

基于尼罗红类 ONOO⁻近红外荧光探针的开发及其成像应用

贺晓梦 袁方 张素雅 张健健*

(西北大学化学与材料科学学院 西安 710021)

摘要 过氧亚硝酸根(ONOO⁻)在氧化应激和炎症过程中的生成与细胞损伤、炎症反应和免疫调节等密切相关,因此,开发高灵敏且高度选择性的 ONOO⁻检测方法对于深入理解疾病发生和发展机制、提高疾病的早期诊断和治疗水平具有极其重要意义. 设计合成了一种选择性检测 ONOO⁻的新型荧光探针 NR-Pro. 该探针通过使用烷基链将 2-羟基尼罗红衍生物(NR-OH)与 4,4'-氮杂二基二苯酚基团有机结合,在 ONOO⁻作用下,释放出近红外染料 NR-OH. 实验研究表明,该探针在 658 nm 处对 ONOO⁻表现出显著的“OFF-ON”型荧光信号响应,且对 ONOO⁻浓度在 0~10 μmol/L 范围内呈现良好的线性关系,检出限低至 17.7 nmol/L. 这项研究进一步证实了 NR-Pro 探针在检测 RAW264.7 细胞中外源和内源 ONOO⁻方面具有优良的成像能力,这为早期诊断和治疗疾病提供了新的思路.

关键词 近红外; 荧光探针; 过氧亚硝酸根; 尼罗红; 细胞成像

Development of a Near-Infrared Fluorescent Probe Based on Nile Red for ONOO⁻ and Its Imaging Applications

He, Xiaomeng Yuan, Fang Zhang, Suyu Zhang, Jianjian*

(College of Chemistry & Materials Science, Northwest University, Xi'an 710021)

Abstract The production of peroxynitrite (ONOO⁻) in situations of oxidative stress and inflammation has a profound impact on cellular damage, inflammatory responses, and immune regulation. Thus, the advancement of highly sensitive and selective techniques to detect ONOO⁻ is of great significance. These methods are crucial for gaining insights into disease mechanisms, improving early disease diagnosis, and enhancing treatment effectiveness. In this study, we have designed and synthesized a novel fluorescent probe, NR-Pro, specifically for the selective detection of ONOO⁻. The probe incorporates a 2-hydroxy Nile red derivative (NR-OH) that is organically bound to a 4,4'-azabicyldiphenol group via an alkyl chain. Upon interaction with ONOO⁻, the probe releases the near-infrared dye NR-OH, leading to a significant “OFF-ON” fluorescence signal response at 658 nm. The mechanism involves the initial attack of ONOO⁻ on the 4,4'-aza-diyl diphenol group, resulting in the formation of an alkylamine-modified Nile red derivative and the release of two 1,4-benzoquinone molecules. Subsequently, the alkylamine group undergoes further oxidation by ONOO⁻, leading to the liberation of the near-infrared fluorophore NR-OH and acrolein through a 1,3-elimination reaction with the involvement of water. Experimental investigations have demonstrated that the probe exhibits a favorable linear relationship with ONOO⁻ concentration in the range of 0 to 10 μmol/L, with an exceptionally low detection limit of 17.7 nmol/L. Furthermore, the fluorescence emission of NR-Pro remained unaffected by various biological species, including reactive oxygen species (ROSs), metal ions, enzymes, anions, and amino acids. NR-Pro also exhibited minimal cytotoxicity and very high photostability, suggesting its potential suitability for cell imaging applications. Moreover, our study confirms the remarkable imaging capability of the NR-Pro probe in detecting both exogenous and endogenous ONOO⁻ in RAW264.7 cells. These findings present novel insights for the early diagnosis and treatment of diseases, paving the way for potential advancements in the field.

Keywords near-infrared; fluorescent probe; peroxynitrite; Nile red; cell imaging

1 引言

活性氧(Reactive oxygen species, ROS)在信号转导、氧化损伤以及炎症等生理和病理过程中发挥着关键作用^[1-4]. 过氧亚硝酸盐(ONOO⁻/ONOOH, pK_a=6.8)作为 ROS 的一种,由一氧化氮(NO)和超氧阴离子自由基

(O₂⁻)在无酶催化的作用下,通过扩散控制($k=0.4\times 10^{10}\sim 1.6\times 10^{10}\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)反应在生物系统中内源性产生^[5-6]. 作为一种强氧化剂, ONOO⁻主要存在于线粒体和吞噬体,对生物体内的信号转导过程至关重要,有助于调节生物体的动态氧化还原稳态,抵抗外源性病原体或微生物的入侵^[7].

* E-mail: zhangjj@nwnu.edu.cn

Received May 13, 2023; published August 14, 2023.

Supporting information for this article is available free of charge via the Internet at <http://sioc-journal.cn>.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 22277098, 21904105), and the Shaanxi Fundamental Science Research Project for Chemistry & Biology (No. 22JHQ070).

项目受国家自然科学基金(Nos. 22277098, 21904105)和陕西化生基础科学研究项目(No. 22JHQ070)资助.

当生物体内的 ONOO^- 过量产生时, 会引起氧化应激, 使包括脱氧核糖核酸(DNA)、蛋白质以及脂质在内的生物大分子发生过氧化作用, 对细胞造成损伤。此外, 过量的 ONOO^- 甚至还会进一步引发炎症、神经退行性疾病、心血管疾病以及癌症等多种疾病^[8-17]。迄今为止, ONOO^- 在生命系统中的深层机制及其作用尚未完全阐明。同时, ONOO^- 又具有高反应性和强的亲核性、低稳态浓度(纳摩尔水平)和较短的半衰期($<20\text{ ms}$), 使其在生物体内难以捕获^[18]。因此, 开发有效的分析方法检测 ONOO^- , 以实现生物系统中 ONOO^- 浓度的准确实时测定, 仍然是一个巨大的挑战。

