

一类酸响应、信号触发探针的生物成像应用

刘剑^{1*}, 薛钟慰¹, 赵虎¹, 韩家淮^{2*}, 韩守法^{1*}

1. 厦门大学化学化工学院化学生物学系, 固体表面物理化学国家重点实验室, 谱学分析与仪器教育部重点实验室, 福建省化学生物学重点实验室, 厦门 361102

2. 厦门大学生命科学学院, 细胞应激生物学国家重点实验室, 细胞信号网络协同创新中心, 厦门 361102

*通讯作者, jianliuxmu@xmu.edu.cn; jhan@xmu.edu.cn; Shoufa@xmu.edu.cn

收稿日期: 2017-03-21; 接受日期: 2017-04-18; 网络版发表日期: 2017-07-26

国家自然科学基金(编号: 21602185, 21572189)、福建省自然科学基金(编号: 2016J05047)和中央高校基本科研业务费专项资金(编号: 20720150047, 20720160052)资助项目

摘要 水作为所有细胞和组织的重要组成部分, 其pH和诸多生理活动密切相关。荧光分析具有可视化、高分辨率等特点, 在生命体系的pH分析中得到广泛应用。近年来, pH触发荧光成像技术在生物医学领域逐渐得到应用。本文简要介绍了一类酸度触发荧光、含分子内螺环的罗丹明衍生物的设计与功能化, 及其生物成像应用。

关键词 信号触发荧光成像, 细胞器变化成像, 糖缀合探针, 炎癌活体成像, 比率荧光成像

1 引言

水是生命存在的基础。pH和各种生命活动密切相关, 人体器官或组织的pH偏离正常值时会导致多种疾病。例如, 血液pH的降低会影响细胞的功能, 导致机体产生炎症、免疫功能受损甚至死亡(acidosis)^[1]。此外, 细胞内呈现细胞器特异的pH分布: 细胞质接近中性(pH 7.2), 而溶酶体为酸性(pH 4.5~6.5)。溶酶体是一种由单层膜包封的酸性细胞器, 内含多种水解酶用以消化各种细胞外源和内源物质, 是细胞的消化器官。溶酶体的pH在各种生命过程中呈现动态变化的特点, 如在细胞凋亡、癌细胞的转移、细胞成熟等过程中溶酶体pH会降低, 而在衰老及溶酶体贮积症等过程中pH则会上升^[2~4]。溶酶体pH的动态变化与细胞自噬、死亡、致病菌吞噬、神经性疾病等密切相关^[5,6]。线粒体

是一种棒状细胞器, 被喻作细胞的发电厂, 其内部呈弱碱性(pH 8)。膜电位($\Delta\Psi_m$)是线粒体的重要特征, 是维持线粒体合成ATP的必要条件, 稳定的 $\Delta\Psi_m$ 有利于维持细胞的正常生理功能。发展能够灵敏分析溶酶体pH、线粒体膜电位的动态变化、生物体系兼容的成像技术对溶酶体、线粒体等细胞器相关的信号传导和病理研究具有重要的价值。

本课题组拓展、应用一类含分子内螺环结构的罗丹明衍生物, 作为信号触发探针用于分析相关细胞信号传导(图1)。该类探针在溶酶体外没有荧光, 进入溶酶体后在酸性条件下会异构化为具有强烈荧光的罗丹明。我们通过结构改造, 得到一类含不同螺环结构与生色团取代基的探针, 使其具有不同酸响应灵敏度与多种光学性能(绿、橙、红、近红外荧光, 光声效应与光热效应)。利用这些探针实现了: (1)细胞应激

引用格式: 刘剑, 薛钟慰, 赵虎, 韩家淮, 韩守法. 一类酸响应、信号触发探针的生物成像应用. 中国科学: 化学, 2017, 47: 973~985
Liu J, Xue Z, Zhao H, Han J, Han S. Bio-imaging with a group of acid-responsive fluorescence-on probes. *Sci Sin Chim*, 2017, 47: 973~985,
doi: 10.1360/N032017-00058

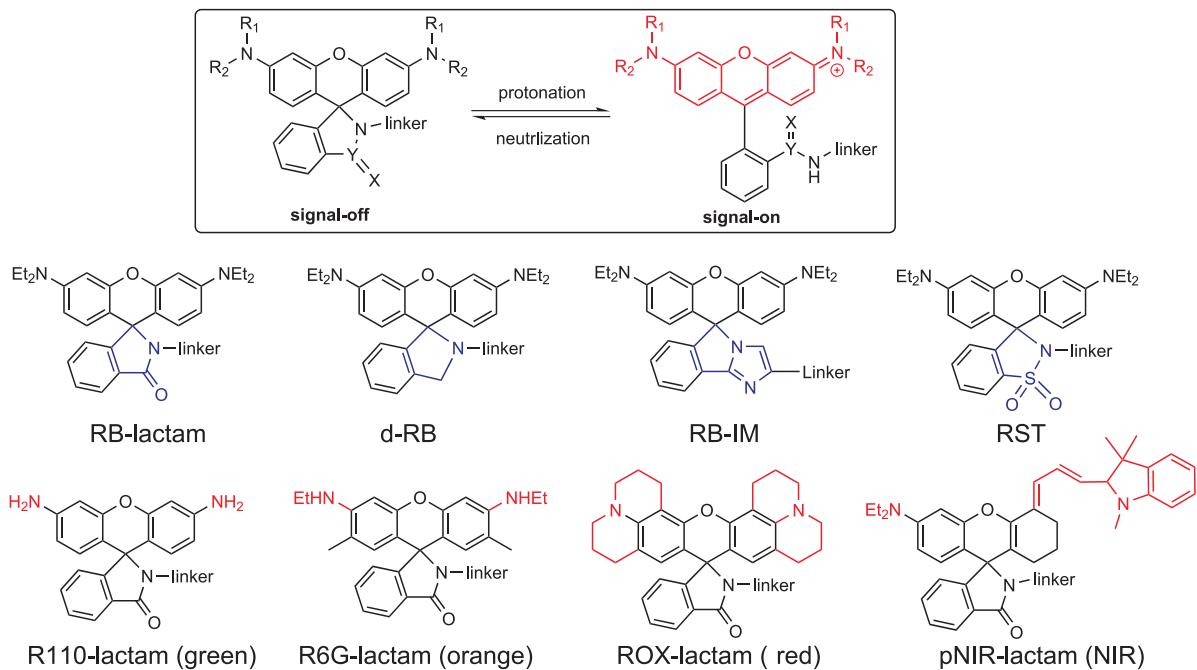


图1 一类信号触发多功能溶酶体探针及pH响应机制(网络版彩图)

过程溶酶体酸度变化的灵敏荧光成像分析; (2) 通过糖缀合赋予该类探针对炎症、肿瘤组织的靶向性,由此实现信号触发小鼠炎癌组织的活体成像; (3) 比率荧光成像跟踪溶酶体pH的变化及免疫细胞吞细菌过程; (4) 能量代谢过程中线粒体的去极化分析。本文旨在介绍本课题组对溶酶体探针及其生物医学成像的研究,以期为分析科学和生命科学的交叉发展提供助力。

2 信号传导过程溶酶体成像与活体炎癌病灶成像

2.1 溶酶体成像分析

溶酶体正常功能的维持依赖于其酸性pH,而溶酶体pH的异常变化又与衰老、肿瘤迁移、溶酶体贮积症等多种疾病密切关联。随着研究的深入,人们还发现溶酶体在细胞代谢、免疫、激素分泌调节等生命活动中发挥着重要的功能。但是人们对在这些信号传导过程中溶酶体酸度变化缺乏可靠的分析方法。因此,溶酶体pH的动态变化成像技术对于相关细胞应激的致病机理研究具有重要意义。溶酶体荧光成像是细胞生物学常用分析方法,商业化溶酶体探针如LysoTracker green^[7]常含有一个荧光基团和弱碱性的胺基官能团,

其中弱碱性基团通过分子内光引发的电子转移(photo induced electron transfer, PET)抑制探针的荧光,在溶酶体酸性条件下胺基被质子化,抑制了PET,从而导致探针的荧光增强。但该类探针的缺点也十分明显,抑制PET不充分导致荧光信号弱;易发生光漂白,从而丧失荧光性能;在溶酶体保留时间短,难用于长时间跟踪、分析溶酶体。

