

本文引用: 毛林夕, 王梦云, 杨皓宇, 覃艳, 王炜. 谷胱甘肽响应型探针的制备及其在天然药物筛选中的应用[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(5): 838-846.

## 谷胱甘肽响应型探针的制备及其在天然药物筛选中的应用

毛林夕, 王梦云, 杨皓宇, 覃艳, 王炜\*  
湖南中医药大学药学院, 湖南长沙 410208

**[摘要]** **目的** 制备谷胱甘肽(glutathione, GSH)响应的香豆素类荧光探针并应用于中药 GSH 调节剂的筛选。**方法** 以香豆素为荧光团, 2-氯-5-硝基嘧啶为淬灭基团, 构建 GSH 响应的荧光探针(HCN), 通过紫外、高效液相色谱、荧光光谱和核磁等表征手段确定 HCN 的结构及其对 GSH 响应的可行性、特异性、灵敏度, 以确定最佳响应条件。通过 MTT 实验及细胞成像考察 HCN 的细胞毒性及胞内荧光信号。以 GSH 商品化消耗剂(NEM)为阳性对照, 选取民族药血筒中 16 种化合物为筛选对象, 通过 HCN 检测所选化合物对 GSH 水平的调控能力, 并进一步采用分子对接手段验证筛选结果的可靠性。**结果** 核磁谱表明 HCN 合成成功, 能与 GSH 特异性响应并呈线性关系, 且 HCN 的最佳反应温度和反应时间分别为 37 °C 和 100 min。MTT 实验表明, 在 HepG2 细胞中, 与 0 μmol/mL 相比, 80 μmol/mL 和 100 μmol/mL 的 HCN 降低了细胞活力( $P<0.05$ ), 说明 HCN 对 HepG2 细胞增殖有影响; 在 HL-7702 细胞中, 与 0 μmol/mL 相比, 各浓度 HCN 对细胞活力影响微弱( $P>0.05$ ), 说明 HCN 对 HL-7702 细胞增殖无影响。在细胞成像实验中, 与 0 μmol/mL 相比, 各浓度 HCN 的荧光强度增强( $P<0.05$ )。在药物筛选中, 与 control 相比, 血筒中的化合物五内酯 B、南五内酯和异南内酯 A 下调了 GSH 的水平( $P<0.001, P<0.05$ )。分子对接结果表明, 血筒中的化合物五内酯 B、南五内酯和异南内酯 A 与 GSH 形成了 2 个及以上的氢键, 结合能分别为 -3.94、-3.64、-4.87 kcal/mol。**结论** 本文设计合成了一种 GSH 响应的香豆素类探针 HCN, HCN 具有良好的 GSH 响应特异性、灵敏度、光稳定性及低细胞毒性等特点, 能应用于中药 GSH 调节剂的筛选, 该研究可为荧光探针技术服务与中药活性成分筛选提供参考。

**[关键词]** 荧光探针; 香豆素; 谷胱甘肽; 生物硫醇; 天然产物; 血筒

**[中图分类号]** R284; R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.05.012

### Preparation of GSH-responsive probe and its application in screening natural medicine

MAO Linxi, WANG Mengyun, YANG Haoyu, QIN Yan, WANG Wei\*

College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

**[Abstract]** **Objective** To prepare the glutathione (GSH)-responsive coumarin fluorescent probe and apply it to screen GSH regulators in Chinese medicine. **Methods** A GSH-responsive fluorescent probe (HCN) was constructed by coumarin as fluorophore and 2-chloro-5-nitropyrimidine as quench group. The structure of HCN and the feasibility, specificity, and sensitivity of its response to GSH were determined by ultraviolet-visible (UV-Vis), high performance liquid chromatography (HPLC), fluorescence spectrum and nuclear magnetic resonance (NMR) spectrum, so as to ascertain the optimal response conditions. The cytotoxicity and intracellular fluorescence signal of HCN were examined by MTT assay and cell imaging, respectively. Using GSH commercial consumable (NEM) as the positive control, 16 compounds of Xuetong in the ethnic medicine were selected as screening objects. The regulatory ability of the selected compounds on GSH level was checked by HCN, and the reliability of the screening

**[收稿日期]** 2023-03-06

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(82174078, 82003931); 湖湘青年科技人才创新项目(2021RC3100)。

**[第一作者]** 毛林夕, 女, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物活性筛选及其作用机制研究。

**[通信作者]** \* 王炜, 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, E-mail: wangwei402@hotmail.com。

results was further verified by molecular docking method. **Results** The NMR spectrum showed that HCN was synthesized successfully and could respond to GSH in a linear relationship. The optional temperature and time of reaction of HCN were 37 °C and 100 min, respectively. MTT assay showed that, in HepG2 cells, HCN of 80 μmol/mL and 100 μmol/mL lowered the cell viability compared with HCN of 0 μmol/mL ( $P < 0.05$ ), which indicated the influence of HCN on HepG2 cell proliferation. While in HL-7702 cells, HCN with various concentrations has mild effects on cell viability compared with HCN of 0 μmol/mL ( $P > 0.05$ ), which indicated that HCN had no effects on HL-7702 cell proliferation. Cell imaging experiment demonstrated that HCN of various concentrations possessed higher fluorescence intensity compared with HCN of 0 μmol/mL ( $P < 0.05$ ). Schisanlactone B, kadsudilactone, and heteroclitallactone A of Xuotong down-regulated GSH level compared with control in drug screening ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.05$ ). Molecular docking results showed that two or more hydrogen bonds were formed by Schisanlactone B, kadsudilactone, and heteroclitallactone A of Xuotong, and GSH, with the binding energies of -3.94, -3.64, and -4.87 kcal/mol. **Conclusion** In this paper, HCN, a GSH-responsive coumarin fluorescent probe, was designed and synthesized. It is featured by good GSH response specificity, sensitivity, light stability and low cytotoxicity, which could help screen GSH regulators of Chinese medicines. This study aimed to provide reference for fluorescence probe technology to screen active ingredients in Chinese medicines.

