本文支持信息)发现, 探针 1 的响应最为迅速, 约 5 min 即达到反应平衡, 而探针 2 和探针 3 则需要 60 min 以上。为定量评估取代基对反应动力学的影响, 在伪一级反应条件下(GSH 浓度远大于探针浓度), 通过拟合计算得到探针 1~3 与 GSH 反应的二级速率常数(k)分别为 2.54, 8.9×10^{-2} 和 $6.4 \times 10^{-2} \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (图 S16, 见本文支持信息), 与文献[28,29]报道的性能优异的比率型 GSH 可逆荧光探针的响应速度相当(表 S1, 见本

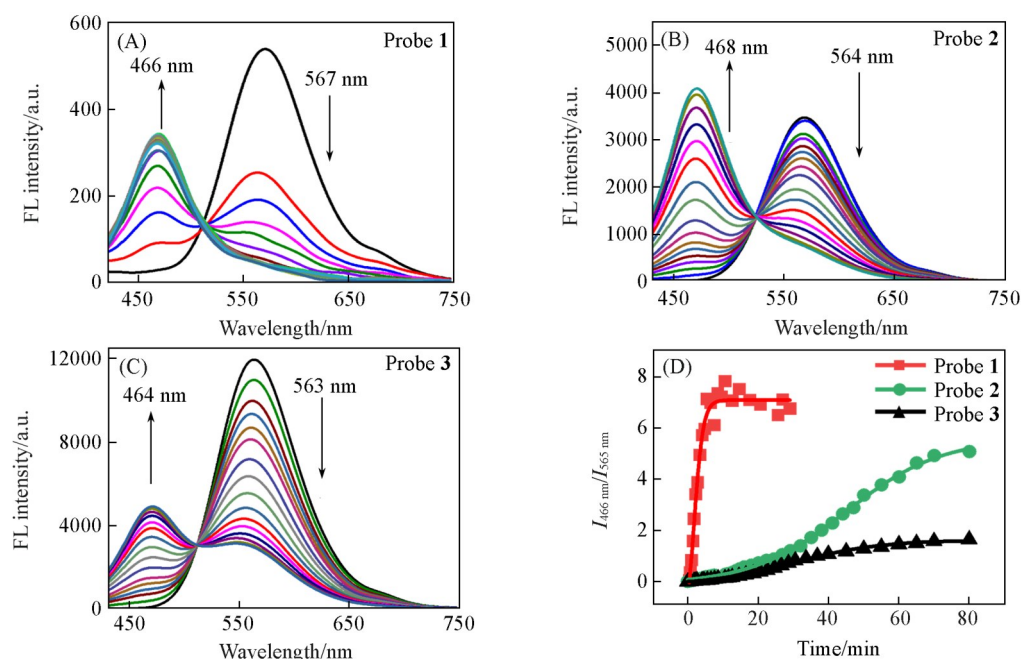


Fig. 2 Fluorescence spectra and ratio changes of probe 1—3 responding to 20 mmol/L GSH

文支持信息)。进一步采用密度泛函理论(DFT)对反应路径进行了模拟计算,以揭示取代基效应机制(计算数据见表S2,见本文支持信息)。如图S17(见本文支持信息)所示,参考文献[17]方法,用MeSH代替GSH计算了探针1~3与其反应的活化自由能($\Delta G^\ddagger$),探针1(9.2 kJ/mol)远低于探针2和3的31.38, 26.8 kJ/mol,与实验测得的速率常数顺序一致。理论计算与实验数据相互印证,证实了强吸电子的硝基可通过共轭和诱导效应有效分散过渡态的负电荷,从而显著降低反应能垒,加快反应速率。该结果表明,探针1具备优异的响应动力学特性,有望实现对细胞内GSH变化的快速捕捉与检测。

相比之下,探针与GSH的反应自由能(ΔG_r)的计算值差异较小,探针1为-28.45 kJ/mol,探针2和3分别为-19.2和-23.0 kJ/mol,最大差值9.2 kJ/mol,远小于活化自由能的差异(22.18 kJ/mol),说明取代基变化对探针反应过程的热力学影响较小,与实验测得的解离常数 K_d 值均在同一数量级的结论相符。