荧光传感和荧光成像技术在生物样品成像中具有许多优点, 包括灵敏度高、靶点选择性精确、生物安全性好、非侵入性可视化和高时空分辨率等优点^[19-26], 这些优点使得它们成为检测生物系统中 ONOO^- 的一种有效方法。近年来, 基于花菁、1,8-萘酰亚胺、荧光素、罗丹明和氟硼二吡咯化合物(BODIPY)等染料构建了多种荧光探针用来检测 ONOO^- ^[27-32]。然而, 由于 ONOO^- 的强氧化性, 上述所设计的探针中有很大大一部分容易被 ONOO^- 氧化, 导致假阴性信号或检测结果不准确^[33-34]。另外, 现有的探针大多以苯硼酸酯、不饱和双键以及胍等作为 ONOO^- 的识别位点, 它们易受到其他高浓度活性氧(如 H_2O_2 , NaClO 和 $\cdot\text{OH}$)的影响。因此, 构建一种用于检测生物体内具有高灵敏度、高选择性和良好抗氧化性的 ONOO^- 探针是非常重要的。

本研究设计合成了用于选择性检测 ONOO^- 的荧光探针 NR-Pro, 以 2-羟基尼罗红衍生物(NR-OH)为荧光团, 4,4'-氮杂二基二苯酚基团为 ONOO^- 的识别位点。由于分子内存在光诱导电子转移效应(Photo-Induced Electron Transfer, PET), 该探针在水溶液中表现出弱荧光。当向反应体系加入 ONOO^- , 通过新型化学触发的两级级联反应释放出近红外荧光染料 NR-OH, 表现出显著的荧光信号增强。此外, 该探针具有高灵敏度、高选择性、优异的稳定性及良好的生物相容性。利用构建的探针 NR-Pro 实现了对 RAW264.7 细胞中外源性以及内源性 ONOO^- 成像检测。

2 结果与讨论

2.1 探针 NR-Pro 对 ONOO^- 的检测性能

2.1.1 探针 NR-Pro 的荧光特性

为研究探针 NR-Pro 在不同助溶剂中与 ONOO^- 的光谱响应情况, 我们向含有 30% 不同助溶剂(丙酮、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)、二甲基亚砜(DMSO)、乙醇、乙腈和甲醇)的 NR-Pro 溶液($\text{pH } 7.4$, 20 mmol/L)中添加 $20\text{ }\mu\text{mol/L}$ ONOO^- , 并在激发波长为 580 nm 下测定其荧光光谱(支持信息图 S9)。实验结果表明, 当使用丙酮、DMF 或 MeCN 作为助溶剂时, NR-Pro 的荧光信号在 658 nm

处显著增强, 这可能与尼罗红自身的化学性质有关, 其具有显著的溶剂致变色性能, 在极性非质子性溶剂中具有良好的荧光量子产率; 而在极性质子性溶剂中, 其荧光发射会显著红移, 但其量子产率却大幅降低^[35-36]。因此, 为保证后续测试条件的一致性, 我们选择了较为温和的 MeCN 作为最佳助溶剂。

为进一步研究探针 NR-Pro 在不同乙腈(MeCN)/磷酸缓冲溶液(PBS)体积比例下与 ONOO^- 的响应情况, 本实验选择在发射波长 658 nm 处测定其荧光信号。实验结果表明, 随着溶液中 MeCN 比例的增加, 荧光信号逐渐增强(支持信息图 S10)。其中在体积分数为 30% 的 MeCN 中荧光信号最大, 但与此同时其空白信号也明显增强(总体约增强 6.5 倍), 而 20% MeCN 的空白信号未发生明显变化(总体约增强 6.0 倍)。因此, 本实验选择体积分数为 20% MeCN 作为最佳的助溶剂比例。

基于此, 本实验也研究了探针 NR-Pro 与 ONOO^- 在磷酸缓冲溶液中(20 mmol/L , $\text{pH } 7.4$, 20% MeCN)的光谱响应情况。如支持信息图 S11 所示, 探针 NR-Pro 的最大吸收峰在 561 nm 。向溶液中加入 ONOO^- 后, 检测体系在 561 nm 处的吸光度稍有增加并伴随稍许蓝移, 与此同时 658 nm 处的荧光发射显著增强, 这些变化初步表明了 NR-Pro 与 ONOO^- 反应使近红外染料 NR-OH 得到释放。此外, 实验还研究了探针 NR-Pro 随 ONOO^- 浓度增加的荧光光谱变化情况。结果显示(图 1), 随着溶液中 ONOO^- 浓度的不断增加, 反应体系在 658 nm 处的荧光发射逐渐增强。当 ONOO^- 浓度增加到 $50\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时, 体系的荧光信号增强了约 10 倍。反应体系在 658 nm 处的荧光强度与 ONOO^- 浓度在 $0\sim 10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 范围内呈现良好的线性关系, 并且检出限为 17.7 nmol/L ($\text{DL}=3\sigma/k$, $S/N=3$)。上述实验结果表明 NR-Pro 对 ONOO^- 的检测具有较好的灵敏度。

2.1.2 动力学及光稳定性研究

为了研究探针 NR-Pro 对 ONOO^- 的荧光响应动力学及光稳定性情况。我们在探针 NR-Pro 体系中加入 $20\text{ }\mu\text{mol/L}$ ONOO^- (图 2a), 随着反应时间的延长, 检测体系的荧光信号在前 10 min 显著增强, 30 min 后慢慢趋于平缓, 大约在 75 min 达到平台。而探针本身的荧光信号几乎不随时间而改变。此外, 我们将 NR-Pro 与 ONOO^- 反应后的体系继续监测 2 h , 荧光强度随时间的增加几乎保持不变(图 2b), 显示出 NR-Pro 及与 ONOO^- 反应后优异的光稳定性。

2.1.3 不同 pH 对反应的影响

本实验也研究了反应体系中 pH 值对探针 NR-Pro 检测 ONOO^- 的影响。如图 3 所示, 探针 NR-Pro 的荧光信号在不同 pH 条件下几乎保持不变。加入 ONOO^- 后, 检测体系在 $\text{pH } 5.8\sim 7.4$ 范围内的荧光信号显著升高, 但当 pH 值增加到 8.0 时, 体系的荧光强度明显下降, 这