[**Keywords**] fluorescent probe; coumarin; glutathione; biological thiols; natural products; Xuotong

谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 作为细胞中最丰富的生物硫醇, 1~10 mmol/L 的含量在维持人体正常生理活动方面发挥着重要作用。因此, 检测体内 GSH 具有重要意义<sup>[1-3]</sup>。现有分析方法如高效液相色谱法<sup>[4-6]</sup>、质谱法<sup>[7-9]</sup>、荧光探针法<sup>[10-12]</sup>、电化学法<sup>[13]</sup>和量热法<sup>[14]</sup>已被广泛用于 GSH 水平检测。其中, 荧光探针法具有操作方便、成本低和灵敏可视等特点, 已成为目前检测 GSH 的主要手段。GSH 是细胞内氧化还原活动、细胞内信号转导和基因调控的重要单位<sup>[15]</sup>, 常为疾病诊断和治疗的重要生物标志物。癌症、心脏病和肝损伤等疾病, 可能都是由 GSH 水平异常引起的<sup>[16-17]</sup>。因此, 开发定量检测 GSH 水平的荧光探针方法具有重要的疾病诊断和治疗意义<sup>[18-19]</sup>。

荧光探针主要由荧光团、连接基团和识别基团组成, 荧光团可用来发射荧光信号, 其结构多含有共轭体系, 识别基团是荧光探针与分析物特异性识别的位点, 连接基团的作用是将荧光团和识别基团连接起来<sup>[20]</sup>。荧光分子探针检测方法具有选择性高、灵敏度高、肉眼可见、操作简单和成本低等特点, 已成为生物学分析、有机合成与代谢和临床诊断的重要手段之一<sup>[21]</sup>。香豆素的基本结构是苯并吡喃环, 为一种内酯化合物, 具有荧光量子产率高、斯托克斯位移大和光学性能好等优点<sup>[22]</sup>。本实验以 7-羟基香豆素为荧光基团、2-氯-5-硝基嘧啶为荧光淬灭基团, 合成具有 GSH 识别位点的香豆素型探针 HCN。研究通过合成一种开关型荧光探针, 从而可视化地对细胞内外 GSH 的水平变化进行定量检测, 并据此快速地筛选具有 GSH 水平调控能力的中药活性成分, 为 GSH 相关疾病的调控寻找新的候选中药活性分子。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验试剂

GSH (上海源叶生物科技有限公司, 批号: Z17S10C97807); 7-羟基香豆素 (批号: I1818049)、2-氯-5-硝基嘧啶 (批号: G2123334) 均购自上海阿拉丁试剂公司; N,N-二甲基甲酰胺 (上海麦克林生化科技股份有限公司, 批号: C13331861); 吡啶 (批号: 20150930)、二氯甲烷 (批号: 20220119)、石油醚 (批号: 20210914)、二甲基亚砜 (批号: 20220218) 均购自国药集团化学试剂有限公司; 胎牛血清 (批号: SA220415)、DMEM 高糖培养基 (批号: WH0022D221)、青霉素-链霉素 (双抗, 100×) (批号: WH0622G181) 均购自武汉普诺赛生命科技有限公司; PBS (批号: 20221101)、胰蛋白酶 (批号: 20220501) 均购自北京赛文创新科技有限公司。天然产物来自湖南中医药大学中医药名族医药国际联合实验室从血筒叶中分离出来的化合物。

### 1.2 实验仪器

荧光分光光度计 (日本 Hitachi 公司, 型号: F-7000); 紫外分光光度计 (日本岛津公司, 型号: UV-1800); 激光扫描共聚焦显微镜 (日本奥林巴斯公司, 型号: FV1200); NMR 光谱 (德国 Bruker 公司, 型号: Bruker 600MHz); 微孔板检测器 (美国 PerkinElmer 公司, 型号: Epire); 细胞 CO<sub>2</sub> 培养箱、高速冷冻离心机 (美国赛默飞公司, 型号: HERA CELL 150i, ST 8R); 双目倒置相差显微镜 (美国尼康公司, 型号: TS2R)。

### 1.3 HCN 的合成和表征

氮气保护下, 向 250 mL 圆底烧瓶中分别加入

7-羟基香豆素(10.5 mg)、2-氯-5-硝基嘧啶(28.6 mg)和吡啶(20  $\mu\text{L}$ ),加入 10 mL 无水 N,N-二甲基甲酰胺中,在 70  $^{\circ}\text{C}$ 下反应 7 h。将混合物蒸发,并通过二氯甲烷和石油醚(v/v, 10/1)洗脱的硅胶色谱进一步纯化残留物,以获得 HCN(白色固体,20.8 mg,53.3%)。HCN 的氢谱数据显示有 7 个氢,分别为  $\delta_{\text{H}}$  9.47(s, 2H)、8.11(1H,d, $J=58$  Hz)、7.85(1H,d, $J=8.45$  Hz)、7.49(1H,d, $J=2.23$  Hz)、7.33(1H,dd, $J=8.46,2.28$  Hz)、6.51(1H,d, $J=9.61$  Hz)。碳谱数据显示有 13 个碳,分别为  $\delta_{\text{C}}$  165.8、159.7、156.8、154.5、154.4、143.8、139.8、129.8、118.3、117.0、115.7、110.0、59.8。液质数据 LC-MS  $m/z$  [ $\text{C}_{13}\text{H}_7\text{N}_3\text{O}_5^+$ ]为 286.3。