1997年, Czarnik课题组^[8]报道了含有分子内螺环的罗丹明酰肼衍生物用于铜离子检测,环内酰胺结构的存在,探针分子本身不具备荧光发光性质,当Cu²⁺存在时会促使该化合物发生水解反应生成罗丹明B发出强烈荧光,实现对Cu²⁺的选择性识别。此后,罗丹明类染料作为荧光载体被广泛应用于化学传感与分子识别^[9]。

2009年,唐波课题组^[10]与Hamada课题组^[11]分别报道了利用含分子内螺环酰胺的罗丹明衍生物用于细胞内酸性pH成像,其响应机理如图2所示。在此基础上,我们通过结构修饰拓展了该类酸响应探针的结构,调控其酸度响应范围、荧光性能和溶酶体靶向功能,从而用于不同生物过程成像。

在以上研究基础上,我们首先合成了罗丹明6G(R6G)与乙二胺(EDA)的缩合产物R6G-EDA^[12]。探针分子的内胺基在酸性条件下被质子化,从而提高探针

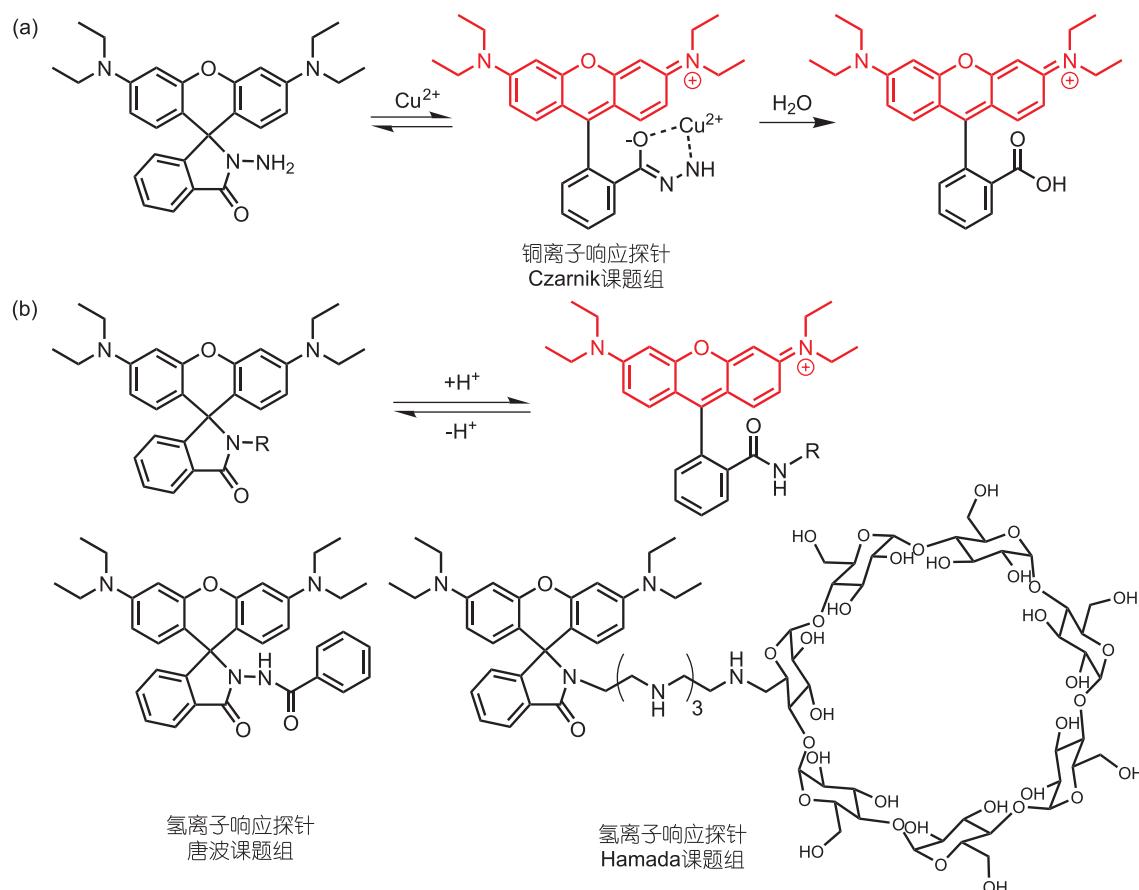


图 2 (a) 罗丹明螺环内酰胺衍生物用于 Cu^{2+} 离子检测的机理^[8]; (b) 罗丹明螺环内酰胺衍生物用于酸性pH的荧光成像的机理^[10,11] (网络版彩图)

在溶酶体的富集能力。pH滴定发现, R6G-EDA在中性至碱性条件下无荧光, 荧光强度随酸度增加而提高, pH 4.0时的荧光强度比pH 7时强100倍。R6G-EDA孵育的细胞内部呈现强烈的点状罗丹明荧光, 该荧光信号与商业化溶酶体探针(Lysotracker green:DND 26)的荧光信号共定位^[12], 说明了探针可有效富集于溶酶体。Bafilomycin A1 (BFA)是一种常用的ATPase抑制剂^[13], 用于抑制质子泵功能, 中和溶酶体酸度。用BFA处理细胞后, 溶酶体内探针的荧光信号消失, 证明R6G-EDA对溶酶体酸度响应的专一性^[12]。这些实验确立了R6G-EDA标记溶酶体的区域选择性与pH依赖性, 由此实现不同类型细胞的溶酶体定位成像^[12]。与商业化探针相比, R6G-EDA在溶酶体的保留时间长(图3(b))、光稳定性高, 实现了对TNF- α 引发细胞死亡期间溶酶体的24小时成像并观察到溶酶体增大破裂(图3(c))^[12], 证实了文献中关于细胞死亡期溶酶体增大

的推测^[14]。这些经典细胞生物学实验结果表明, 含分子内螺环的罗丹明衍生物适于细胞信号传导过程中溶酶体的变化分析。

我们利用适于溶酶体分析的罗丹明衍生物的结构特性, 设计、合成了具有不同分子内螺环结构的探针, 以提高其溶酶体响应性能和荧光性能(图4(a))。研究发现, 含去氧分子内氮杂螺环的探针dRB-EDA具有更灵敏的酸响应性能, 其荧光强度比含内酰胺螺环罗丹明RB-EDA高5~8倍^[15]。dRB-EDA在细胞中呈现溶酶体定位的强烈荧光, 荧光信号在BFA孵育的细胞中消失, 证明该探针对溶酶体酸度响应的专一性^[15]。dRB-EDA缀合的高分子胶束通过尾静脉注射到荷瘤小鼠体内后, 高效聚集于小鼠的肿瘤部位, 产生强烈罗丹明荧光; 而正常脏器组织背景信号低。这说明该类探针与纳米技术的结合可实现溶酶体酸度响应的活体肿瘤成像^[15]。

