# 检测乙酰胆碱酯酶的双光子荧光探针的设计、合成及生物学评价

范好群,李力\*(浙江医院药剂科,杭州 310013)

摘要:目的 设计并合成用于检测乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)的双光子荧光探针,并考察探针对 AChE 的成 像检测性能。方法 经酯化、取代等多步有机反应合成探针,并通过 <sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR 和 ESI-MS 确认结构。考察探针 与 AChE 发生响应后的荧光信噪比、灵敏度、特异性、酶动力学和双关子吸收截面积数值等指标;研究探针可否用于 AChE 抑制剂的体外筛选;利用单-双光子成像试验考察探针在细胞和组织水平上对 AChE 活力变化的检测能力。结果 通过 <sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR 和 ESI-MS 确认了产物的结构。体外试验表明探针与 AChE 响应后的荧光信噪比为 15 倍,检测限达到 0.23 U·mL<sup>-1</sup>,并具有很强的特异性和优良的酶亲合能力,在波长 820 nm 有最优的双光子吸收;探针可用于 AChE 抑制剂的 体外筛选;探针通过单-双光子成像技术可对细胞和组织水平上的 AChE 活力变化进行成像检测,并且组织成像检测深度可 达 110 μm。结论 本研究成功开发了可用于 AChE 检测的双光子荧光探针,有潜力成为可用于活体中检测 AChE 活力的 双光子成像试剂。

关键词: 乙酰胆碱酯酶; 有机荧光探针; 细胞和组织成像; 双光子成像

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)11-1404-08

**DOI:** 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.11.003

引用本文: 范好群, 李力. 检测乙酰胆碱酯酶的双光子荧光探针的设计、合成及生物学评价[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(11): 1404-1411.

# Design, Synthesis and Biological Evaluation of the Two-photon Fluorescence Probe for Acetylcholinesterase Detection

FAN Haoqun, LI Li<sup>\*</sup>(Department of Pharmacy, Zhejiang Hospital, Hangzhou 310013, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To design and synthesize a two-photon fluorescence probe for acetylcholinesterase(AchE) detection, and evaluate its imaging detection performance toward AChE. **METHODS** The probe was synthesized by esterification and substitution reaction and the structures of synthetic compounds were fully characterized by <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR and ESI-MS. The signal-to-noise ratio, sensitivity, specificity, enzyme kinetics and double correlation absorption cross-sectional area of fluorescence response of probe toward AChE were evaluated. Whether the probe could be used to screen AChE inhibitors *in vitro* was studied. One and two photon imaging experiments were conducted to investigate the ability of probes for detecting changes of AChE activity in cell and tissue levels. **RESULTS** The structures of synthetic products were confirmed by <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR and ESI-MS. The fluorescence signal-to-noise ratio of the probe toward AChE was 15 times and the detection limit was 0.23 U·mL<sup>-1</sup>. The probe also exhibited strong specificity and excellent binding constant for AChE detection, and could be applied for screening AChE inhibitors. Meanwhile, the reaction solution of probe with AChE showed the optimal two-photon absorption was 820 nm. Moreover, the probe could be successfully used for imaging the changes of AChE activity in living cells and tissues, and the detection has been successfully developed, and this probe has the potential to become a two-photon imaging reagent for detecting AChE activity *in vivo*.

KEYWORDS: acetylcholinesterase; organic fluorescent probe; cell and tissue imaging; two-photon imaging

乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE) 是中枢神经系统和外周神经系统传导中的一种关 键酶,能将乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)裂解生 成胆碱和乙酸,调节神经突触间隙 ACh 水平的平 衡<sup>[1]</sup>。研究表明 AChE 的活性异常会导致阿尔茨 海默病<sup>[2]</sup>、重症肌无力<sup>[3]</sup>和外周血管疾病<sup>[4]</sup>等疾病 的发生,与细胞发育和分化<sup>[5]</sup>、细胞凋亡<sup>[6]</sup>等生理 功能也有着密切联系。因此,开发精准高效的用 于检测 AChE 活力的方法, 有助于深入了解 AChE 的生理功能以及阐释其与疾病发病机制的关系, 同时对药物的研发也有重要意义。

常用于测定 AChE 活力的比色法<sup>[7]</sup>、化学发 光法<sup>[8]</sup>和电化学法<sup>[9]</sup>有易受较多因素干扰和不能 用于实时检测生物体内 AChE 的活性变化等缺 点<sup>[10]</sup>,而荧光探针分析法因其优良的灵敏度、极 佳的生物相容性和高的成像分辨率,正成为研究