#### 1.4 HCN 的可行性和特异性实验

用去离子水制备 GSH(10 mmol/mL)的储存溶液,并稀释至不同浓度。HCN 储备液用 DMSO/PBS (1/9, v/v)制备,并将储备液用去离子水稀释至终浓度为 20  $\mu\text{mol/mL}$ ,得到光谱测定溶液。用荧光分光光度计或紫外可见吸收分光光度计记录不同分析物的荧光或紫外吸收光谱。

#### 1.5 MTT 实验

HL-7702 和 HepG2 细胞( $1 \times 10^4$  个/孔)在含有 100  $\mu\text{L}$  DMEM 培养基(10%胎牛血清、1%链霉素、37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ )的 96 孔板中培养 24 h,待细胞密度达到 80%时,弃掉培养基,将含不同浓度 HCN 的培养基(1%胎牛血清)加入 96 孔板中进一步孵育 48 h。HCN 孵育结束后去除培养基,将含有 MTT 溶液(0.5 mg/mL)的 100  $\mu\text{L}$  新鲜 DMEM 培养基加入每个孔中,再孵育 2~4 h。最后,弃掉含有 MTT 溶液的培养基,加入 DMSO(100  $\mu\text{L}$ ),并在细胞活力测定前,在黑暗中低速摇动 15 min。

#### 1.6 细胞成像

将 HepG2 细胞( $4 \times 10^4$  个/孔)接种在铺有爬片的 12 孔板上,用 1 mL DMEM(10%胎牛血清、1%链

霉素、37  $^{\circ}\text{C}$ 和 5%  $\text{CO}_2$ )培养 24 h,待细胞密度达到 80%后,用 Mito-Tracker 红色染料(200  $\mu\text{L}$ )孵育 30 min。随后用恢复至室温的 PBS 洗 3 遍,用不同浓度的 HCN (0、40、80、100、200、300、400  $\mu\text{mol/mL}$ )孵育 30 min 后,用 PBS 洗 3 遍,最后用激光扫描共聚焦显微镜进行荧光成像。

#### 1.7 GSH 中药调节剂的筛选

在含有 200  $\mu\text{L}$  PBS 的 EP 管中依次加入 16 种血管化合物(20  $\mu\text{mol/mL}$ )和 GSH(100  $\mu\text{mol/mL}$ ),室温下反应 30 min。随后加入 HCN(20  $\mu\text{mol/mL}$ ),在 37  $^{\circ}\text{C}$ 下反应 30 min。用荧光分光光度计测量荧光强度。激发波长为 350 nm,发射范围为 400~550 nm。

#### 1.8 分子对接

研究 HCN 和血管化合物(五内酯 B、南五内酯、异南内酯 A)与 GSH 之间的潜在结合模式,使用 Le Dock.win32 软件进行分子对接。通过 Chem 3D 20.0 将 HCN 和血管化合物结构的 2D 模式转换为 3D 模式,将 HCN 和血管化合物(五内酯 B、南五内酯、异南内酯 A)结构能量质子化并最小化,以获得稳定的 3D 结构,并以“moe file”形式保存。从 NCBI 数据库中下载 GSH(PDB 代码:1b4q)的氨基酸序列。用 Le Dock.win32 软件进行分子对接。

## 2 结果

### 2.1 HCN 的检测原理

香豆素类化合物具有荧光强度高、光稳定性强、荧光量子产率高等特点,是一种优良的荧光基团。同时,2-氯-5-硝基嘧啶作为一种经典的荧光淬灭剂,具有稳定可靠的荧光淬灭性能。本实验以 7-羟基香豆素为荧光团、2-氯-5-硝基嘧啶为淬灭基团,成功合成了无荧光信号的 HCN。HCN 可特异性地与 GSH 反应,释放出荧光基团 7-羟基香豆素,实现了荧光信号从无到有的转变。详见图 1。

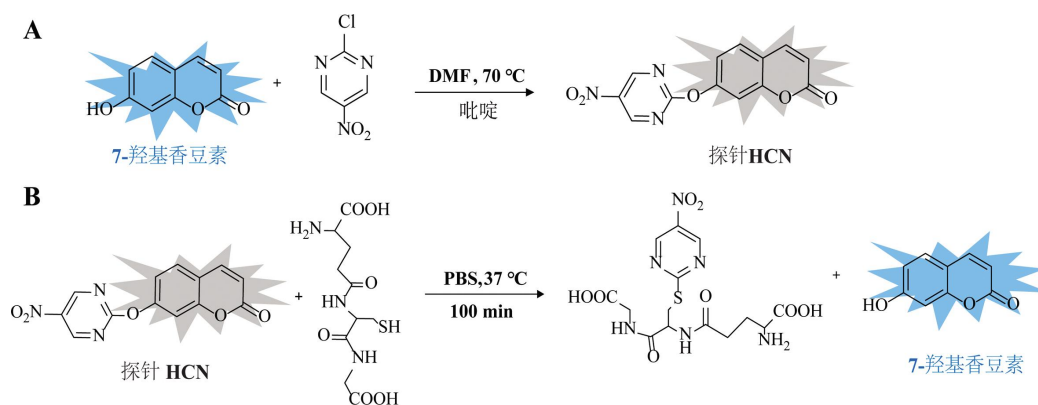


图 1 HCN 的设计原理图

注:A.HCN 的合成路线图;B.HCN 检测 GSH 的设计原理图。

## 2.2 HCN 的表征

为验证 HCN 是否成功合成,采用质谱对其分子量进行了分析。由图 2 可见,HCN 的分子量为 286.3,与计算所得分子量 286.2 相符。同时,采用核磁技术进一步确证了 HCN 的结构。从氢谱中可以看出该探针含有 7 个氢,并且有 2 个氢化学位移相同,说明这 2 个氢在嘧啶基团上空间位置相同,且香豆素上的 7 位羟基与嘧啶上的 2 位氯发生取代反应。从碳谱可