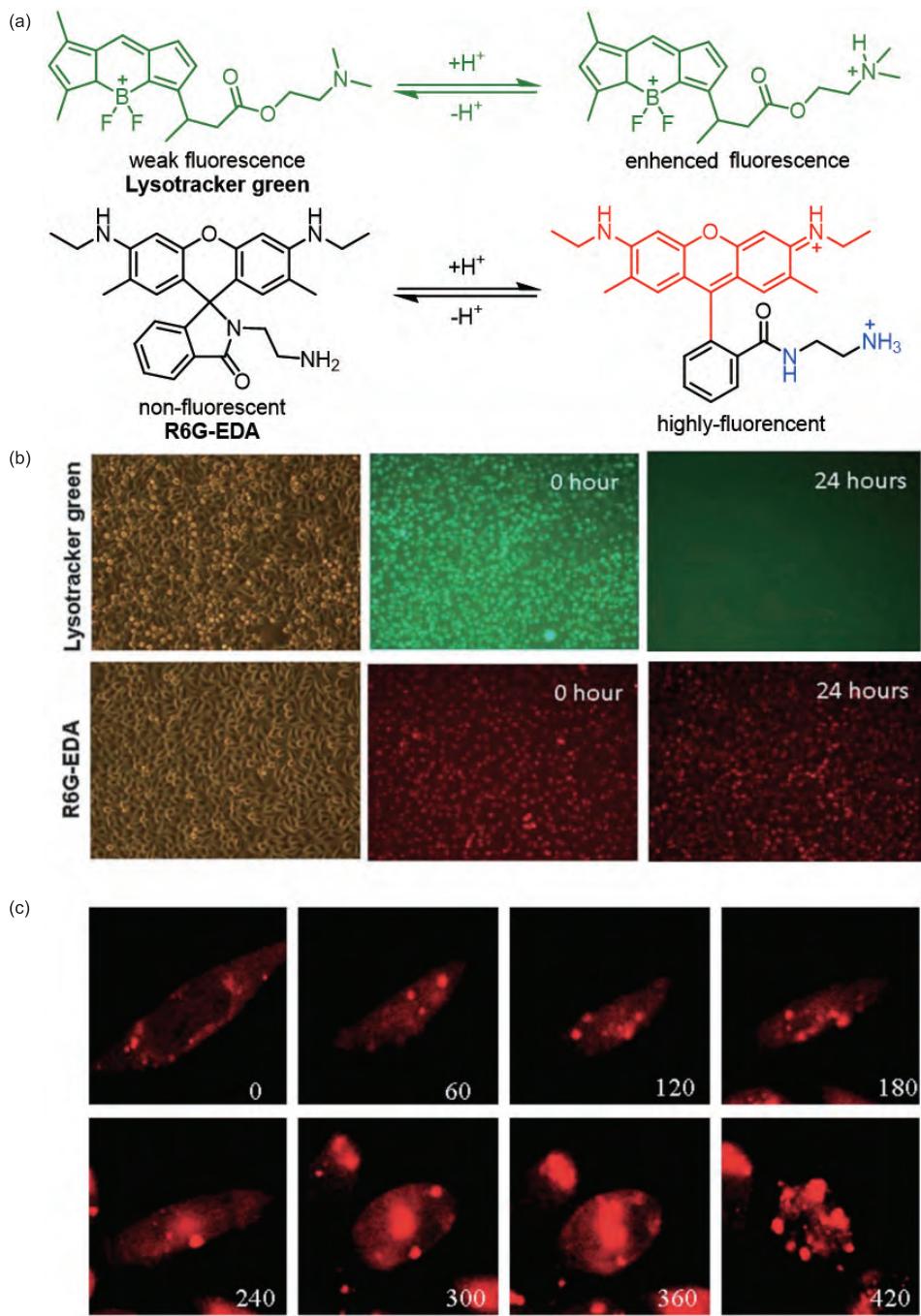


图3 R6G-EDA用于细胞溶酶体成像分析. (a) Lysotracker green和R6G-EDA的不同酸响应机制; (b) R6G-EDA长时间保留在溶酶体(红色荧光), 而Lysotracker green易从溶酶体流失(绿色荧光); (c) R6G-EDA用于细胞死亡过程中溶酶体变化成像(0~420 min), 溶酶体在该过程中逐渐增大^[12] (网络版彩图)

我们通过, 在探针上引入分子内螺环苯并咪唑, 以降低金属阳离子干扰, 提高pH选择性(图4(a))^[16]. 含苯并咪唑的罗丹明B衍生物(RB-IM)的最佳pH响应窗口与溶酶体酸度区间重叠, 可以有效地被溶酶体酸度质

子化, 引发探针异构化. 该探针对质子选择性高, 对生命体内常见的阳离子(Fe^{3+} 、 Mg^{2+} 、 Zn^{2+} 等)没有响应. 我们利用该探针实现了斑马鱼的消化道酸度成像分析^[16].

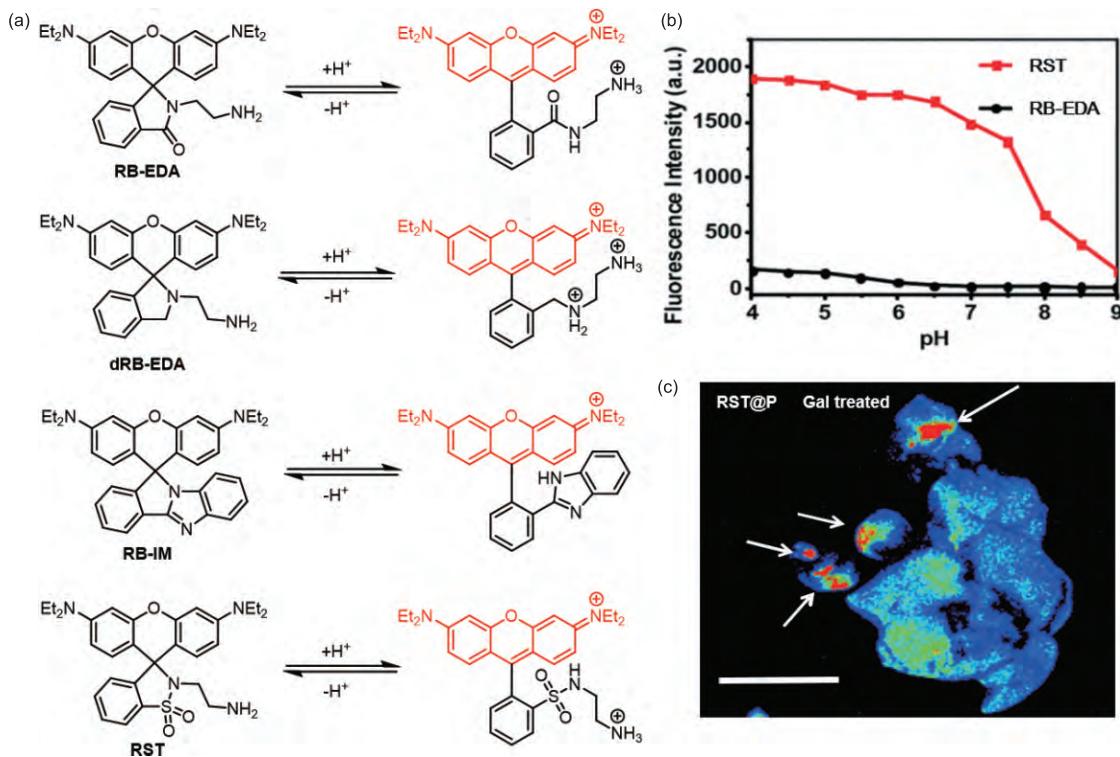


图4 (a) 具有不同分子内螺环结构的罗丹明衍生物的酸响应机理; (b) RST较RB-EDA有更灵敏的酸响应性能; (c) RST包埋的高分子胶束实现小鼠肝脏小尺寸(0.1~10 mm)肿瘤的定位成像^[17]. 标尺: 1 cm (网络版彩图)

我们将探针分子内的酰胺键替换为磺酰胺, 合成了罗丹明B内磺酰胺螺环化合物(RST)。研究发现, 在同等条件下RST的荧光强度比RB-EDA高8~10倍(图4(a), (b))^[17]。将RST连接至缀合半乳糖的高分子胶束内部后, 得到靶向活体肿瘤细胞表面半乳糖受体的、溶酶体酸度响应的荧光纳米胶束。经过静脉注射后, 胶束有效集聚在扩散的小鼠肝癌病灶, 产生强烈荧光(图4(c))^[17]。鉴于其对微小尺寸(0.1~5 mm)的肝癌病灶的分辨能力, 对该类探针进行进一步优化, 有望用于荧光辅助临床手术切除实体肿瘤。

目前已经有多类罗丹明衍生物探针用于pH检测^[18~33], 已报道的溶酶体酸度检测探针如图5所示, 有罗丹明B酰胺衍生物1~8^[34~41]、酰肼衍生物9~12^[42~45]以及近红外特性的罗丹明衍生物13~15^[46]和16^[47], 这为将来的生物成像研究提供了新选择。