2.2 蛋白质环境对探针GSH响应行为的影响

探针在纯水相中的荧光信号弱且不稳定,单独加入GSH无法获得可靠响应,因此前文GSH响应实验在DMSO/HEPES混合溶剂中进行。但该体系无法直接模拟细胞内水相环境,使探针在生理条件下的实际应用可能存在局限性。鉴于此,进一步考察了蛋白质环境对探针传感性能的影响。考虑到活细胞内富含蛋白质,可能通过非共价相互作用影响探针行为,因此在纯水相体系中引入牛血清白蛋白(BSA)模拟细胞内蛋白质环境。如图S18(见本文支持信息)所示,纯水相中单独加入过量GSH(10 mmol/L)对探针1(10 μ mol/L)荧光信号的影响微弱。加入BSA(5 mg/mL)后,相同GSH浓度诱导的荧光响应显著增强,响应速度明显加快。当BSA浓度提高至10 mg/mL时,响应速度及荧光强度进一步提升。无GSH存在时,BSA本身不引起探针荧光变化,表明BSA通过改善探针的水相分散性间接促进其与GSH反应,而非直接产生信号。以上结果表明,蛋白质可通过与疏水性探针的非共价相互作用,有效提高其水相分散性,从而促进其与GSH反应。因此,探针在生理条件下的实际应用仍具有合理性。

2.3 探针1~3对GSH响应的选择性

为实现探针在复杂生物体系中对GSH的特异性检测,考察了探针1~3在多种潜在干扰物质存在下的荧光响应行为。如图S19(见本文支持信息)所示,当探针分别与各种离子、氨基酸及其它生物活性物质孵育时,其荧光光谱变化微弱。加入10 mmol/L GSH后,方可观察到显著的特征性比率响应:466 nm附近的荧光强度明显增强,同时565 nm附近的荧光强度则相应减弱。值得注意的是,高浓度半胱氨酸(Cys)虽可引起一定程度的荧光变化,但其在胞内的实际浓度远低于GSH,故由此产生的潜在干扰在生理环境下可忽略不计。为更直观地量化该选择性,以466与565 nm处的荧光强度比值(I_{466}/I_{565})绘制柱

状图(图S19). 结果显示, 仅在GSH存在时, 3种探针的荧光比率值均出现50~100倍的显著提升, 而其它干扰物质所引起的比值变化可忽略不计. 这表明探针1~3均能对生理浓度的GSH保持高选择性.

2.4 探针1~3对GSH响应的可逆性

为进一步探究探针与GSH反应的动态过程, 考察了探针1在超过量GSH(2, 5, 10 mmol/L)作用下的光谱变化. 如图3所示, 随着GSH浓度增加及反应时间延长, 可观察到479 nm处的吸收峰与567 nm处的荧光峰强度逐渐降低, 而399 nm处的吸收峰与469 nm处的荧光峰强度则同步增强. 每次加入GSH后, 吸收与荧光信号均趋于一个新的平衡状态, 表明该反应具有典型的可逆响应特征.