以看出该探针含有 13 个碳,故氢谱和碳谱数据表明 HCN 合成成功。

## 2.3 HCN 的可行性和特异性

为了研究 HCN 对 GSH 的敏感性,研究特定浓度 HCN (20  $\mu\text{mol/mL}$ ) 和 GSH (100  $\mu\text{mol/mL}$ ) 的温度和时间依赖性荧光响应。温度依赖性实验表明在 37  $^{\circ}\text{C}$  时其荧光强度最高,故后续实验在 37  $^{\circ}\text{C}$  下进行(见图 3A)。时间依赖性实验中,在刚开始的 10~

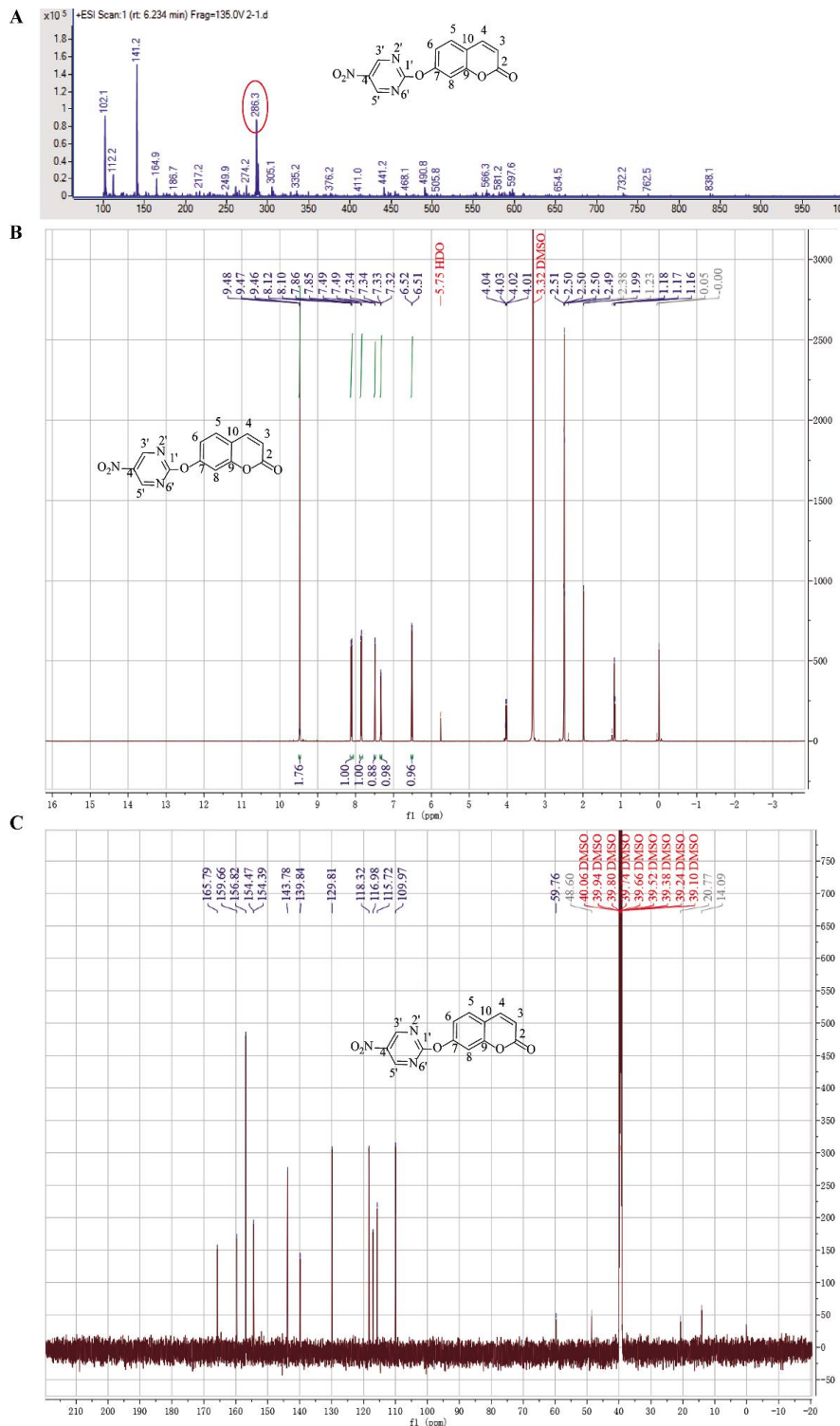


图 2 HCN 的合成表征图

注:A. HCN 的 LC-MS 光谱图;B. HCN 的  $^1\text{H}$  NMR 波谱图;C. HCN 的  $^{13}\text{C}$  NMR 波谱图。