\*通信作者:李力,男,博士,副主任药师 E-mail: zjyylili@163.com

中国现代应用药学 2022 年 6 月第 39 卷第 11 期

**基金项目:** "重大新药创制"国家科技重大专项(2013ZX09303005) 作者简介:范好群,女,硕士,药师 E-mail:fhqzjyy@sina.com

生物体内 AChE 活性变化和生理功能的一种新型 分析方法<sup>[11-13]</sup>。基于双光子荧光成像技术研发的 双光子荧光探针相较于普通的单光子荧光探针, 具有抗生物体自发荧光干扰强、组织穿透性深、 耐光漂白能力强和空间分辨率高等优点,已成为 分析成像检测领域的研究热点<sup>[14-15]</sup>。Wang 等<sup>[16]</sup> 以新斯的明为灵感,设计并合成了激活式双光子 荧光探针。尽管该探针对 AChE 具有很高的响应 特异性,也能适用于活体内 AChE 活性变化的成 像检测,但依然存在着响应信噪比低和灵敏度不 够好等缺点。

因此,本研究拟开发一种具有更优荧光响应 性能的用于检测 AChE 的双光子荧光探针。以基 于分子内电荷转移效应(intramolecular charge transfer, ICT)响应的,且具有优异双光子荧光性 质的羟基-萘二甲酰亚胺染料为荧光团,通过醚键 的方式将二甲氨基甲酸酯修饰的苄基 AChE 特异 性响应基团与染料进行偶联,构建基于 ICT 效应 响应的双光子荧光探针,具体设计和响应机制见 图 1A。通过考察探针对 AChE 的荧光信噪比、灵 敏度、特异性、酶动力学和双光子吸收截面积数 值等指标,并在细胞和组织水平上进一步探究探 针的检测能力,以期为 AChE 的生理学研究和相 关药物的研发提供一种新型可靠的工具。

- 1 材料与方法
- 1.1 仪器与药品

DRX 400 核磁共振仪(德国 Bruker 公司);LCQ Advantage MAX 质谱仪(美国 Thermo Finnigan 公 司); UV-2450 紫外可见光分光光度计(日本岛津公

司); FS5 荧光分光光度计(英国爱丁堡公司); Ti-E+A1MP 双光子共聚焦显微镜(日本尼康公 司); TGL-20M 离心机(长沙平凡仪器仪表有限公 司)。佛波醇-12-十四酸酯-13-乙酸酯(PMA, 货号: P8139)、羧酸酯酶(货号: E3019)、丁酰胆碱酯酶 (BuChE, 货号: C7512)、AChE(货号: C3389)和 AChE 商业化检测试剂盒(货号: MAK119)均购自 美国 Sigma 公司; PC12 细胞、HeLa 细胞、MCF-7 细胞(湘雅医学院细胞库); BALB/C-NU 裸鼠, ♂, 10只,体质量约为25g[湖南斯莱克景达实验动物 有限公司, 生产许可证号: SCXK(湘)2019-0004]; 对羟基苯甲醛、二甲氨基甲酰氯、4-溴-1.8-萘二甲 酸酐、三溴化磷、碘化氢(北京百灵威科技有限公 司, 批号分别为 L760N29, 20200602, BE17123, 20200423, P1055697); 新斯的明、多奈哌齐、加 兰他敏(上海阿拉丁生化试剂公司,批号分别为 2131107, 2107153, TB23067); 硼氢化钠、无水 碳酸钾、碘化钠(国药集团);其余试剂为分析纯。 1.2 探针的制备与表征

探针的合成路线参考图 1B。

化合物 1 的合成: 向单口烧瓶中依次加入 4-羟基苯甲醛(1.22 g, 10 mmol), 三乙胺(3.1 g, 30 mmol)和无水二氯甲烷(50 mL),加毕后将反应 瓶置于冰浴中冷却。用注射器吸取二甲氨基甲酰 氯(3.7 mL, 30 mmol),并将其缓慢滴加至反应瓶 中。加完后维持冰浴条件反应 0.5 h,然后恢复至 室温搅拌反应过夜。反应停止后,依次使用饱和 碳酸氢钠溶液和食盐水洗涤反应液,无水硫酸钠



图 1 探针的设计、响应机制(A)和探针的合成路线图(B) Fig. 1 Design strategy and response mechanism of probe(A) and synthetic route of probe(B)

 $\cdot 1405 \cdot$ 

中国现代应用药学 2022 年 6 月第 39 卷第 11 期

干燥过夜。过滤,旋蒸溶剂,残留物用硅胶柱层 析(洗脱剂为乙酸乙酯:石油醚=1:4)分离提 纯,得到固体产物 1.4g,产率 73%。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) $\delta$ : 9.98(1H, s, CHO), 7.90(2H, d, *J*=8.0 Hz, Ar-H), 7.31(2H, d, *J*=8.8 Hz, Ar-H), 3.13(3H, s, CH<sub>3</sub>), 3.04(3H, s, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 191.05, 156.73, 133.42, 131.10, 122.27, 36.78, 36.54。