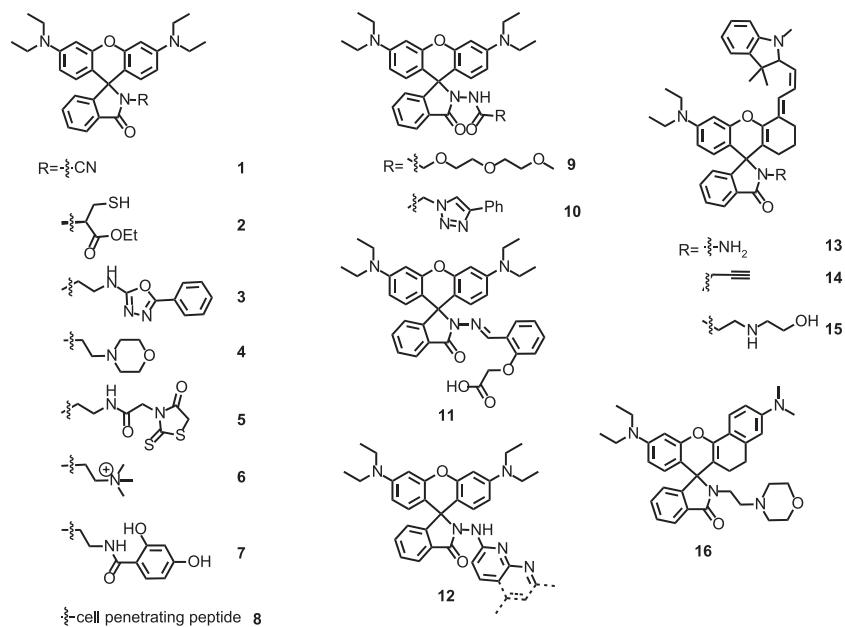
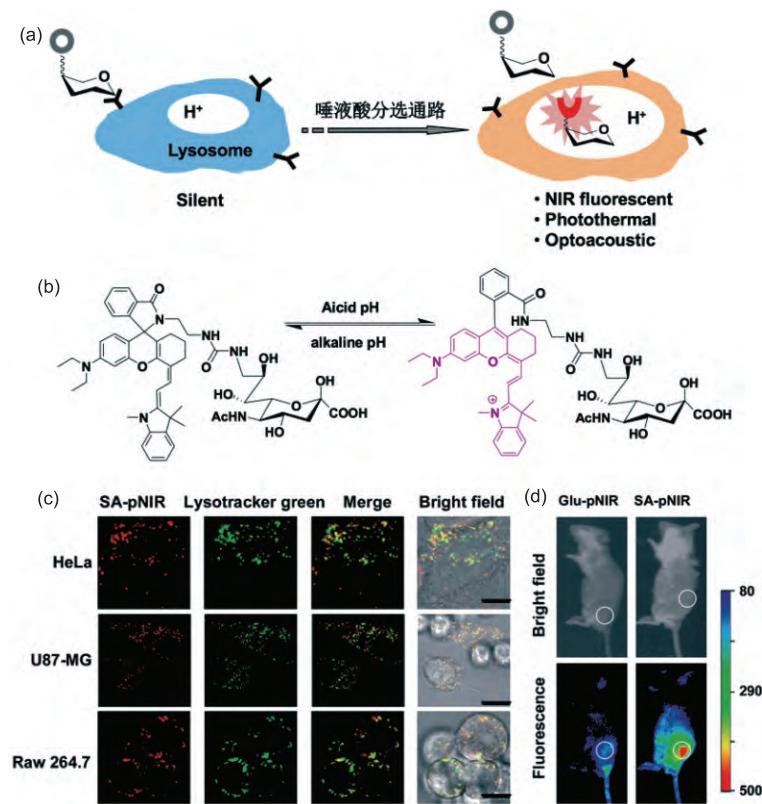
2.2 糖缀合探针用于小鼠炎癌成像

2.2.1 活体肿瘤成像

生命进化产生了多种糖分选运输途径(sorting/traf-

ficking), 以将不同糖分子运输到细胞特定区域。细胞表面的Sialin蛋白^[48]能够将外源唾液酸(SA)主动导入溶酶体。荧光分子在活体内常缺乏细胞与组织的选择性。为了靶向活体炎癌组织, 我们设计将酸响应近红外探针与唾液酸缀合, 用于靶向炎癌组织的Sialin。糖探针被Sialin导入溶酶体后, 实现溶酶体酸度触发信号的病灶成像。

生物体系在近红外区(650~900 nm)具有低光学吸收、低自发荧光的特点。近红外荧光与光声成像具有较深的组织穿透性, 在生物医学领域具有重要应用。我们对林伟英课题组^[49]报道的近红外探针长沙红进行衍生化, 并与唾液酸缀合得到酸响应近红外荧光探针SA-pNIR (near infrared profluorophore, pNIR) (图6(b))^[50]。SA-pNIR通过尾静脉注射到荷瘤小鼠体内30 min内, 小鼠体内没有明显荧光, 说明探针在接近中性(pH 7.2)的血液中处于信号沉默的分子内关环状态。注射后48~114 h, 肿瘤组织逐渐呈现高信噪比的近红外荧光, 说明探针进入肿瘤被酸性溶酶体激活产生荧光, 却较少进入正常组织(图6(d))。细胞分析证实探针

图 5 用于溶酶体成像的罗丹明衍生物探针 1~16^[34~47]图 6 基于糖缀合探针 Sia-pNIR 的肿瘤成像. (a) 唾液酸分选通路介导的糖缀合探针靶向机制; (b) Sia-pNIR 的酸度响应机理; (c) Sia-pNIR 有效富集于细胞溶酶体内, 产生荧光; (d) Sia-pNIR 有效靶向小鼠肿瘤, 实现信号触发活体成像, 葡萄糖缀合近红外探针(Glu-pNIR)难以定位肿瘤溶酶体^[50] (网络版彩图)

富集在肿瘤细胞内部, 并依赖肿瘤溶酶体酸度产生近红外荧光(图6(c))^[50]. 除了信号触发近红外荧光, Sia-pNIR在溶酶体内展现信号触发的光声信号和光致热性能(吸收光子产生热量)^[5,50]. 由此实现了活体小鼠肿瘤溶酶体响应的光声成像, 及光热处理杀死肿瘤细胞. Sia-pNIR探针具有优异的体内代谢动力学性能、信号触发的近红外荧光、光声效应及光热效应. 这说明了含分子内螺环的罗丹明类衍生物在生物医学领域的广泛应用潜力.

2.2.2 活体炎症成像

炎症是机体对于外界损伤因子的防御响应, 是一种重要的病理过程. 现有成像技术利用炎症组织的生物标记物作为靶标, 或者采用荧光标记的纳米颗粒. 这些探针通常具有“always-on”信号特性, 信噪比较低. 我们尝试靶向炎症组织的溶酶体, 实现信号触发的炎症成像(图7)^[5]. 经尾静脉给药的Sia-pNIR有效聚集在炎症模型小鼠的炎症部位, 呈现高信噪比的近红外荧光, 证实该探针能够用于炎症组织成像. 小鼠经过抗

生素治疗后, 炎症组织内Sia-pNIR荧光逐渐消失^[5]. 活体炎症状态变化的跟踪成像技术有望用于活体评估炎症药物的药效(图7(b)). 细胞分析还发现, 经过细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、大肠杆菌与金黄色葡萄球菌刺激的细胞溶酶体pH明显酸化, 表明细胞膜表面TLR-4、TLR-2介导的信号传导能够显著影响细胞溶酶体的酸度(图7(c))^[5]. 炎症细胞溶酶体酸度的变化有望成为炎症反应分析的一种新型生物标记物(biomarker).

基于唾液酸缀合探针的活体成像表明唾液酸糖分选途径提供了一类有效的、尚无先例的活体病灶溶酶体靶向的新策略. 与基于抗体的肿瘤靶向策略相比, 糖缀合探针具有分子结构明确可控、易于制备、稳定性好的特点. 基于唾液酸代谢途径的抗炎癌药物的靶向运输值得进一步探索.