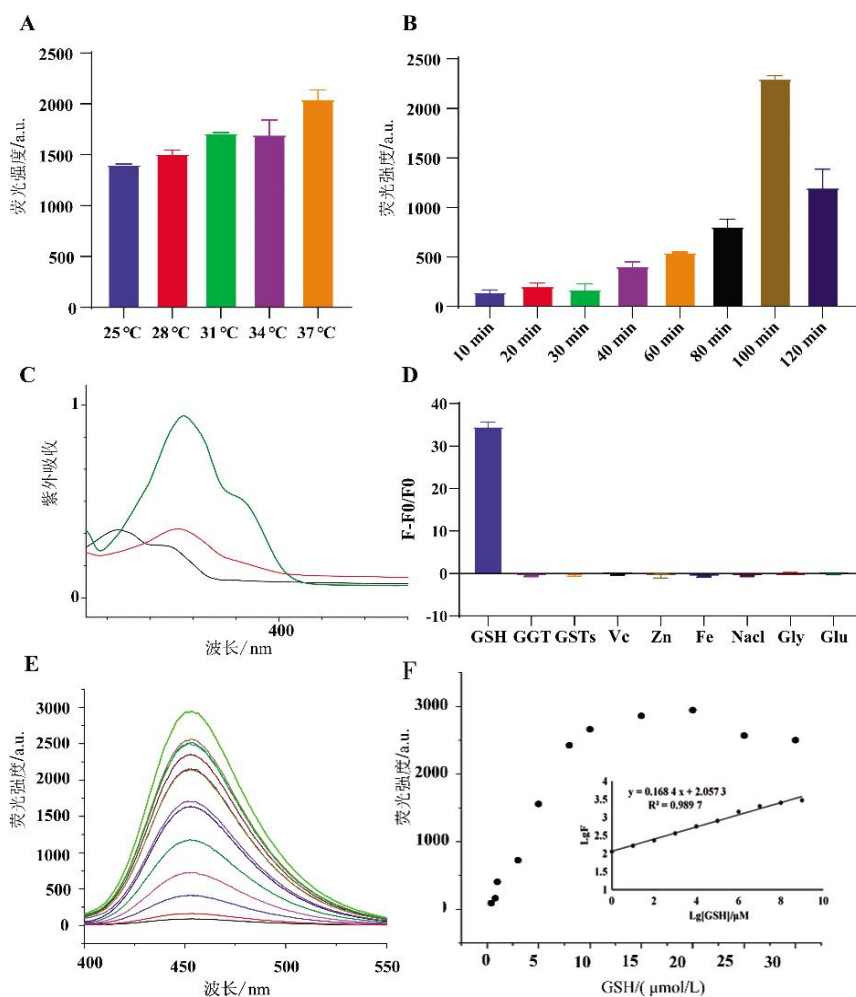


图3 HCN特异性检测GSH光谱图

注:A. HCN在不同温度下与GSH反应的荧光强度图;B. HCN在不同浓度下与GSH反应的荧光强度图;C. HCN(黑色)、HCN/GSH(红色)和7-羟基香豆素(绿色)的紫外可见光谱图;D. HCN与不同离子反应的荧光光谱图;E. HCN对GSH的浓度依赖性荧光发射光谱图(GSH:0~200  $\mu\text{mol/mL}$ );F. HCN的荧光强度随GSH浓度变化的曲线图。

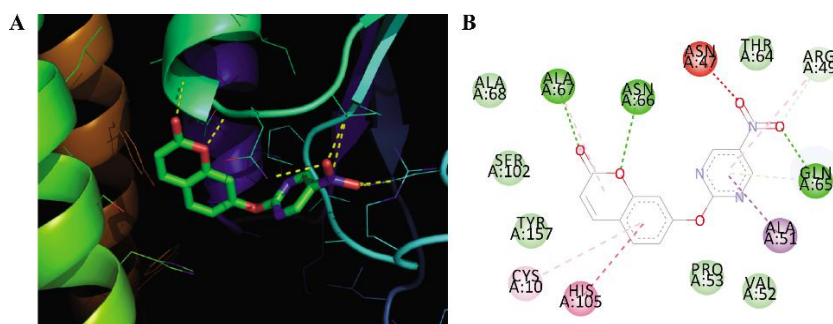


图4 HCN与GSH分子对接的模拟图

注:A. 3D图;B. 2D图。

100 min,可以发现其峰值发射强度迅速增加,120 min时达到平台期后开始下降,因此,100 min为HCN与GSH的最佳反应时间(见图3B)。在紫外可见吸收光谱实验中,当HCN的溶液中含有GSH时,其紫外吸收峰和荧光团7-羟基香豆素吸收峰位置相同,而不含GSH的溶液几乎没有紫外吸收,说明HCN与GSH反应后释放的荧光物质为7-羟基香豆素,这与预期

结果相符(见图3C)。在离子选择性实验中,HCN与各组分反应后,HCN与GSH响应最强,说明HCN可以特异性地响应GSH而不受其他干扰因素的影响(见图3D)。HCN对GSH的浓度依赖性实验中,在不含GSH时,几乎没有荧光发射峰,然而,随着GSH(0~200  $\mu\text{mol/mL}$ )浓度的增加,各发射光谱曲线在450 nm处的发射条带逐渐增强,并与0~200  $\mu\text{mol/mL}$



范围内的 GSH 浓度具有线性相关性 ( $R^2=0.9897$ ) (见图 3E、3F)。分子对接结果表明,HCN 和 GSH 通过氢键与 GLN-65、ASN-66 和 ALA-67 结合,形成了 3 个稳定的氢键,其结合能为  $-6.09$  kcal/mol,说明 HCN 与 GSH 可以稳定地结合(见图 4)。

#### 2.4 HCN 细胞毒性和成像

两株细胞分别用不同浓度的 HCN 孵育 48 h 后,在 HepG2 细胞中,与  $0 \mu\text{mol/mL}$  相比, $80 \mu\text{mol/mL}$  和  $100 \mu\text{mol/mL}$  的 HCN 降低了细胞活力 ( $P<0.05$ ),对 HepG2 细胞增殖有影响。在 HL-7702 细胞中,与  $0 \mu\text{mol/mL}$  相比,各浓度的 HCN 对细胞活力影响微弱 ( $P>0.05$ ),对细胞增殖无影响。细胞成像实验中,与  $0 \mu\text{mol/mL}$  相比,各浓度 HCN 蓝色荧光强度增强 ( $P<0.05$ ),直到浓度达到  $400 \mu\text{mol/mL}$  时,荧光强度趋于稳定。详见图 5—6。

