

DOI: 10.20098/j.cnki.1001-5132.2025.0501

荧光探针用于细胞内谷胱甘肽检测与成像

张宇航¹, 张涛¹, 吴祥武¹, 喻盛容^{1,2}, 吴永祥^{1,2*}

(1.宁波大学 材料科学与化学工程学院, 浙江 宁波 315211; 2.镇海质谱研究院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 聚焦于新型荧光纳米探针的构建, 以牛血清白蛋白金纳米簇 (BSA@AuNCs) 作为荧光信号源, 利用树枝状大孔二氧化硅 (DSiO₂) 作为载体, 将 BSA@AuNCs 负载于 DSiO₂ 孔洞内。在此基础上, 通过精确调控高锰酸钾 (KMnO₄) 质量浓度, 在 DSiO₂ 表面原位生长出可降解的二氧化锰 (MnO₂) 纳米片, 最终成功制备出 DSiO₂-BSA@AuNCs@MnO₂ 荧光纳米探针。结果表明: 探针表面的 MnO₂ 可高效淬灭 BSA@AuNCs 荧光, 且能与谷胱甘肽 (GSH) 特异性反应, 促使 BSA@AuNCs 释放, 恢复荧光信号, 同时 DSiO₂-BSA@AuNCs@MnO₂ 荧光纳米探针对于 GSH 的检测展现出优秀特异性和高灵敏度, 可有效地用于 GSH 检测。当 KMnO₄ 质量浓度为 100.0 mg/L 以及 BSA@AuNCs 荧光淬灭原强度 89.30% 时, 并经 GSH 降解 MnO₂ 后, 其恢复的荧光强度可达初始强度的 81.34%。此外, 细胞实验进一步验证了该荧光纳米探针能对细胞内 GSH 进行高效的生物成像, 表明构建的 DSiO₂-BSA@AuNCs@MnO₂ 荧光纳米探针可以作为细胞内 GSH 检测和生物成像的有效工具。

关键词: 牛血清白蛋白金纳米簇; 树枝状大孔二氧化硅; 二氧化锰; 谷胱甘肽; 荧光纳米探针; 生物成像

中图分类号: O657.3; TB383 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-5132 (2025) 05-0096-09

在生物医学领域, 荧光探针凭借高灵敏度和特异性已成为疾病诊断、细胞研究等领域不可或缺的工具, 而荧光生物成像技术也已为医学研究提供了有效的技术手段^[1-4]。金纳米簇 (AuNCs) 因其独特的光学特性与优异的生物相容性, 成为了生物成像领域的研究热点^[5-9]。其中, 牛血清白蛋白修饰的金纳米簇 (BSA@AuNCs) 展现出优秀性能, 其纳米级别的超小尺寸赋予了 BSA@AuNCs 优异的荧光特性、稳定的信号输出和出色的组织穿透能力, 确保了成像过程中的高灵敏度与准确性。这种特性也使 BSA@AuNCs 成为了理想的生物成像信号源, 为后续的生物检测与成像应用提供了可靠保障, 在生物医学领域展现出较大的应用潜力^[10-12]。

树枝状大孔二氧化硅 (DSiO₂) 作为高效载体, 凭借良好的生物相容性、超高比表面积及较大的孔

径结构, 不仅能够实现 BSA@AuNCs 的高效负载, 还能提供稳定环境, 确保负载物活性与功能的完整性^[13-15]。此外, 由于肿瘤微环境 (TME) 相较于正常组织具有温和的偏酸性环境、呈现缺氧状态以及富含谷胱甘肽 (GSH, 0.01 mol/L) 等特征^[16-19], 使得针对肿瘤细胞 GSH 的高灵敏检测和生物成像研究具有重要意义^[20-21]。二氧化锰 (MnO₂) 在研究中具备多重优势。一方面, 其作为保护性屏障, 有效防止了内部负载物质在非肿瘤区域提前释放; 另一方面, 它能作为肿瘤微环境的特异性响应元件, 利用肿瘤组织中高浓度谷胱甘肽 (GSH) 的特性, 当荧光纳米探针进入肿瘤区域后, MnO₂ 可与 GSH 发生特异性氧化还原反应, 被还原为 Mn²⁺, 从而精准释放包裹物质^[22-23]。此特性充分利用了肿瘤微环境的独特性质, 通过 MnO₂ 门控系统实现对

收稿日期: 2025-05-01

宁波大学学报(理工版) 网址: <http://journal.g.nbu.edu.cn/>

基金项目: 浙江省自然科学基金 (LY23B050002)

第一作者: 张宇航, 硕士研究生, 主要研究方向为化学与生物传感。E-mail: 18858243281@163.com

*通信作者: 吴永祥, 副教授, 主要研究方向为化学与生物传感。E-mail: wuyongxiang@nbu.edu.cn

细胞中 GSH 的检测以及生物成像。

为构建一种能够对细胞内 GSH 精准响应,进而用于细胞成像的荧光纳米探针,本研究选用具备树枝状分支结构、高孔隙率以及优良生物相容性的 DSiO_2 作为载体,将 BSA@AuNCs 负载于 DSiO_2 的孔洞内部,通过优化高锰酸钾 (KMnO_4) 质量浓度,并严格控制反应温度、反应时间等实验条件,在 DSiO_2 - BSA@AuNCs 表面原位生长出 MnO_2 纳米片,并借助扫描电子显微镜 (SEM) 等手段进行形貌表征。所制备的 DSiO_2 - BSA@AuNCs@MnO_2 荧光纳米探针以金纳米簇为荧光信号,通过系统分析荧光强度变化,不仅确定了 KMnO_4 的最佳浓度范围,还深入研究了 GSH 触发的荧光信号响应机制。最终,本研究还进一步考察了该荧光纳米探针在细胞内的荧光成像性能,以期为细胞内 GSH 的高灵敏检测提供新的技术路径。