化合物 2 的合成: 往单口烧瓶中加入化合物 1(0.96 g, 5 mmol)和无水甲醇(20 mL),加毕后将 反应瓶置于冰浴中。分批将硼氢化钠(0.38 g, 10 mmol)加入反应瓶中,于室温下搅拌反应 1 h。 反应停止后,旋蒸溶剂,残留物用二氯甲烷(50 mL) 溶解,使用饱和食盐水洗涤,无水硫酸钠干燥有 机相过夜。过滤,旋蒸溶剂,残留物用硅胶柱层 析(洗脱剂为乙酸乙酯:石油醚=1:2)分离提纯, 得到固体产物 0.63 g,产率 65%。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.33(2H, d, *J*=8.0 Hz, Ar-H), 7.09(2H, d, *J*=8.8 Hz, Ar-H), 4.63(2H, s, CH<sub>2</sub>), 3.11(3H, s, CH<sub>3</sub>), 3.02(3H, s, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 154.76, 150.62, 138.01, 127.75, 121.76, 64.43, 36.71, 36.46。

化合物 3 的合成: 往单口烧瓶中加入化合物 2(0.39g, 2 mmol)和无水二氯甲烷(10 mL),加毕 后将反应瓶置于冰浴中。将用注射器吸取的三溴 化磷(0.38 mL, 4 mmol)缓慢滴加到反应瓶中,然 后恢复至室温搅拌反应 2 h。反应停止后,依次用 饱和碳酸氢钠溶液和食盐水洗涤反应液,无水硫 酸钠干燥过夜。过滤,旋蒸溶剂得到化合物 3,未 经纯化可直接用于下一步反应。

化合物 4 的合成: 往单口烧瓶中加入 4-溴-1,8-萘 二 甲 酸 酐 (5.2 g, 20 mmol) 和 无 水 乙 醇 (200 mL), 加毕后将反应瓶于油浴中加热至回流反 应过夜。停止反应, 待冷却至室温, 将反应液加 入到装有去离子水(500 mL)的烧杯中, 放置于冰箱 中冷藏过夜。抽滤, 用去离子水洗涤滤饼数次, 真空干燥即得固体产物 5.4 g, 产率 82%。

化合物 5 的合成: 往单口烧瓶中加入依次化 合物 4(3.3 g 10 mmol), 无水碳酸钾(5.5 g 40 mmol) 和无水甲醇(100 mL), 加毕后将反应瓶于油浴中加 热至回流反应过夜。停止反应, 待冷却至室温, 将反应液加入到含有去离子水(300 mL)的烧杯中, 放置于冰箱中冷藏过夜。抽滤, 用去离子水洗涤 滤饼数次,真空干燥即得固体产物 1.7 g,产率 59%。<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.51(1H, d, *J*=6.8 Hz, Ar-H), 8.42~8.45(2H, m, Ar-H), 7.61(1H, t, *J*=6.0 Hz, Ar-H), 6.95(2H, d, *J*=7.2 Hz, Ar-H), 4.14(2H, t, *J*=6.0 Hz, CH<sub>2</sub>), 4.09(2H, s, OCH<sub>3</sub>), 1.67~1.73(2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.41~1.48(2H, m, CH<sub>2</sub>), 0.98(3H, t, *J*=6.4 Hz, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 164.36, 163.78, 160.59, 133.21, 131.51, 129.15, 128.38, 125.77, 123.29, 122.31, 115.02, 105.05, 56.13, 40.03, 30.25, 20.41, 13.86, 138.01, 127.75, 121.76, 64.43, 36.71, 36.46。

化合物 6 的合成: 往单口烧瓶中加入依次化 合物 5(1.4 g, 5 mmol)和 55%碘化氧溶液(30 mL), 加毕后将反应瓶置于 130 ℃中加热反应 6 h。停止 反应,待冷却至室温,使用饱和碳酸钾溶液将反 应液 pH 调至中性。抽滤,用去离子水洗涤滤饼数 次,干燥后滤饼再经硅胶柱层析(洗脱剂为乙酸乙 酯:石油醚=1:1)分离提纯,得到固体产物 0.62 g, 产率 47%。<sup>1</sup>H-NMR(400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ: 8.45(1H, d, J=6.8 Hz, Ar-H), 8.38(1H, d, J=6.4 Hz, Ar-H), 8.27(1H, d, J=6.4 Hz, Ar-H), 7.67(1H, t, J=6.4 Hz, Ar-H), 7.09(1H, d, J=7.2 Hz, Ar-H), 4.12(2H, t, J=6.4 Hz, CH<sub>2</sub>), 1.54~1.61(2H, m, CH<sub>2</sub>), 1.29~1.37(2H, m, CH<sub>2</sub>), 0.91(3H, t, J=6.0 Hz, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 164.03, 163.36, 160.67, 133.79, 131.37, 129.56, 129.19, 125.74, 122.78, 122.17, 112.98, 110.27, 39.52, 30.21, 20.29, 14.15; MS(ESI) m/z: [M-H]<sup>-</sup> 理论值 268.19, 实测值 268.12。