#### 2.5 GSH 中药调节剂的筛选及其分子对接

与 control 相比,化合物五内酯 B、南五内酯和异南内酯 A 的 GSH 水平下调 ( $P<0.05$ ),而其他化合物对 GSH 水平变化的影响微弱 ( $P>0.05$ )。分子对接结果表明,五内酯 B 通过氢键与 LYS-A:19 和 GLN-A:57 结合,而南五内酯通过氢键与 VAL-A:29、TYR-A:24、CYS-A:22 和 LYS-A:19 连接,异南内酯 A 通过氢键与 SER-A:83、GLN-A:57 和 ARG-A:67 连接,各自形成了 2 个及以上稳定的氢键,其结合能分别为  $-3.94$ 、 $-3.64$ 、 $-4.87$  kcal/mol。详见表 1、图 7。

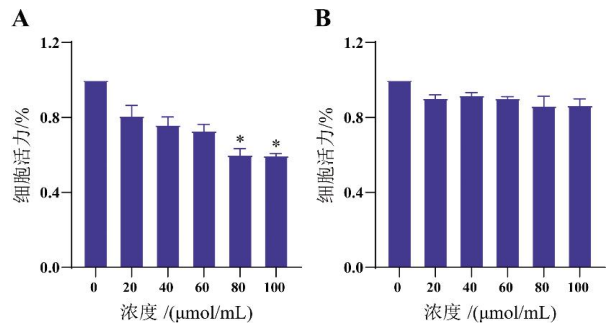


图 5 各组细胞活力图

注:A. HCN 对 HepG2 细胞的影响;B. HCN 对 HL-7702 细胞的影响。与  $0 \mu\text{mol/mL}$  比较,\* $P<0.05$ 。

### 3 讨论

土家族药物血筒 [*Kadsura heteroclita* (Roxb.) Craib] 为五味子科 (Schisandraceae) 南五味子属 (*Kadsura*),是一种常绿攀援型木质藤本,主要药用部位是茎和果实。目前,已经有较多的文献报道了中药血筒中化学成分的研究,从中药血筒茎中分离并鉴定的化合物主要有木脂素类、三萜类、倍半萜类、黄酮类、甾体类等化学成分<sup>[23-26]</sup>。药理学研究也表明,中药血筒中分离得到的单体化合物具有抗类风湿关节炎、抗炎、镇痛、保肝、抗 HBV、抗 HIV 和抗癌等药理活性<sup>[27]</sup>。本实验中筛选的化合物主要是从血筒叶中分离提取得到,除了传统的抗炎和抗癌等药理作用外,血筒化合物五内酯 B、南五内酯和异南内酯 A 3 个三萜化合物可以下调 GSH 的表达水平。

GSH 是含量最多的一种生物硫醇,在维持氧化还原稳态、抵御自由基和毒素方面起着重要作用。本

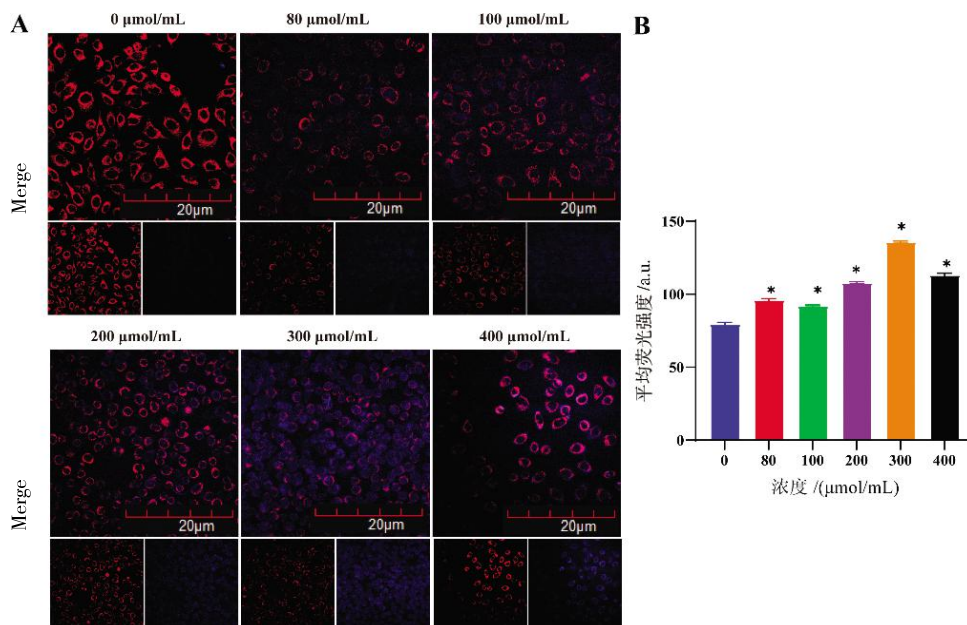
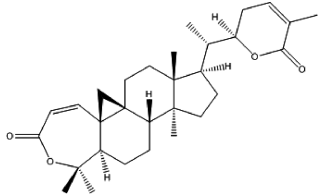
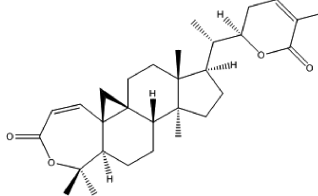
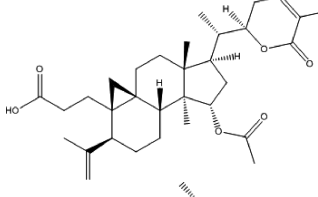
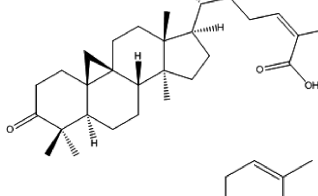
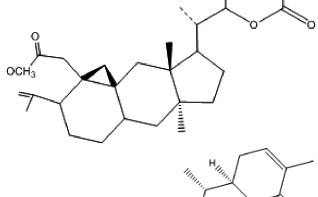
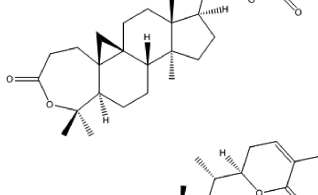
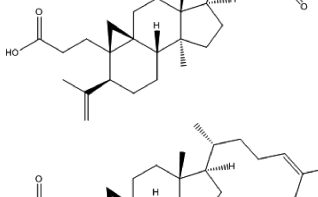
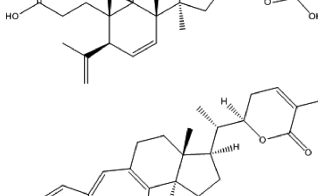
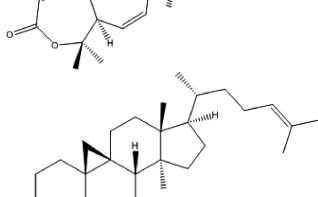