1 实验部分

1.1 原料

氯金酸 ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)、谷胱甘肽 (GSH)、牛血清白蛋白 (BSA)、高锰酸钾 (KMnO_4)、氯化锰 (MnCl_2) 购自阿拉丁试剂有限公司。氢氧化钠 (NaOH)、三乙醇胺 (TEA)、正硅酸四乙酯 (TEOS)、十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 和水杨酸钠购自国药集团化学试剂有限公司。3-氨基丙基三乙基氧基硅烷 (APTES)、乙醇、PBS (10.0 mmol/L, pH=7.4) 由上海生工生物工程股份有限公司提供。4-(2-羟乙基)哌嗪-1-乙磺酸 (Hepes)、2-(N-吗啉代)乙磺酸缓冲液 (MES)、三(羟甲基)氨基甲烷-乙二胺四乙酸缓冲液 (TE)、三(羟甲基)氨基甲烷缓冲液 (Tris)、氯化钾 (KCl)、氯化钠 (NaCl)、硫酸锌 (ZnSO_4)、硝酸钾 (KNO_3) 购自麦克林公司。甘氨酸 (Gly)、半胱氨酸 (Cys) 和谷氨酸 (Glu) 购自索宝莱试剂公司。RPMI 1640 培养基购自康宁公司。在整个实验中使用的超纯水均由美国 Millipore 系统进行纯化。

1.2 材料制备

1.2.1 BSA@AuNCs 的制备

将 5.0 mL $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 水溶液 (10.0 mmol/L) 与 5.0 mL BSA 水溶液 (50 g/L) 混合,剧烈搅拌 5 min,然后用 0.5 mol/L NaOH 水溶液缓慢调整混

合物的 pH 值为 12,在 37.0 °C 搅拌 15 h 直到亮黄色溶液变成红棕色,表明牛血清白蛋白金纳米簇 (BSA@AuNCs) 已合成完毕。最后,使用透析袋 (MWCO 10 000.0 Da) 去除杂质,透析后的 BSA@AuNCs 保持在 -4 °C 环境中,用于后续使用。

1.2.2 DSiO_2 的制备

将 136.0 mg 三乙醇胺加入 50.0 mL 去离子水中,80 °C 下搅拌 30 min,然后将 350.0 mg 水杨酸钠和 608.0 mg 十六烷基三甲基溴化铵加入上述溶液中,持续搅拌 1 h 后,缓慢加入 4.0 mL 正硅酸乙酯,在 80 °C 下搅拌 3 h。最后经离心和洗涤得到产物。将产物用甲醇/盐酸 (体积比=1:1) 重新分散以去除表面活性剂,再用乙醇稀释混合物,并离心收集沉淀物。将沉淀物分散于 100.0 mL 乙醇中备用。然后将 5.0 mL APTES 和 100.0 mg DSiO_2 加入 100.0 mL 乙醇中,加热回流 24 h 后,用水和乙醇交替洗涤 3 次。产物 80 °C 下干燥后,最终得到白色粉末状的氨基化树枝状大孔二氧化硅 (DSiO_2)。

1.2.3 DSiO_2 - BSA@AuNCs 、 DSiO_2 - BSA@AuNCs@MnO_2 的制备

将 1.0 mg DSiO_2 与 2.0 mg BSA@AuNCs 在 2.0 mL 水中混合,于 25.0 °C 避光振荡 24 h 后,通过多次离心后收集沉淀。通过测量上清液的荧光强度,计算出 BSA@AuNCs 的封装率和负载率。将所获产物添加到 2.0 mL 去离子水中,以获得产物的水分散液。然后将 2.0 μL APTES 加入 2.0 mL 上述分散液中,并在 35.0 °C 下剧烈搅拌悬浮液 30 min,再次加入 2.0 μL APTES 搅拌 30 min。重复离心后,用去离子水洗涤。随后加入高锰酸钾 (KMnO_4) 溶液,将混合物涡旋 3 min,搅拌 30 min。最后用去离子水纯化所得产物,以备后续使用。合成制备过程如图 1 所示。

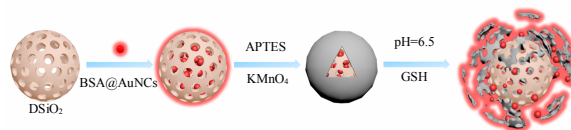


图1 DSiO_2 - BSA@AuNCs@MnO_2 的合成与对 GSH 的检测原理示意图

1.3 表征与测试

BSA@AuNCs 稳定性测试:在不同 pH 溶液中,配制相同浓度的 BSA@AuNCs 溶液;在不同缓冲

溶液中, 配制相同浓度的 BSA@AuNCs 溶液。将 BSA@AuNCs 溶液放置于 -4°C 冰箱内, 在不同时间 (0、6、12、24、48、168、720 h) 取出样品。使用荧光分光光度计 (RF-6000, 日本岛津), 将激发波长设定为 520 nm, 对溶液进行荧光强度测量。DSiO₂-BSA@AuNCs@MnO₂ 吸光度测量采用 UV-1800 分光光度计 (日本岛津), 表面形貌与成分分析在 US-70 扫描电子显微镜 (日本日立) 上进行, 动态光散射 (DLS) 分析和 Zeta 电位分析在 Nano ZS90 (英国马尔文) 上进行, 傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 分析在 Nicolet 6700 (美国) 上进行, 利用 FV3000 共聚焦激光扫描显微镜 (日本奥林巴斯) 进行细胞共聚焦荧光成像。

1.4 二氧化锰的原位生成和荧光恢复

通过加入不同质量浓度 (10、30、50、70、100、200 mg/L) 的高锰酸钾, 在 DSiO₂-BSA@AuNCs 表面原位生成二氧化锰, 以猝灭 BSA@AuNCs 的荧光, 然后加入谷胱甘肽 (GSH), 降解表面的二氧化锰, 并测量荧光强度。使用 RF-6000 荧光分光光度计对溶液进行荧光强度测量, 激发波长设定为 520 nm。不断优化条件, 选取最佳的高锰酸钾浓度。

2 结果与讨论

2.1 样品的 SEM 和流体动力学尺寸表征

制备的 DSiO₂、DSiO₂-BSA@AuNCs 及 DSiO₂-BSA@AuNCs@MnO₂ 结构形貌通过 SEM 表征, 结果如图 2 所示。由图 2 (a) ~ (b) 可见, DSiO₂ 呈现出大孔硅特有的多孔结构。由图 2 (c) ~ (d) 可