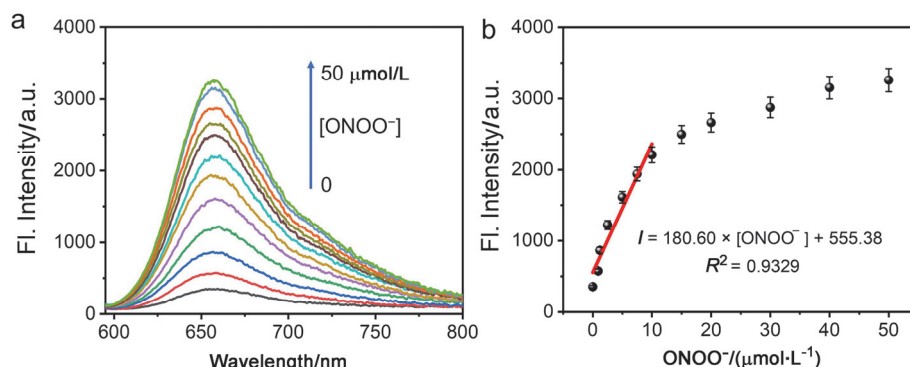


图 1 (a) NR-Pro (5 $\mu\text{mol/L}$)与不同浓度 ONOO^- (0~50 $\mu\text{mol/L}$)在 PBS (pH 7.4, 20 mmol/L, 20% MeCN)中反应 30 min 后的荧光光谱; (b)反应体系在 658 nm 处的荧光强度与 ONOO^- 浓度的关系

Figure 1 Fluorescence spectra of NR-Pro (5 $\mu\text{mol/L}$) and ONOO^- (0~50 $\mu\text{mol/L}$) in PBS (pH 7.4, 20 mmol/L, 20% MeCN) for 30 min (a); the embedded graph (b) shows the relationship between fluorescence intensity and ONOO^- concentration of the reaction system at 658 nm

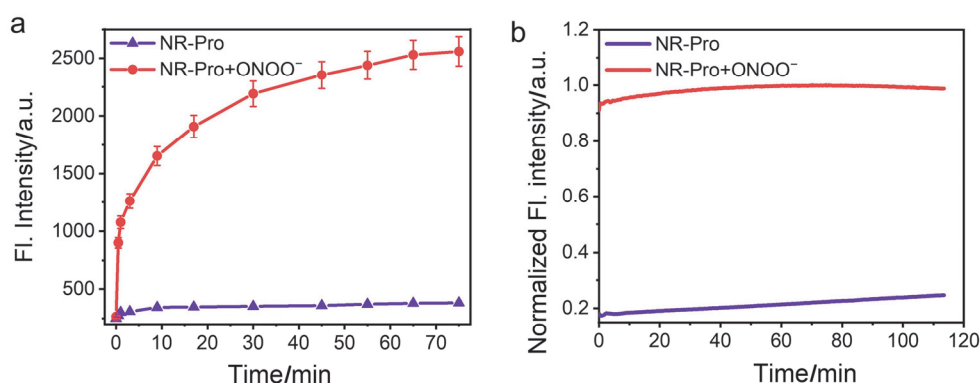


图 2 NR-Pro (5 $\mu\text{mol/L}$)与 ONOO^- (20 $\mu\text{mol/L}$)在 PBS (pH 7.4, 20 mmol/L, 20% MeCN)中反应的荧光动力学曲线(a)和光稳定性曲线(b)

Figure 2 Fluorescence kinetic curves (a) and photostability curves (b) of NR-Pro (5 $\mu\text{mol/L}$) and ONOO^- (20 $\mu\text{mol/L}$) in PBS (pH 7.4, 20 mmol/L, 20% MeCN)

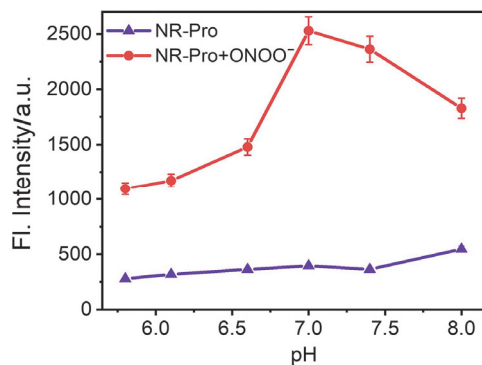


图 3 pH 对 NR-Pro (5 $\mu\text{mol/L}$)与 ONOO^- (20 $\mu\text{mol/L}$)反应体系荧光强度的影响

Figure 3 Effect of pH on fluorescence intensity of NR-Pro (5 $\mu\text{mol/L}$) and ONOO^- (20 $\mu\text{mol/L}$) reaction systems

可能是由于在强碱性介质中, 电负性较大, 影响分子内氢键, 使释放出 2-羟基尼罗红衍生物的荧光强度降低^[37]. 实验结果表明, 探针 NR-Pro 在生理 pH 条件下能够灵敏检测 ONOO^- .

2.1.4 选择性研究

为了考察探针 NR-Pro 的选择性, 我们在反应体系中加入其他常见的干扰物(图 4), 如 ROS (H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$,

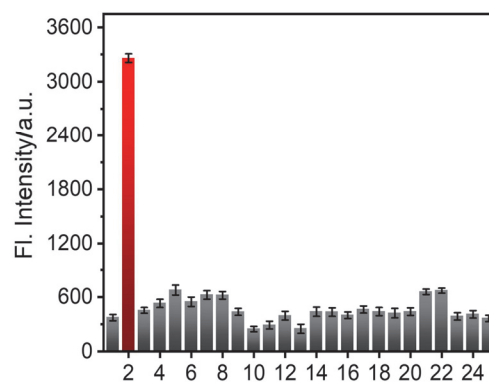


图 4 NR-Pro (5 $\mu\text{mol/L}$)与不同分析物(50 $\mu\text{mol/L}$)在 PBS (pH 7.4, 20 mmol/L, 20% MeCN)中反应 30 min 后的荧光强度. 其中分析物 1~25: Blank, ONOO^- , H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, ClO^- , TBO $\cdot$, TBHP, NO, NO_2^- , Na_2S , GSH, Lys, Cys, Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , $\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$, β -半乳糖苷酶, 胰蛋白酶, L-抗坏血酸

Figure 4 Fluorescence intensity of NR-Pro (5 $\mu\text{mol/L}$) and different analytes (50 $\mu\text{mol/L}$) after 30 min reaction in PBS (pH 7.4, 20 mmol/L, 20% MeCN). Among them, analytes 1~25: Blank, ONOO^- , H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, ClO^- , TBO $\cdot$, TBHP, NO, NO_2^- , Na_2S , GSH, Lys, Cys, Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , $\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$, β -galactosidase, trypsin, L-ascorbic acid

ClO^- , $\text{TBO}^\bullet$, TBHP , NO , NO_2^- , $\bullet\text{OH}$, $^1\text{O}_2$)、常见金属离子 (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+}) 及活性硫(RSS) (Na_2S , GSH , Lys , Cys) 和 β -半乳糖苷酶、胰蛋白酶、*L*-抗坏血酸等. 加入的这些物质均未引起检测体系的荧光信号显著变化. 表明探针 NR-Pro 具有良好的选择性.

