检测活性氮/活性氧的分子荧光探针

矫春鹏^{a,b,c,d} 刘媛媛^{a,b,c,d} 路文娟^{a,b,c,d}
张平平^{a,b,c,d} 王延凤^{*,a,b,c,d}

(^a 济南大学山东省医学科学院医学与生命科学学院 济南 250062)

(^b 山东省医学科学院药物研究所 济南 250062)

(^c 国家卫生部生物技术药物重点实验室 济南 250062)

(^d 山东省罕见病重点实验室 济南 250062)

摘要 活性氮和活性氧是具有强生物活性的化学物质。在人体细胞中,由于酶促或非酶促过程均可生成过氧化物,该物种的异常水平会引起氧化损伤与衰老和各种疾病,如心血管疾病、神经性疾病、阿尔茨海默病、帕金森病甚至癌症。因此,发展选择性识别和高灵敏度的分子荧光探针,实现活性氮或活性氧的有效检测具有重要意义。分子荧光探针检测法与成像技术具有灵敏度高、选择性强、损伤性小和细胞相容性好等优点,并在阐述活性氮和活性氧的病理生理过程中起到重要作用,在生物和医学等领域应用广泛。然而,由于活性氮和活性氧自身的特殊性而存在许多难题,例如反应活性高、存在周期短等一直困扰研究人员。着重综述了近年来发展的分子荧光探针用于活性氮和活性氧的检测及细胞成像工作的研究进展,提出进一步构建新型分子荧光探针用于活性氮和活性氧检测面临的挑战、未来发展方向及展望。

关键词 活性氮; 活性氧; 荧光探针; 荧光成像

Molecular Fluorescence Probe for Detecting Reactive Nitrogen/Reactive Oxygen

Jiao, Chunpeng^{a,b,c,d} Liu, Yuanyuan^{a,b,c,d} Lu, Wenjuan^{a,b,c,d}
Zhang, Pingping^{a,b,c,d} Wang, Yanfeng^{*,a,b,c,d}

(^a School of Medicine and Life Sciences, University of Jinan-Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062)

(^b Institute of Materia Medica Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062)

(^c Key Laboratory for Biotech-Drugs Ministry of Health, Jinan 250062)

(^d Key Laboratory of Rare and Uncommon Diseases of Shandong Province, Jinan 250062)

Abstract Reactive nitrogen and reactive oxygen are chemical substances with strong biological activity. In human cells, peroxides can be generated due to enzymatic or non-enzymatic processes. Abnormal levels of peroxide can cause oxidative damage and aging and various diseases such as cardiovascular disease, neurological diseases, Alzheimer's disease, Parkinson's disease and even cancer. In order to effectively cure these diseases, health workers must find the source of the problem. Currently, there is no better way to detect reactive oxygen species and reactive nitrogen. Fluorescence spectrometry in recent years becomes the preferred method for the majority of researchers for detecting active oxygen and reactive nitrogen. Therefore, the development of selective recognition and high sensitivity molecular fluorescent probes to achieve effective detection of reactive nitrogen and reactive oxygen species is of great significance. On one hand, molecular fluorescent probe detecting and imaging technology has excellent characteristics such as high sensitivity, strong selectivity, small damage and good cell compatibility. On the other hand, fluorescent probes play an important role in the pathophysiological process of reactive nitrogen and reactive oxygen species. Therefore, the fluorescent probe method is widely used in the fields of biology and medicine. However, due to the inherent specificity of reactive nitrogen and reactive oxygen species, it has become an urgent problem for researchers, such as high reactivity, short cycle, etc. In order to overcome the shortcomings of fluorescent probe

* Corresponding author. E-mail: wyfshiwoya@126.com

Received October 12, 2018; revised November 2, 2018; published online November 30, 2018.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21305079).

国家自然科学基金(No. 21305079)资助项目。

analysis, researchers are constantly striving to find better active fluorescent probes for the detection of reactive nitrogen and reactive oxygen species. Recent evolutions in the development of molecular fluorescent probes for the detection of active nitrogen and reactive oxygen species and cell imaging work are reviewed. Finally, a new type of molecular fluorescent probe is proposed to be used for the challenge of active nitrogen and active oxygen detection, and the future development direction and prospect.

Keywords reactive nitrogen species; reactive oxygen species; fluorescence probe; fluorescence imaging

生物机体在含氧新陈代谢过程中会产生多种自由基, 活性氮物种(Reactive nitrogen species, RNS)和活性氧物种(Reactive oxygen species, ROS)便是其中重要的两类^[1]. RNS 主要是一氧化氮(NO)与包括 ROS 在内的活性物质相互作用衍生出的一系列具有高度活性的自由基和硝基类化合物, 主要包括一氧化氮(NO)、二氧化氮(NO₂)、次硝酸(HNO)、亚硝酸根离子(NO₂⁻)和过氧化亚硝酰阴离子(ONOO⁻)等^[2]. RNS 在自然界分布广泛, 人体中活性氮物种对于癌症具有双向作用, 一方面通过产生亚硝胺类致癌物破坏 DNA 并抑制 DNA 修复系统引发癌症, 另一方面则具有阻止癌细胞转移和抑制分化的作用^[3,4]. 正常水平的 RNS 对人体生理机能具有至关重要的意义, 细胞信号的传导、机体物质合成代谢与能量转换等都需要 RNS 的介导, 一旦水平失衡便会引起人体机能紊乱, 诱发各种疾病^[5]. ROS 是机体在有氧环境下的代谢副产品, 氧被过氧化酶催化形成过氧化离子或超氧化离子, 在细胞中经过不断转化最后可形成化学反应活跃的氧自由基, 主要包括氧离子、过氧化物(H₂O₂, HClO 等)和含氧自由基(HO•等)^[6]. ROS 对机体也具有双重性. 优点: 少量 ROS 可激活环氧化酶和脂氧合酶活性. 而过量 ROS 则起到抑制作用; 巨噬细胞在吞噬异物过程中生成大量氧自由基和过氧化氢, 并摧毁异物或细菌. 可见 ROS 与某些机体生理活性物质的调控和免疫过程有关. 弊端: 像金属被氧化物腐蚀一样, 机体内 ROS 过度活跃则会起到破坏作用, 如共价结合, 改变多不饱和脂肪酸与蛋白质的比例而干扰膜的转运功能, 加速人体衰老及细胞损坏^[7]. 因此, 探索环境及机体中活性氮和活性氧的含量、分布及作用机制成为目前重要的研究领域.

检测活性氮和活性氧的方法有比色法、质谱法、电化学分析法、电子自旋共振波谱法、紫外可见光谱分析法和荧光分析法等^[8]. 其中, 荧光分析法具有灵敏度高、生物相容性好、易于化学和生物学修饰等优点, 备受分析化学、生物学和医学等领域的关注, 尤其是近年来被广泛应用于活性氮和活性氧检测, 大大推进人们对机体活性氮和活性氧的研究进程.

近 10 年来, 活性氮和活性氧及其衍生物的荧光可视化检测一直是环境、生物和医学领域研究的热点和重点, 国内外研究者对活性氮和活性氧的分子荧光探针的设计与合成方法不断地被创新和改造并取得众多成效.

本文主要综述近 5 年来在活性氮和活性氧方面的分子荧光探针的研究进展.

1 用于检测活性氮的荧光探针

1.1 用于一氧化氮(NO)检测的荧光探针

一氧化氮(NO)是一种具有高度活性的自由基气体, 其作为一种信号因子无处不在, 在生物生理系统的稳态调节过程中扮演重要角色, 例如: 神经系统方面, 作为信号传导因子, 参与神经递质的释放传递; 心血管方面, 可以促使血管平滑肌舒张减压; 在合适的作用时间和位点进行诱导, 具有良好的抗病毒、抗菌、抗肿瘤等免疫功效; 随着近年来的研究表明, NO 在抗细胞凋亡和衰老等方面也具有一定效果. 异常的 NO 水平, 则会打破原有生理平衡, 引起多种疾病, 例如阿尔兹海默综合症和帕金森综合症等疾病^[9,10].

近年来, 涌现出一系列利用邻苯二胺与 NO 成五元环抑制光诱导电子转移(Photoinduced electron transfer, PET)机理从而改变荧光团母核的荧光探针^[11]. 该类探针中荧光团受到激发后基态电子跃迁到高能级从而产生空轨道, 邻苯二胺基团将处于最高能级的电子转移到该空轨道中, 这就导致荧光团中被激发的电子无法直接跃迁回基态发射荧光, 从而导致了荧光的淬灭(Eq. 1). 江华和李国平课题组^[12]介绍了一种以 2-乙酰基-6-二甲氨基基团为荧光团, 用于细胞中 NO 检测的双光子荧光探针 **1**. 在与 NO 接触后, 邻苯二胺结构被氧化, PET 过程受到抑制, 546 nm 处荧光强度增强, 其紫外吸收波长从 390 nm 蓝移至 358 nm, 并被成功应用于细胞 NIH3T3 成像. 为减少细胞损伤并将其应用于人体检测, 刘志宏课题组^[13]设计并合成了一种基于喹啉的近红外双光子荧光探针 **2**, 并用于活细胞和组织中的 NO 检测. 该探针在 810 nm 激发波长下与 NO 接触后, 邻苯二胺中的两个氨基与 NO 反应形成五元杂环, 抑制了 PET 过程, 使得在 810 nm 双光子激发波长下 535 nm 处强荧光强度逐渐增强, 同时由于探针具有高选择性、低细胞毒性和 pH 不敏感性等优点, 可以应用于 90~180 μm 深度的活体组织细胞中的 NO 检测. 同时, 探针 **3** 是刘海英课题组^[14]为了更好地适应水性检测环境设计并合成的一个基于硼二吡咯烷(BODIPY)类衍生物的高水溶性荧光探针, 侧链位置三甘醇甲基醚的引入大大提高了该化合物

的水溶性, 2,6-位引入的富电子邻苯二胺作为响应基团. 由于发生邻苯二胺向 BODIPY 的 PET 作用, BODIPY 染料的荧光发生明显的猝灭; 当进行细胞中 NO 检测时, 邻苯二胺结构被氧化成五元杂环, PET 过程被阻止, 荧光恢复, 557 nm 处荧光增强. 该探针具有优异的水溶性、膜透性和与活细胞的相容性, 并成功检测到 RAW 264.7 中的内源性 NO.

随后, 崔京南课题组^[15]基于 PET 与分子内电荷转移(ICT)效应设计并合成一个用于 NO 检测的荧光探针 4. 探针 4 以萘酰亚胺为荧光团, 在 3,4-位引入氨基响应基团, 邻位两个氨基与 NO 选择性反应生成三唑环后, 发射波长发生蓝移, 在生理条件下生成 DAN-T 的三唑化物形式, 抑制了 1,8-萘二甲酰亚胺的 3-氨基的 PET 效应与 4-氨基的 ICT 效应, 454 nm 处荧光强度增强, 并应用于细胞 HT29 成像中. 与探针 4 的 PET 和 ICT 原理一样, 王丽秋课题组^[16]设计并合成一个靶向溶酶体检测 NO 的分子荧光探针 5. 该探针同样以萘酰亚胺为荧光团, 引入溶酶体目标基团 4-(2-氨基乙基)-吗啉, 生理 pH 下稳定性良好, 在与 NO 反应后形成大共轭体系, 荧光量子产率提高, 454 nm 处强度增强, 具有高灵敏度(4.57

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

与前 5 个探针机理不同, 王云铭课题组^[17]报道了一个利用罗丹明内酰胺环的开启用于 NO 检测的探针 6, 选用罗丹明作为荧光团, 水合肼氨基与罗丹明羧基反应生成内酰胺环, 当与 NO 反应后, 内酰胺环打开显现罗丹明荧光, 580 nm 处荧光强度增强(Eq. 2). 2013 年, 肖义课题组^[18]利用相同机理并引进三苯基膦靶向线粒体合成了分子荧光探针 7. 该探针具有选择性高、检测限低 ($4.0 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、细胞毒性低和靶向性强等优点, 并成功应用于活细胞 MCF-7 和 RAW 264.7 线粒体中 NO 的检测(Eq. 3).