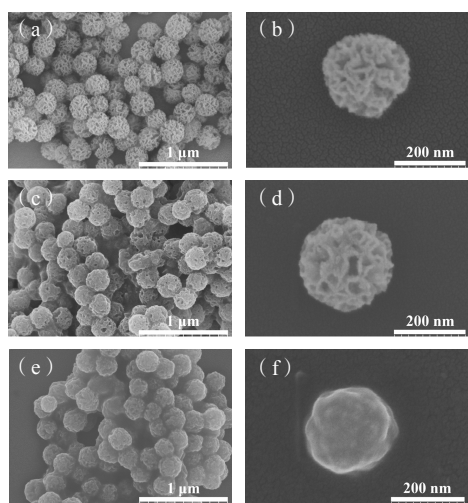


图 2 样品的 SEM 图

见, 当装载 BSA@AuNCs 后, 样品表面形态发生明显变化, 其表面孔径处有物质附着。由图 2 (e) ~ (f) 清晰可见, MnO₂ 纳米片原位生成并成功包裹 DSiO₂-BSA@AuNCs 体系, 此时样品表面几乎观察不到孔隙, MnO₂ 纳米片紧密覆盖载体表面, 有效阻断了孔道, 从而防止 BSA@AuNCs 的泄漏。同时流体动力学尺寸 (图 3) 数据显示 BSA@AuNCs 大小为 2~3 nm, 具备纳米级别超小尺寸, 更有利于其高效负载于 DSiO₂ 孔径内 (图 4)。在 DSiO₂-BSA@AuNCs 的表面原位生成二氧化锰后, 粒径从约 210 nm 增至约 270 nm (图 5~6)。结合结构形貌与尺寸数据, 证明 DSiO₂-BSA@AuNCs@MnO₂ 荧光纳米探针制备成功。

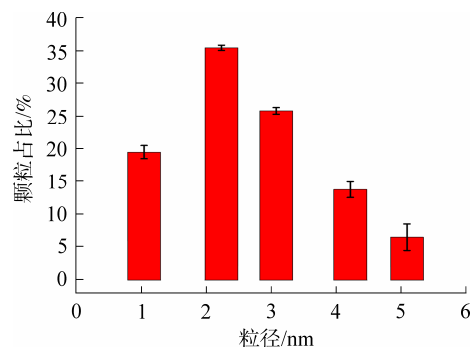


图 3 BSA@AuNCs 的流体动力学尺寸分布

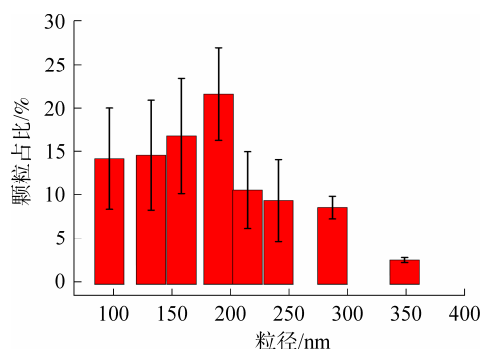


图 4 DSiO₂ 的流体动力学尺寸分布

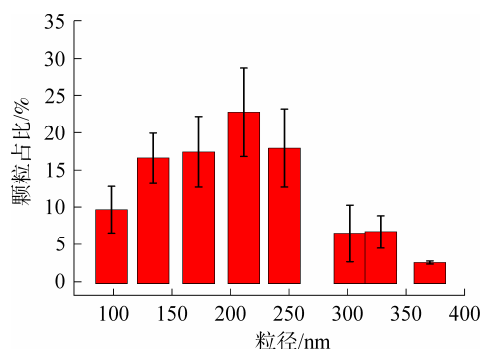
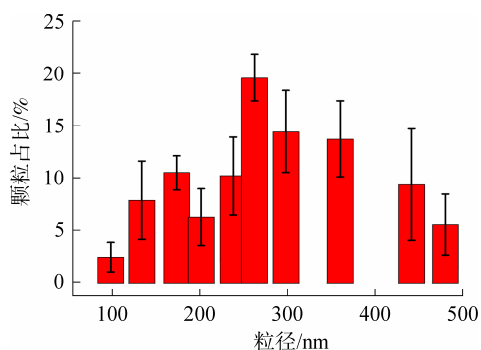


图 5 DSiO₂-BSA@AuNCs 的流体动力学尺寸分布

图6 DSiO₂-BSA@AuNCs@MnO₂的流体动力学尺寸分布

2.2 紫外-可见吸收光谱、红外光谱、电位和能谱分析

在样品紫外-可见吸收光谱(图7)中,BSA@AuNCs于280 nm处呈现出与牛血清白蛋白相关的明显吸收峰。MnO₂存在较宽吸收峰,此特性使其能够有效猝灭BSA@AuNCs的荧光。DSiO₂-BSA@AuNCs@MnO₂吸收峰融合了各组成样品特征,有力地证明了其已被成功合成。此外,在样品红外光谱(图8)中,BSA@AuNCs的C—H伸缩振动吸收峰和酰胺I带特征峰与BSA分子结构有关,MnO₂的Mn—O键特征吸收峰体现其化学键特性,DSiO₂的Si—O—Si强吸收峰则明确了其硅氧键结构,DSiO₂-BSA@AuNCs@MnO₂因相互作用,体