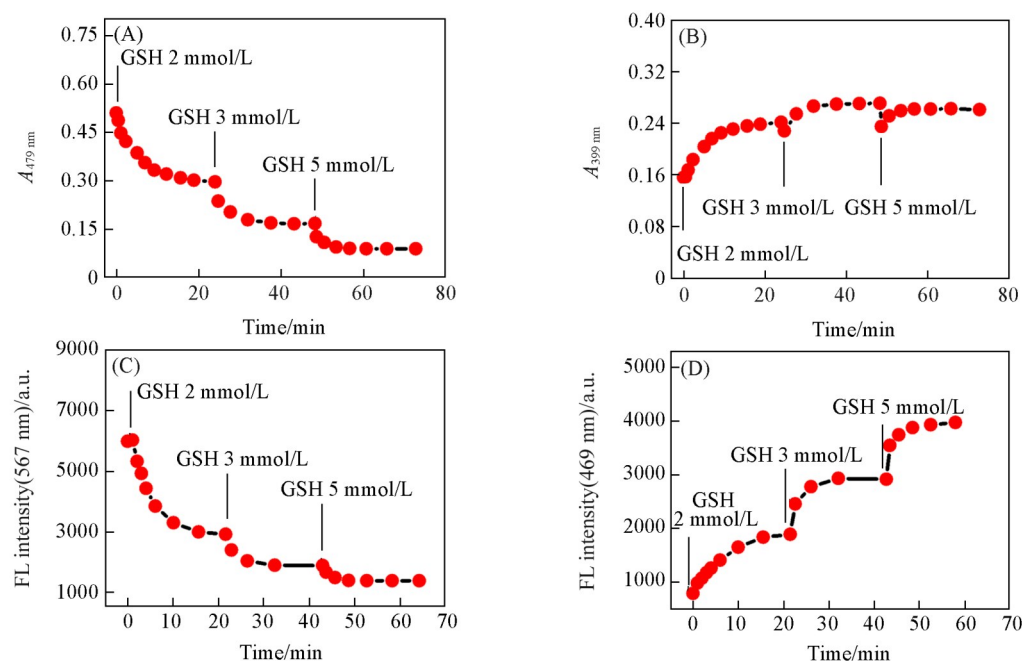


Fig. 3 Changes in the absorption and fluorescence spectra of probe 1 in response to GSH

为验证探针1对GSH响应的可逆性, 在探针1~3与GSH的反应过程加入GSH清除剂*N*-乙基马来酰亚胺(NEM), 测定其紫外-可见吸收光谱和荧光光谱的变化(图S20~S21, 见本文支持信息). 吸收光谱结果显示, 向探针1中加入GSH(2 mmol/L)并反应平衡后, 其在482 nm处的吸收强度降低, 而399 nm处吸收强度升高; 在加入等量的NEM(2 mmol/L)后, 两处吸收信号均可逆地恢复至初始状态. 再依次加入GSH和NEM后, 上述变化可重复出现, 表明探针1对GSH的响应具备良好的可逆性, 与一些优异的可逆型GSH探针性能相当^[12,23].

利用荧光光谱研究了探针1~3对GSH响应的可逆平衡过程. 由图4可见, 随着GSH(2 mmol/L)的加入, 3种探针在565 nm处的荧光强度逐渐下降, 而466 nm处的荧光强度则相应上升. 待反应平衡后, 加入等量的NEM(2 mmol/L)以清除体系中的GSH, 此时565 nm处荧光逐渐恢复, 466 nm处荧光相应减弱. 该现象说明, 在NEM清除GSH后, 反应平衡向逆方向移动, 促使探针恢复其原始共轭结构; 而再次分别加入GSH(2 mmol/L)和NEM(2 mmol/L), 565 nm处的荧光强度会发生反复的降低与恢复, 而466 nm处荧光也同样是增强又减弱.

为进一步验证探针1对GSH响应的定量可逆性, 进行了NEM滴定实验. 如图S21所示, 在探针1~3(10 $\mu\text{mol/L}$)与10 mmol/L GSH反应达到平衡后, 分别加入不同浓度的NEM(0, 2, 4, 6, 8和10 mmol/L), 继续反应20 min后测定其荧光比率(I_{466}/I_{565})变化. 结果表明, 随着NEM浓度增加, 3种探针的荧光比率均呈剂量依赖性恢复. 当NEM浓度与GSH等当量(10 mmol/L)时, 比率值基本恢复至初始状态. 其中, 探针1的荧光变化仍最显著. 该结果进一步证实探针对GSH的响应是定量可逆的.

综上, 光谱研究证实3个探针在与GSH反应时均表现出良好的可逆性, 其中, 探针1的可逆反应速率更快, 可逆循环过程中荧光恢复更加充分, 表明探针1具备对细胞内GSH含量进行动态、定量检测的潜力, 为其在细胞内GSH荧光检测与成像的应用奠定了基础.