2.1.5 反应机制研究

接下来我们对探针与 ONOO^- 反应进行了机理研究. 根据文献调研^[38], ONOO^- 首先攻击 4,4'-氮杂二基二苯酚基团, 形成以烷基基团修饰的尼罗红衍生物并释放两分子对苯二醌, 随后烷基基团依次与 ONOO^- 发生氧化反应, 在水的参与下通过 1,3-消除反应释放近红外荧光团 NR-OH 和丙烯醛(图 5). 为进一步确定该反应过程, 实验进行了高效液相色谱(HPLC)和质谱分析. 如图 6 所示, NR-Pro 与 5 equiv. ONOO^- 反应后, 在保留时间 t_R 为 3.3 min 处出现了新的色谱峰, 与 NR-OH 的保留时间一致; 随着 ONOO^- 浓度的增加, 可观察到 NR-Pro 已完全转化为 NR-OH. 另外, 从 NR-Pro 与 ONOO^- 反应后的质谱图中也可观察到 NR-OH 的分子离子峰(支持信息图 S8). 该结果进一步证明了探针 NR-Pro 以 4,4'-氮杂二基二苯酚基团为新型反应触发器, 在体外能特异性识别 ONOO^- .

2.2 细胞成像实验

为了研究探针 NR-Pro 在活细胞中成像分析的可行性, 我们首先通过噻唑蓝(MTT)实验评估了 NR-Pro 对 RAW264.7 细胞的细胞毒性. 实验结果表明, 细胞与 0~50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内的 NR-Pro 孵育 12 h 后, 细胞存活率均大于 85%(支持信息图 S12), 说明 NR-Pro 的生物相容性好, 可用于细胞成像分析. 接着, 应用探针 NR-Pro 对活细胞中外源性 ONOO^- 进行成像分析. 如图 7 所示, 相比于仅使用探针孵育的 RAW264.7 细胞, 加入 20 或

50 $\mu\text{mol/L}$ ONOO^- 后, 红色通道的荧光强度显著增强. 上述结果表明, 探针 NR-Pro 可以实现活细胞中外源性 ONOO^- 的成像分析.

为进一步确定探针 NR-Pro 对活细胞中内源性 ONOO^- 的成像情况, 我们进行了如下实验. 首先将 RAW264.7 细胞分为三组进行实验: 第一组作为对照组(图 8a), 在 NR-Pro 孵育 30 min 后进行成像, 其呈现出微弱的红色荧光, 这可能是由细胞内本身存在的 ONOO^- 造成的. 第二组用 LPS(诱导一氧化氮合酶(iNOS)的刺激剂)和 PMA(产生超氧化物的刺激剂)预刺激细胞产生 ONOO^- ^[39] 后再与 NR-Pro 孵育(图 8b), 观察到细胞内红通道的荧光强度显著增强. 第三组先将细胞与 UA (ONOO^- 清除剂^[40])孵育, 然后再用 LPS 和 PMA 刺激, 再与 NR-Pro 孵育(图 8c), 此时, 细胞的红色荧光强度大幅度减弱, 表明该信号与细胞内 ONOO^- 浓度有关. 此外, 实验中还利用 LPS 刺激 4 h, PMA 刺激 RAW264.7 细胞不同的时间段(0, 10, 30, 50 min), 然后再与探针 NR-Pro 孵育后成像. 如支持信息图 S13 所示, 随着 PMA 刺激细胞时间变长, 细胞内荧光强度逐渐升高, 表明 LPS 诱导的细胞在 PMA 刺激后 ONOO^- 含量逐渐升高. 在对照实验中将 PMA 刺激 50 min 的细胞预先加入尿酸孵育 1 h, 然后再与探针孵育 30 min 后进行成像, 细胞内荧光强度明显下降. 这些结果充分证明了探针 NR-Pro 对活细胞中内源性 ONOO^- 的成像分析具有很大的潜力.

3 结论

利用烷基链将 4,4'-氮杂二基二苯酚和 2-羟基尼罗红衍生物(NR-OH)有机结合, 设计合成了专一检测 ONOO^- 的荧光探针 NR-Pro. 光谱研究表明, 探针