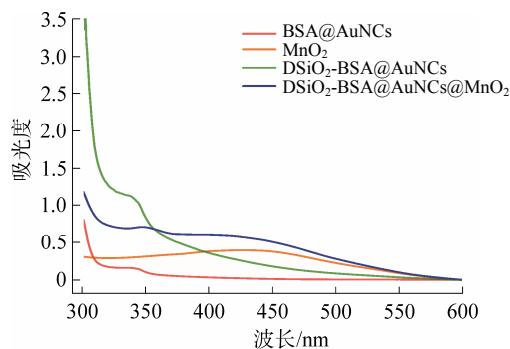


图7 样品的紫外-可见吸收光谱

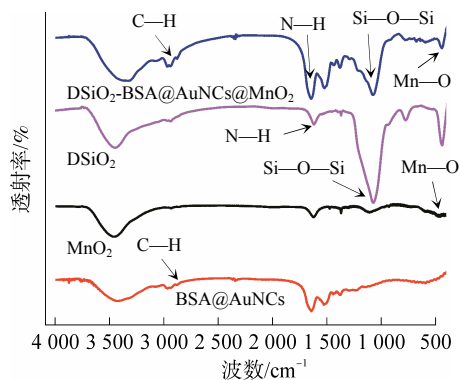


图8 样品的红外光谱

现出样品的特征峰,有助于剖析样品的化学键组成。如图9所示,在样品电位变化中,当表面电位-6.4 mV的BSA@AuNCs负载到氨基化的DSiO₂中时,表面电位变为3.1 mV,而当原位生成二氧化锰纳米片后,又转变为-15.2 mV。样品的能量色散谱(图10)与SEM谱相结合后,可分析出DSiO₂-BSA@AuNCs@MnO₂样品含C、N、O、Si、Au、Mn元素。以上实验都有力证实了BSA@AuNCs的成功负载以及与MnO₂的成功合成。

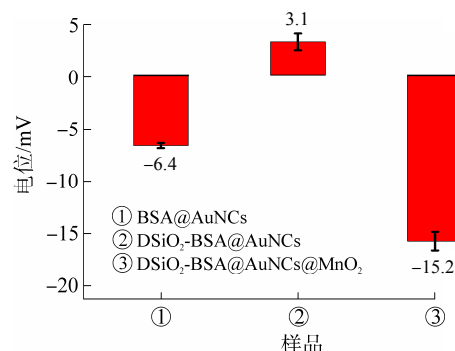


图9 不同样品的电位变化

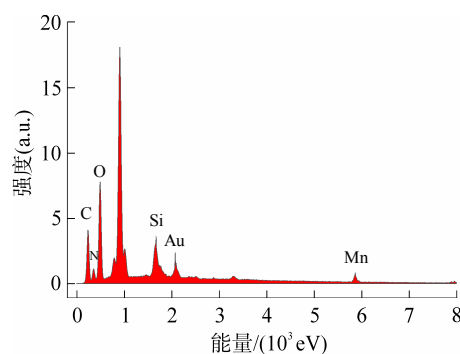


图10 样品的能量色散谱

2.3 BSA@AuNCs的荧光性能分析

图11为BSA@AuNCs紫外灯照射下的发光图及荧光发射光谱。BSA@AuNCs在紫外灯照射下,显示出明显荧光,其荧光光谱激发波长为520 nm,发射波长为710 nm,具有较大的斯托克斯位移,此特性使其可进一步应用于荧光生物成像。对BSA@AuNCs在不同时间、不同pH值及不同缓冲溶液条件下的荧光强度进行测试。对放置不同时间的BSA@AuNCs荧光强度进行测定,结果表明其稳定性较好,放置数天,其荧光强度几乎不变(图12)。不同pH下AuNCs的荧光强度曲线显示,荧光差别基本很小(图13)。在PBS、Hepes、MES、TE、Tris、1640等缓冲溶液中,BSA@AuNCs的荧光强

度也无太大差异(图14)。以上数据均表明,BSA@AuNCs 具有优异的荧光稳定性。通过处理不同质量比例下的 BSA@AuNCs 和 DSiO₂, 并测量负载

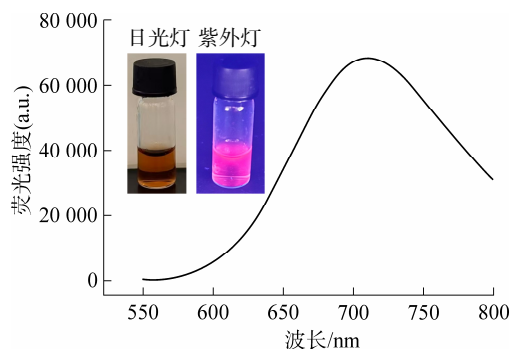


图11 BSA@AuNCs 的荧光发射光谱

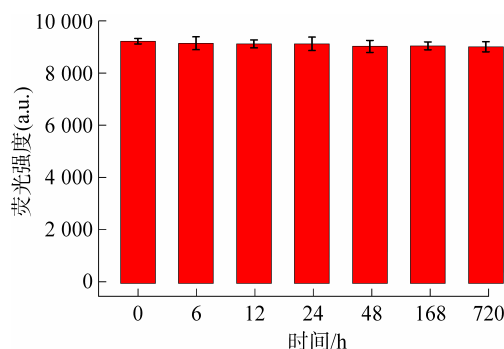


图12 不同时间下 BSA@AuNCs 的荧光发射强度

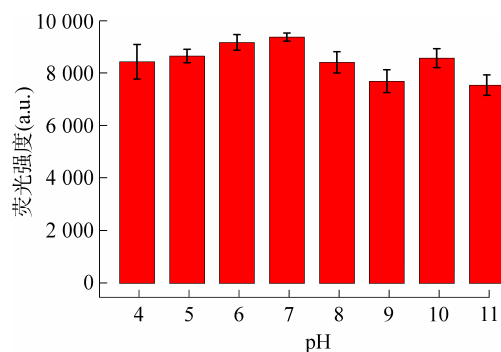


图13 不同 pH 下 BSA@AuNCs 的荧光发射强度

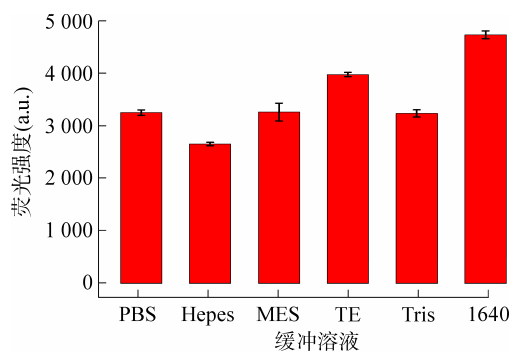


图14 不同缓冲溶液下 BSA@AuNCs 的荧光发射强度

后上清液的荧光强度,计算得到不同比例下的包封率和负载率(图15~16)。结果表明,当BSA@AuNCs:DSiO₂=2:1 时,BSA@AuNCs 包封率达到 91.40%,负载率达到 64.64%。此结果不仅进一步确定了最佳样品比例,同时也证实 DSiO₂ 具有大孔径结构优势,能够实现大量 BSA@AuNCs 的高效负载。