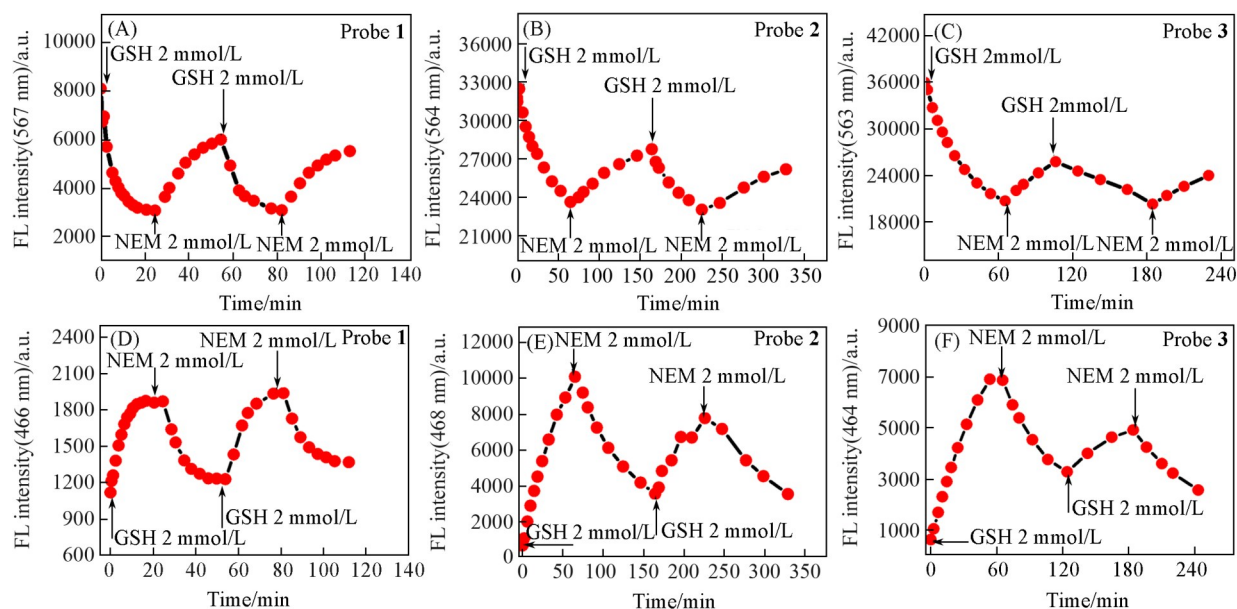


Fig. 4 Fluorescence-time changes of probes 1–3 in the reversible response process of GSH

2.5 探针对细胞内 GSH 的比率荧光成像

为探究探针 1~3 在细胞内对 GSH 水平的荧光响应能力,进行了染色成像实验. 每种探针均设置 3 组实验,分别为空白对照组、外源性 GSH (20 mmol/L) 处理组及 NEM (50 μ mol/L) 处理组,并分别在 405 与 488 nm 激发波长下采集各组细胞的荧光图像,并进一步得到绿色通道/蓝色通道的比率荧光图. 图 5(A) 为探针 1 的荧光成像图,图 S22 (见本文支持信息) 为探针 2 和 3 的荧光成像图. 与空白组相比, GSH 处理组在蓝色通道的荧光信号显著增强,而在绿色通道则明显减弱;相反, NEM 处理组在蓝色通道的荧光强度降低,在绿色通道则呈现增强趋势,该结果与 3 种探针本身的光谱性质高度吻合. 同时,探针 1 的 3 组成像的比率荧光图具有最显著的差异,说明探针 1 在活细胞内仍最灵敏.

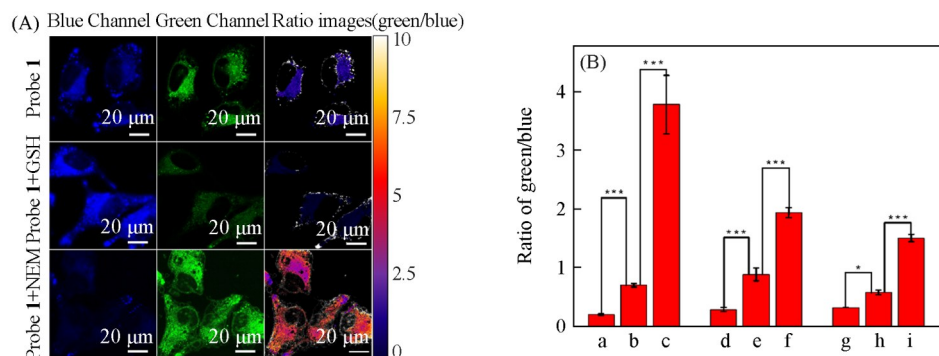


Fig. 5 Ratiometric imaging of probe 1 to intracellular GSH (A) and ratio values analysis results of probes 1–3 (B)

Error bars represent standard deviation ($n=20$). Significance was determined using the T test (* $P<0.05$; *** $P<0.001$).