图 1 探针 7 与 NO 反应细胞成像
Figure 1 Imaging of probe 7 and NO reactive cells

过渡金属由于其顺磁性对处于激发态荧光团具有淬灭作用被研究者所关注, 基于过渡金属络合物的荧光团被设计并研究. NO 可与过渡金属生成新金属亚硝酰基络合物, 金属顺磁性被破坏或者与荧光团竞争夺去过渡金属, 荧光团荧光恢复^[19]. Ali 课题组^[20]设计并合成出探针 **8** 用于 NO 检测, 该探针是基于丹磺酰基引入不饱和含 N 杂原子环与顺磁性 Cu^{2+} 络合淬灭荧光, 在与 NO 反应后, 络合金属由 Cu^{2+} 到 Cu^+ , 顺磁性被破坏, 532 nm 处荧光团荧光强度增强, 并成功用于 HeLa 细胞 NO 检测成像(Eq. 4). 与 Ali 课题组工作相同, 均利用金属顺磁性的淬灭效果, Mondal 课题组^[21]报道了探针 **9**. 该探针具有高水溶性和高选择性, 当与 NO 反应后, 金属离子被剥夺, 顺磁性干扰消除, 荧光团 400 nm 处荧光强度增强, 并被成功用于 SKN-SH 细胞检测 NO (Eq. 5).

基于 NO 重氮化反应, Yoon 课题组^[22]报道了探针 **10**, 该探针由二甲氨基苯和苯并噻吩通过 4-氨基甲苯的 2,5 位连接, 在与 NO 反应后苯胺上氨基发生重氮化反应与二甲氨基苯 4 位连接形成大 π 体系, 形成比率型荧光探针, 二甲氨基苯形成的大 π 体系在 470 nm 处的荧光增强, 苯并噻吩在 560 nm 处的荧光减弱(Eq. 6). 相比其它 H_2O_2 , ONOO^- , ClO^- , $\cdot\text{OH}$, NO_2^- , NO_3^- 等活性氮、活性氧物质具有高选择性, 成功应用于 HeLa 细胞检测 NO 并成像. 与 Yoon 课题组相似, 宋钦华课题组^[23]设计并合成双光子荧光探针 **11**, 可选择性快速检测活体细胞和组织切片中的 NO, 该探针以 5-氨基喹啉作为荧光团前体, 6-位引入二甲氨基苯作为响应位点, 与 NO 反应后发生重氮化反应, 540 nm 处荧光强度增强, 具有低检测限($15 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)和高灵敏度等优点, 成功被用于 RAW 264.7 细胞检测 NO 成像(Eq. 7).

科学研究发现 5-甲基胞嘧啶、鸟嘌呤、腺嘌呤中的氨基可被 NO 诱导脱落. 基于 NO 的这一特殊机理, Luis 和 Galindo 课题组^[24]报道了基于吡喃阳离子以邻羟基氨基为基础的探针 **12**, 在与 NO 反应后, 苯环上氨基脱落, 550 nm 处荧光强度增强, 检测限低($2.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 相比 H_2O_2 , ONOO^- , ClO^- , $\cdot\text{OH}$, NO_2^- , NO_3^- , HNO , O_2 等物质具有高选择性, 并被成功用于 RAW 264.7 细胞检测 NO 及成像(Eq. 8).

2.2 用于 HNO 检测的荧光探针

次硝酸(HNO)被认为是 NO 被线粒体黄嘌呤氧化酶和细胞色素 C 还原的产物, 具有一定的药理作用, 例如: 对心力衰竭和钙通道具有正向调节作用, 对肿瘤细胞的生长繁殖具有抑制作用, 同时也是有效的血小板聚集抑制剂. 目前用于 HNO 检测的探针响应机理主要有两种类型.

第一种类型为(二苯基膦基)苯酸盐作为反应基团: 当与 HNO 结合以后, (二苯基膦基)苯酸盐通过 Staudinger ligation(施陶丁格反应)转化为羟基, 此时通过螺内开环机制或者 ICT(分子内电荷转移)机制促使荧光团的荧光恢复(Scheme 1). 自第一例此种类型的 HNO 荧光出现以后^[25], 大量的该类型探针涌现. 2014 年谭蔚泓课题组^[26]报道了一种以香豆素类为荧光团用于对水溶液和血清中硝酰基检测的探针 **13**. 该探针在香豆素

7-位羟基引进二苯基膦苯甲酸酯作为 HNO 的检测基团, 在与 HNO 接触后 7-羟基香豆素荧光团被释放, 450 nm 处荧光强度增强. 该探针具有选择性高、灵敏度高、细胞毒性低、检测限低($20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)及不受其他生物还原剂影响等优点, 对血清中 HNO 的定量检测结果满意, 有利于复杂生物样品中 HNO 的直接定量检测, 具有实用价值. King 课题组^[27]合成了以荧光素为荧光团的 HNO 探针 **14**, 该探针能够用于 Hela 细胞内 HNO 的共聚焦成像.

图式 1 苯酸盐作为反应基团

Scheme 1 Diphenylphosphino groups as reactive groups

为了提高探针的选择性, 2015 年朱宝存和张晓玲课题组^[28]设计并合成了一种用于 HNO 检测的荧光探针 **15**. 该探针以 2-(二苯基膦)苯甲酸酯作为响应基团, 即使在谷胱甘肽、硫化氢和抗坏血酸等生物还原剂存在下仍具有较高的 HNO 选择性, 2-(2-羟基苯基)苯并噻唑作为荧光团显色, 在与 HNO 接触后, 探针可快速响应, 紫外吸收波长红移, 495 nm 处荧光强度增强, 检出限为 $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 并用于 HeLa 细胞检测 HNO. 2016 年杨小峰课题组^[29]设计了一种基于花青素骨架的线粒体靶向 NIR 荧光探针 **16**. 该探针以亲脂阳离子为线粒体靶向位点, 在与 HNO 反应后 727 nm 处荧光出现, 该探针对于 HNO 有较高的敏感性和选择性. 细胞成像和共定位实验证明该探针适用于活细胞线粒体中 HNO 的可视化检测(图 2). 林伟英课题组^[30]设计了三种均具有良好选择性、高敏感性以及低细胞毒性的探针 **17A**~**17C**. 三种化合物除可以单独使用外, 还可以混合使用, 当三种

化合物共同培养细胞时, 在 HNO 存在下可以观察到从绿色到彩色的多种颜色变化, 这种多种颜色变化使观察更加精准, 且化合物 **17C** 还可以用于小鼠体内成像. 2017 年 Thomas 课题组^[31]报道了一种基于 BODIPY 的荧光探针 **18**. 该探针具有高灵敏度、高选择性、低细胞毒性等优点, 已用于检测水溶液和活 264.7 细胞中的 HNO. 2018 年彭孝军课题^[32]以 6-羟基噻唑-2-苯并噻唑的衍生物合成了双光子荧光探针, 该探针能够检测 RAW 264.7 细胞外生型及 Hela 内生型 HNO, 在病理学及生理学研究方面将是很好的工具. 除此之外, 还有多个文献报道了相关的工作^[33-35].

图 2 探针 **16** 与 HNO 反应细胞成像Figure 2 Imaging of probe **16** with HNO-reactive cells

第二类为基于铜络合物的荧光探针. 该类探针与 HNO 反应前, 发生荧光团到 Cu(II)成单电子 d 轨道的 PET, 致使荧光团的荧光淬灭. 与 HNO 反应后, 二价铜离子被还原为一价, d 轨道全部配对, PET 作用受到限制, 荧光重新恢复(Eq. 9).

2010年 Lippard 等^[36]首次报道了基于该机理的荧光探针. 在该开创性的工作之后, Lippard 课题组^[37]于 2014 年首次合成一例近红外 HNO 荧光探针 **19**, 该探针对于生物样品具有低的光损伤、低背景噪声以及较强的组织穿透力. 该化合物以 2-羟基氧杂蒽作为荧光团, 与 HNO 结合后 715 nm 荧光强度增大 5 倍; 与硫醇及其他活性氮、活性氧相比, 该探针对 HNO 有很好的选择性. 该课题组^[38]于 2015 年以四甲基罗丹明为荧光团合成了探针 **20**, 当探针与过量的 AS (Angeli's salt) 作用时, 580 nm 处的荧光有 4 倍的增加, 且该探针有很好的选择性, 能够用于生物环境中 HNO 的检测. 为了增加探针分子的生物相容性, Yoon 等^[39]设计合成了水溶性的探针 **21**, 该探针对 HNO 及 NO 都有荧光响应, 且能用于细胞成像. 2016 年邢国文等^[40]以部花青-吡啶作为荧光基团合成探针 **22**, AS 处理以后 595 nm 处的荧光明显加强, 能够用于脂质体中 HNO 的检测.

Chan 课题组^[41]合成了一例以硫醇作为结合位点的 HNO 探针 **23**, 该探针响应机理与(二苯基膦基)苯酸盐

类似(Scheme 2). AS 处理后该探针荧光有 16 倍的增强, 硫醇类基团对此均无干扰. 该探针能够用于细胞成像.

图式 2 探针 **23** 对 HNO 的响应机理
Scheme 2 HNO detection mechanism of probe **23**

2.3 用于 ONOO⁻检测的荧光探针

过氧亚硝酸根(ONOO⁻)被认为是生物系统中一种强氧化剂, 它的存在会导致生物分子氧化并参与各种生理和病理过程, 这种化学特性使其成为神经退行性疾病、炎症性疾病、心血管疾病、代谢性疾病、疼痛和癌症等的致病因子, 过氧亚硝酸盐也被证明是生物体免疫应答和细胞信息传递的重要信号因子. 由于 ONOO⁻在细胞内的氧化还原平衡是一个复杂的生物系统氧化还原过程, 为了阐明 ONOO⁻发挥其独特生物学作用的机制, 开发具有高选择性、高灵敏度和高效率的检测方法显得尤为重要, 因此分子荧光探针检测法被生物医学环境等领域的工作者高度重视^[42,43].

目前设计用于 ONOO⁻检测的荧光探针主要有以下几种方式.

第一类是通过 ONOO⁻对硼酸酯的氧化反应, 在与 ONOO⁻结合以后硼酸酯基团脱落, 探针被氧化成相应的酚类化合物(Scheme 3), Sikora 课题组^[44]报道了基于该原理的荧光素衍生物探针 **24** (FBBE), 该探针利用 ONOO⁻的氧化作用导致硼酸酯基团破坏, 518 nm 处荧光强度增强, 同时, FBBE 探针也用于研究使用阿霉素蒽环类抗生素多柔比星培育的内皮细胞(Ea.hy926)中的氧化应激. 王云铭课题组^[45]在 2017 年又将 4-溴甲基苯基硼酸频哪醇酯和香豆素相连合成比率型荧光探针 **25**. 该探针与 ONOO⁻反应, 苯硼酸酯基团被氧化, 香豆素荧光团被释放, 此时 390 nm 处苯硼酸酯荧光强度降低, 450 nm 处香豆素母核荧光强度增强. 该探针具有毒性

低、选择性强和灵敏度高等优点,被成功用于细胞 RAW264.7 和 EAhy926 的内源性外源性 ONOO^- 的检测. 随后,朱宝存课题组^[46]基于 ICT 原理设计并合成了荧光探针 **26**. 该探针在与 ONOO^- 反应后荧光团显色,颜色变化肉眼可见. 该探针具有选择性好、灵敏度高、响应快($<5\text{ s}$)、检出限低(0.9 和 $17\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)和细胞毒性低等优点,可用于活体细胞内源性的荧光成像.