探针的合成:往单口烧瓶中加入依次化合物 6(0.27 g, 1 mmol),化合物 3(0.51 g, 2 mmol),碳 酸钾(0.28 g, 2 mmol),碘化钠(0.015 g, 0.1 mmol) 和乙腈(20 mL),加毕后将反应瓶于油浴中加热至 回流反应 18 h。停止反应,待冷却至室温,过滤 并旋蒸溶剂,残留物经硅胶柱层析(洗脱剂为乙酸 乙酯:油醚=1:3)分离提纯,得到固体产物 0.29 g,产率66%。<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 8.51~8.55(3H, m, Ar-H),7.61(1H, t, *J*=6.4 Hz, Ar-H),7.23(2H, d, *J*=6.4 Hz, Ar-H),7.11~7.19(3H, m, Ar-H),5.35(2H, s, CH<sub>2</sub>),4.18(2H, t, *J*=4.8 Hz, CH<sub>2</sub>),3.13(3H, s, CH<sub>3</sub>),3.05(3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.73~1.82(2H, m, CH<sub>2</sub>),1.36~1.47(2H, m, CH<sub>2</sub>), 0.99(3H, t, *J*=5.6 Hz, CH<sub>3</sub>);<sup>13</sup>C-NMR(100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) & 164.35, 163.88, 159.68, 154.70, 151.68, 133.11, 132.21, 131.46, 129.36, 128.69, 126.01, 123.46, 122.49, 121.97, 115.43, 106.37, 70.48, 40.11, 36.75, 36.49, 30.13, 20.42, 13.87; MS(ESI) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup>理论值 469.17, 实测值 469.18。

1.3 体外光谱测量

对于工作曲线测定试验,溶液的总体积为 200 µL,含有 5 µmol·L<sup>-1</sup>的探针和系列酶活力浓度 的 AChE(0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.5,15.0,20.0 U·mL<sup>-1</sup>)。对于实时试验,5 µmol·L<sup>-1</sup> 探针与 15 U·mL<sup>-1</sup> 的 AChE 反应,每 5 min 取一个 点。对于选择性试验,5 µmol·L<sup>-1</sup>探针与不同浓度 的干扰物反应 2 h。对于细胞液抑制试验,抑制剂 新斯的明的浓度为 1.0 µmol·L<sup>-1</sup>,PC12 细胞裂解液 用量为 5 µL。对于动力学测定试验,15 U·mL<sup>-1</sup> 的 AChE 分别与 2, 5, 10, 20, 40 µmol·L<sup>-1</sup>的探针 反应 2 h。测量条件: 37 ℃,激发波长 470 nm, 收光范围 520~750 nm,发射波长为 560 nm,狭缝 5/5 nm。

1.4 双光子吸收截面数值的测定

以罗丹明 B(5 μmol·L<sup>-1</sup>)溶液作为参比,然后 在 750~870 nm 的激发波长范围内对罗丹明 B、探 针 (5 μmol·L<sup>-1</sup>) 以 及 探 针 (5 μmol·L<sup>-1</sup>) 与 AchE (15 U·mL<sup>-1</sup>)的反应液的双光子荧光发射光谱进行 扫描,用如下公式进行计算:

$$\delta_{\rm s} = \frac{{\rm s}_{\rm s}}{{\rm s}_{\rm R}} \cdot \left[ \frac{\Phi_{\rm s} \cdot C_{\rm R} \cdot n_{\rm s}}{\Phi_{\rm R} \cdot C_{\rm S} \cdot n_{\rm R}} \right] \cdot \delta$$

S 表示在双光子激光激发下的发射强度, Φ 代 表量子产率, C 表示测量样品的浓度, n 表示所用 溶剂的折光率, 下标 s 和 R 各代表测试样和参照样。 1.5 抑制剂 IC<sub>50</sub> 值测定

AChE(15 U·mL<sup>-1</sup>)与不同浓度的抑制剂在PBS 缓冲溶液中于 37 ℃下反应 1 h 后,再加入探针 (5 µmol·L<sup>-1</sup>)继续反应 2 h。以 470 nm 为荧光光谱 测试的激发波长,收集 560 nm 处的荧光强度值。 商业化试剂盒的检测操作参考说明书。