(B) a. probe 1+GSH; b. probe 1; c. probe 1+NEM; d. probe 2+GSH; e. probe 2; f. probe 2+NEM; g. probe 3+GSH; h. probe 3; i. probe 3+NEM.

为进一步评价探针在活细胞中对 GSH 的响应性能,对成像结果进行了定量统计分析. 如图 5(B) 所示,每组随机选取 20 个细胞进行 ROI 分析,计算双通道荧光比率值. 经 GSH 或 NEM 处理后,3 种探针的荧光比率均呈现显著性差异,其中探针 1 的比率变化幅度最大. 该结果证实探针 1 对细胞内 GSH 水平的响应最为显著,与其在溶液体系中的优异性能一致. 以上结果表明,该类探针可用于活细胞内 GSH 浓度动态变化的比率荧光成像.

3 结 论

基于模块化设计策略构建了基于香豆素-查尔酮骨架的可逆型比率荧光探针(探针 1~3),用于谷胱

甘肽(GSH)的特异性检测与动态监测. 通过引入不同电子效应的取代基(硝基、甲氧基等), 系统调控了探针的光物理性质及其与GSH反应的动力学特性. 研究表明, 所有探针均在GSH生理浓度范围(0~10 mmol/L)内对其浓度变化产生比率型荧光响应, 其解离常数($K_d=4.61\sim8.25$ mmol/L)适用于细胞内GSH的检测. 其中, 探针**1**因硝基与酮羰基的协同吸电子效应, 使其不仅具有最高的灵敏度和最显著的荧光比率信号变化, 更在反应动力学上表现突出, 仅需约5 min即达到平衡, 反应速率为 $2.54\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, 超过探针**2**和**3**(8.9×10^{-2} 和 $6.4\times10^{-2}\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$). 密度泛函理论(DFT)计算结果进一步揭示, 硝基通过稳定迈克尔加成反应的过渡态, 显著降低了活化自由能($\Delta G^\ddagger=9.2\text{ kJ/mol}$), 而对反应自由能(ΔG_r)的影响较小, 阐明了取代基主要影响动力学而非热力学的机理. 探针**1**与GSH的迈克尔加成反应具有快速的响应性和良好的可逆性, 能在多次GSH添加-清除循环中保持稳定的荧光响应. 探针可应用于活细胞内GSH浓度变化的比率荧光成像. 本研究为活细胞GSH动态变化的荧光成像研究提供了性能优异的工具.

支持信息见 <http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/20260023>.