2.3 比率荧光探针用于溶酶体pH变化分析

在生物样品分析中, 单荧光发射的探针受样品内

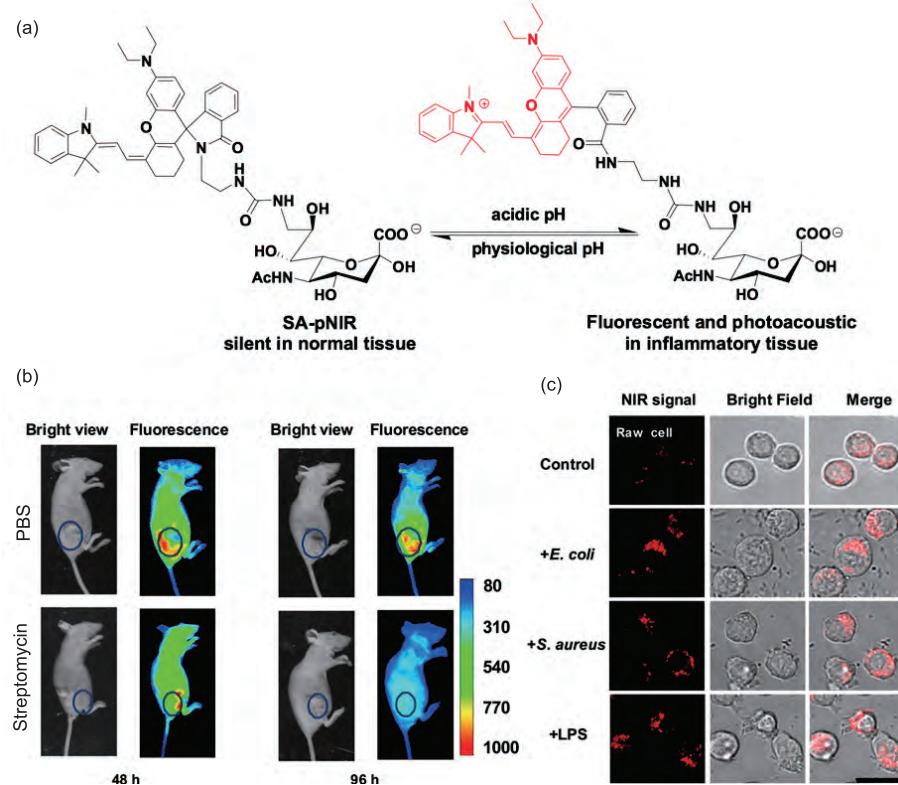


图7 基于Sia-pNIR的炎症成像与分析. (a) Sia-pNIR的化学结构及酸度响应机理; (b) Sia-pNIR用于抗生素治疗小鼠炎症过程成像; (c) LPS与细菌处理的Raw 264.7细胞的溶酶体显著酸化^[5] (网络版彩图)

探针分布、样品厚度等因素干扰,难以实现待分析物参数的定量分析。比率荧光法可以有效排除这些干扰,但是商业化比率探针具有明显缺点(如Lysosensor):比率信号变化小,影响测量pH微变化的准确性(pH 5.5降到5.0,比率增加30%)^[51],发射峰波长之间间距小;荧光弱,背景信号高。为了实现溶酶体pH的定量分析、拓展探针的应用范围,我们在前文所述的酸响应荧光探针基础上,引入内标得到比率荧光探针。此类探针拥有两种发射波长,且其荧光比率与酸度关联。利用这些比率荧光探针实现了溶酶体酸度变化的定量分析、细菌内吞过程成像、跟踪线粒体去极化过程。

2.3.1 比率荧光小分子探针

小分子探针通过自由扩散的方式跨膜进入细胞内部,便于表征细胞的溶酶体群体与个体变化。我们采用二亚乙基三胺(diethylenetriamine, DETA)将罗丹明6G

(R6G)和丹磺酰氯连接得到比率荧光探针Lyso-DR^[52]。pH滴定表明,该探针在pH 3.5~6的范围内比率荧光信号灵敏,适于溶酶体酸度变化分析。激光共聚焦实验证实,Lyso-DR富集于溶酶体,实现了对群体溶酶体酸度分布成像和细胞内群体溶酶体pH的测量。

绿色荧光蛋白(GFP)技术是一种经典的细胞生物学研究手段^[53]。GFP荧光发射波长为509 nm。为了与GFP技术协同,我们合成了连接接香豆素(coumarin, CM, $\lambda_{em}=475$ nm)与罗丹明-X (ROX, $\lambda_{em}=615$ nm)、pH响应灵敏的比率荧光探针(CM-ROX, 图8(a))^[54]。该探针的蓝色荧光强度随酸度升高而降低,而红色荧光随酸度升高而急剧升高。CM-ROX的荧光比率在pH 4.5~6.0区间的变化高达70倍^[54]。细胞分析发现,探针的蓝色、红色荧光与溶酶体膜特异蛋白(GFP-LAMP2)的绿色信号共定位,证实探针专一富集在溶酶体(图8(b))。我们利用该探针有效区分了不同应激状态下溶酶体

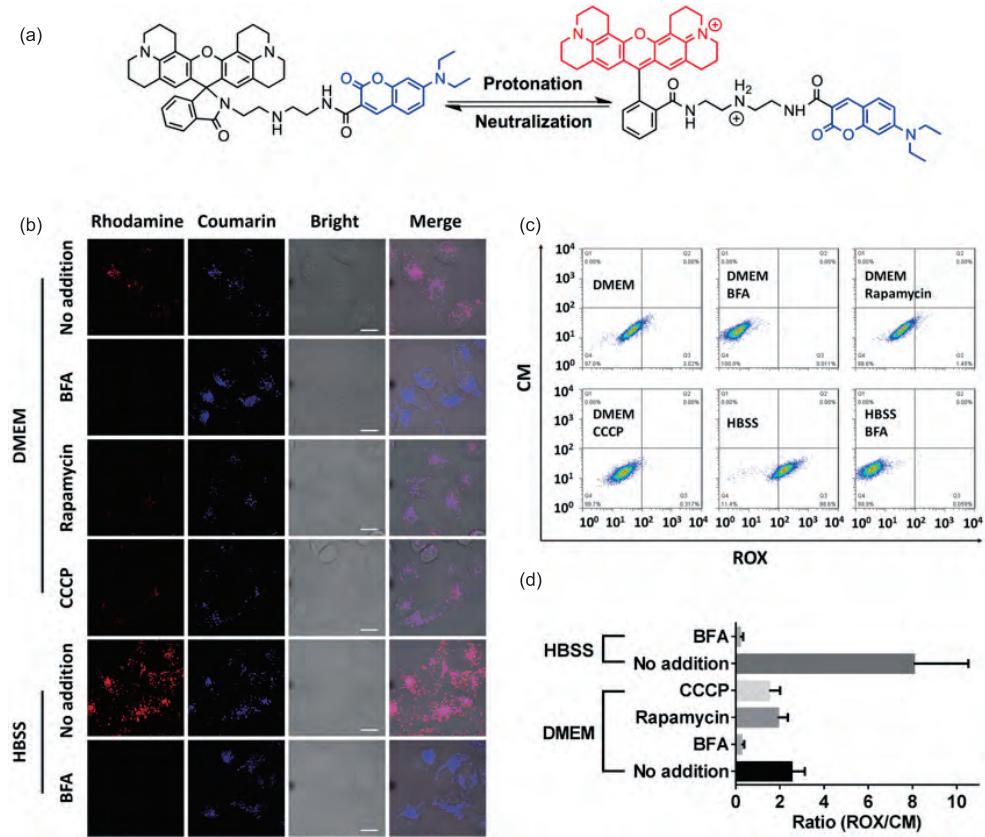


图8 比率探针CM-ROX用于溶酶体成像。(a) CM-ROX的酸响应机理;(b) CM-ROX在细胞应激条件下的分布;(c)基于CM-ROX的流式细胞仪对应激条件下溶酶体酸度变化的分析;(d)基于流式细胞仪的、细胞应激条件下溶酶体酸度变化的定量分析结果^[54](网络版彩图)

酸度的动态变化(如自噬、凋亡、病毒感染). 该探针的荧光性能与流式细胞仪兼容, 由此实现简便快捷分析溶酶体酸度的细微变化(图8(c), (d))^[54].

在过去几年, 相继涌现出了基于罗丹明衍生物的多种比率荧光小分子探针17~25(图9)^[55~63]. 这些具有不同荧光特性与pH响应性的探针为探索不同信号传导过程溶酶体pH的变化提供了无限机遇.

2.3.2 比率荧光纳米探针

蛋白、纳米颗粒和细菌等常通过内吞(endocytosis)过程导入细胞内部, 与溶酶体融合被消化降解. 溶酶体酸度对于自噬、内吞等生理过程至关重要. 我们将荧光素(FITC)与R6G-EDA装载至介孔硅材料制备得到了比率荧光纳米探针. 该探针通过细胞内吞作用跨膜运输至细胞内溶酶体^[64]. 探针的FITC荧光随pH降低而降低, 而R6G荧光随pH降低而增加, 通过FITC与R6G荧光比率实现了溶酶体酸度变化的灵敏检测. 通过流式细胞仪实验发现, L929细胞溶酶体酸度在细胞凋亡过程中较正常状态显著降低. 该研究证明了纳米探针用于溶酶体相关的生物医学研究的可行性. 利用基于内吞作用的溶酶体靶向策略, 随后Georgiev等^[65]和Kim等人^[66]发展了高分子载体比率荧光探针.