新斯的明的测试浓度为 0, 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.10 和 0.20 μmol·L<sup>-1</sup>; 多奈哌齐的测试浓度 为 0, 0.002, 0.005, 0.008, 0.012, 0.016 和 0.025 μmol·L<sup>-1</sup>; 加兰他敏的测试浓度为 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.8 和 1.0 μmol·L<sup>-1</sup>, 使用 Graphpad Prism 7.0 软件计算 IC<sub>50</sub> 值。

1.6 响应机制验证

探针 (10 µmol·L<sup>-1</sup>) 与 AChE(40 U·mL<sup>-1</sup>) 在 200 µL 的 PBS 缓冲溶液中于 37 ℃下反应 2 h, 接 着向反应液中加入 600 µL 乙腈,于离心机中以 369 ×g 离心 10 min。吸取上清液并使用氮气吹干, 残留物使用 100 µL 的质谱级甲醇溶解,在 ESI 负 离子模式下进行质谱扫描。

1.7 细胞及组织成像试验

往接种了 PC12 细胞的激光共聚焦培养皿中 加入含有 5 µmol·L<sup>-1</sup>探针的 DMEM 培基,置于含 有 5% CO<sub>2</sub> 的恒温箱中在 37 ℃条件下培养 2 h。对 于抑制试验,细胞使用 10 µmol·L<sup>-1</sup> 的新斯的明溶 液处理 1 h 后,再加入 5 µmol·L<sup>-1</sup> 的探针溶液,继 续培养 2 h。对于诱导试验,细胞使用 5 µg·mL<sup>-1</sup> 的 PMA 溶液处理 2 h 后,再加入 5 µmol·L<sup>-1</sup> 的探 针溶液,继续培养 2 h。所有的细胞在成像前均需 弃去含有探针的培养液,并用冷 PBS 洗涤 3 遍, 再加入新鲜培养基。单光子成像和双光子成像试 验的激发波长分别为 488 nm 和 820 nm,收集发射 波长在 520~580 nm 内的荧光信号。

在 3 周的 BALB/C-NU 裸鼠的前腿皮下接种 PC12 细胞,饲养 6 周后,处死裸鼠并切除肿瘤。 把肿瘤切成 1 mm 的薄片,放置于含有 10 μmol·L<sup>-1</sup> 探针溶液的激光共聚焦培养皿中,于培养箱中培 养 6 h。弃去培养基,用冷 PBS 溶液冲洗组织切片, 然后加入新鲜培养基。组织深度测试条件参照上 述双光子成像条件,扫描的深度间隙为 10 μm。 2 结果

2.1 体外测试结果

紫外-可见吸收光谱结果可见,在探针与 AChE 反应 2 h 后的体系中,470 nm 处出现了强紫 外吸收峰,见图 2A,因此选择 470 nm 为荧光发 射光谱测试的激发光波长。探针与系列酶活力浓 度的 AChE 发生反应后的荧光光谱图见 2B。反应 后的荧光光谱强度与酶活力浓度的增加呈正相关 性,在 560 nm 处荧光强度的增强信噪比可达 15 倍,比报道的双光子荧光探针<sup>[16]</sup>的 5 倍信噪比要 高。酶活力浓度与 560 nm 处的荧光强度变化关系 图见图 2C,可知在 0.5~12.5 U·mL<sup>-1</sup>的酶活力范围 内,拟合曲线具有良好的线性关系,相关系数可 达 0.991。根据公式 3σ/k(k 为曲线斜率,σ 为平行 测定 20 次探针在 560 nm 的荧光强度值的标准偏 差),可计算出检测限为 0.23 U·mL<sup>-1</sup>。荧光实时测

中国现代应用药学 2022 年 6 月第 39 卷第 11 期



图2 体外测试结果

A-探针与 AChE 反应前后的紫外-可见吸收光谱图;B-探针与系列浓度的 AChE 反应的荧光光谱图;C-探针与 AChE 的荧光响应线性拟合图; D-探针与 AChE 反应的实时荧光响应;E-探针与系列物质混合后的荧光响应;F-AChE 对探针的酶促反应动力学曲线。

Fig. 2 Assay data in vitro

A-UV-Vis absorption spectra of probe before and after being reacted with AChE; B-fluorescence spectra of probe to AChE at varied concentrations; C-linear fitting of fluorescence intensity of probe to AChE; D-real-time response of probe toward AChE; E-fluorescence response of probe to various substances; F-lineweaver-burk plot for the enzyme-catalyzed reaction of AChE to probe.