参 考 文 献

- [1] Forman H. J., Zhang H., Rinna A., *Mol. Aspects Med.*, **2009**, 30(1/2), 1—12
- [2] Johnson W. M., Wilson-Delfosse A. L., Mieyal J. J., *Nutrients*, **2012**, 4(10), 1399—1440
- [3] Bansal A., Simon M. C., *J. Cell Biol.*, **2018**, 217(7), 2291—2298
- [4] Chen X. Q., Zhou Y., Peng X. J., Yoon J., *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39(6), 2120—2135
- [5] Wang L. L., Mai Y. Z., Zheng M. H., Yan G. H., Jin J. Y., *Dev. Cell*, **2024**, 59(4), 517—528, e3
- [6] Bi S., Wen X., Sun G., Zeng S., *Nano Today*, **2023**, 53, 102027
- [7] Du Y. T., Yuan J., Deng P. Y., *Chinese J. Inorg. Chem.*, **2025**, 41(7), 1331—1337(杜宇婷, 袁静, 邓佩瑶. 无机化学学报, **2025**, 41(7), 1331—1337)
- [8] Liu Z., Zhou X., Miao Y., Hu Y., Kwon N., Yoon J., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, 56(21), 5812—5816
- [9] Sun K., Liu C., Cao Y., Zhu J., Li J., Huang Q., *Anal. Chim. Acta*, **2024**, 1304, 342552
- [10] Wang J., Yin C., Huo F., *Analyst*, **2025**, 150(2), 220—239
- [11] Dang Y. C., Feng Y. Z., Chen D. G., *Prog. Chem.*, **2021**, 33(5), 868—882(党耶城, 冯杨振, 陈杜刚. 化学进展, **2021**, 33(5), 868—882)
- [12] Jiang X., Chen J., Bajic A., Zhang C., Song X., Carroll S. L., Cai Z. L., Tang M., Xue M., Cheng N., Schaaf C. P., Li F., MacKenzie K. R., Ferreón A. C. M., Xia F., Wang M. C., Maletić-Savatić M., Wang J., *Nat. Commun.*, **2017**, 8, 16087
- [13] Yan H., Huo F., Yue Y., Chao J., Yin C., *J. Am. Chem. Soc.*, **2021**, 143(1), 318—325
- [14] Li X., Liu C., Gao N., Sheng W., Zhu B., *Chinese Chem. Lett.*, **2022**, 33(5), 2527—2531
- [15] Liu C., Rong X., Li X., Gao N., Qu L., Peng Y., Shi J., Yu M., Sheng W., Zhu B., *Sensor Actuat. B-Chem.*, **2023**, 389, 133841
- [16] Han S., Wang H., Li H., Li K., Wang J., Song X., *Anal. Chem.*, **2023**, 95(20), 8002—8010
- [17] Tian M., Liu X. Y., He H., Ma X. Z., Liang C., Liu Y., Jiang F. L., *Anal. Chem.*, **2020**, 92(14), 10068—10075
- [18] Neng Y., Ma S., Long S., Guo S., Zhang N., Chen G., *Dyes Pigments*, **2024**, 224, 112055
- [19] Liu H., Wang S., Gao H., Shen Z., *Eur. J. Org. Chem.*, **2020**, 2020(35), 5647—5663
- [20] Qu H. R., Zhang Z. Y., Wang N., Sun Q., Liu S. S., Zhang W. B., Qian J. H., *Chinese Chem. Lett.*, **2015**, 26(10), 1249—1254
- [21] Kim G. J., Lee K., Kwon H., Kim H. J., *Org. Lett.*, **2011**, 13(11), 2799—2801
- [22] Chen J., Jiang X., Carroll S. L., Huang J., Wang J., *Org. Lett.*, **2015**, 17(24), 5978—5981
- [23] Jiang X., Yu Y., Chen J., Zhao M., Chen H., Song X., Matzuk A. J., Carroll S. L., Tan X., Sizovs A., Cheng N., Wang M. C., Wang J., *ACS Chem. Biol.*, **2015**, 10(3), 864—874
- [24] Xing M., Wang K., Wu X., Ma S., Cao D., Guan R., Liu Z., *Chem. Commun.*, **2019**, 55(99), 14980—14983
- [25] Sun Y., Shan Y., Sun N., Li Z., Wu X., Guan R., Cao D., Zhao S., Zhao X., *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **2018**, 205, 514—519
- [26] Shan Y., Sun Y., Sun N., Guan R., Cao D., Wang K., Wu Q., Xu Y., *Inorg. Chem. Commun.*, **2015**, 59, 68—70
- [27] Umezawa K., Yoshida M., Kamiya M., Yamasoba T., Urano Y., *Nat. Chem.*, **2017**, 9(3), 279—286
- [28] Jeong E. M., Yoon J. H., Lim J., Shin J. W., Cho A. Y., Heo J., Lee K. B., Lee J. H., Lee W. J., Kim H. J., Son Y. H., Lee S. J., Cho S. Y., Shin D. M., Choi K., Kim I. G., *Stem Cell Report.*, **2018**, 10(2), 600—614
- [29] Tian M., Yang M., Liu Y., Jiang F. L., *ACS Applied Bio. Materials*, **2019**, 2(10), 4503—4514

(Ed.: F, K)