图式 3 硼酸酯被 ONOO^- 氧化
Scheme 3 Boronate oxidation by ONOO^-

第二种类型是 ONOO^- 将 $\text{C}=\text{C}$ 和 $\text{C}=\text{N}$ 的双键氧化断裂. 利用该原理 Yoon 课题组^[47]设计并合成了由香豆素-半酰胺连接的红色荧光探针 **27**, 该探针在与不同浓度 ONOO^- 反应后, 碳碳双键断裂, 香豆素荧光团释放, 422 nm 处荧光强度增强, 568 nm 处荧光强度减弱, 呈比率型变化, 探针检测限为 49.7 nm , 具有优异的细胞膜穿透性, 适合对细胞内源性和外源性 ONOO^- 进行测定(Scheme 4). 张向阳课题组^[48]设计并合成一种基于分子内质子传递(ESPT)机理的苯并噻唑衍生物分子荧光探针 **28**, 该探针通过苯并噻唑与胍基吡啶相连引进 $\text{C}=\text{N}$, 在与过氧硝酸根接触后, $\text{C}=\text{N}$ 键被氧化断裂, 524 nm 处荧光强度增大 40 倍, 且具有检测限低($5.8\times$

$10^{-8}\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、响应速度快(60 s 内)和选择性高等优点, 并被成功用于 HeLa 细胞中的过氧硝酸根成像. 余孝其课题组^[49]介绍了一种高水溶性用于内源性 ONOO^- 检测的荧光探针 **29**, 作者采用具有良好光稳定性、大 Stokes 位移和较高量子产率的香豆素支架作为荧光载体, 并通过引入吡啶基以提高其水溶性. 通过 $\text{C}=\text{C}$ 与可提高水溶性的吡啶连接, 在与过氧亚硝酸盐接触后, $\text{C}=\text{C}$ 被氧化, 493 nm 处荧光显现, 具有敏感性高、选择性优异、反应时间快和细胞毒性低等优点, 已经被成功用于 RAW264.7 中内源性过氧亚硝酸盐的检测.

图式 4 探针 **27** 对 ONOO^- 的响应机理
Scheme 4 Sensing mechanism of probe **27** for monitoring ONOO^-

第三类是利用硒、碲的氧化来实现探针荧光的变化. 2017 年, 孙春龙课题组^[50]报道了一个用于线粒体靶向的荧光探针 **30** 用于检测细胞和体内的 ONOO^- . 以往研究表明, 细胞抗氧化防御系统对细胞中 ONOO^- 的浓度具有调控作用, 硒在谷胱甘肽过氧化物酶的活性位点中起重要作用. 该探针则是模拟硒酶对 ONOO^- 和谷胱甘肽的催化反应, 具有高灵敏度、高选择性、背景干扰小和细胞毒性低等特点, 被成功用于 HeLa 细胞和 RAW264.7 细胞检测 ONOO^- 并成像. 碲酶模拟物的活性比硒酶模拟物更高, 且因为碲能与邻位氮原子形成可逆的环化反应, 抑制了 ONOO^- 对碲酶模拟物的过度氧化. 2013 年, 韩克利课题组^[51]报道了一个基于花青类衍

生物的近红外荧光探针 **31**, 用于检测细胞和体内的 ONOO^- (图 3). 该探针成功在生理条件下监测 ONOO^- 氧化/谷胱甘肽还原过程. 探针具有较高的选择性, 敏感性和线粒体靶向性, 检测限低至 $9.17 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 探针在与 ONOO^- 接触后 Te 被氧化, 820 nm 处荧光强度达到峰值, 可用于观察 ONOO^- 爆发期间氧化还原周期的变化及抗氧化细胞和动物的谷胱甘肽(GSH)修复, 并成功应用于 RAW 264.7 细胞和小鼠腹腔中的 ONOO^- 检测.

图 3 探针 **31** 用于小鼠体内检测 ONOO^- 成像

Figure 3 Fluorescence imaging of the mice treated with probe **31** to detect ONOO^-

除了上面硼酸酯、 $\text{C}=\text{N}$ 、 $\text{C}=\text{C}$ 作为响应基团和模拟酶对 ONOO^- 和谷胱甘肽的催化反应外, 还发展了一系列具有其他响应基团的荧光探针.

龚兵和卢忠林课题组^[52]报道了一种基于芳构化 9,10-二氢吡啶衍生物显示荧光用于 ONOO^- 检测的探针 **32**. 在 ONOO^- 检测过程中氧化荧光探针使其芳构化, 形成大 π 面, 荧光由无到有, 最大值为 496 nm (Eq. 10). 该探针具有选择性强和响应快速等优点, 在探针溶液中加入少于 1 equiv. 的 ONOO^- 导致超过 100 倍的荧光增强, 并成功实现 RAW 264.7 细胞中的 ONOO^- 检测.

袁林课题组^[53]报道了一个基于能量转移(FRET)机制的双光子比率荧光 ONOO^- 探针 **33**, 该探针与 ONOO^- 反应使得电子转移到母核上荧光强度增强(Eq. 11). 该双光子比率荧光探针通过对两个发射带(473 和 651 nm)

标定, 消除了探针浓度、探测环境和激发强度等因素所造成的不利影响, 使得检测速度快(20 s 以内)且灵敏度高(检出限 $11.30 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 对 ONOO^- 选择性好, 并应用于 HepG 2/RAW 264.7 细胞内源性 ONOO^- 的比值检测.

王云铭课题组^[54]在 2013 年报道了一种以丹磺酰氯为荧光团, 邻苯二胺作为响应基团的 *N*-(2-氨基苯基)-5-(二甲基氨基)-1-萘磺酰胺(Ds-DAB)分子荧光探针 **34**. ONOO^- 首先经过亲核亚硝化反应形成亚硝胺, 然后质子化水解, 最终产生具有荧光性质的丹磺酸以及苯并三唑(Eq. 12). 向 Ds-DAB 水溶液中加入 ONOO^- 会导致 505 nm 处荧光强度明显增强, 该探针具有灵敏度高(检测限为 $52.4 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、响应快(20 s)和选择性高等优点, 成功实现对小鼠巨噬细胞内源性过氧亚硝酸盐的检测及荧光成像, 具有定量检测 ONOO^- 的潜力.

Bull 课题组^[55]设计了一种在果糖存在条件下检测

ONOO⁻的水溶性荧光探针 **35**. 其中 *D*-果糖可以阻止探针被其余 RNS 或者 ROS 破坏, 也增强了探针荧光强度, 选择性提高. 该探针在与 ONOO⁻反应后, 含共价电子对的叔胺 PET 过程被解锁(Scheme 5), 荧光强度减弱, 并成功用于细胞 RAW264.7 和 HeLa 成像实验, 检测内源性和外源性过氧亚硝酸根, 并完美成像. 马会民课题组^[56]设计并合成了探针 **36**, 罗丹明与苯肼反应合成的带有内酰胺环结构的探针分子, 由于该内酰胺环的存在, 化合物自身没有荧光, 当与 ONOO⁻反应后内酰胺环打开, 罗丹明处的荧光恢复, 利用该关-开机理实现了对 ONOO⁻的检测, 在探针设计中, 作者还引入了三苯基膦作为线粒体靶向基团, 从而实现了线粒体内 ONOO⁻的检测. 该探针具有选择性好、灵敏度高、检测限低(53 nmol·L⁻¹)和细胞毒性低等优点, 成功用于活体细胞内源性的荧光成像. 同样利用罗丹明内酰胺环的

图式 5 探针 **35** 对 ONOO⁻的响应机理

Scheme 5 Response mechanism of probe **35** to ONOO⁻

关-开机理, 朱宝存课题组^[57]设计了探针 **37**, 该探针响应快(<5 s)且检出限更低(0.9 和 17 nmol·L⁻¹), 也被成功用于活体细胞内源性的荧光成像.

2.4 用于 NO₂⁻ 检测的荧光探针

亚硝酸根离子(NO₂⁻)是一类常见于生产生活中的无机盐类. 一方面, NO₂⁻在胃中可以与胃中蛋白质作用生成致癌物质亚硝胺; 另一方面, NO₂⁻对血液循环和低氧性 NO 的动态平衡起到调节作用, 并被作为血管扩张剂用于心脏疾病的治疗, NO₂⁻在血液中可将低铁血红蛋白转化成高铁血红蛋白, 氧气运输受阻造成组织缺氧. 因此, 对于 NO₂⁻的检测具有重要意义^[58].

基于 BODIPY 荧光团, 2013 年 Ramaiah 课题组^[59]设计并合成一个用于日常水源中 NO₂⁻检测的荧光探针 **38**. 探针在 BODIPY 的 3,5-位引入苯胺作为响应基团, 与 NO₂⁻反应发生重氮化反应, 氨基转化为羟基, 波长发生红移, 肉眼可见溶液颜色由蓝变绿, 探针在对水源 NO₂⁻检测过程中不受其余存在阴阳离子的干扰, 选择性高, 检测限为 2×10⁻⁵ mol·L⁻¹. 与上述反应原理相同, 2018 年, 张卫娟课题组^[60]报道了一个以 BODIPY 为荧光团, 邻苯二胺作为响应基团在酸性条件下检测 NO₂⁻的荧光探针 **39**. 在与 NO₂⁻重氮化反应后, 532 nm 处荧光强度增强, 颜色由蓝变成黄绿色, 肉眼可见, 探针具有高选择性和高灵敏度等优点, 被成功应用于 HepG2 检测 NO₂⁻ (Scheme 6).

2.5 用于 NO₂ 检测的荧光探针

NO₂ 是一种可以在空气中稳定存在的红棕色气体, 不仅污染环境, 对人体芳香族氨基酸也具有强氧化性, 引发氨基酸发生硝化反应, 同时亲脂性强, 可引起脂质的自氧化反应. 因此, 对于 NO₂ 的检测具有重要意义. 迄今为止, 已报道的对于 NO₂ 检测的探针较少. 2013 年, 黄德建课题组^[61]介绍了探针 **40**, 该探针以磺酰罗丹明 B 作为荧光基团, 通过二硫代氨基甲酸镍对磺酰罗丹明 B 的 PET 作用导致荧光淬灭(Scheme 7). 当 NO₂ 存在时, 二硫代氨基甲酸镍与之发生络合反应生成新络合物和自由基, PET 过程被阻止, 荧光团荧光开启, 590 nm 处荧光强度增强. 与对位异构体 **40B** 相比, 邻位异构体 **40A** 中荧光团与 Ni²⁺之间的距离更短(分别为 0.74 和 0.94 nm), 而 PET 作用的强度与距离成反比, 因此探针 **40A** 中 PET 作用更加敏感, 具有更高的选择性和灵敏度, 并成功实现了 RAW 264.7 细胞中外源性 NO₂ 的检测.

2017 年, 孙杰课题组^[62]报道了两个高选择性的荧光探针 **41A** 和 **41B**. 两个荧光探针均以香豆素作为荧光团母核, 响应基团都是脒基团, **41A** 探针是通过与 NO₂ 反应后脒基团被氧化, 荧光团开启, 425 nm 处荧光强度

图式 6 探针 38 和 39 对 NO_2^- 的响应机理Scheme 6 Response mechanism of probes 38 and 39 to NO_2^- 图式 7 探针 40 对 NO_2 的响应机理Scheme 7 Response mechanism of probe 40 to NO_2

增强; **41B** 则正好相反, 由于扭曲的分子内电荷转移机制而表现出独特的关闭响应, 荧光猝灭率约为 98% (Scheme 8). 通过实验证明, **41B** 探针的响应效果较好, 选择性强, 灵敏度高, 独特的荧光猝灭策略可用于构建

新的传感器系统和荧光放大聚合物, 用于 NO_2 和硝胺的超痕量检测.