试结果见图 2D,随着反应时间的增加,探针在 560 nm 的荧光强度值也逐渐增加, 大约在 80 min 达到最大值。特异性试验测试结果见图 2E, 表明 探针不与细胞内常见的离子、氨基酸、活性小分 子和酶等响应,只与 AChE 有最优的响应。探针 与 PC12 细胞提取液反应后也产生很强的荧光信 号,但当探针与用 AChE 的特异性抑制剂新斯的 明处理过的 PC12 细胞提取液反应后, 荧光信号则 有明显减弱,进一步验证了探针对 AChE 的强特 异性响应,同时也表明探针可用于活细胞或者组 织中 AChE 的检测。最后酶动力学试验结果显示, 探针与 AChE 反应的米式常数  $K_m$ 为 51.6  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>,  $V_{\text{max}}$ 为 0.59 µmol·L<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>, 比已报道探针的  $K_{\text{m}}$ 值(141 µmol·L<sup>-1</sup>)低<sup>[16]</sup>,表明 AChE 对该探针的亲 合力要比双光子荧光探针的亲合力大,该探针是 酶更优的反应底物。综上的试验结果验证了探针 与 AChE 在体外响应的能力, 为后续细胞和组织 试验提供了重要的试验基础。

### 2.2 双光子响应性质测定

评价化合物双光子能力强弱的一个重要指标 是双光子吸收截面数值,单位为 Goppert-Mayer (GM),该数值越大,则表明物质的双光子性能越优 越。接下来测量探针以及探针与 AChE 响应后的双 光子吸收截面积数值。探针与 AChE 响应后的溶液 在 820 nm 处有最大的双光子吸收,其双光子吸收 截面积值为 52.3 GM,而探针在此波长处的双光子 吸收截面积值为 5.8 GM,两者之间的数值相差达 到 9 倍,均优于双光子荧光探针的双关子吸收截面 积值(21 GM)和差值比(7 倍)<sup>[16]</sup>,结果见图 3。表明 探针与 AChE 发生响应后具有优异的双光子性质, 并可选择 820 nm 为双光子成像试验的激发光波长。

2.3 响应机制验证

探针结构中二甲氨基甲酸酯被 AChE 特异性 切断后,游离出 O-分子。电子发生 1,4-重排反应, 释放烯醌式化合物同时伴随着羟基给电子基团的 恢复,恢复染料的 ICT 效应,从而实现荧光信号 的增强。为了验证这一响应机制,将探针与 AChE 在缓冲溶液中反应 2 h 后,加入乙腈沉淀蛋白并离 心,吸取上清液进行质谱检测,见图 4。由图 4 结 果可见,质谱图中出现了 *m/z* 268.21 的主峰,与产 物[M-H]-的理论分子量 268.19 一致,验证了探针 的反应机制。

2.4 用于抑制剂 IC50 值的测量

分别使用合成的探针和商业化的检测试剂盒



图 3 探针与 AChE 响应前后的双光子吸收截面数据图 Fig. 3 Two-photon action spectra of probe before and after being reacted with AChE



图 4 探针与 AChE 反应的 ESI 质谱图 Fig. 4 ESI-MS spectrum of the reaction between probe and AChE

对新斯的明、多奈哌齐和加兰他敏这 3 种临床上 使用的 AChE 抑制剂的 IC<sub>50</sub> 值进行计算与比较, 见表 1。从表中结果可见,使用探针测量出的这 3 种抑制剂对 AChE 的 IC<sub>50</sub> 值与文献报道的数值接 近,并与商业化的检测试剂盒测出的结果也有很 高的相似度,表明该探针可用于 AChE 抑制剂的 筛选,有一定的临床应用价值。

**表 1** 探针与商业化试剂盒用于 AChE 抑制剂的 ICso 值测 量的对比结果

Tab. 1Comparison results of IC50 value for AChE inhibitormeasured by probe or commercial kit $\mu mol \cdot L^{-1}$ 

5 1			1	
名称	新斯的明	多奈哌齐	加兰他敏	
文献报道	0.053 <sup>[17]</sup>	0.012 <sup>[18]</sup>	0.41 <sup>[19]</sup>	
探针	$0.045{\pm}0.003$	$0.014 \pm 0.001$	$0.43 {\pm} 0.02$	
商业化试剂盒	$0.051{\pm}0.002$	$0.009 \pm 0.002$	$0.45 {\pm} 0.03$	