图 6 HepG2 细胞的共聚焦成像图

注:A. HCN 在 HepG2 细胞中的荧光成像图;B. GSH 荧光强度定量分析图。与  $0 \mu\text{mol/mL}$  比较,\* $P<0.05$ 。

表 1 16 种血筒化合物的化学结构和名称

编号	化学名称	化学结构
1	五内酯 B(schisanlactone B)	
2	南五内酯(kadsuilactone)	
3	异南内酯 A(heteroclitalactone A)	
4	五味子酸(schizandronic acid)	
5	异南内酯 F(heteroclitalactone F)	
6	菲律宾南五味子内酯 B(kadsuphilactone B)	
7	五内酯 E(schisanlactone E)	
8	长南酸(changnanic acid)	
9	南五味子内酯 B(lancilactone B)	
10	环木菠萝烯酮(cycloartenone)	

续表 1 16种血管化合物的化学结构和名称

编号	化学名称	化学结构
11	开环-绯红南五味子酸 F(seco-coccinic acid F)	
12	未命名(masticadienoic acid)	
13	高粱醇(sorghumol)	
14	未命名(xuetonpene)	
15	未命名(kadsuracoccinic acid B)	
16	未命名(litseachromolaevane A)	

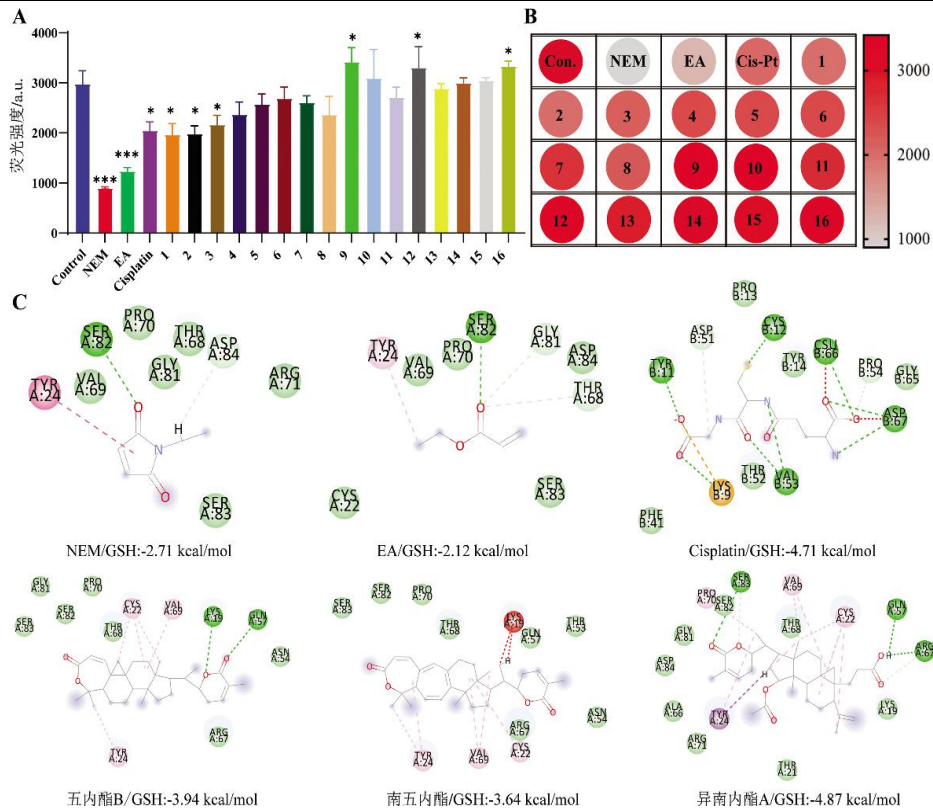


图 7 GSH 体外中药调节剂筛选图

注: A、B 为血管不同化合物对 GSH 表达水平的影响图。与 control 相比, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。C. 不同化合物与 GSH 的分子对接模拟图。



研究成功合成了 GSH 响应型 HCN,其具有高选择性、低细胞毒性和高灵敏度等特点。通过紫外、液相、荧光光谱和细胞成像等实验发现 HCN 可以灵敏地检测细胞内外 GSH 表达水平的变化,并通过 HCN 成功地从血筒化合物中筛选了中药 GSH 调节剂五内酯 B、南五内酯和异南内酯 A。综上所述,本文主要以 HCN 为筛选工具,GSH 为筛选靶标,成功获取了能下调 GSH 水平的中药 GSH 调节剂,该研究为快速发现中药活性成分提供了新思路。