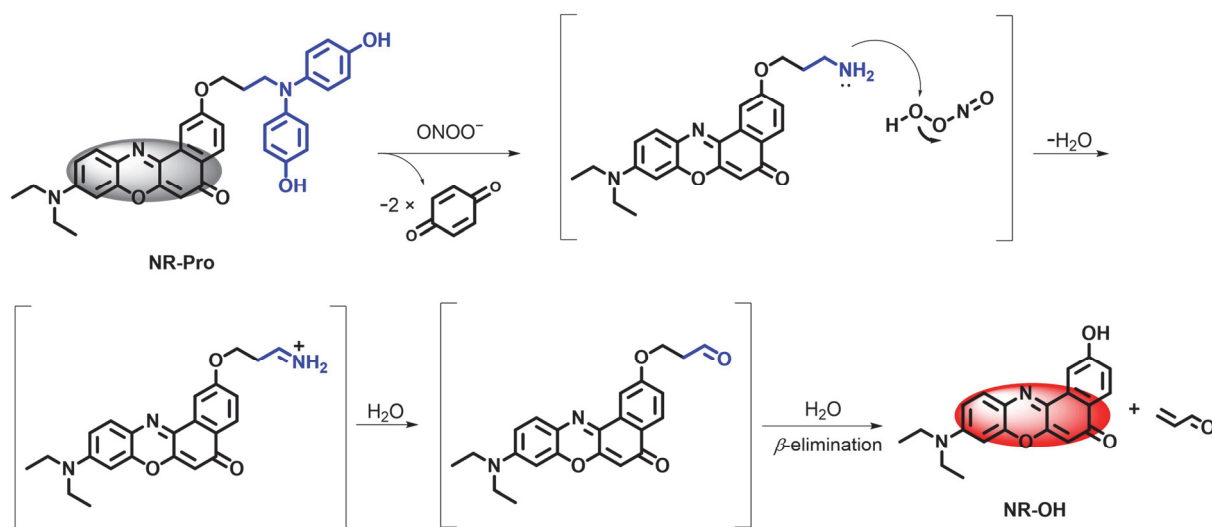


图 5 探针 NR-Pro 检测 ONOO^- 可能的作用机制

Figure 5 Possible mechanism of ONOO^- detection by probe NR-Pro

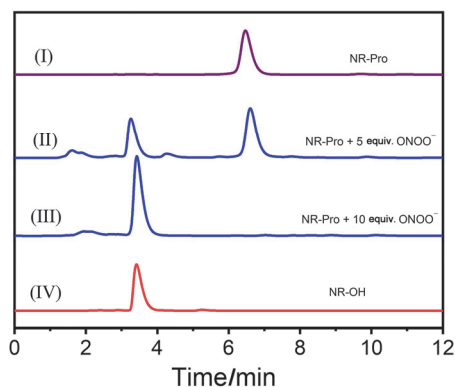


图6 探针 NR-Pro 与 ONOO^- 反应的高效液相色谱图. (I) NR-Pro; (II, III) NR-Pro (5 $\mu\text{mol/L}$) 与 ONOO^- (25 和 50 $\mu\text{mol/L}$) 在 PBS (pH 7.4, 20 mmol/L, 20% MeCN) 中反应的溶液; (IV) NR-OH. 流动相: MeCN/ H_2O (70/30, V/V), 流速 (1 mL/min)

Figure 6 High performance liquid chromatogram of the reaction of probe NR-Pro with ONOO^- . (I) NR-Pro; (II, III) NR-Pro (5 $\mu\text{mol/L}$) and ONOO^- (25 and 50 $\mu\text{mol/L}$) in PBS (pH 7.4, 20 mmol/L, 20% MeCN); (IV) NR-OH. Mobile phase: MeCN/ H_2O (70/30, V/V), flow rate (1 mL/min)

NR-Pro 在 658 nm 处对 ONOO^- 表现出明显的“OFF-ON”型荧光信号响应, 且与 ONOO^- 浓度在 0~10 $\mu\text{mol/L}$ 范围内呈现良好的线性关系, 检出限低至 17.7 nmol/L. 细胞成像实验表明, 该探针显示出良好的生物相容性, 已成功实现了 RAW264.7 细胞中 ONOO^- 的可视化成像, 展现了其在生物应用方面具有重要作用.

4 实验部分

4.1 探针 NR-Pro 的合成

探针的合成路线如支持信息图 S1 所示, 具体合成步骤如下.

4.1.1 化合物 NR-OH 的合成

称取 3-二乙氨基酚 (300 mg, 1.82 mmol) 用 1 mol/L HCl 溶解, 0 $^{\circ}\text{C}$ 下加入 NaNO_2 (125 mg, 1.82 mmol) 的水溶液. 待其反应结束后, 先用粉末状的 NaHCO_3 调节 pH 至中性, 反应液用二氯甲烷萃取, 得到的有机相用饱和食盐水洗涤, 无水 Na_2SO_4 干燥, 浓缩后得到橙红色固态化合物 **I** (240 mg, 产率 68%), 无需纯化直接用于下一步.

将上述反应得到的化合物 **I** (240 mg, 1.24 mmol) 和 1,6-二羟基萘 (397 mg, 2.48 mmol) 用 3 mL DMF 溶解, 加入 3~5 滴甲基磺酸, 80 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌 5 h, 然后将反应液用乙酸乙酯萃取, 得到的有机相用饱和食盐水洗涤, 无水 Na_2SO_4 干燥, 浓缩后的粗产物经硅胶柱层析纯化 (洗脱剂: 二氯甲烷/乙酸乙酯 = 20/1, V/V), 得到黑褐色固体粉末 NR-OH (184.2 mg, 产率 44%). ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ : 10.48 (s, 1H), 7.95 (d, $J=8.4$ Hz, 1H), 7.86 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.54 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 7.08 (dd, $J=8.4, 2.4$ Hz, 1H), 6.76 (dd, $J=9.2, 2.8$ Hz, 1H), 6.59 (d, $J=2.8$ Hz, 1H), 6.12 (s, 1H), 3.47 (q, $J=6.8$ Hz, 4H), 1.15 (t, $J=6.8$ Hz, 6H); HRMS (ESI) calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 333.1233, found 333.1263.

4.1.2 化合物 **III** 的合成

称取 4,4'-二甲氧基二苯胺 (500 mg, 2.20 mmol) 和 NaH (79 mg, 3.30 mmol) 在冰浴条件下用无水 DMF (5 mL) 溶解, 再加入 1,3-二溴丙烷 (4.4 g, 21.80 mmol), 0 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌 30 min, 然后将其加热至 80 $^{\circ}\text{C}$, 反应 48 h. 待反应结束后, 用乙酸乙酯萃取反应液, 饱和食盐水洗涤有机相, 无水 Na_2SO_4 干燥, 浓缩后的粗产物通过硅胶柱层析纯化 (洗脱剂: 石油醚/乙酸乙酯 = 100/1, V/V), 得到淡粉色油状化合物 **II** (320 mg, 产率 42%).