2.3.3 比率荧光细菌探针

免疫细胞通过胞吞(phagocytosis)吞噬致病菌形成

胞吞体. 胞吞体随后和溶酶体融合, 降解内含物. 胞吞作用构成了免疫防御机制的重要部分, 其成像研究对于相关疾病病理研究具有重要意义^[67]. 现有胞吞过程检测主要依赖于荧光标记微粒和GFP标记的大肠杆菌. 其缺点是“always-on”的荧光信号导致难以区分被胞吞的细菌与细胞外黏附的细菌^[68]. 另外, 该方法难以拓展到生物医学相关致病菌, 如金黄色葡萄球菌. Kuru等^[69]报道了D构型氨基酸可以被细菌的转肽酶有效识别并整合于细菌细胞壁的肽聚糖. 据此将酸响应比率荧光成像的概念进行延伸, 我们把荧光素标记的D构型赖氨酸(FITC-d-lysine)与ROX标记的D构型赖氨酸(ROX-lactam-d-lysine)通过代谢途径, 引入细菌胞壁, 得到比率荧光标记的活细菌, 用于细胞吞噬细菌的实时动态成像分析^[70]. 细菌在细胞外呈现FITC的绿色荧光, 被免疫细胞吞入溶酶体过程中, ROX被溶酶体酸度激活产生红色荧光, 实现全程跟踪细菌被胞吞的过程(图10)^[70]. 该策略解决了传统细菌胞吞分析低选择性和高背景信号的局限, 并可用于不同种类活细菌的分析(均具有细胞壁). 该方法保留了细菌外膜的天然结构, 这对于致病菌的机理研究有重要意义.

2.3.4 双细胞器响应比率荧光探针

线粒体膜电位($\Delta\psi_m$)是线粒体的一个核心特征, 是维持线粒体合成ATP的必要条件, 并和多种生命活动密切相关. $\Delta\psi_m$ 降低是细胞凋亡的重要前兆. $\Delta\psi_m$ 降低

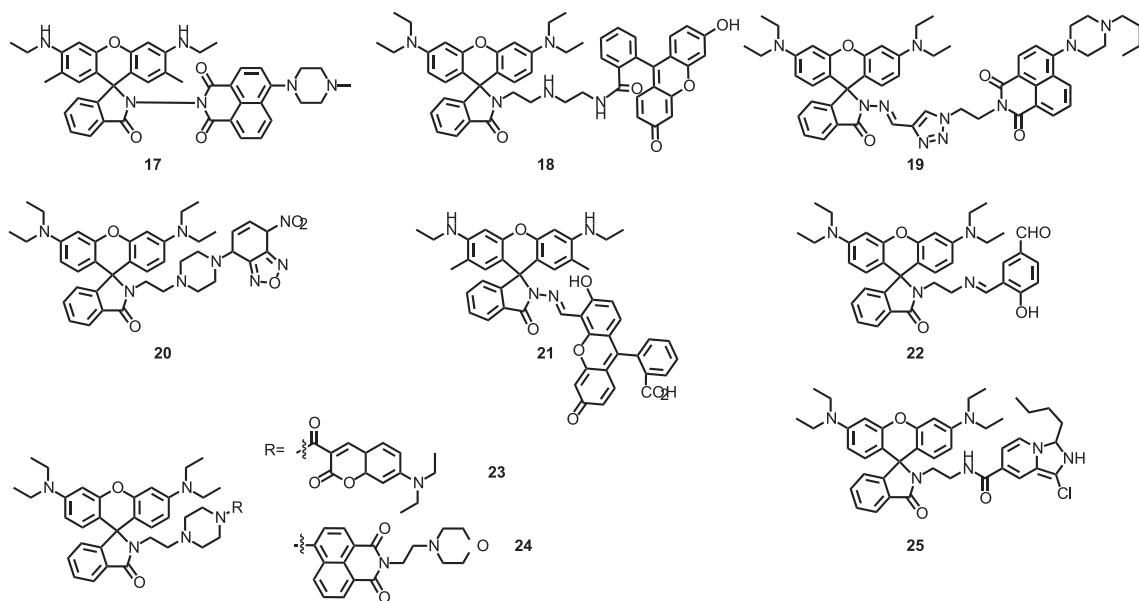


图9 基于罗丹明衍生物的酸响应比率荧光探针17~25^[55~63]

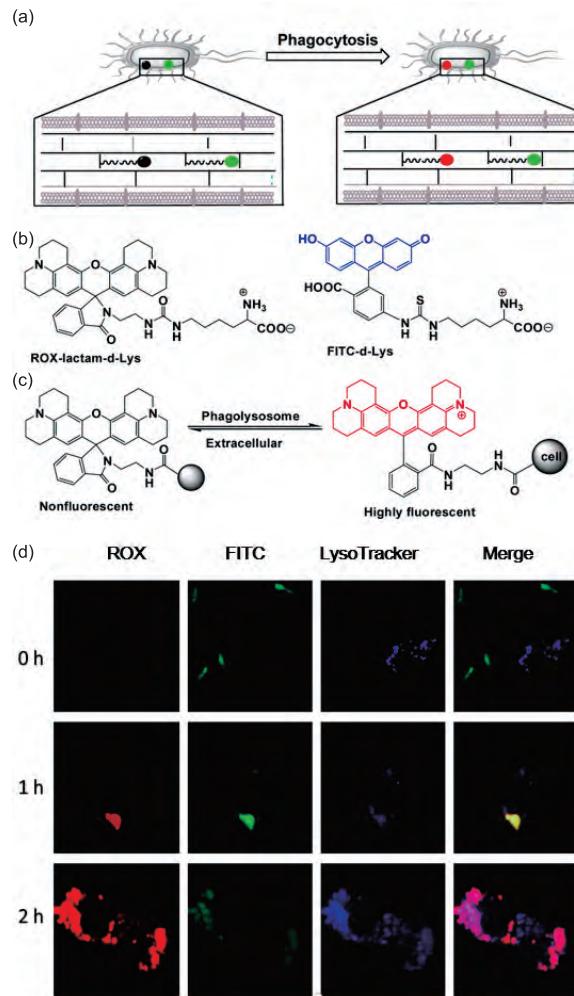


图 10 基于比率荧光策略的胞吞细菌过程成像. (a) 巨噬细胞胞吞荧光标记细菌过程信号变化示意图; (b) FITC-d-lysine与ROX-lactam-d-lysine的化学结构; (c) 通过代谢标记在细胞壁肽聚糖ROX-lactam的酸响应机理; (d) 比率荧光跟踪免疫细胞胞吞细菌过程成像, 细菌被吞噬到巨噬细胞溶酶体, 导致溶酶体激活红色ROX荧光^[70] (网络版彩图)

还经常伴随着线粒体形态和功能的变化, 导致活性氧产生乃至细胞死亡^[71]. 灵敏动态监测 $\Delta\psi_m$ 变化对研究线粒体功能具有重要意义^[72].

鉴于膜电位对于细胞稳态维持和代谢过程的重要作用, 我们发展了双细胞器响应比率荧光探针RC-TPP(图11). 该探针含有用以靶向线粒体的三苯基季𬭸(TPP)官能团作为内标荧光团的香豆素结构域、以及酸度响应的ROX结构域. RC-TPP的比率荧光信号在不同pH下变化明显, 可与绿色荧光蛋白(GFP)同时使用, 实现三色(蓝、绿、红)细胞成像分析(图9(a))^[73]. 细胞分析发现, RC-TPP有效集聚在线粒体内发出蓝色荧光. 当外界条件刺激下线粒体膜电位丧失时, 探针进

入溶酶体并被溶酶体酸度激活发出红色荧光. 我们利用该探针阐明了细胞在凋亡或坏死过程线粒体膜电位丧失和溶酶体膜通透性变化的动态关联: 凋亡过程中线粒体去极化先于溶酶体去极化发生, 细胞坏死过程中线粒体去极化晚于溶酶体去极化发生(图11(c), (d))^[73]. RC-TPP可有效监测线粒体膜电位丧失, 并区分细胞坏死与凋亡. 该探针为研究线粒体功能以及线粒体与溶酶体的功能互动提供了一种双细胞器响应的分析方法.