## 参考文献

- [1] CHEN S, HOU P, SUN J W, et al. A new long-wavelength emission fluorescent probe for imaging biothiols with remarkable Stokes shift[J]. *Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, 241: 118655.
- [2] SONG Y, ZHOU L Y, WANG J J, et al. Synthesis and application of benzoxazole derivative-based fluorescent probes for naked eye recognition[J]. *Luminescence*, 2020, 35(7): 1010-1016.
- [3] ZHONG Q, CHEN Y, SU A, et al. Synthesis of catalytically active carbon quantum dots and its application for colorimetric detection of glutathione[J]. *Sensors and Actuators*, 2018, 273: 1098-1102.
- [4] LIU S, ANSARI N H, WANG C, et al. A rapid HPLC method for the quantification of GSH and GSSG in ocular lens[J]. *Current Eye Research*, 1996, 15(7): 726-732.
- [5] GIUSTARINI D, DALLE-DONNE I, COLOMBO R, et al. An improved HPLC measurement for GSH and GSSG in human blood[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2003, 35(11): 1365-1372.
- [6] DI PIETRA A M, GOTTI R, BONAZZI D, et al. HPLC determination of glutathione and L-cysteine in pharmaceuticals after derivatization with ethacrynic acid[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1994, 12(1): 91-98.
- [7] ZHANG Y F, WANG Y, ZHANG K R, et al. Development and validation of a rapid, robust and sensitive UPLC-QQQ-MS/MS method for simultaneous quantification of GSH metabolism in lung cancer cells[J]. *Journal of Chromatography B*, 2020, 1148: 122145.
- [8] HABERHAUER-TROYER C, DELIC M. Accurate quantification of the redox-sensitive GSH/GSSG ratios in the yeast *Pichia pastoris* by HILIC-MS/MS[J]. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 2013, 405(6): 2031-2039.
- [9] HARWOOD D T, KETTLE A J, WINTERBOURN C C. Production of glutathione sulfonamide and dehydroglutathione from GSH by myeloperoxidase-derived oxidants and detection using a novel LC-MS/MS method[J]. *The Biochemical Journal*, 2006, 399(1): 161-168.
- [10] SEDGWICK A C, HAN H H, GARDINER J E, et al. The development of a novel AND logic based fluorescence probe for the detection of peroxynitrite and GSH[J]. *Chemical Science*, 2018, 9(15): 3672-3676.
- [11] LI X Q, HUO F J, YUE Y K, et al. A coumarin-based "off-on" sensor for fluorescence selectively discriminating GSH from Cys/Hcy and its bioimaging in living cells[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017, 253: 42-49.
- [12] LIU C, QI F, WEN F, et al. Fluorescence Detection of Glutathione (GSH) and Oxidized Glutathione (GSSG) in Blood with a NIR-Excitable Cyanine Probe[J]. *Methods and Applications in Fluorescence*, 2017, 25(4): 580-586.
- [13] XIE J, CHENG D, LI P, et al. Au/metal-organic framework nanocapsules for electrochemical determination of glutathione[J]. *ACS Applied Nano Materials*, 2021, 4(5): 4853-4862.
- [14] XIANYU Y L, XIE Y Z Y, WANG N X, et al. A dispersion-dominated chromogenic strategy for colorimetric sensing of glutathione at the nanomolar level using gold nanoparticles[J]. *Small*, 2015, 11(41): 5510-5514.
- [15] ZHAI L, SHI Z, TU Y, et al. A dual emission fluorescent probe enables simultaneous detection and discrimination of Cys/Hcy and GSH and its application in cell imaging[J]. *Dyes and Pigments*, 2019, 165: 164-171.
- [16] LI X R, LIU W S, DENG M, et al. Fluorescent glutathione probe based on MnO<sub>2</sub>-Si quantum dots nanocomposite directly used for intracellular glutathione imaging[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 255: 1687-1693.
- [17] 朱玉辉, 柴劲. 黄芪补气汤联合还原型谷胱甘肽对肝癌介入治疗后患者肝功能、氧化应激及炎症的影响[J]. *陕西中医*, 2021, 42(5): 570-572, 576.
- [18] LIU Y, XIANG K, TIAN B, et al. A fluorescein-based fluorescence probe for the fast detection of thiol[J]. *Tetrahedron Letters*, 2016, 57(23): 2478-2483.
- [19] ZHANG J, WANG N, JI X, et al. Recent Progress in BODIPY-based Fluorescent Probes for Biothiols[J]. *Chemistry*, 2019, 26(19): 4172-4192.
- [20] 韩文强. 罗丹明和香豆素类金属离子荧光探针的合成及光谱性能研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2017.
- [21] 陈祥根. 香豆素类多反应位点的活性硫荧光探针: 设计合成与应用[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2022.
- [22] 商理超. 用于检测肝细胞肝癌患者 GSH 水平变化的香豆素荧光探针及其生物成像应用[D]. 泸州: 西南医科大学, 2022.
- [23] 李晓光, 罗焕敏. 南五味子属植物化学成分及其活性研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2003, 28(12): 1120-1125.
- [24] 陆晓珊, 胡胜涛, 唐琳, 等. 血筒化学成分、药理作用及质量控制研究进展[J]. *中成药*, 2022, 44(10): 3263-3268.
- [25] 苏维. 血筒氯仿部位的化学成分及其生物活性的研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2014.
- [26] 罗艺萍, 王素娟, 赵静峰, 等. 异型南五味子的化学成分研究[J]. *云南大学学报(自然科学版)*, 2009, 31(4): 406-409.
- [27] CAO L, SHEHLA N, LI B, et al. Schinortriterpenoids from *Tujia* ethnobotany Xuetong—the stems of *kadsura heteroclita*[J]. *Phytochemistry*, 2020, 169: 112178.