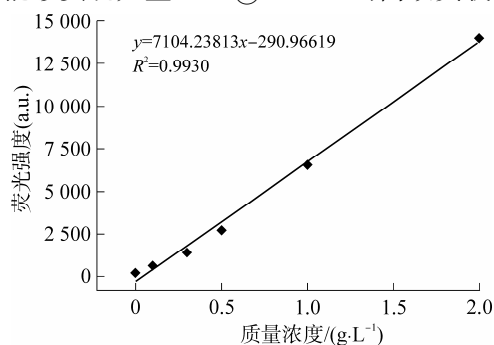


图15 BSA@AuNCs 的质量浓度曲线

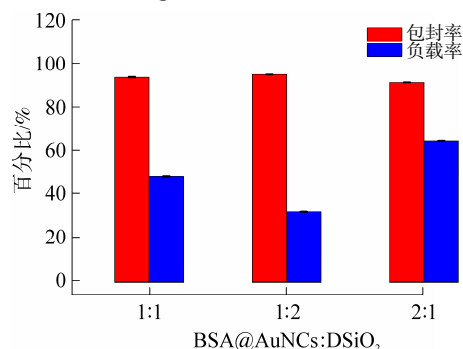


图16 BSA@AuNCs:DSiO₂ 不同质量比下 BSA@AuNCs 的包封率及负载率

2.4 GSH 的检测探究

图17展示了不同质量浓度KMnO₄所生成的MnO₂对BSA@AuNCs的猝灭作用,以及加入谷胱甘肽(GSH)后的荧光恢复情况。从图17可见,当加入质量浓度为100.0 mg/L的KMnO₄后,荧光强度猝灭了初始荧光强度的89.30%;而在GSH降解MnO₂后,荧光恢复至初始强度的81.34%,此时效果最佳。实验结果表明,在将BSA@AuNCs负载到DSiO₂并原位生成MnO₂后,BSA@AuNCs能够被有效猝灭。随后,考察不同pH条件下的荧光恢复情况。在pH=7.4(图18)与pH=6.5(图19)条件下,无GSH时,DSiO₂-BSA@AuNCs@MnO₂荧光探针的荧光几乎不恢复;当经GSH(pH=6.5, 10 mmol/L)处理后,MnO₂发生降解,DSiO₂-BSA@AuNCs@MnO₂荧光探针在10 min后达到稳定状态,并释放出大量BSA@AuNCs,使荧光强度显著

增加(图 20~21)。接下来评估 DSiO₂-BSA@AuNCs@MnO₂ 荧光纳米探针针对 GSH 的特异性,考察其与多种物质(KCl、MnCl₂、NaCl、ZnSO₄、KNO₃、甘氨酸(Gly)、半胱氨酸(Cys)、谷氨酸(Glu))的响应。图 22 结果显示,当存在 GSH 时,荧光纳米探针的荧光强度显著提高,而仅含有其他物质时,荧光强度无明显变化。上述实验结果表明,该