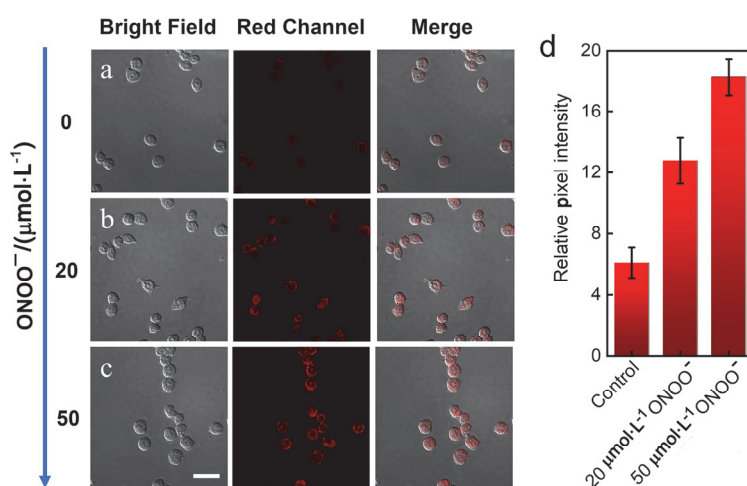


图7 RAW264.7 细胞中外源性 ONOO^- 的荧光成像图. NR-Pro (10 $\mu\text{mol/L}$) 与细胞孵育 30 min, 用 PBS 洗净后进行不同处理: (a) 对照组; (b) 加入 20 $\mu\text{mol/L}$ ONOO^- 孵育 30 min; (c) 加入 50 $\mu\text{mol/L}$ ONOO^- 孵育 30 min; (d) 图像 a~c 中细胞的平均荧光强度. 标尺: 20 μm

Figure 7 Fluorescence imaging of exogenous ONOO^- in RAW264.7 cells. NR-Pro (10 $\mu\text{mol/L}$) was incubated with cells for 30 min, washed with PBS and treated differently: (a) control group; (b) add 20 $\mu\text{mol/L}$ ONOO^- and incubate for 30 min; (c) add 50 $\mu\text{mol/L}$ ONOO^- and incubate for 30 min; (d) average fluorescence intensity of cells in images a~c. Scale bar: 20 μm

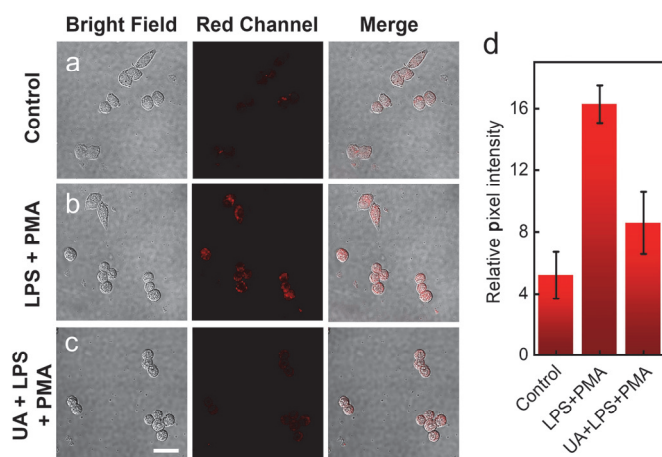


图 8 RAW264.7 细胞中内源性 ONOO^- 的荧光成像图. (a) 细胞与 NR-Pro (10 $\mu\text{mol/L}$) 孵育 30 min; (b) 细胞先用 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS 刺激 4 h, 接着用 1 $\mu\text{g/mL}$ PMA 刺激 30 min, 最后再与 NR-Pro (10 $\mu\text{mol/L}$) 孵育 30 min; (c) 100 $\mu\text{mol/L}$ UA 预处理细胞 1 h 后, 与 LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) 孵育 4 h, PMA (1 $\mu\text{g/mL}$) 孵育 30 min, 再与 NR-Pro (10 $\mu\text{mol/L}$) 孵育 30 min; (d) 图像 a~c 中细胞的平均荧光强度. 标尺: 20 μm

Figure 8 Fluorescence imaging of endogenous ONOO^- in RAW264.7 cells. (a) Incubate the cells with NR-Pro (10 $\mu\text{mol/L}$) for 30 min; (b) cells were first stimulated with 1 $\mu\text{g/mL}$ LPS for 4 h, then 1 $\mu\text{g/mL}$ PMA for 30 min, and finally incubated with NR-Pro (10 $\mu\text{mol/L}$) for 30 min; (c) after 100 $\mu\text{mol/L}$ UA pretreated cells for 1 h, incubate with LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) for 4 h, PMA (1 $\mu\text{g/mL}$) for 30 min, and NR-Pro (10 $\mu\text{mol/L}$) for 30 min; (d) average fluorescence intensity of cells in images a~c. Scale bar: 20 μm

冰浴条件下, 将化合物 **II** (320 mg, 0.91 mmol) 用无水 CH_2Cl_2 (2 mL) 溶解, 然后再向上述反应缓慢加入 BBr_3 (5 mL), 0 $^\circ\text{C}$ 搅拌 30 min 将其恢复至室温, 1 h 完全转化后, 用饱和的 NaHCO_3 淬灭反应, 反应液用二氯甲烷萃取, 得到的有机相用饱和食盐水洗涤, 无水 Na_2SO_4 干燥, 浓缩后得到淡黄色油状化合物 **III** (278 mg, 产率 95%), 无需进一步纯化直接用于下一步. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ : 8.95 (s, 2H), 6.73 (d, $J=8.0$ Hz, 4H), 6.65 (d, $J=8.8$ Hz, 4H), 3.57 (t, $J=6.8$ Hz, 4H), 1.99 (q, $J=6.8$ Hz, 2H).

4.1.3 化合物 NR-Pro 的合成

称取化合物 **III** (116 mg, 0.36 mmol)、染料 NR-OH (100 mg, 0.30 mmol) 和 K_2CO_3 (124 mg, 0.90 mmol) 用 3 mL DMF 溶解, 80 $^\circ\text{C}$ 搅拌 6 h, 反应结束后, 用乙酸乙酯萃取反应液, 得到的有机相用饱和食盐水洗涤, 无水 Na_2SO_4 干燥, 浓缩后的粗产物通过硅胶柱层析纯化 (洗脱剂: 二氯甲烷/乙酸乙酯 = 10/1, $V:V$), 得到紫色固体粉末 NR-Pro (54 mg, 产率 31%). ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) δ : 8.97 (s, 2H), 7.99 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.86 (d, $J=2.4$ Hz, 1H), 7.54 (d, $J=9.2$ Hz, 1H), 7.19 (dd, $J=8.8$, 2.8 Hz, 1H), 6.76 (d, $J=8.8$ Hz, 4H), 6.73 (d, $J=2.8$ Hz, 1H), 6.65 (d, $J=9.2$ Hz, 4H), 6.57 (d, $J=2.8$ Hz, 1H), 6.13 (s, 1H), 4.19 (t, $J=6.0$ Hz, 2H), 3.70 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 3.46 (q, $J=6.8$ Hz, 4H), 1.98 (s, 2H), 1.15 (t, $J=6.8$ Hz, 6H); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz) δ : 181.35, 161.05, 151.81 (2C), 151.60, 150.73, 146.36, 140.86 (2C), 138.17, 133.48, 130.89, 127.15, 124.88, 123.90, 122.08 (4C), 117.88, 115.82 (4C), 113.88, 106.13, 104.04, 95.89, 65.77, 49.50, 44.45 (2C), 26.97, 12.48 (2C); HRMS (ESI) calcd

for $\text{C}_{35}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 576.2492, found 576.2498.