3 结论与展望

细胞器是细胞的结构与功能单元. 细胞器异常与

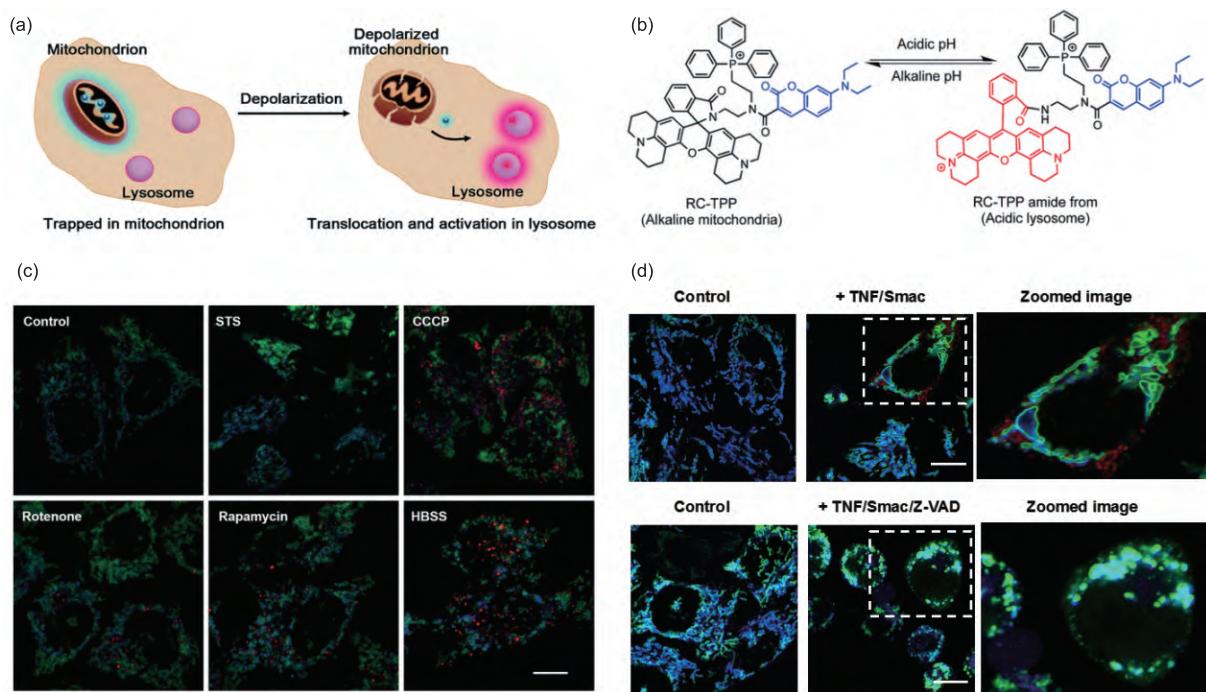


图 11 比率荧光探针RC-TPP分析线粒体 $\Delta\Psi_m$ 变化. (a) RC-TPP分析 $\Delta\Psi$ 变化的原理; (b) RC-TPP的酸响应机理; (c) lamp2-GFP标记人宫颈癌细胞系(HeLa)在不同应激条件下RC-TPP的荧光比率变化; (d) RC-TPP用于分析凋亡和坏死过程线粒体膜电位丧失与溶酶体膜通透性变化的动态关联^[73] (网络版彩图)

炎症、帕金森病等多种重大疾病密切关联。生命科学与医学急需用于细胞应激或疾病状态下细胞器变化的灵敏跟踪与分析方法。我们通过对一类含分子内螺环的罗丹明衍生物进行结构改造与功能化, 得到了一系列信号触发、具有不同荧光性能的溶酶体酸度成像探针。利用这些探针实现了应激过程溶酶体酸度与

线粒体膜电位变化的分析、免疫吞噬细菌过程跟踪及炎癌病灶的多模式活体成像。我们认为对理想生物分析探针的探索没有止境, 化学小分子探针不仅为相关生物医学动态细胞器分析提供新的研究手段与工具, 也将用于细胞器的功能调控。文中所述的信号触发探针无疑将在该研究领域占有一席之地。

参考文献

- Kraut JA, Madias NE. *Nat Rev Nephrol*, 2010, 6: 274–285
- Kogot-Levin A, Zeigler M, Ornoy A, Bach G. *Pediatr Res*, 2009, 65: 686–690
- Colacurcio DJ, Nixon RA. *Ageing Res Rev*, 2016, 32: 75–88
- Di A, Brown ME, Deriy LV, Li C, Szeto FL, Chen Y, Huang P, Tong J, Naren AP, Bindokas V, Palfrey HC, Nelson DJ. *Nat Cell Biol*, 2006, 8: 933–944
- Yu M, Wu X, Lin B, Han J, Yang L, Han S. *Anal Chem*, 2015, 87: 6688–6695
- Serrano-Puebla A, Boya P. *Ann NY Acad Sci*, 2016, 1371: 30–44
- <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/L7526>. 2017, Mar. 19
- Dujols V, Ford F, Czarnik AW. *J Am Chem Soc*, 1997, 119: 7386–7387
- Kim HN, Lee MH, Kim HJ, Kim JS, Yoon J. *Chem Soc Rev*, 2008, 37: 1465–1472
- Zhang W, Tang B, Liu X, Liu Y, Xu K, Ma J, Tong L, Yang G. *Analyst*, 2009, 134: 367–371
- Hasegawa T, Kondo Y, Koizumi Y, Sugiyama T, Takeda A, Ito S, Hamada F. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17: 6015–6019