# 2.5 细胞成像

首先通过 MTT 法测定了探针对 PC12、HeLa 和 MCF-7 细胞的细胞毒性,3 种细胞与系列浓度

中国现代应用药学 2022 年 6 月第 39 卷第 11 期

的探针培养24h后的存活率依然>85%,表明探针 对细胞的毒性较低,可用于细胞试验,结果见图 5A。

设置 3 组试验组以研究探针在活细胞内对 AChE 的荧光成像能力。第1组是探针与 AChE 高 表达的 PC12 细胞孵育 2h 的试验组; 第 2 组是 PC12 细胞先用 AChE 抑制剂新斯的明处理 1h 后,再与探针继续孵育 2h 的试验组;第 3 组是 PC12 细胞先用 PMA 处理 2 h 后, 再与探针继续孵 育 2 h 的试验组。3 组试验组都进行了单-双光子成 像,结果见图 5B。从图中可见,探针与 PC12 细 胞孵育 2h 后, 在单-双光子的激发下进行细胞成 像,都可以观察到明亮的绿色荧光,表明探针可 对 PC12 内的正常 AChE 的酶活力进行成像检测。 当细胞用 AChE 的抑制剂新斯的明处理后, 再与 探针孵育,单-双光子的细胞成像结果则显示绿色 荧光信号有明显的减弱,初步表明探针可用于 AChE 酶活力变化的成像检测。相关文献表明细胞 凋亡增强后,细胞内 AChE 活力和表达水平也会 增强<sup>[20]</sup>。当 PC12 细胞用凋亡诱导剂 PMA 处理 后,单-双光子的细胞成像显示探针在细胞内发出 的绿色荧光强度有明显增强,也证实细胞凋亡强 弱与 AChE 酶活力变化的正相关性。图 5C 中的成 像荧光强度值计算结果也与成像试验的结果一 致,进一步证明探针可用于活细胞内 AChE 酶活 力变化的单-双光子成像检测。

# 2.6 组织深度成像

验证了探针可用于细胞水平上 AChE 活力变 化的成像检测后,进一步在组织水平上探究对 AChE 的成像检测能力,见图 6。在 50~120 μm 的 组织深度范围内,可以观察到绿色的荧光信号强 度逐渐减弱,表明探针对不同深度组织中的 AChE 都可以进行成像检测。同时,其最大组织成像深度 可达 110 μm,表明探针具有优良的组织穿透能力和 AChE 的组织成像检测能力。

### 3 讨论

同一种酶的绝大部分响应型荧光探针都含有 同样的特异性响应基团,而探针检测性能上的差异 则由选取染料的荧光性质以及探针结构与酶催化 活性中心的亲合能力所共同决定<sup>[21]</sup>。因此在本研究 中,选择具有优异双光子荧光性质的羟基-萘二甲酰 亚胺为双光子染料,通过 ICT 效应引入 AChE 的特 异性响应底物二甲氨基甲酸酯,设计并合成了用于



图5 细胞实验结果

A-3 种细胞与探针培养 24 h 后的存活率; B-探针对 PC12 细胞中 AChE 活力变化的单-双光子成像图,标尺=20 μm; C-图 B 中 a~f 成像图取 10 处的荧光强度平均值。

#### Fig. 5 Cell experiment data

A-viability of cells incubated with probe for 24 h; B-one-photon and two-photon images of probe to the changes of AChE activity in PC12 cells, scale bar=20  $\mu$ m; C-average fluorescence intensity in ten arbitrary regions in figure B a-f.



# 组织深度/µm

图 6 在组织深度为 50~120 µm 内探针对 AChE 的双光子成像图(标尺=100 µm)

Fig. 6 Two-photon images of probe to AChE were obtained in a depth of 50-120 µm(Scale bar=100 µm)

AChE 的体外检测和单-双光子成像的荧光响应型 探针。试验结果表明,该探针对 AChE 的响应信噪 比达到 15 倍,检测限为 0.23 U·mL<sup>-1</sup>、双光子吸收 截 面 积 数 值 为 52 GM 和 米 式 常 数  $K_m$  为 51.6  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>,均优于报道的双光子荧光探针的响 应信噪比(5 倍)、灵敏度(0.36 U·mL<sup>-1</sup>)、双光子吸收 截面积值(21 GM)和  $K_m$ (141  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>)。这些优异的 响应性能可能归功于羟基-萘二甲酰亚胺染料的优 良荧光性质以及探针结构与酶催化活性中心的更

优亲合能力,后续的研究中将借助理论计算和分子 对接技术对此进行深入研究。同时优异的单-双光 子响应性能和高响应特异性不仅确保该探针可对 细胞内 AChE 的活力变化进行响应型单-双光子成 像检测,也保证了探针的良好组织穿透深度以及 对 AChE 组织成像检测能力。在今后研究中,将 进一步引入荧光性能更优的双光子染料和近红外 染料,开发检测性能更优的可用于活体中检测 AChE 的荧光探针。