4.2 探针 NR-Pro 的光谱性能测试

ONOO^- 的制备: 冰浴条件下, 在 250 mL 烧杯中快速搅拌 50 mmol/L NaNO_2 和 50 mmol/L H_2O_2 的 50 mL 水溶液. 分别准备一个装有 25 mL 1 mol/L HCl 的烧杯, 一个装有 25 mL 1.5 mol/L NaOH 的烧杯. 再依次将 HCl 溶液快速地倒入 $\text{NaNO}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液中, 中间间隔不超过 1 s 迅速加入 NaOH 溶液, 待溶液变为淡黄色时停止搅拌并将其装入 10 mL 离心管中冷冻储存. 使用时将溶液稀释后测定其在 302 nm 处的吸光度值并计算 ONOO^- 的浓度 ($\epsilon = 1670 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). 其他活性氧的制备参考文献^[41].

NR-Pro 储备液配制及测试方法: 称取化合物 NR-Pro 5.76 mg, 用 DMSO 溶解定容至 10 mL 容量瓶, 所得到探针母液的浓度为 1 mmol/L. 测试时, 在 10 mL 比色管中依次加入 25 μL 探针母液, 1 mL 乙腈, 500 μL 磷酸缓冲溶液 (pH 7.4, 0.2 mol/L), 然后用蒸馏水定容至 5 mL. 再加入 ONOO^- , 配成含不同浓度 ONOO^- (0~50 $\mu\text{mol/L}$) 的探针溶液, 将其摇匀后置于 37 $^\circ\text{C}$ 水浴锅中反应 30 min 测定紫外-可见吸收光谱和荧光光谱变化情况. 荧光光谱扫描参数设置为: $\lambda_{\text{ex}} = 580 \text{ nm}$, 仪器狭缝设置为 5, 5 nm.

4.3 细胞实验

4.3.1 细胞培养和细胞毒性实验

使用 DMEM 培养基 (10% 胎牛血清和 1% 青霉素、链霉素) 于 37 $^\circ\text{C}$, 5% CO_2 恒温培养箱中培养 RAW264.7 细胞使其贴壁生长. 采用标准的 MTT 比色法测定探针 NR-Pro 的细胞毒性作用. 将 RAW264.7 细胞接种在 96 孔板中培养 24 h, 随后分别加入不同浓度的 NR-Pro 溶

液孵育 12 h. 用 PBS 缓冲溶液洗除残留的探针后, 将 10 μL MTT (5.0 mg/mL, HEPES) 添加到每孔中继续孵育 4 h, 然后除去上清液, 再加入 100 μL DMSO 溶解形成蓝色甲瓞, 在摇床上连续振摇 10 min, 最后用酶标仪读取各孔溶液在 490 nm 处的吸光度. 根据公式 $V_R = A/A_0 \times 100\%$ 计算细胞毒性(V_R), 其中 A 、 A_0 分别为实验组和对照组的吸光度值. 每组浓度平行测定 6 次.

4.3.2 细胞成像实验

将 RAW264.7 细胞接种在共聚焦成像专用培养皿中, 使其贴壁生长 12 h. 进行外源性 ONOO⁻ 成像时, 将细胞与 10 $\mu\text{mol/L}$ 探针 NR-Pro 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30 min, 用 PBS (pH 7.4) 洗涤 3 次, 再分别加入不同浓度的 ONOO⁻ (20 或 50 $\mu\text{mol/L}$) 孵育 30 min. 内源性 ONOO⁻ 成像时, 细胞先用脂多糖(LPS, 1 $\mu\text{g/mL}$) 刺激 4 h, 再用佛波醇-12-十四酸酯-13-乙酸酯(PMA, 1 $\mu\text{g/mL}$) 刺激 30 min, 然后加入探针 NR-Pro (10 $\mu\text{mol/L}$) 孵育 30 min. 在与其相比较的对照实验中, 将 LPS 和 PMA 刺激前的细胞用尿酸(UA, 100 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 1 h, 然后加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 探针 NR-Pro 孵育 30 min. 待上述细胞均孵育结束后用 PBS 洗涤 3 次后, 进行激光共聚焦成像($\times 40$ 物镜). 激发波长: 594 nm, 荧光成像波长采集范围: 640~720 nm.