- 12 Li Z, Wu S, Han J, Han S. *Analyst*, 2011, 136: 3698–3706
13 Yoshimori T, Yamamoto A, Moriyama Y, Futai M, Tashiro Y. *J Biol Chem*, 1991, 266: 17707–17712
14 Groth-Pedersen L, Ostenfeld MS, Hoyer-Hansen M, Nylandsted J, Jäättelä M. *Cancer Res*, 2007, 67: 2217–2225
15 Li Z, Song Y, Yang Y, Yang L, Huang X, Han J, Han S. *Chem Sci*, 2012, 3: 2941–2948
16 Xue Z, Chen M, Chen J, Han J, Han S. *RSC Adv*, 2014, 4: 374–378
17 Wu X, Tian Y, Yu M, Han J, Han S. *Biomater Sci*, 2014, 2: 972–979
18 Kang S, Kim S, Yang YK, Bae S, Tae J. *Tetrahedron Lett*, 2009, 50: 2010–2012
19 Best QA, Xu R, McCarroll ME, Wang L, Dyer DJ. *Org Lett*, 2010, 12: 3219–3221
20 Xie X, Li X, Ge Y, Qin Y, Chen HY. *Sensors Actuat B-Chem*, 2010, 151: 71–76
21 Yuan L, Lin W, Feng Y. *Org Biomol Chem*, 2011, 9: 1723–1726
22 Wang J, Yang Q, Song H, Zhang W. *Org Biomol Chem*, 2012, 10: 7677–7680
23 Yapici NB, Mandalapu SR, Chew TL, Khuon S, Bi L. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22: 2440–2443
24 Hu ZQ, Li M, Liu MD, Zhuang WM, Li GK. *Dyes Pigments*, 2013, 96: 71–75
25 Czaplyski WL, Purnell GE, Roberts CA, Allred RM, Harbron EJ. *Org Biomol Chem*, 2014, 12: 526–533
26 Liu L, Guo P, Chai L, Shi Q, Xu B, Yuan J, Wang X, Shi X, Zhang W. *Sensors Actuat B-Chem*, 2014, 194: 498–502
27 Devi M, Dhir A, Pradeep CP. *Eur J Org Chem*, 2015, 2015: 4650–4657
28 Ma P, Liang F, Wang D, Yang Q, Yang Z, Gao D, Yu Y, Song D, Wang X. *Dyes Pigments*, 2015, 122: 224–230
29 Iwatate RJ, Kamiya M, Urano Y. *Chem Eur J*, 2016, 22: 1696–1703
30 Li H, Li T, Zuo H, Xiao S, Guo M, Jiang M, Li Z, Li Y, Zou X. *RSC Adv*, 2016, 6: 94756–94762
31 Tan JL, Yang TT, Liu Y, Zhang X, Cheng SJ, Zuo H, He H. *Luminescence*, 2016, 31: 865–870
32 Yu H, Li G, Zhang B, Zhang X, Xiao Y, Wang J, Song Y. *Dyes Pigments*, 2016, 133: 93–99
33 Guo P, Liu L, Shi Q, Yin C, Shi X. *J Mol Struct*, 2017, 1130: 150–155
34 Li H, Guan H, Duan X, Hu J, Wang G, Wang Q. *Org Biomol Chem*, 2013, 11: 1805–1809
35 Lv HS, Huang SY, Zhao BX, Miao JY. *Anal Chim Acta*, 2013, 788: 177–182
36 Lv HS, Liu J, Zhao J, Zhao BX, Miao JY. *Sensors Actuat B-Chem*, 2013, 177: 956–963
37 Shi XL, Mao GJ, Zhang XB, Liu HW, Gong YJ, Wu YX, Zhou LY, Zhang J, Tan W. *Talanta*, 2014, 130: 356–362
38 Zhao XX, Chen XP, Shen SL, Li DP, Zhou S, Zhou ZQ, Xiao YH, Xi G, Miao JY, Zhao BX. *RSC Adv*, 2014, 4: 50318–50324
39 Zhao XX, Ge D, Dai X, Wu WL, Miao JY, Zhao BX. *Spect Acta Pt A-Molec Biomolec Sp*, 2015, 151: 218–224
40 Li B, Ge G, Wen L, Yuan Y, Zhang R, Peng X, Liu F, Sun S. *Dyes Pigments*, 2017, 139: 318–325
41 Xia MC, Cai L, Zhang S, Zhang X. *Anal Chem*, 2017, 89: 1238–1243
42 Zhu H, Fan J, Xu Q, Li H, Wang J, Gao P, Peng X. *Chem Commun*, 2012, 48: 11766–11768
43 Yu KK, Li K, Hou JT, Qin HH, Xie YM, Qian CH, Yu XQ. *RSC Adv*, 2014, 4: 33975–33980
44 Lv HS, Huang SY, Xu Y, Dai X, Miao JY, Zhao BX. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24: 535–538
45 Li H, Wang C, She M, Zhu Y, Zhang J, Yang Z, Liu P, Wang Y, Li J. *Anal Chim Acta*, 2015, 900: 97–102
46 Vigesna GK, Janjanam J, Bi J, Luo FT, Zhang J, Olds C, Tiwari A, Liu H. *J Mater Chem B*, 2014, 2: 4500–4508
47 Niu G, Zhang P, Liu W, Wang M, Zhang H, Wu J, Zhang L, Wang P. *Anal Chem*, 2017, 89: 1922–1929
48 Verheijen FW, Verbeek E, Aula N, Beerens CEMT, Havelaar AC, Joosse M, Peltonen L, Aula P, Galjaard H, van der Spek PJ, Mancini GMS. *Nat Genet*, 1999, 23: 462–465
49 Yuan L, Lin W, Yang Y, Chen H. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 1200–1211
50 Wu X, Yu M, Lin B, Xing H, Han J, Han S. *Chem Sci*, 2015, 6: 798–803
51 Kang JS, Kostov Y. *BMB Rep*, 2002, 35: 384–388
52 Li Z, Wu S, Han J, Yang L, Han S. *Talanta*, 2013, 114: 254–260
53 Yuste R. *Nat Meth*, 2005, 2: 902–904
54 Xue Z, Zhao H, Liu J, Han J, Han S. *ACS Sens*, 2017, 2: 436–442
55 Bojinov VB, Venkova AI, Georgiev NI. *Sensors Actuat B-Chem*, 2009, 143: 42–49
56 Lee MH, Han JH, Lee JH, Park N, Kumar R, Kang C, Kim JS. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 6206–6209
57 Fan J, Lin C, Li H, Zhan P, Wang J, Cui S, Hu M, Cheng G, Peng X. *Dyes Pigments*, 2013, 99: 620–626
58 Liu A, Hong M, Yang W, Lu S, Xu D. *Tetrahedron*, 2014, 70: 6974–6979
59 Liang F, Wang D, Ma P, Wang X, Song D, Yu Y. *Chem Res Chin Univ*, 2015, 31: 724–729
60 Yu KK, Hou JT, Li K, Yao Q, Yang J, Wu MY, Xie YM, Yu XQ. *Sci Rep*, 2015, 5: 15540

- 61 Zhang XF, Zhang T, Shen SL, Miao JY, Zhao BX. *RSC Adv*, 2015, 5: 49115–49121
 62 Zhang XF, Zhang T, Shen SL, Miao JY, Zhao BX. *J Mater Chem B*, 2015, 3: 3260–3266
 63 Song GJ, Bai SY, Dai X, Cao XQ, Zhao BX. *RSC Adv*, 2016, 6: 41317–41322
 64 Wu S, Li Z, Han J, Han S. *Chem Commun*, 2011, 47: 11276–11278
 65 Georgiev NI, Bryaskova R, Tzoneva R, Ugrinova I, Detrembleur C, Miloshev S, Asiri AM, Qusti AH, Bojinov VB. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21: 6292–6302
 66 Kim Y, Kim D, Jang G, Kim J, Lee TS. *Sensors Actuat B-Chem*, 2015, 207: 623–630
 67 Nüssle O. *Sci World J*, 2011, 11: 2364–2381
 68 Bicker H, Hoflich C, Wolk K, Vogt K, Volk HD, Sabat R. *Clin Chem*, 2008, 54: 911–915
 69 Kuru E, Hughes HV, Brown PJ, Hall E, Tekkam S, Cava F, de Pedro MA, Brun YV, VanNieuwenhze MS. *Angew Chem*, 2012, 124: 12687–12691
 70 Tian Y, Yu M, Li Z, Han J, Yang L, Han S. *Anal Chem*, 2015, 87: 8381–8386
 71 Lin MT, Beal MF. *Nature*, 2006, 443: 787–795
 72 Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA. *Biotech*, 2011, 50: 98–115
 73 Xue Z, Zhao H, Liu J, Han J, Han S. *Chem Sci*, 2017, 8: 1915–1921

Bio-imaging with a group of acid-responsive fluorescence-on probes

Jian Liu^{1*}, Zhongwei Xue¹, Hu Zhao¹, Jiahui Han^{2*}, Shoufa Han^{1*}

¹ Department of Chemical Biology, College of Chemistry and Chemical Engineering, State Key Laboratory for Physical Chemistry of Solid Surfaces, The Key Laboratory for Chemical Biology of Fujian Province, The MOE Key Laboratory of Spectrochemical Analysis & Instrumentation, Xiamen University, Xiamen 361102, China

² State Key Laboratory of Cellular Stress Biology, Innovation Center for Cell Signaling Network, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China

*Corresponding authors (email: jianliuxmu@xmu.edu.cn; jhan@xmu.edu.cn; Shoufa@xmu.edu.cn)

Abstract: pH is critical for diverse physiological activities. Disruption of pH homeostasis is pertinent to myriad pathological events. Particularly, the organelle-specific pH within mammalian cells is elaborately controlled and yet succumbs to pathological stress. Lysosomes are the major intracellular acidic compartments, and the lysosomal acidity is critical for diverse biological events. Aberrant lysosomal pH is manifested a broad spectrum of diseases ranging from inflammation to cancer metastasis, and to lysosomal storage diseases. As such, defining pH changes in specific pathological settings would be of use for biomedical investigations. Rhodamine-lactams, a group of nonfluorescent rhodamine derivatives featuring intramolecular spirolactam, are poised to proton triggered opening of the lactams to give fluorescent rhodamines, and has been widely used for lysosomal imaging in cell models. Herein we review the use of structurally modified rhodamine-lactams as acidity-reporting entities for bioimaging of distinct biological events, including host-pathogen interaction, cell death, autophagy, and mitochondrial depolarization in cells, and inflammation and tumors in mice models.

Keywords: fluorescence-on imaging, imaging of organelle responses, glyco-probes, *in vivo* tumour/inflammation imaging, ratiometric fluorescence imaging

doi: 10.1360/N032017-00058