3 用于活性氧检测的分子荧光探针

3.1 用于次氯酸检测的荧光探针

日常生活中, 次氯酸及次氯酸盐可以说是最强的氧化剂之一. HClO 作为一种常见的杀菌剂, 被人们广泛使用, 例如公共供水消毒剂、杀菌剂及家用漂白剂等. 活性氧现在被普遍认为是病理生理中重要的一个存在环节, 其中, 生物体内源性次氯酸主要产生于白细胞, 在 H_2O_2 和髓过氧化物酶共同作用下与 Cl^- 结合, 生成具有强氧化作用的次氯酸根. 生物系统的 HClO 正常水平波动范围较窄, 水平异常都将导致各种疾病的产生, 例如心脑血管疾病、动脉粥样化、神经性疾病和癌症等. 针对次氯酸找到一种高灵敏度、易于操作、价格低廉的检测方法尤为重要, 因此, 荧光探针被列为主要研究对象,

图式 8 探针 41A 和 41B 对 NO_2 的响应机理Scheme 8 Response mechanism of probes 41A and 41B to NO_2

具有细胞动力学可视化、生物分子高分辨定位等优点,被环境生物医学等领域高度重视^[63,64]。目前检测次氯酸的荧光探针响应基团反应类型主要有以下几种:氧化 $C=N$ 、 $C=C$ 键使之断裂,氧化 $C=N$ 、 $C=C$ 键生成 CN 、三元环等,罗丹明类螺内酰胺环开环反应,氧化含氧族化合物(硫、硒和碲元素),氧化酰肼反应和其它类型氧化反应。

第一种类型,在温和的条件下,次氯酸可以选择性的氧化 $C=N$ 、 $C=C$ 键并使其断裂,阻断荧光团向连接基团的作用,进而促进荧光母体信号释放。吴淑裸课题组^[65]介绍了一个基于 BODIPY 衍生物的“打开型”荧光探针 **42**。探针引进 $C=N$ 双键对荧光团淬灭,当与 ClO^- 接触被氧化后,荧光团在 508 nm 处显色(Eq. 13)。该探针具有选择性高和检测限低等优点,在共聚焦荧光显微镜下 RAW 264.7 细胞的成像结果表明,新的探针可作为检测活细胞中 ClO^- 的有效荧光探针。基于同一机理,姜世梅课题组^[66]设计并合成茈萘类荧光探针 **43**。该类探针以茈萘作为荧光团,通过 $C=N$ 连接给电子的苯肼基团,由于 PET 作用其给电子基团对荧光团起到一个淬灭的效应,在与 ClO^- 反应后, $C=N$ 被氧化断裂(Eq. 14),荧光团荧光显著增强 42.6 倍,并成功应用于 HeLa 细胞成像(图 4)。吴水珠和曾钊课题组^[67]也基于此机理做了相关工作。

陈小强和王芳课题组^[68,69]在 2017 年设计了一种用于线粒体中 ClO^- 检测的比率型荧光探针 **44** (Eq. 15)。该探针以吡啶为线粒体识别基团,苯并噻唑连接苯环作为荧光团。由于其优异的水溶性、选择性、特异性、快速响应(30 s 内)和低检测限($0.18 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)等优点,在 HeLa 细胞中成功应用并用于 ClO^- 的定量检测。该课题组于 2018 年进一步合成了探针 **45**,当探针与 ClO^- 接触后, $C=C$ 断裂(Eq. 16),530 nm 处荧光增强且与 ClO^- 的浓度($0 \sim 50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)呈线性关系。同样利用 $C=C$ 被氧化,赵宝祥课题组^[70]设计了一例基于 FRET 机理并用于

图 4 探针 **43** 与次氯酸反应的细胞成像

Figure 4 Cellular imaging of probe **43** reacting with hypochlorous acid

近红外区的探针 **46** (Eq. 17), 探针与 ClO^- 接触后, 25 s 内可显示出清晰的响应, 荧光颜色由红色向亮黄色明显变化, 肉眼可识别, 检测限低至 $0.19 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。荧光发射出现在近红外区(NIR), 在细胞成像中对 ClO^- 可灵敏识别并具有选择性。在这一方面该课题组^[71]还做过相关工作。同样应用于近红外区域, 曾林涛课题组^[72]合成了探针 **47** (Eq. 18), 该探针由 7-二乙基氨基香豆素与苯并[e]呋喃组成, 通过 $C=C$ 连接, 当 $C=C$ 键被 ClO^- 破坏后, 探针显示对 ClO^- 的比色荧光和比值荧光双重响应, 658 nm 处荧光强度降低, 475 nm 处增强(图 5)。该探针具有选择性高、响应速度快(90 s)和较低的检测限($33 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)等优点, 并被成功应用于 HeLa 细胞的 ClO^- 检测和细胞成像, 且可以实现活细胞内 ClO^- 的定量检测。

仍然是基于双键被氧化的特点, 还有 $C=N$ 双键氧化成 CN 基、双键成三元环等其他反应类型。王传明课题组^[73]介绍了一个用于内源性 HClO 检测的“打开型”双光子荧光探针 **48**。该探针以 1,8-萘酰亚胺作为荧光

图5 探针 47 与次氯酸反应的细胞成像

Figure 5 Cellular imaging of probe 47 reacting with hypochlorous acid

团, 3'位引入荧光淬灭基团, 当与 HClO 作用时, C=N 双键被氧化成 CN 基(Eq. 19), 荧光恢复. 该探针保留了羟基和化合物的光学特性, 同时大大提高了产物的水溶性, 具有双光子吸收、抗漂白、细胞吸收效率高、无细胞毒性等多种优点, 双光子激发下(800 nm), 穿透深度达 150 μm , 并在细胞 RAW 264.7 和 小鼠肝脏组织进行

试验成功, 可以作为一种成像工具来揭示 HClO 在广泛的病理过程中的作用.

王素华课题组^[74]亦通过氧化 C=C 双键进行荧光探针的设计, 合成了一例处于近红外区域的荧光探针 49, 该探针与 HClO 接触后, 母核碳碳双键被氧化形成三元环(Eq. 20), 774 nm 处荧光淬灭. 该探针具有低检测限 ($0.13 \sim 0.70 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的特点, 在生理 pH 条件下稳定, 并成功在活 A549 细胞中成像. 林伟英课题组^[75]也基于该机理合成了一种具有大位移并用于 ClO^- 检测的比率型荧光探针 50. 除了双键被氧化成三元环外, 同时该探针中带正电的 α, β -不饱和羰基在与 ClO^- 反应后断裂(Eq. 21), 探针本身在 662 nm 处显示近红外(NIR)荧光, 与 ClO^- 反应时可以在 456 nm 处显示强蓝色荧光, 具有灵敏度高、选择性好、生理 pH 值高和细胞毒性低等优点. HeLa 细胞的生物成像实验中表明, 该探针可成功地用于 ClO^- 在活体细胞中的比值成像.

彭孝军课题组^[76]介绍了一种基于 BODIPY 衍生物的“增强型 PET”荧光探针 **51**。该探针中位的吡咯基团对 BODIPY 荧光团具有“增强的 PET”效应,与次氯酸根反应后,吡咯上的双键被氧化成酮(Eq. 22),PET 效应被阻止,505 nm 处荧光强度增强且与 ClO^- 的浓度($0 \sim 10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)成线性关系。该探针具有灵敏度高(1 s 内)和选择性强等优点,检测限低至 $0.56 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,已被成功应用于细胞 MCF-7 和人体肿瘤细胞中 ClO^- 的检测。

第二种类型是基于罗丹明类螺内酰胺环开环反应。Yoon 课题组^[77]报道了一个用于 ClO^- 检测及诱导微生物中 ClO^- 合成的荧光探针 **52**。该探针选用硼酸酯和硫代内酯作为荧光团,使探针具有较低的荧光产率,并且这种双控制光能团有效的提高了探针的选择性,其与 ClO^- 反应后,硫代内酯环开启生成一种高荧光强度的荧光素化合物(Eq. 23),颜色从无色到绿色,荧光发射峰为 523 nm,荧光强度与 ClO^- 浓度成线性关系($0 \sim 1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),在生理 pH 下稳定性良好,对于体内成像检测具有重要意义。同样利用罗丹明硫代内酯环的关-开机理,马会民和史文课题组^[78]设计并合成了探针 **53**,用于检测巨噬细胞中的 ClO^- (Eq. 24)。探针引入了三苯基膦作为线粒体靶向基团,因此该探针具有良好的线粒体靶向性,值得注意的是,以非吞噬细胞和抑制剂作为对照,该探针首次发现了在细菌感染过程中巨噬细胞内线粒体 HClO 的出现。该探针还具有反应速度快、选择性好、灵敏度高及检测限低($9 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)的优点,可以用于次氯酸的追踪工作。在此之前作者还做过大量相关工作^[79,80]。

利用次氯酸对罗丹明内酰胺环的氧化作用,张桢课题组^[81,82]于 2015、2016 年分别设计了探针 **54** 和 **55**。两个化合物均以罗丹明 6G 为荧光团,与 ClO^- 接触后,内

酰胺环打开,550 nm 处荧光逐渐增强。前者具有高灵敏度、低细胞毒性和良好的细胞膜渗透性,被广泛用于细胞中 ClO^- 的成像检测;后者被成功地用于监测自来水中微量的 HClO ,并对活细胞 A549 和 RAW264.7 的外源性和内源性 HClO 成像,具有响应速度快、检出限低及 pH 检测范围较宽等优点,可以促进更多 HClO 相关的化学和生物学研究。Wong 课题组^[83]报道了一种母核具有罗丹明和荧光素优点的罗多尔衍生物荧光探针 **56**。该荧光探针通过引进修饰基团异硫氰酸苯酯基,在 HClO 存在下内酰胺开环再发生环化反应,生成罗丹明-噁二唑(Eq. 25),新的荧光发射峰在 612 nm,具有高选择性和高灵敏度,在生理 pH 下功能优异,并成功应用于 HeLa 细胞荧光成像。

曹晓群课题组^[84]在利用罗丹明内酰胺环的关-开基础上同时引进 FRET 机理设计了比率型荧光探针 **57**。在

无 HClO 时, 通过 PET 过程将罗丹明能量转移到咪唑并吡啶基团上, 当与 ClO^- 接触后 PET 过程被阻止, 咪唑并吡啶基团能量通过 FRET 过程转移到罗丹明基团, 罗丹明开环, 荧光主要以罗丹明 560 nm 的发射为主. 探针具有选择性强、灵敏度高、检测限低 ($24 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和响应时间短、溶酶体靶向性好、细胞毒性低等特点, 被成功用于内源性 ClO^- 的检测.

57

基于这一理念, 赵宝祥课题组^[85~87]设计并合成探针 **58~60** (Scheme 9). 探针 **58** 由罗丹明与萘酰亚胺两个荧光团组成, 在自由态下仅发出萘酰亚胺的荧光, 当与 ClO^- 接触后, 罗丹明内环被打开的同时荧光显现, 萘酰亚胺荧光团能量通过跨键能量转移 (TBET) 机理转移到罗丹明母核, 罗丹明在 582 nm 处的发射增加, 而萘酰

亚胺在 532 nm 处的发射减少. 探针 **59** 由罗丹明硫代酰肼和萘甲酰基构建硫-肼的结构, 与 HClO 反应时, 单硫代-双肼可转化为 1,2,4-噁二唑, 这不仅确保了供体和受体与电子共轭键连接, 而且还导致螺环开环和荧光团荧光发射, 440 nm 处荧光强度下降, 585 nm 处荧光强度增强, 并成功应用于 RAW264.7 细胞荧光成像. 探针 **60** 是通过刚性结构哌嗪作为连接基团, 将香豆素类和罗丹明类荧光团连接, 用于酸性条件下检测 HClO , 在与 ClO^- 反应后, 罗丹明内酰胺环打开, 香豆素能量经过 FRET 过程转移到罗丹明母核, 470 nm 处荧光强度减弱, 580 nm 处荧光强度增强. 三个探针均具有选择性高、反应迅速、细胞毒性小及细胞膜透性好等特点, 适合于在活细胞中内源性 ClO^- 成像.

第三种类型是基于氧化含硫族化合物 (硫、硒和碲元素) 设计的新型荧光探针. 林伟英课题组^[88]合成了一种用于细胞和斑马鱼体内 ClO^- 检测的“打开型” PZ-HA 分子荧光探针 **61**. 该探针以吩噻嗪作为荧光团, 二氟甲基-4-吡喃作为给电子基团, 在近红外区有可控的发射波长, 吩噻嗪在硫原子处有较高的电子云密度, 在与 ClO^- 接触后, 有效地氧化生成亚砷 (Eq. 26), 使其产生优良的比率荧光信号, 605 nm 处荧光出现 80 倍增强 (图 6).

图式 9 探针 **58~60** 对 HClO 的响应机理
Scheme 9 Reaction mechanism of probes **58~60** to HClO

图6 探针 **61** 用于斑马鱼体内检测次氯酸及荧光成像

Figure 6 Imaging of hypochlorous acid in zebrafish treated with probe **61**

基于此原理, Gupta 课题组^[89]报道了探针 **62**, 该探针为近红外荧光探针, 作者在 BODIPY 骨架的 C-3 位置上引入了吩噻嗪基, 保证了分子中的延伸共轭, 在与 ClO^- 接触后, 吩噻嗪基上的硫被氧化(Eq. 27), 610 nm 处荧光强度增强 72 倍, 为 ClO^- 的检测提供依据. 叶勇课题组^[90]介绍了一个靶向检测溶酶体中 ClO^- 的双光子荧光探针 **63**. 该探针以萘酰亚胺为荧光团, 在与 ClO^- 接触后, S 被氧化发生分子内电荷转移(Eq. 28), 505 nm 处荧光强度减弱, 其还具有优良的选择性、灵敏度和可肉眼检测等优点, 检测限为 $0.674 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 并被成功在 MCF-7 细胞和 4T1 细胞实现次氯酸的检测成像.