References

- [1] Nathan, C.; Cunningham-Bussell, A. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13*, 349.
- [2] Dickinson, B. C.; Chang, C. J. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 504.
- [3] Liu, Y.; Teng, L.; Lyu, Y.; Song, G.; Zhang, X. B.; Tan, W. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 2216.
- [4] Wang, Y.; Shi, L.; Ye, Z.; Guan, K.; Teng, L.; Wu, J.; Yin, X.; Song, G.; Zhang, X. B. *Nano. Lett.* **2020**, *20*, 176.
- [5] Ferrer-Sueta, G.; Campolo, N.; Trujillo, M.; Bartsaghi, S.; Carballal, S.; Romero, N.; Alvarez, B.; Radi, R. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 1338.
- [6] Radi, R. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 26464.
- [7] De Armas, M. I.; Esteves, R.; Viera, N.; Reyes, A. M.; Mastrogianni, M.; Alegria, T. G. P.; Netto, L. E. S.; Tortora, V.; Radi, R.; Trujillo, M. *Free Radic. Biol. Med.* **2019**, *130*, 369.
- [8] Graham, P. M.; Li, J. Z.; Dou, X.; Zhu, H.; Misra, H. P.; Jia, Z.; Li, Y. *Mol. Cell Biochem.* **2013**, *378*, 291.
- [9] Li, X.; Tao, R. R.; Hong, L. J.; Cheng, J.; Jiang, Q.; Lu, Y. M.; Liao, M. H.; Ye, W. F.; Lu, N. N.; Han, F.; Hu, Y. Z.; Hu, Y. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 12296.
- [10] Islam, M. T. *Neurol. Res.* **2017**, *39*, 73.
- [11] Munn, L. L. *WIREs Syst. Biol. Med.* **2017**, *9*, e1382.
- [12] Xie, X.; Tang, F.; Liu, G.; Li, Y.; Su, X.; Jiao, X.; Wang, X.; Tang, B. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 11629.
- [13] Bartsaghi, S.; Radi, R. *Redox Biol.* **2018**, *14*, 618.
- [14] Hu, J. S.; Shao, C.; Wang, X.; Di, X.; Xue, X.; Su, Z.; Zhao, J.; Zhu, H. L.; Liu, H. K.; Qian, Y. *Adv. Sci.* **2019**, *6*, 1900341.
- [15] Gao, L.; Wang, W.; Wang, X.; Yang, F.; Xie, L.; Shen, J.; Brimble, M. A.; Xiao, Q.; Yao, S. Q. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 1219.
- [16] Zhang, S. Y.; Ning, L. L.; Song, Z. H.; Zhao, X. Y.; Guan, F.; Yang, X. F.; Zhang, J. J. *Anal. Chem.* **2022**, *94*, 5805.
- [17] Zhao, X. Y.; Ning, L. L.; Zhou, X. M.; Song, Z. H.; Zhang, J. J.; Guan, F.; Yang, X. F. *Anal. Chem.* **2021**, *93*, 4894.
- [18] Wu, W.; Zhang, C.; Rees, T. W.; Liao, X.; Yan, X.; Chen, Y.; Ji, L.; Chao, H. *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 6003.
- [19] Ueno, T.; Nagano, T. *Nat. Methods* **2011**, *8*, 642.
- [20] Chan, J.; Dodani, S. C.; Chang, C. J. *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 973.
- [21] Zhang, J.-J. *Fine Chem.* **2020**, *37*, 2229 (in Chinese). (张素雅, 张健健, 精细化工, **2020**, *37*, 2229.)
- [22] Li, Y.; Ning, L. L.; Yuan, F.; Zhang, T.; Zhang, J. J.; Xu, Z. G.; Yang, X. F. *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 5733.
- [23] Zhao, X. Y.; Ding, M. B.; Ning, L. L.; Yuan, F.; Li, J. C.; Guo, Y.; Mu, Y. G.; Zhang, J. J. *Acta Mater. Med.* **2022**, *1*, 476.
- [24] Yuan, F.; He, X. M.; Lu, Y. R.; Ning, L. L.; Zhao, X. Y.; Zhang, S. Y.; Guan, F.; Guo, Y.; Zhang, J. J. *Anal. Chem.* **2023**, *95*, 6931.
- [25] Lv, X.; Wu, Y.; Zhang, B.-R.; Guo, W. *Acta Chim. Sinica* **2023**, *81*, 359 (in Chinese). (吕鑫, 吴仪, 张勃然, 郭炜, 化学学报, **2023**, *81*, 359.)
- [26] Li, X.; Liang, X.; Yin, J.; Lin, W. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 102.
- [27] Lu, J.; Li, Z.; Gao, Q.; Tan, J.; Sun, Z.; Chen, L.; You, J. *Anal. Chem.* **2021**, *93*, 3426.
- [28] Wang, N.; Wang, H.; Zhang, J.; Ji, X.; Su, H.; Liu, J.; Wang, J.; Zhao, W. *Chin. Chem. Lett.* **2022**, *33*, 1584.
- [29] Cui, J.; Zang, S.; Nie, H.; Shen, T.; Su, S.; Jing, J.; Zhang, X. *Sensor. Actuat. B-Chem.* **2021**, *328*, 129069.
- [30] Chen, S.; Vurusaner, B.; Pena, S.; Thu, C. T.; Mahal, L. K.; Fisher, E. A.; Canary, J. W. *Anal. Chem.* **2021**, *93*, 10090.
- [31] Huang, J.; Wang, C.; Lin, M.-G.; Zeng, F.; Wu, S.-Z. *Acta Chim. Sinica* **2021**, *79*, 331 (in Chinese). (黄靖, 王超, 林敏刚, 曾钊, 吴水珠, 化学学报, **2021**, *79*, 331.)
- [32] Chen, F.; Teng, L.; Lu, C.; Zhang, C.; Rong, Q.; Zhao, Y.; Yang, Y.; Wang, Y.; Song, G.; Zhang, X. *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 13452.
- [33] Zhou, D. Y.; Li, Y.; Jiang, W. L.; Tian, Y.; Fei, J.; Li, C. Y. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 11590.
- [34] Cheng, D.; Peng, J.; Lv, Y.; Su, D.; Liu, D.; Chen, M.; Yuan, L.; Zhang, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 6352.
- [35] Martinez, V.; Henary, M. *Chemistry* **2016**, *22*, 13764.
- [36] Jose, J.; Burgess, K. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 11021.
- [37] Sebok-Nagy, K.; Miskolczy, Z.; Biczok, L. *Photochem. Photobiol.* **2005**, *81*, 1212.
- [38] Wang, P.; Yu, L.; Gong, J.; Xiong, J.; Zi, S.; Xie, H.; Zhang, F.; Mao, Z.; Liu, Z.; Kim, J. S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2022**, *61*, e202206894.
- [39] Lin, K. K.; Wu, S. C.; Hsu, K. M.; Hung, C. H.; Liaw, W. F.; Wang, Y. M. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 4242.
- [40] Hooper, D. C.; Scott, G. S.; Zborek, A.; Mikheeva, T.; Kean, R. B.; Koprowski, H.; Spitsin, S. V. *FASEB J.* **2000**, *14*, 691.
- [41] Wang, Z.; Cong, T. D.; Zhong, W.; Lau, J. W.; Kwek, G.; Chan-Park, M. B.; Xing, B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2021**, *60*, 16900.

(Lu, Y.)