#### REFERENCES

- SILMAN I, SUSSMAN J L. Acetylcholinesterase: how is structure related to function?[J]. Chem Biol Interact, 2008, 175(1/2/3): 3-10.
- TALESA V N. Acetylcholinesterase in Alzheimer's disease[J]. Mech Ageing Dev, 2001, 122(16): 1961-1969.
- [3] BRENNER T, NIZRI E, IRONY-TUR-SINAI M, et al. Acetylcholinesterase inhibitors and cholinergic modulation in myasthenia gravis and neuroinflammation[J]. J Neuroimmunol, 2008(201/202): 121-127.
- [4] GOLIASCH G, KLEBER M E, RICHTER B, et al. Routinely available biomarkers improve prediction of long-term mortality in stable coronary artery disease: The Vienna and Ludwigshafen Coronary Artery Disease (VILCAD) risk score[J]. Eur Heart J, 2012, 33(18): 2282-2289.
- [5] PARAOANU L E, LAYER P G. Acetylcholinesterase in cell adhesion, neurite growth and network formation[J]. FEBS J, 2008, 275(4): 618-624.
- [6] ZHANG X J, YANG L, ZHAO Q, et al. Induction of acetylcholinesterase expression during apoptosis in various cell types[J]. Cell Death Differ, 2002, 9(8): 790-800.
- [7] LI Y G, BAI H, LI C, et al. Colorimetric assays for acetylcholinesterase activity and inhibitor screening based on the Disassembly-Assembly of a water-soluble polythiophene derivative[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2011, 3(4): 1306-1310.
- [8] GUARDIGLI M, PASINI P, MIRASOLI M, et al. Chemiluminescent high-throughput microassay for evaluation of acetylcholinesterase inhibitors[J]. Anal Chimica Acta, 2005, 535(1/2): 139-144.
- [9] DU D, HUANG X, CAI J, et al. Comparison of pesticide sensitivity by electrochemical test based on acetylcholinesterase biosensor[J]. Biosens Bioelectron, 2007, 23(2): 285-289.
- [10] POHANKA M, HRABINOVA M, KUCA K, et al. Assessment of acetylcholinesterase activity using indoxylacetate and comparison with the standard Ellman's method[J]. Int J Mol Sci, 2011, 12(4): 2631-2640.

- [11] CHEN J, LIAO D L, WANG Y, et al. Real-time fluorometric assay for acetylcholinesterase activity and inhibitor screening through the *Pyrene* probe monomer–excimer transition[J]. Org Lett, 2013, 15(9): 2132-2135.
- [12] MA J L, SI T T, YAN C X, et al. Correction to near-infrared fluorescence probe for evaluating acetylcholinesterase activity in PC12 cells and *in situ* tracing AChE distribution in zebrafish[J]. ACS Sensors, 2020, 5(4): 1246.
- [13] CHAO S, KREJCI E, BERNARD V, et al. A selective and sensitive near-infrared fluorescent probe for acetylcholinesterase imaging[J]. Chem Commun, 2016, 52(77): 11599-11602.
- [14] LIM C S, MASANTA G, KIM H J, et al. Ratiometric detection of mitochondrial thiols with a two-photon fluorescent probe[J]. J Am Chem Soc, 2011, 133(29): 11132-11135.
- [15] ZHANG H, FAN J L, WANG K, et al. Highly sensitive naphthalene-based two-photon fluorescent probe for *in situ* real-time bioimaging of ultratrace cyclooxygenase-2 in living biosystems[J]. Anal Chem, 2014, 86(18): 9131-9138.
- [16] WANG X, LI P, DING Q, et al. Observation of acetylcholinesterase in stress-induced depression phenotypes by two-photon fluorescence imaging in the mouse brain[J]. J Am Chem Soc, 2019, 141(5): 2061-2068.
- [17] TREVISANI G T, HYMAN N H, CHURCH J M. Neostigmine[J]. Dis Colon Rectum, 2000, 43(5): 599-603.
- [18] BRYSON H M, BENFIELD P. Donepezil[J]. Drugs Aging, 1997, 10(3): 234-239.
- [19] FULTON B, BENFIELD P. Galanthamine[J]. Drugs Aging, 1996, 9(1): 60-65.
- [20] YANG L, HE H Y, ZHANG X J. Increased expression of intranuclear AChE involved in apoptosis of SK-N-SH cells[J]. Neurosci Res, 2002, 42(4): 261-268.
- [21] LIU H W, CHEN L L, XU C Y, et al. Recent progresses in small-molecule enzymatic fluorescent probes for cancer imaging[J]. Chem Soc Rev, 2018, 47(18): 7140-7180.

收稿日期: 2021-06-11 (本文责编:沈倩)