通过对硒的氧化, 2013 年, 江华课题组^[91]设计并合成了探针 **64** 和 **64'** (Scheme 10). 由于大的共轭基团被破坏, 在与 ClO^- 反应前探针分子没有荧光, 当向探针溶液中加入 ClO^- 后, 探针分子中的苯硒经过一步氧化转变成苯硒亚砷, 苯硒亚砷再经过消除反应形成香豆素荧光团, 从而荧光恢复. 由于甲基的位阻影响, 探针 **64'** 比 **64** 探针检测限高, 探针 **64** 具有高的灵敏度 ($<2 \text{ s}$) 和低的检测限 ($10 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 能够实时检测 ClO^- 的生成, 并被成功用于细胞内活体成像. 同样利用硒的氧化前后分子的荧光变化, Churchill 课题组^[92,93]设计并报道了两个基于 BODIPY 衍生物的“打开型”荧光探针 **65** 和 **66**. 与 **64** 和 **64'** 消除机理不同, 与 HClO 接触后, 化合物 **65** 和 **66** 内的硒元素被氧化, 探针内的 PET 过程被禁止, 荧光团处于 526 nm 的荧光恢复. **65** 和 **66** 均是引入苯基硒基团对母核荧光进行淬灭, 同时 Cl 元素的引入又降低了背景荧光, 使检测限进一步降低. 两个探针都具有分辨率高、检测限低和响应时间快等优点. 前者成功用于细

图式 10 探针 **64** 对 HClO 的响应机理
Scheme 10 Response mechanism of probe **64** to HClO

胞 RAW 264.7 和 MCF-7 中 HClO 检测, 且对细胞活性无影响, 可作为活体细胞成像的较好的探针. 后者探针荧光强度在 1~2 min 内达到最大值, 检出限低($19.6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 与其它 RNS 信号相比, 荧光增强幅度为 110 倍.

通过氧化酰肼反应, 梁高林课题组^[94]报道了一种被苯甲酰肼荧光素抑制荧光的 *D*-荧光素 **67**, 用于体外 ClO^- 的检测(Eq. 29). 探针 **67** 被 ClO^- 氧化后再水解产生具有荧光性的荧光素酶, 560 nm 处荧光达到峰值, 具有选择性高($0 \sim 62.5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和检测限低($0.705 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)等优点, 并实现体外活 MDA-MB-231 细胞和小鼠 MDA-MB-231 中的 ClO^- 成像.

除了以上反应类型外, 还发展了其余类型的荧光探针. 闫良国和朱宝存课题组^[95]报道了一种通过分子内电荷转移用于生物体中 ClO^- 检测的比率型荧光探针 **68** (Eq. 30). 该探针以萘二甲酰亚胺为荧光团, 4-位引入含硫脲基团作为响应基团, 与 HClO 作用后, 柔性链部分成环, 533 nm 处荧光降低, 473 nm 处荧光增强, 实现了比率型检测. 该探针具有检测范围广、选择性强和检测限低($3.9 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)等优点, 被成功用于细胞 RAW 264.7 内源性 ClO^- 检测.

韩益锋课题组^[96]报道了一例基于 ESIPt 原理用于水溶液中 ClO^- 检测的荧光探针 **69**. 该探针以 2-(2'-羟基苯基)苯并噻唑为荧光团, 引进偶氮基团抑制荧光团的荧光发射, 在与 ClO^- 接触后 $\text{N}=\text{N}$ 被氧化破坏(Eq. 31), 466 nm 处荧光强度逐渐增强, 具有制备简单、水溶性

好、对 HClO 的选择性和灵敏度高及检出限低($13.2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)的独特优点.

陈建和张培盛课题组^[97]根据 ICT 和 FRET 原理设计并合成了用于 ClO^- 检测的探针 **70**. 该探针以萘酰亚胺为荧光团, 电子供体硫脲基团与 ClO^- 接触后被氧化, 转化为咪唑基(吸电子基团) (Eq. 32), 荧光发射出现显著的蓝移($>100 \text{ nm}$). 且水分散性能好、响应速度快($<40 \text{ s}$), 灵敏度(检出限 $1.75 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)和选择性高, 体内成像实验表明探针 **70** 能够用于斑马鱼模型内源性 ClO^- 生成的可视化检测.

李鑫和韩益锋课题组^[98]设计并报道了一个用于 ClO^- 检测的 BODIPY 类 PHC-1 荧光探针 **71**. 该探针通过在侧链引入 $\text{C}=\text{N}$, 在与 ClO^- 接触后侧链被氧化分子内成环(Eq. 33), 508 nm 处荧光强度增强, 从而实现了对 ClO^- 的检测.

阴彩霞课题组^[99]直接利用 2-萘酚及其衍生物作为

探针报道 2 个用于 ClO^- 检测的比率型荧光探针 **72**. 探针在次氯酸强氧化作用下, 酚羟基分子间发生脱水反应进而偶联, 共轭结构延伸, 探针 **72A** 在 430 nm 处荧光强度增强, 探针 **72B** 在 520 nm 处荧光强度增强, 颜色前后变化肉眼可见. 探针 **72A** 和 **72B** 检测限分别为 81 和 49 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 二者均具有高选择性和高灵敏度等优点.

3.2 用于过氧化氢检测的荧光探针

过氧化氢作为活性氧中的强氧化剂, 也是氧代谢的产物之一. 随着科研工作者的研究, 发现该化合物在多种信号传递过程中作为信号分子起到关键作用, 另外还发现其在氧化应激过程中同样起到重要作用. 过氧化氢的水平过量将会引起多种疾病, 例如心血管疾病、神经性疾病、和癌症等. 因此, 使用荧光探针选择性检测 H_2O_2 并进一步理解 H_2O_2 在生物体中的生成, 并阐述其在生命过程中的作用是非常重要的. 硼酸酯是广泛用于 H_2O_2 识别的一类基团, 主要利用了 H_2O_2 诱导的化学选择性苯基硼酸-苯酚的转化^[100,101].

最早将硼酸酯脱保护应用于荧光探针检测 H_2O_2 的是 Chang 课题组^[102]. 该课题组在 2004 年将硼酸酯与荧光素结合, 设计合成了一例对 H_2O_2 增强型荧光探针. 该探针加入 H_2O_2 后荧光增强大于 500 倍, 远大于其他 ROS 和 RNS 加入后荧光强度的变化, 并且作者阐述了苯基硼酸-苯酚的转化机理. 随后的几年时间里, 该课题组在这一理论的基础上又设计合成了一系列荧光探针, 并将其运用到线粒体中 H_2O_2 的测试. 但是前期化合物的绝对荧光强度较小, 在生物样品中的测试受到了影响.

近年来, 以各种荧光团为骨架利用该机理设计的分子探针越来越多.

邵士俊课题组^[103,104]报道了一例水溶性 BODIPY 类荧光探针 **73**, 并将其用于 H_2O_2 的快速检测. 未与 H_2O_2 结合之前该化合物中发生季铵盐氮原子向 BODIPY 的 PET 作用, 因此化合物几乎没有荧光; 探针分子与 H_2O_2 结合以后, PET 被阻断, BODIPY 的荧光恢复. 该探针能够用于 Hepg2 细胞中外源性的 H_2O_2 分布, 及天使鱼在外源性 H_2O_2 存在下的活体荧光成像. 该课题组于 2016 年设计合成了另一例硼酸酯水解机理的 H_2O_2 荧光探针 **74**. 与探针 **73** 发光机理类似, 探针 **74** 发生喹啉的季胺氮原子向咪唑的 PET 作用导致本身没有荧光, 与 H_2O_2

反应后 PET 作用消失, 咪唑基团的荧光恢复(Eq. 34). 作者成功利用探针 **74** 含有的线粒体靶向位点季氨基喹啉检测 Hela 细胞中内源性 H_2O_2 并进行了荧光成像.

探针 **75** 是唐波课题组^[105]设计合成的一例以四苯乙烯为荧光母核的 H_2O_2 荧光探针. 该探针基于聚集诱导发光(AIE)机理, 当体系中存在 H_2O_2 时, 探针中的苯硼酸酯基团转变成苯酚基团(Eq. 35), 增加了四苯乙烯的聚集作用, 体系 500 nm 处的荧光强度增加, 且与 H_2O_2 的浓度($10\sim 200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)呈线性关系, 检测限低至 $0.52\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. 该探针已经被成功用于小鼠 RAW 264.7 细胞中的 H_2O_2 检测成像. 林伟英课题组^[106]同样利用硼酸酯的水解反应合成了探针 **76**. 该探针基于扭曲的分子内电荷转移(TICT)底物本身没有荧光, 与 H_2O_2 反应后, 迅速形成一个具有刚性平面的稳定大 π 体系(Eq. 36), 随着 H_2O_2 浓度上升荧光强度增强, 400 nm 激发波

长下显现绿色荧光. 该探针还具有检测线粒体粘稠度的效应, 粘稠度升高分子内旋转受到抑制, 500 nm 激发波长下显现红色荧光. 该探针中的吡啶具有低细胞毒性及优异的膜穿透性等优点, 可以靶向进入线粒体, 成功应用于 HeLa 细胞和 RAW 264.7 细胞的内源性 H_2O_2 检测.

Chang 课题^[107]利用硼酸对 H_2O_2 的特异性响应通过正电子成像术设计了一个用于 H_2O_2 检测的探针 **77** (Eq. 37). 过氧笼-[^{18}F]氟脱氧胸苷作为荧光团和靶向基团, 在与 H_2O_2 反应后, 硼酸基团被水解, 荧光强度增强(图 7), 具有高选择性、高灵敏度、低细胞毒性和高细胞膜渗透性, 预计可用于临床.

图 7 探针 **77** 用于肾癌细胞过氧化氢检测及荧光成像

Figure 7 Imaging of hydrogen peroxide in UOK262 renal carcinoma cells treated with probe **77**

以单一波长处荧光强度的变化而设计的荧光探针在使用过程中容易受到设备效率、环境条件、探针浓度等外在因素的干扰, 从而降低荧光探针检测的选择性和灵敏度. 而比率型荧光探针恰好克服这类缺点.

最近, 张向阳课题组^[108]设计了一例基于苯基硼酸-苯酚机理的 H_2O_2 荧光探针 **78** (Eq. 38), 该探针未与 H_2O_2 反应时, 在 640 nm 处发射红色荧光, 当与 H_2O_2 结合以后发射波长蓝移至 535 nm, 蓝移幅度高达 105 nm. 且发射比值(I_{535}/I_{640})与 H_2O_2 浓度呈线性关系. 该探针被

成功应用于 HeLa 细胞内荧光成像.

薛林和江华课题组^[109]报道了一例以 2-(2'-羟基苯基)苯并噻唑为荧光团, C-9 烷基链作为疏水尾基团的比率型荧光探针 **79** (Eq. 39). 探针 **79** 在表面活性剂溶液中被表面活性剂分子包覆形成阳离子聚集体, 在该聚集态中, 分子内旋转受限从而限制了非辐射途径, 表现出强烈的激发态分子内质子转移(ESIPT)的过程, 在与 H_2O_2 反应后硼酸酯基团被破坏, 405 nm 处荧光强度降低, 510 nm 处荧光强度增强. 这种聚集状态加速了探针 **79** 与 H_2O_2 的响应速率, 建立了一种快速检测 H_2O_2 的新方法. 用于 H_2O_2 检测和检测其他物质的相关探针工作, 江华课题组^[110~114]在 2012 年和 2013 年在该方面也展开了很好的工作.

吴水珠和李文笙课题组^[115]开发了一种基于 FRET 机理的 H_2O_2 检测的荧光探针 **80** (Eq. 40). 带有硼酸酯基团的蔡酰亚胺连接到碳量子点上, 完整的纳米探针在 395 nm 激发时在 457 nm 发射出碳量子点的荧光. 与 H_2O_2 结合后硼酸酯基团水解成苯酚基团, 此时由于 FRET 作用 457 nm 处荧光强度降低, 550 nm 处荧光强度增强. $\text{FI}_{550 \text{ nm}}/\text{FI}_{457 \text{ nm}}$ 的比值与 H_2O_2 浓度呈良好的线性关系. 探针还具有响应快速、检测限低($0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、毒性低和灵敏度高优点, 被成功用于斑马鱼药物氧化损伤产生的 H_2O_2 检测.