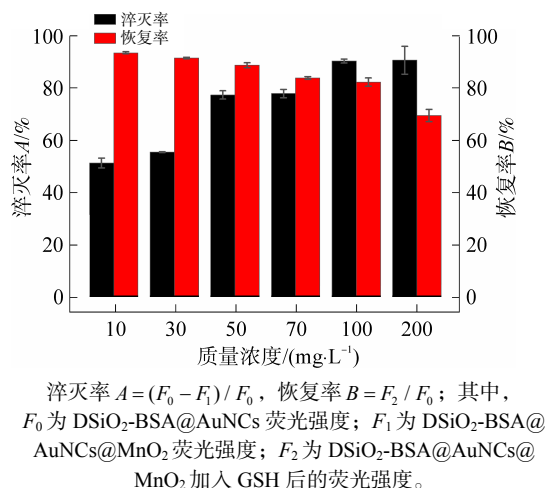


图 17 DSiO₂-BSA@AuNCs 与不同质量浓度 KMnO₄ 反应后的荧光淬灭率及加入 GSH 后的荧光恢复率

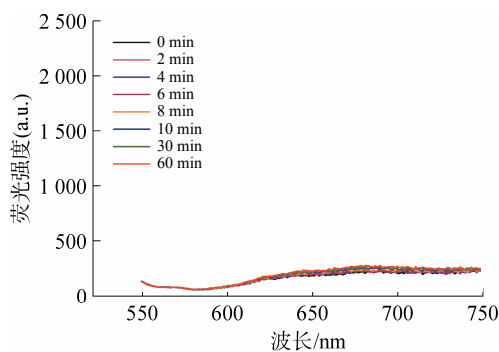


图 18 DSiO₂-BSA@AuNCs@MnO₂ 在 pH=7.4 条件下不同时间的荧光谱

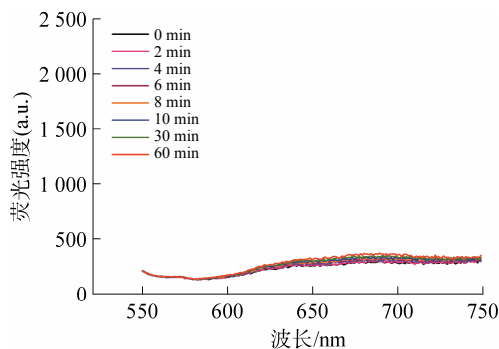


图 19 DSiO₂-BSA@AuNCs@MnO₂ 在 pH=6.5 条件下不同时间的荧光谱

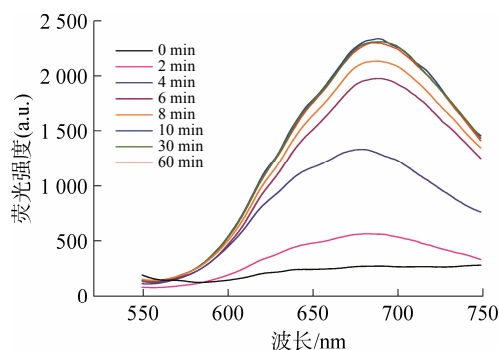


图 20 DSiO₂-BSA@AuNCs@MnO₂ 在不同时间下对 GSH (pH=6.5, 10 mmol/L) 响应的荧光谱

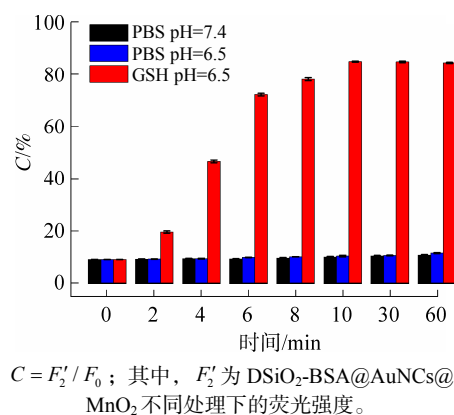


图 21 DSiO₂-BSA@AuNCs@MnO₂ 在不同条件下处理下的荧光比例

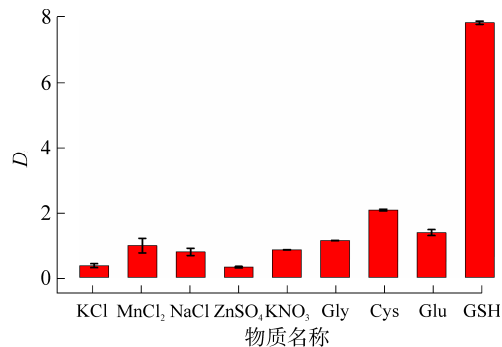


图 22 DSiO₂-BSA@AuNCs@MnO₂ 对不同物质的荧光响应

荧光纳米探针具有较高的选择性,能够在复杂生理环境中实现对 GSH 的高效检测。如图 23 所示,DSiO₂-BSA@AuNCs@MnO₂ 荧光纳米探针针对 GSH 不同浓度下的荧光响应研究表明,随着 GSH 浓度的增加,DSiO₂-BSA@AuNCs@MnO₂ 荧光强度显著增强。此外,通过探针与 GSH (0~1 000 μmol/L) 浓度间的线性关系(图 24),得出检测下限(LOD)

为 $40.03 \mu\text{mol/L}$ ($R^2=0.9704$), 由此发现该探针最低检测限的浓度远远小于肿瘤细胞中内源性 GSH 的浓度 ($0.5\sim 10 \text{ mmol/L}$)。最后的结果表明, 本研究已成功制备了一种用于高灵敏检测 GSH 的荧光探针, 能使 GSH 迅速降解表面的 MnO_2 , 恢复其荧光能力, 从而为细胞成像奠定基础。

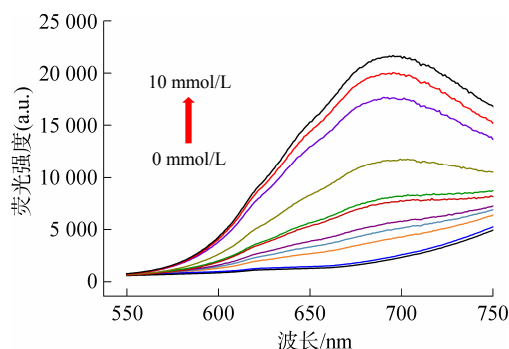


图 23 $\text{DSiO}_2\text{-BSA@AuNCs@MnO}_2$ 在不同浓度 GSH ($0\sim 10 \text{ mmol/L}$) 存在下的荧光谱图

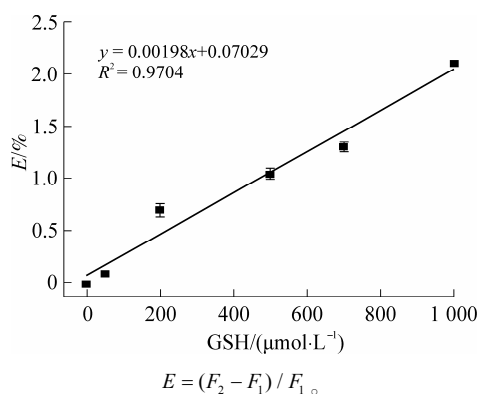


图 24 $\text{DSiO}_2\text{-BSA@AuNCs@MnO}_2$ 的荧光强度比例与 GSH 浓度之间的线性关系

2.5 细胞内 GSH 的成像探究

上述实验已经充分说明 $\text{DSiO}_2\text{-BSA@AuNCs@MnO}_2$ 荧光纳米探针能够检测溶液中的 GSH, 因此对该探针在细胞内对 GSH 的检测和成像进行进一步探究。首先, 将 HCT116 细胞接种于 24 孔板内, 采用 RPMI-1640 培养基进行培养。待细胞贴壁生长以后, 加入质量浓度 100.0 mg/L $\text{DSiO}_2\text{-BSA@AuNCs@MnO}_2$ 荧光探针, 并孵育 9 h。待孵育结束后, 小心去除培养基, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 轻柔洗涤细胞 3 次, 充分去除未结合的探针。随后, 使用 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min, 使细胞形态得以稳定保存。利用奥林巴斯共聚焦显微镜在 514 nm 激发光下获取细胞的荧光共聚焦成像。如图 25 所

示, 加入荧光纳米探针组的细胞内呈现出显著的红色荧光, 而空白对照组细胞几乎未见荧光信号。进一步对荧光强度灰度值进行分析, 如图 26 所示, 经 $\text{DSiO}_2\text{-BSA@AuNCs@MnO}_2$ 处理后的细胞荧光强度显著高于空白 HCT116 细胞。该实验结果说明, $\text{DSiO}_2\text{-BSA@AuNCs@MnO}_2$ 荧光纳米探针可用于细胞内 GSH 的高效荧光成像, 为细胞内 GSH 检测提供了一种新的技术手段。