Kim 课题组^[116]报道了一种用于组织器官中 H_2O_2 检测的双光子比率型荧光探针 **81**。该探针以 6-(苯并[d]噻唑-2'-基)-2-(*N,N*-二甲基氨基)萘为荧光团, 仍然以苯基硼酸酯作为 H_2O_2 的响应基团, 在与 H_2O_2 反应后, 苯基硼酸酯基团水解离去(Eq. 41), 455 nm 处荧光强度降低, 528 nm 处荧光强度增强, 检测限低至 $4.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

李银辉课题组^[117]也是利用硼酸酯水解原理设计了荧光探针 **82**, 探针 **82** 与 H_2O_2 反应后硼酸酯基团水解(Eq. 42), 430 nm 处荧光强度增强, 随着 H_2O_2 浓度增加到 $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 荧光强度达到峰值, 能够用于双光子荧光显微镜长时间检测活细胞和组织中的 H_2O_2 , 成像质量优良(图 8), 对于深入研究 H_2O_2 在复杂生物系统中的作用和功能有重要作用。

除了上面提到的硼酸酯作为响应基团的 H_2O_2 荧光探针外, 还发展了一系列具有其他响应基团的荧光探针分子。

图 8 探针 **82** 用于 HeLa 细胞检测过氧化氢及荧光成像
Figure 8 Probe **82** for hydrogen peroxide detection and fluorescence imaging in HeLa cells

张晓玲课题组^[118]设计并合成了一种基于羰基酰胺水解的比率型荧光探针 **83**, 用于定向检测内质网中的 H_2O_2 。探针中的过氧基团在与 H_2O_2 反应后, 过氧基团被水解氧化脱落(Eq. 43), 新的荧光发射峰在 540 nm 处逐渐增强, 465 nm 处峰值逐渐减弱。该探针可利用比值法定量检测 H_2O_2 的含量, 具有高选择性, 并在 HeLa 细胞中实现外源性 H_2O_2 检测成像。

吴水珠和曾钊课题组^[119]报道了一个通过磷脂包封的比率型荧光纳米探针 **84**, 磷脂的包封作用使探针 **84** 具有很好的生物相容性。探针 **84** 是在萘的 6-位引入苯乙二酮响应基团, 该基团在与 H_2O_2 接触后转变为羧基(Eq. 44)。6-位取代基吸电能力的变化使探针分子的荧光性质能够发生相应的变化, 因此探针 **84** 与 H_2O_2 反应后 516 nm 处荧光强度降低, 595 nm 处荧光强度增强, 检出限为 $0.49 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 能够有效监测活细胞及生物体内源性的 H_2O_2 。此外, 在器官受损的斑马鱼模型中, 纳米探针能够追踪 H_2O_2 的浓度水平, 这将有助于相关疾病的诊断, 也为判断 H_2O_2 在相关病理过程中的作用提供了一个潜在的工具。Sumimoto 课题组^[120]同样基于苯二乙酮响应机理设计并合成了荧光素为母核的荧光探针 **85**, 该探针还引进了噬菌体靶向定位基团苄基鸟嘌呤。能够在活 HEK293T 细胞、RAW 264.7 细胞实现实时成像监测。

在这一领域的继续研究中, Kumar 课题组^[121]设计并报道了一个用于溶酶体靶向的 H_2O_2 荧光探针 **86**. 该探针中含有一个邻苯二酚作为 H_2O_2 的响应基团, 分子内的邻苯二酚能够发生向羧基的 PET 作用, 分子荧光很弱. 当与 H_2O_2 作用后邻苯二酚的酚羟基被氧化, 分子内 PET 被阻止(Eq. 45), 荧光团在 537 nm 处荧光增强. 探针分子中吗啉基团作为溶酶体的靶向基团, 该基团能够靶向活细胞溶酶体中的 H_2O_2 进行内源性检测, 探针还被用于脑组织和活线虫中的 H_2O_2 检测, 因此, 该探针可能是检测 H_2O_2 及相关病理反应的有效工具.

2014 年, 余孝其课题组^[122]设计合成了“打开”型含硒探针 **87** (Eq. 46), 探针在 H_2O_2 作用下, 硒原子被氧化成硒氧化物, 本身的 PET 作用受到抑制, 形成聚集体从而发生 AIE 型荧光. 荧光强度与 H_2O_2 浓度成正比且具有良好的选择性, 其他 ROS/RNS 都不能引起探针 **87** 的荧光变化. Shanmugapriya 课题组^[123]介绍了一种含硫取代基取代苯胺的硼烷染料荧光探针 **88** (Eq. 47), 在与 H_2O_2 接触过程中, 含硫取代基被快速氧化, 该探针具有响应速度快、灵敏度高等优点, 并成功应用于 HeLa 细胞在生理条件下的 H_2O_2 成像.

上述 H_2O_2 检测的荧光探针都是基于氧化机理, 而亲和取代反应是和氧化机理同等重要的一种机理, 并且

更加容易避免其他 ROS/RNS 的干扰. 战付旭课题组^[124]介绍了一种基于此机理设计的 H_2O_2 荧光探针 **89** (Eq. 47). 该探针包含三个基本基团: 氯原子、叠氮基团和含有活性羰基的内酰胺环, 在与 H_2O_2 反应后, 叠氮基团脱落, 内酰胺环打开, 560 nm 处荧光显现. 探针具有高选择性和较宽的浓度($0 \sim 400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)检测范围, HeLa 细胞的初步成像表明具有生物系统利用潜能(图 9). 作者又将氯原子、叠氮基团分别换成其他原子及基团, 新形成的化合物均失去了对 H_2O_2 的响应, 原因仍需探索.

图 9 探针 **89** 用于 HeLa 细胞过氧化氢检测及荧光成像
Figure 9 Imaging of hydrogen peroxide in Hela cells stained with the probe **89**

3.3 用于羟基自由基和超氧阴离子的检测

羟基自由基($\cdot\text{OH}$)现在被认为是最具破坏性的一种 ROS, 众多研究表明羟基自由基也被认为是氧化应激损伤的主要原因, 它几乎攻击所有类型的生物大分子, 并导致不可修复的细胞损伤, 加剧生物细胞的衰老, 由于其在体内浓度极低, 成为影响检测难度的原因之一, 这就需要高灵敏度的检测方法^[125]. 超氧阴离子(O_2^-)则是生物系统中的初级 ROS, 在细胞的传导过程中和病理变化中都有参与. 超氧阴离子不仅是其余 ROS 的前体, 还与多数 ROS 的平衡水平有相关性, 例如细胞内 O_2^- 和 NO 浓度处于平衡状态, 且总是相互作用, 过量产生 O_2^- 会抑制 NO 的生物利用度, 导致内皮功能障碍^[126]. 对于羟基自由基和超氧阴离子的定性定量检测尤为重要, 因此荧光探针技术被广泛研发, 然而现如今已经设计出的探针并不多.

刘志宏课题组^[127]设计并合成一个用于检测 $\cdot\text{OH}$ 调节超氧化物歧化酶水平的探针 **90** (Eq. 49). 该分子探针是以苋衍生物为荧光团, 富电子的芳香胺为响应基团的单光子可激发分子探针, 探针是一个“A- π -D”类型化合物, 在与 $\cdot\text{OH}$ 反应后, 探针 **P1/P3** 在 560 nm 处出现荧光峰值, **P2/P4** 在 55 nm 处出现荧光峰值, 其中 **P2** 表现出较高的灵敏度(1 equiv. $\cdot\text{OH}$ 下荧光强度增强 200 倍)和特异性, 成功应用于可视化各种类型 SOD-1 参与的生物学过程的 $\cdot\text{OH}$ 变化, 也直观揭示 SOD1 和 $\cdot\text{OH}$ 水平之间的负相关性.

杨丹课题组^[128]设计并合成了一种用于体内 $\cdot\text{OH}$ 检测的荧光探针 **91**. 该荧光探针以荧光素为荧光团, 通过侧链引进二碘苯酚作为响应基团, 因为 $\cdot\text{OH}$ 易于与大体积苯酚如二碘苯酚反应发生电子转移形成苯氧自由基(Eq. 50), 520 nm 处荧光强度增强. 该探针灵敏度高, 选择性强, 毒性低, 在小鼠巨噬细胞 RAW264.7 共聚焦成像结果显示, HKOH-1 更具有潜在应用价值.

Shin 和 Tac 课题组^[129]基于罗丹明合成一种内酰胺环荧光探针 **92**. 该探针内酰胺环是一个吡唑结构, 在与羟基自由基反应后内酰胺环 C—H 被氧化抽提断裂, 内酰胺环打开, 形成一个新的吡唑结构(Eq. 51), 550 nm 处产生新的荧光发射峰. 同时该探针具有优异的细胞膜穿透性, 可用于细胞内的羟基自由基的检测.

张小兵和谭蔚泓课题组^[130]介绍了一种基于非氧化还原策略用于超氧阴离子 O_2^- 检测的荧光探针 **93** (Eq. 52). 该探针是一个 D- π -A 结构, 萘衍生物作为有效的 TP 荧光团, 三氟甲烷磺酸盐基作为 O_2^- 识别单元, 在与 O_2^- 反应后, 识别基团被氧化成羟基, 500 nm 处荧光强度增强(235 倍), 且具有低检测限($1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、高灵敏度和高选择性等优点, 组织深度检测达到 $30 \sim 150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 在 O_2^- 参与的生物和病理变化过程中具有潜在应用价值.

孙景志和唐本忠课题组^[131]设计并合成一种具有聚

集诱导发光特性的用于 O_2^- 检测的双通道荧光探针 **94**. 该探针以四苯乙烯衍生物为荧光团, 二苯基-膦基为反应基团, 连接单元为甲酚类结构, 起着荧光通道开关的作用, 与超氧阴离子反应后分子链断裂(Eq. 53), 荧光团聚集诱导发光, 随着 O_2^- 浓度($0 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)增加, 525 nm 处荧光强度增强, 615 nm 处荧光强度减弱. 该双通道探针克服了信号依赖于探针的浓度、微环境的变化等影响因素, 具有高选择性, 并在 HepG 2 细胞中成功应用, 对活细胞中 O_2^- 的检测具有重要意义.

4 多通道检测探针

当一个化合物有多个反应机理时且其响应条件也不相同时, 多通道检测的荧光探针便存在, 并能够在不同条件下检测不同活性氮和活性氧物质.

郑静课题组^[132]设计并合成了能够用于 ONOO^- 和 HClO 区分检测的新型小分子荧光探针 **95**. 该探针是一

种绿色发光的香豆素衍生物, 在添加 ONOO^- 后能够产生三通道荧光信号(355, 475 和 575 nm), 而与 HClO 作用则只能产生双通道信号(355 和 475 nm) (Scheme 10). 该探针具有高选择性、优异的膜渗透性和低细胞毒性, 已经被成功应用在活细胞中 ONOO^- 和 HClO 的检测.

图式 10 探针 **95** 对 HClO 和 ONOO^- 的响应机理
Scheme 10 Working principle of probe **95** to HClO and ONOO^-

Chellappa 课题组^[133]报道了一种基于罗丹明的铜络合物用于 NO/组氨酸检测的荧光探针 **96**. 该探针由罗丹明 6G 酰肼和 2-羟基-1-萘醛反应并与 Cu(II) 络合, 其中 Cu(II) 可以看作是罗丹明的淬灭剂, 在与 NO 接触后无荧光顺磁性 Cu(II) 配合物转变为抗磁性 Cu(II) , 548 nm 处荧光强度增强(Scheme 11). 由于探针的高选择性, 并成功应用于细胞 RAW264.7 和 MCF-7 中荧光成像.

张忠平课题组^[134]设计并合成一个可以实时鉴别检测 $\bullet\text{OH}$ 和 HClO 的荧光探针 **97** (Scheme 12). 该荧光探针以荧光素为母核, 与水合肼形成五元内酰胺环导致荧光消失, 侧链引进三甘醇提高水溶性, 具有双响应位点. 当激发波长为 405 nm 时, 探针选择性检测 $\bullet\text{OH}$, 内酰胺

图式 11 探针 **96** 对 NO 和 Histidine 的响应机理
Scheme 11 Response mechanism of probe **96** to NO and Histidine

图式 12 探针 **97** 对 HClO 和 $\bullet\text{OH}$ 的响应机理
Scheme 12 Reaction mechanism of probe **97** to HClO and $\bullet\text{OH}$

环打开, 羟基苯环断裂开环, 荧光显蓝色; 当激发波长为 488 nm 时, 选择性检测 HClO, 内酰胺环打开, 羟基被氧化成羰基, 荧光显绿色(图 10). 该探针具有选择性强、水溶性高等优点, 可 RAW264.7 细胞成像及进一步活体斑马鱼体内荧光成像.

图 10 探针 97 用于斑马鱼体内羟基自由基和次氯酸检测及荧光成像

Figure 10 Probe 97 for hydroxy free radical and hypochlorous acid detection and fluorescence imaging in zebrafish

陈令新课题组^[135]认为 O_2^- 会与 H_2S 发生反应产生硫烷硫, 因此, 作者开发了一种近红外线粒体靶向探针双通道检测的花青类荧光探针 98, 该探针允许对 O_2^- 和 H_2S_n 进行多反应且双通道信号在 610~700 和 750~800 nm 之间(Scheme 13), 通过体内体外实验作者得出结论:

图式 13 探针 98 对 O_2^- 和 H_2S_n 的响应机理

Scheme 13 Detection mechanism of probe 98 toward O_2^- and H_2S_n

在 O_2^- 的存在下, H_2S_n 会从 O_2^- 得到氧进而对机体造成损伤.

Ang 等^[136]利用香豆素和罗丹明构建了一种新的比率型荧光探针 99. 该探针以香豆素为给体, 罗丹明为受体, 二者之间通过刚性链传递能量, 响应基团苯甲酰肼能够用于 HClO 检测, 而邻苯二胺用于 NO 的检测. 二者在与被检测物反应后, 内酰胺环打开, 505 nm 处荧光强度减弱, 580 nm 处荧光强度增强. 两种探针均具有较高的分析选择性和生理稳定性, 在活细胞中具有良好的生物成像性能.

3 结束语

最近几年, 荧光探针在 RNS 和 ROS 的检测方面发展迅速, 对生物、医药和环境等领域做出巨大贡献. 我们探讨了自 2013 年以来开发的用于 RNS 和 ROS 检测的荧光探针, 荧光团主要是有机小分子、聚合物和金属络合物等, 并探讨了这两大物种探针的设计方法、响应机制和应用情况. 通过综述发现, 检测活性氮物种的探针多集中于过氧硝酸根和一氧化氮, 检测活性氧物种的探针多集中于过氧化氢和次氯酸上, 主要原因是大部分情况下其余物种水平浓度较低, 探针的灵敏度和检测限不足, 并且统一大类的活性物质之间可以相互转化, 无法明确标识. 虽然本文提到的探针中有一部分对 RNS 和 ROS 具有高灵敏度和特异性, 但是我们仍需进一步研发与体内环境相容的新探针, 这一类探针的设计中, RNS 和 ROS 在体内存在的稳态浓度相对较低, 因此需要从化学和生物两个方面来进行考虑: 化学方面需要找到更多的反应机制(目前以氧化反应为主); 生物方面除了考虑高选择性和灵敏度之外, 还需要考虑低的自氧化性、高的光学稳定性、低细胞毒性、良好的溶解度、细胞渗透性以及生物环境物质的低干扰. 由于低背景干扰和低能量光对组织的高渗透性, 近红外和双光子探针

对于 RNS 和 ROS 具有很大的生物成像潜力。此外, 由于在维持细胞的正常功能和健康的过程中涉及到了氧化还原反应, 因此通过监测随时间发生的可逆荧光变化来研究细胞氧化还原生物学的氧化还原探针也是荧光探针的研究方向之一。综上所述, 寻找能够更好地了解 RNS 和 ROS 在细胞和生物体中的生理和病理功能的探针将是当前生命科学研究的重要热点和难点领域之一。

References

- [1] Abdel-Fattah, M. M.; Messiha, B. A.; Salama, A. A. *Pharmacology* **2015**, *96*, 167.
- [2] Hernandez-Barrera, A.; Velarde-Buendia, A.; Zepeda, I.; Sanchez, F.; Quinto, C.; Sanchez-Lopez, R.; Cheung, A. Y.; Wu, H. M.; Cardenas, L. *Sensors (Basel)* **2015**, *15*, 855.
- [3] Hu, J. J.; Wong, N. K.; Ye, S.; Chen, X.; Lu, M. Y.; Zhao, A. Q.; Guo, Y.; Ma, A. C.; Leung, A. Y.; Shen, J.; Yang, D. J. *Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 6837.
- [4] Hu, Q.; Gao, M.; Feng, G.; Liu, B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 14225.
- [5] Huang, Y.; Yu, F.; Wang, J.; Chen, L. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 4122.
- [6] Kavok, N. S.; Averchenko, K. A.; Klochov, V. K.; Yefimova, S. L.; Malyukin, Y. V. *Eur. Phys. J. E: Soft Matter Biol. Phys.* **2014**, *37*, 127.
- [7] Kim, D.; Kim, G.; Nam, S. J.; Yin, J.; Yoon, J. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 8488.
- [8] Li, Y.; Li, J.; Li, S.; Li, Y.; Wang, X.; Liu, B.; Fu, Q.; Ma, S. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2015**, *286*, 53.
- [9] Zhang, J.; Bao, X.; Zhou, J.; Peng, F.; Ren, H.; Dong, X.; Zhao, W. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *85*, 164.
- [10] Zhang, J.; Huang, L. L.; Liang, X. J.; Wang, Y.; Duan, N.; Xiang, X. H.; Shu, S. S.; Guo, T. T.; Yang, L.; Tang, X. J. *South. Med. Univ.* **2016**, *36*, 833.
- [11] Suzuki, N.; Kojima, H.; Urano, Y.; Kikuchi, K.; Hirata, Y.; Nagano, T. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 47.
- [12] Liu, Q.; Xue, L.; Zhu, D. J.; Li, G. P.; Jiang, H. *Chin. Chem. Lett.* **2014**, *25*, 19.
- [13] Dong, X.; Heo, C. H.; Chen, S.; Kim, H. M.; Liu, Z. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 308.
- [14] Vegesna, G. K.; Sripathi, S. R.; Zhang, J.; Zhu, S.; He, W.; Luo, F. T.; Jahng, W. J.; Frost, M.; Liu, H. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 4107.
- [15] Wang, M.; Xu, Z.; Wang, X.; Cui, J. *Dyes Pigm.* **2013**, *96*, 333.
- [16] Feng, W.; Qiao, Q. L.; Leng, S.; Miao, L.; Yin, W. T.; Wang, L. Q.; Xu, Z. C. *Chin. Chem. Lett.* **2016**, *27*, 1554.
- [17] Wu, C. M.; Chen, Y. H.; Dayananda, K.; Shiu, T. W.; Hung, C. H.; Liaw, W. F.; Wang, Y. M. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *708*, 141.
- [18] Yu, H.; Zhang, X.; Xiao, Y.; Zou, W.; Wang, L.; Jin, L. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 7076.
- [19] Ouyang, J.; Hong, H.; Shen, C.; Zhao, Y.; Ouyang, C.; Dong, L.; Zhang, C. *Free Radical Biol. Med.* **2008**, *45*, 1426.
- [20] Alam, R.; Mistri, T.; Mondal, P.; Das, D.; Mandal, S. K.; Khuda-Bukhsh, A. R.; Ali, M. *Dalton Trans.* **2014**, *43*, 2566.
- [21] Rout, K. C.; Chaturvedi, S. K.; Khan, R. H.; Mondal, B. *Inorg. Chim. Acta* **2015**, *437*, 201.
- [22] Chen, L. Y.; Park, J. S.; Wu, D.; Kim, C. H.; Yoon, J. *Sens. Actuators, B* **2018**, *259*, 347.
- [23] Dai, C. G.; Wang, J. L.; Fu, Y. L.; Zhou, H. P.; Song, Q. H. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 10511.
- [24] Beltrán, A.; Burguete, M. I.; Abánades, D. R.; Pérez-Sala, D.; Luis, S. V.; Galindo, F. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 3579.
- [25] Liu, S.; Zhao, J.; Zhang, K.; Yang, L.; Sun, M.; Yu, H.; Yan, Y.; Zhang, Y.; Wu, L.; Wang, S. *Analyst* **2016**, *141*, 2296.
- [26] Mao, G. J.; Zhang, X. B.; Shi, X. L.; Liu, H. W.; Wu, Y. X.; Zhou, L. Y.; Tan, W.; Yu, R. Q. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 5790.
- [27] Miao, Z.; Reisz, J. A.; Mitroka, S. M.; Pan, J.; Xian, M.; King, S. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 16.
- [28] Liu, C.; Cao, Z.; Wang, Z.; Jia, P.; Liu, J.; Wang, Z.; Han, B.; Huang, X.; Li, X.; Zhu, B.; Zhang, X. *Sens. Actuators, B* **2015**, *220*, 727.
- [29] Gong, X.; Yang, X. F.; Zhong, Y.; Chen, Y.; Li, Z. *Dyes Pigm.* **2016**, *131*, 24.
- [30] Dong, B. L.; Zheng, K. B.; Tang, Y. H.; Lin, W. Y. *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 1263.
- [31] Ali, F.; Sreedharan, S.; Ashoka, A. H.; Saeed, H. K.; Smythe, C. G. W.; Thomas, J. A.; Das, A. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 12087.
- [32] Li, H.; Yao, Q.; Fan, J.; Long, S.; Du, J.; Peng, X. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 4641.
- [33] Ren, M. G.; Deng, B. B.; Zhou, K.; Lin, W. Y. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 1954.
- [34] Dong, B. B.; Song, X. Z.; Kong, X. Q.; Wang, C.; Zhang, N.; Lin, W. Y. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 5218.
- [35] Jing, X. T.; Yu, F. B.; Chen, L. X. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 14253.
- [36] Rosenthal, J.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5536.
- [37] Wrobel, A. T.; Johnstone, T. C.; Deliz, L. A.; Lippard, S. J.; Rivera-Fuentes, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 4697.
- [38] Wrobel, A. T.; Johnstone, T. C.; Deliz Liang, A.; Lippard, S. J.; Rivera-Fuentes, P. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 4131.
- [39] Sun, X.; Kim, G.; Xu, Y.; Yoon, J.; James, T. D. *ChemPlusChem* **2016**, *81*, 30.
- [40] Lv, H. J.; Ma, R. F.; Zhang, X. T.; Li, M. H.; Wang, Y. T.; Wang, S.; Xing, G. W. *Tetrahedron* **2016**, *72*, 5495.
- [41] Pino, N. W.; Davis III, J.; Yu, Z.; Chan, J. J. *Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 18476.
- [42] Purdey, M. S.; Connaughton, H. S.; Whiting, S.; Scharfner, E. P.; Monro, T. M.; Thompson, J. G.; Aitken, R. J.; Abell, A. D. *Free Radical Biol. Med.* **2015**, *81*, 69.
- [43] Puskullu, M. O.; Shirinzadeh, H.; Nenni, M.; Gurer-Orhan, H.; Suzen, S. J. *Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2016**, *31*, 121.
- [44] Debowska, K.; Debski, D.; Michalowski, B.; Dybala-Defratyka, A.; Wojcik, T.; Michalski, R.; Jakubowska, M.; Selmi, A.; Smulik, R.; Piotrowski, L.; Adamus, J.; Marcinek, A.; Chlopicki, S.; Sikora, A. *Chem. Res. Toxicol.* **2016**, *29*, 735.
- [45] Palanisamy, S.; Wu, P. Y.; Wu, S. C.; Chen, Y. J.; Tzou, S. C.; Wang, C. H.; Chen, C. Y.; Wang, Y. M. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *91*, 849.
- [46] Zhu, B. C.; Wu, L.; Wang, Y.; Zhang, M.; Zhao, Z.; Liu, C.; Wang, Z.; Duan, Q.; Jia, P. *Sens. Actuators, B* **2018**, *259*, 797.
- [47] Zhou, X.; Kwon, Y.; Kim, G.; Ryu, J. H.; Yoon, J. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *64*, 285.
- [48] Shen, Y.; Zhang, X.; Zhang, Y.; Li, H.; Dai, L.; Peng, X.; Peng, Z.; Xie, Y. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1014*, 71.
- [49] Hou, J. T.; Yang, J.; Li, K.; Liao, Y. X.; Yu, K. K.; Xie, Y. M.; Yu, X. Q. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 9947.
- [50] Sun, C.; Du, W.; Wang, P.; Wu, Y.; Wang, B.; Wang, J.; Xie, W. *Biophys. Res. Commun.* **2017**, *494*, 518.
- [51] Yu, F.; Li, P.; Wang, B.; Han, K. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 7674.
- [52] Li, Z. H.; Liu, R.; Tan, Z. L.; He, L.; Lu, Z. L.; Gong, B. *ACS Sens.* **2017**, *2*, 501.
- [53] Cheng, D.; Pan, Y.; Wang, L.; Zeng, Z.; Yuan, L.; Zhang, X.; Chang, Y. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 285.
- [54] Lin, K. K.; Wu, S. C.; Hsu, K. M.; Hung, C. H.; Liaw, W. F.; Wang, Y. M. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 4242.
- [55] Sun, X.; Xu, Q.; Kim, G.; Flower, S. E.; Lowe, J. P.; Yoon, J.; Fossey, J. S.; Qian, X.; Bull, S. D.; James, T. D. *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 3368.
- [56] Li, H. Y.; Li, X. H.; Wu, X. F.; Shi, W.; Ma, H. M. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 5519.
- [57] Zhu, B. C.; Zhang, M.; Wu, L.; Zhao, Z.; Liu, C.; Wang, Z.; Duan, Q.; Wang, Y.; Jia, P. *Sens. Actuators, B* **2018**, *257*, 436.
- [58] Wolff, I. A.; Wasserman, A. E. *Science* **1972**, *177*, 15.