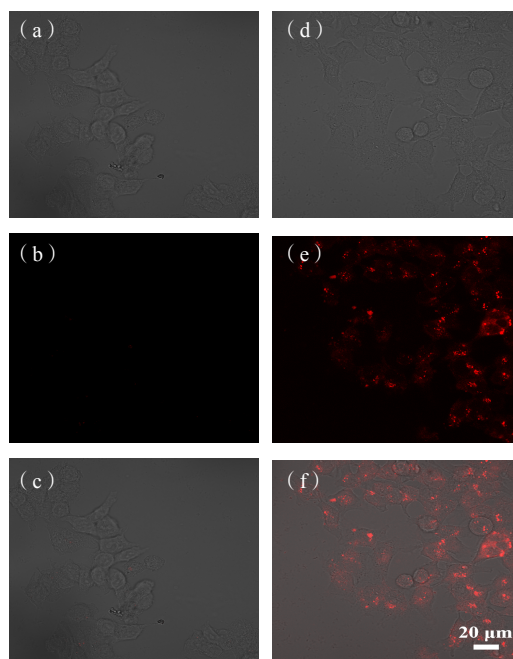


图 25 HCT116 空白细胞共聚焦荧光成像图 (a~c) 和 HCT116 空白细胞与 $\text{DSiO}_2\text{-BSA@AuNCs@MnO}_2$ (100.0 mg/L) 孵育后的共聚焦荧光成像图 (d~f)

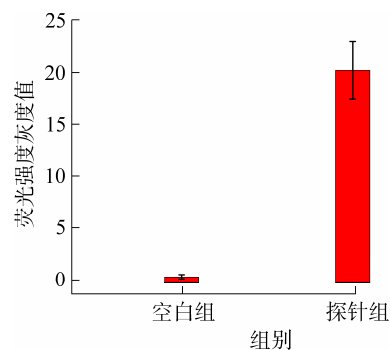


图 26 HCT116 空白细胞 (空白组) 和 HCT116 空白细胞与 $\text{DSiO}_2\text{-BSA@AuNCs@MnO}_2$ (100.0 mg/L , 探针组) 孵育后的细胞共聚焦成像的荧光强度灰度值

3 结论

基于金纳米簇, 在 $\text{DSiO}_2\text{-BSA@AuNCs}$ 外表

面原位生成 MnO_2 , 制备出 $\text{DSiO}_2\text{-BSA@AuNCs@MnO}_2$ 荧光纳米探针, 得出以下结论: (1) 将 BSA@AuNCs 负载到 DSiO_2 中, 质量比例为 2:1 时, BSA@AuNCs 负载率达到最佳 (64.64%), 在此基础上原位生成 MnO_2 后, BSA@AuNCs 荧光能被有效猝灭; (2) KMnO_4 最佳质量浓度为 100.0 mg/L, 此浓度下 KMnO_4 生成的 MnO_2 可使 BSA@AuNCs 荧光猝灭初始荧光强度的 89.30%, GSH 存在时, 在降解 MnO_2 后, 会释放出大量 BSA@AuNCs , 其荧光可恢复至初始荧光强度的 81.34%; (3) $\text{DSiO}_2\text{-BSA@AuNCs@MnO}_2$ 荧光纳米探针对于 GSH 的检测展现出优秀特异性和高灵敏度; (4) 该荧光纳米探针能对细胞内 GSH 进行精准荧光成像。综上, 本研究成功制备出一种基于金纳米簇的荧光纳米探针, 可用于 GSH 高灵敏检测和精准生物成像研究, 有望推动生物医学领域中 GSH 相关检测与成像技术的进一步发展。未来研究中, 可进一步依据 GSH 响应性 MnO_2 的降解特性, 拟在 DSiO_2 孔道内实现成像试剂和药物共同负载, 构建“ GSH 响应的生物成像引导-药物可控释放”的诊疗一体化体系。利用肿瘤微环境中高浓度 GSH 触发 MnO_2 降解, 进而释放负载药物, 拟实现生物成像引导下的肿瘤精准治疗, 为肿瘤诊疗一体化提供新策略。

参考文献:

- [1] ZHAO Q, PIAO J F, PENG W P, et al. Simple and sensitive quantification of microRNAs via PS@Au microspheres-based DNA probes and DSN-assisted signal amplification platform[J]. ACS applied materials & interfaces, 2018, 10(4):3324-3332.
- [2] YANG Y Y, YU Y J, CHEN H, et al. Illuminating platinum transportation while maximizing therapeutic efficacy by gold nanoclusters via simultaneous near-infrared- I /II imaging and glutathione scavenging[J]. ACS nano, 2020, 14(10):13536-13547.
- [3] ZHANG J, ZOU H, GAN S F, et al. Endowing AIE with extraordinary potential: a new Au(I)-containing AIEgen for bimodal bioimaging-guided multimodal synergistic cancer therapy[J]. Advanced functional materials, 2022, 32(2):2108199.
- [4] ZHANG Q, LI S S, FU C X, et al. Near-infrared mito-specific fluorescent probe for ratiometric detection and imaging of alkaline phosphatase activity with high sensitivity[J]. Journal of materials chemistry B, 2019, 7(3):443-450.
- [5] LI Z, PENG H B, LIU J L, et al. Plant protein-directed synthesis of luminescent gold nanocluster hybrids for tumor imaging[J]. ACS applied materials & interfaces, 2017, 10(1):83-90.
- [6] LI Y, CAO Y, WEI L, et al. The assembly of protein-templated gold nanoclusters for enhanced fluorescence emission and multifunctional applications[J]. Acta biomaterialia, 2020, 101:436-443.
- [7] MATUS M F, HÄKKINEN H. Atomically precise gold nanoclusters: towards an optimal biocompatible system from a theoretical: experimental strategy[J]. Small, 2021, 17(27):2005499.
- [8] ZHAO Y, SONG Y, XU H Y. Gold nanocluster hybrid nanomaterials: alloying and nanocomposite for fluorescence detection in food, environment, and healthcare[J]. Chemical engineering journal, 2025, 509:161331.
- [9] 钟文成, 郭文锋, 尚利. 荧光金纳米团簇探针的生物成像应用进展(特邀)[J]. 红外与激光工程, 2022, 51(11): 38-47.
- [10] DING C F, XU Y J, ZHAO Y N, et al. Fabrication of BSA@AuNC-based nanostructures for cell fluorescence imaging and target drug delivery[J]. ACS applied materials & interfaces, 2018, 10(10):8947-8954.
- [11] YANG Y, LEI Y J, ZHANG X R, et al. A ratiometric strategy to detect hydrogen sulfide with a gold nanoclusters based fluorescent probe[J]. Talanta, 2016, 154: 190-196.
- [12] WANG M, LIU R J, LI J B, et al. Self-illuminating near-infrared chemiluminescence nanosensors for tumor imaging[J]. ACS applied nano materials, 2024, 7(11): 13809-13819.
- [13] XU D C, LEI D C, WANG D Y, et al. Dendritic mesoporous nanoparticles: structure, synthesis and properties[J]. Angewandte chemie international edition, 2022, 61(12):e202112752.
- [14] HUANG Y T, SHEN K W, SI Y S, et al. Dendritic organosilica nanospheres with large mesopores as multi-guests vehicle for photoacoustic/ultrasound imaging-guided photo- dynamic therapy[J]. Journal of colloid and interface science, 2021, 583:166-177.
- [15] HUANG L, LIAO T, WANG J, et al. Brilliant pitaya-type silica colloids with central-radial and high-density quantum dots incorporation for ultrasensitive fluorescence immunoassays[J]. Advanced functional materials, 2018, 28(4):1705380.
- [16] WAN D X, ZHONG H, PAN D W, et al. Programmed

- release of dihydroartemisinin for synergistic cancer therapy using a CaCO_3 mineralized metal-organic framework[J]. *Angewandte chemie international edition*, 2019, 58(40):14134-14139.
- [17] IYER R, NGUYEN T, PADANILAM D, et al. Glutathione-responsive biodegradable polyurethane nanoparticles for lung cancer treatment[J]. *Journal of controlled release*, 2020, 321:363-371.
- [18] LI Y, ZHANG L B, ZHANG Z, et al. MnO_2 nanospheres assisted by cysteine combined with MnO_2 nanosheets as a fluorescence resonance energy transfer system for “switch-on” detection of glutathione[J]. *Analytical chemistry*, 2021, 93(27):9621-9627.
- [19] CHEN F, ZHANG J, QU W, et al. Development of a novel benzothiadiazole-based fluorescent turn-on probe for highly selective detection of glutathione over cysteine/homocysteine[J]. *Sensors and actuators B: chemical*, 2018, 266:528-533.
- [20] WANG W, HOU X S, LI X, et al. An ultra-sensitive fluorescent “turn on” biosensor for glutathione and its application in living cells[J]. *Analytica chimica acta*, 2018, 998:45-51.
- [21] 颜范勇, 臧悦言, 章宇扬, 等. 检测谷胱甘肽的荧光探针[J]. *化学进展*, 2022, 34(5):1136-1152.
- [22] WANG Y Q, SHANG W T, ZHONG H S, et al. Tumor vessel targeted self-assemble nanoparticles for amplification and prediction of the embolization effect in hepatocellular carcinoma[J]. *ACS nano*, 2020, 14(11):14907-14918.
- [23] SANG F M, LI M L, YIN S Y, et al. Highly sensitive and selective detection and intracellular imaging of glutathione using MnO_2 nanosheets assisted enhanced fluorescence of gold nanoclusters[J]. *Spectrochimica acta part A: molecular and biomolecular spectroscopy*, 2021, 256:119743.

The fluorescent probe for the detection and imaging of intracellular glutathione

ZHANG Yuhang¹, ZHANG Tao¹, WU Xiangwu¹, YU Shengrong^{1,2}, WU Yongxiang^{1,2}

(1. School of Materials Science and Chemical Engineering, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Zhenhai Institute of Mass Spectrometry, Ningbo 315211, China)

Abstract: This study focused on the development of novel fluorescent nanoprobe, for which bovine serum albumin-gold nanoclusters (BSA@AuNCs) were employed as the fluorescent signal source, with dendritic macroporous silica (DSiO_2) served as the carrier. BSA@AuNCs were subsequently loaded into the pores of DSiO_2 . Thereafter, by precisely controlling the concentration of potassium permanganate (KMnO_4), degradable manganese dioxide (MnO_2) nanosheets were grown in situ on the surface of DSiO_2 , leading to the successful fabrication of DSiO_2 -BSA@AuNCs@ MnO_2 fluorescent nanoprobe. Experimental results demonstrate that the MnO_2 nanosheets on the probe effectively quenched the fluorescence of BSA@AuNCs and specifically reacted with glutathione (GSH) to promote the release of BSA@AuNCs and the restoration of fluorescence signal. Moreover, the DSiO_2 -BSA@AuNCs@ MnO_2 fluorescent nanoprobe exhibits remarkable specificity and high sensitivity for GSH detection. When the concentration of KMnO_4 was 100.0 mg/L, the fluorescence quenching efficiency of BSA@AuNCs reached 89.30%. Following degradation of MnO_2 by GSH, the restored fluorescence intensity accounted for 81.34% of the initial intensity. Furthermore, cellular experiments confirmed the capability of the fluorescent nanoprobe in performing efficient intracellular GSH imaging, suggesting that the constructed DSiO_2 -BSA@AuNCs@ MnO_2 fluorescent nanoprobe is a promising tool for intracellular GSH detection and biological imaging.

Keywords: bovine serum albumin-gold nanoclusters; dendritic macroporous silica; manganese dioxide; glutathione; fluorescent nanoprobe; bioimaging

(责任编辑 章践立)