- [59] Adarsh, N.; Shanmugasundaram, M.; Ramaiah, D. *Anal. Chem.* **2013**, 85, 10008.
- [60] Zhang, J.; Pan, F. C.; Jin, Y.; Wang, N. N.; He, J.; Zhang, W. J.; Zhao, W. L. *Dyes Pigm.* **2018**, 74, 525.
- [61] Yan, Y.; Krishnakumar, S.; Yu, H.; Ramishetti, S.; Deng, L. W.; Wang, S. H.; Huang, L.; Huang, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 5312.
- [62] Chen, J. B.; Li, B.; Xiong, Y. *Sens. Actuators, B* **2017**, 255, 275.
- [63] Zuo, L.; Diaz, P. T.; Chien, M. T.; Roberts, W. J.; Kishek, J.; Best, T. M.; Wagner, P. D. *PLoS One* **2014**, 9, e109884.
- [64] Zuo, L.; Pannell, B. K.; Re, A. T.; Best, T. M.; Wagner, P. D. *Am. J. Physiol.: Cell Physiol.* **2015**, 309, C759.
- [65] Chen, W. C.; Venkatesan, P.; Wu, S. P. *New J. Chem.* **2015**, 39, 6892.
- [66] Zang, L.; Liang, C.; Wang, Y.; Bu, W.; Sun, H.; Jiang, S. *Sens. Actuators, B* **2015**, 211, 164.
- [67] Wu, G. F.; Zeng, F.; Wu, S. Z. *Anal. Methods* **2013**, 5, 5589.
- [68] Chen, Y.; Wei, T.; Zhang, Z.; Zhang, W.; Lv, J.; Chen, T.; Chi, B.; Wang, F.; Chen, X. *Chin. Chem. Lett.* **2017**, 28, 1957.
- [69] Lv, J.; Chen, Y.; Wang, F.; Wei, T.; Zhang, Z.; Qiang, J.; Chen, X. *Dyes Pigm.* **2018**, 148, 353.
- [70] Xi, L. L.; Guo, X. F.; Wang, C. L.; Wu, W. L.; Huang, M. F.; Miao, J. Y.; Zhao, B. X. *Sens. Actuators, B* **2018**, 255, 666.
- [71] Sun, M.; Yu, H.; Zhu, H.; Ma, F.; Zhang, S.; Huang, D.; Wang, S. *Anal. Chem.* **2014**, 86, 671.
- [72] Xu, J.; Yuan, H.; Qin, C.; Zeng, L.; Bao, G. M. *RSC Adv.* **2016**, 6, 107525.
- [73] Xing, P.; Feng, Y.; Niu, Y.; Li, Q.; Zhang, Z.; Dong, L.; Wang, C. *Chem.-Eur. J.* **2018**, 24, 5748.
- [74] Sun, M.; Yu, H.; Zhu, H.; Ma, F.; Zhang, S.; Huang, D.; Wang, S. *Anal. Chem.* **2014**, 86, 671.
- [75] Song, X.; Dong, B.; Kong, X.; Wang, C.; Zhang, N.; Lin, W. *Spectrochim. Acta, Part A* **2018**, 188, 394.
- [76] Zhu, H.; Fan, J.; Wang, J.; Mu, H.; Peng, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 12820.
- [77] Xu, Q.; Lee, K. A.; Lee, S.; Lee, K. M.; Lee, W. J.; Yoon, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 9944.
- [78] Zhou, J.; Li, L. H.; Shi, W.; Gao, X. H.; Li, X. H.; Ma, H. M. *Chem. Sci.* **2015**, 6, 4884.
- [79] Chen, S. M.; Lu, J. X.; Sun, C. D.; Ma, H. M. *Analyst* **2010**, 135, 577.
- [80] Jia, J.; Ma, H. M. *Sci. Bull.* **2011**, 56, 3266.
- [81] Zhang, Z.; Deng, C.; Meng, L.; Zheng, Y.; Yan, X. *Anal. Methods* **2015**, 7, 107.
- [82] Zhang, Z.; Zou, Y.; Deng, C.; Meng, L. *Luminescence* **2016**, 31, 997.
- [83] Li, L.; Wang, S.; Lan, H.; Gong, G.; Zhu, Y.; Tse, Y. C.; Wong, K. M. C. *ChemistryOpen* **2018**, 7, 136.
- [84] Zhang, Y. R.; Zhao, Z. M.; Su, L.; Miao, J. Y.; Zhao, B. X. *RSC Adv.* **2016**, 6, 17059.
- [85] Shen, S. L.; Ning, J. Y.; Zhang, X. F.; Miao, J. Y.; Zhao, B. X. *Sens. Actuators, B* **2017**, 244, 907.
- [86] Zhang, Y. R.; Meng, N.; Miao, J. Y.; Zhao, B. X. *Chemistry* **2015**, 21, 19058.
- [87] Zhang, Y. R.; Zhao, Z. M.; Su, L.; Miao, J. Y.; Zhao, B. X. *RSC Adv.* **2016**, 6, 17059.
- [88] Deng, B.; Ren, M.; Kong, X.; Zhou, K.; Lin, W. *Sens. Actuators, B* **2018**, 255, 963.
- [89] Vedamalai, M.; Kedaria, D.; Vasita, R.; Gupta, I. *Sens. Actuators, B* **2018**, 263, 137.
- [90] Zhang, B.; Yang, X.; Zhang, R.; Liu, Y.; Ren, X.; Xian, M.; Ye, Y.; Zhao, Y. *Anal. Chem.* **2017**, 89, 10384.
- [91] Li, G. P.; Zhu, D. J.; Liu, Q.; Xue, L.; Jiang, H. *Org. Lett.* **2013**, 15, 2002.
- [92] Mulay, S. V.; Choi, M.; Jang, Y. J.; Kim, Y.; Jon, S.; Churchill, D. G. *Chemistry* **2016**, 22, 9642.
- [93] Mulay, S. V.; Yudhistira, T.; Choi, M.; Kim, Y.; Kim, J.; Jang, Y. J.; Jon, S.; Churchill, D. G. *Chem.-Asian J.* **2016**, 11, 3598.
- [94] Chen, P.; Zheng, Z.; Zhu, Y.; Dong, Y.; Wang, F.; Liang, G. *Anal. Chem.* **2017**, 89, 5693.
- [95] Shu, W.; Jia, P.; Chen, X.; Li, X.; Huo, Y.; Liu, F.; Wang, Z.; Liu, C.; Zhu, B.; Yan, L.; Du, B. *RSC Adv.* **2016**, 6, 64315.
- [96] Pan, Y.; Huang, J.; Han, Y. *Tetrahedron Lett.* **2017**, 58, 1301.
- [97] Zhang, P.; Wang, H.; Hong, Y.; Yu, M.; Zeng, R.; Long, Y.; Chen, J. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, 99, 318.
- [98] Zhang, P.; Wang, H.; Hong, Y.; Yu, M.; Zeng, R.; Long, Y.; Chen, J. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, 99, 318.
- [99] Li, J.; Yin, C.; Huo, F.; Xiong, K.; Chao, J.; Zhang, Y. *Sens. Actuators, B* **2016**, 231, 547.
- [100] Lo, L. C.; Chu, C. Y. *Chem. Commun.* **2003**, 21, 2728.
- [101] Chang, M. C. Y.; Pralle, A.; Isacoff, E. Y.; Chang, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15392.
- [102] Srikun, D.; Miller, E. W.; Domaille, D. W.; Chang, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 4596.
- [103] Xu, J.; Li, Q.; Yue, Y.; Guo, Y.; Shao, S. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, 56, 58.
- [104] Xu, J.; Zhang, Y.; Yu, H.; Gao, X.; Shao, S. *Anal. Chem.* **2016**, 88, 1455.
- [105] Zhang, W.; Liu, W.; Li, P.; Huang, F.; Wang, H.; Tang, B. *Anal. Chem.* **2015**, 87, 9825.
- [106] Ren, M.; Deng, B.; Zhou, K.; Kong, X.; Wang, J. Y.; Lin, W. *Anal. Chem.* **2017**, 89, 552.
- [107] Carroll, V.; Michel, B. W.; Blecha, J.; VanBrocklin, H.; Keshari, K.; Wilson, D.; Chang, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 14742.
- [108] Shen, Y.; Zhang, X.; Zhang, Y.; Wu, Y.; Zhang, C.; Chen, Y.; Jin, J.; Li, H. *Sens. Actuators, B* **2018**, 255, 42.
- [109] Li, G.; Zhu, D.; Liu, Q.; Xue, L.; Jiang, H. *Org. Lett.* **2013**, 15, 924.
- [110] Qian, Y. Y.; Xue, L.; Hu, D. X.; Li, G. P.; Jiang, H. *Dyes Pigm.* **2012**, 95, 373.
- [111] Zhu, D.; Li, G.; Xue, L.; Jiang, H. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 4577.
- [112] Zhu, D.; Xue, L.; Li, G.; Che, Y.; Jiang, H. *Org. Chem. Front.* **2014**, 1, 501.
- [113] Li, G.; Zhu, D.; Xue, L.; Jiang, H. *Org. Lett.* **2013**, 15, 5020.
- [114] Zhu, D.; Xue, L.; Li, G.; Jiang, H. *Sens. Actuators, B* **2016**, 222, 419.
- [115] Wu, G.; Zeng, F.; Yu, C.; Wu, S.; Li, W. J. *Mater. Chem. B* **2014**, 2, 8528.
- [116] Lim, C. S.; Cho, M. K.; Park, M. Y.; Kim, H. M. *ChemistryOpen* **2018**, 7, 53.
- [117] Zhang, K.; Wu, W.; Li, Y.; Sun, M.; Yu, H.; Wong, M. S. *RSC Adv.* **2016**, 6, 115298.
- [118] Gao, C.; Tian, Y.; Zhang, R.; Jing, J.; Zhang, X. *Anal. Chem.* **2017**, 89, 12945.
- [119] Peng, J.; Hou, X.; Zeng, F.; Wu, S. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, 94, 278.
- [120] Abo, M.; Minakami, R.; Miyano, K.; Kamiya, M.; Nagano, T.; Urano, Y.; Sumimoto, H. *Anal. Chem.* **2014**, 86, 5983.
- [121] Reja, S. I.; Gupta, M.; Gupta, N.; Bhalla, V.; Ohri, P.; Kaur, G.; Kumar, M. *Chem. Commun.* **2017**, 53, 3701.
- [122] Liao, Y. X.; Li, K.; Wu, M. Y.; Wu, T.; Yu, X. Q. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12, 3004.
- [123] Shanmugapriya, J.; Rajaguru, K.; Sivaraman, G.; Muthusubramanian, S.; Bhuvanesh, N. *RSC Adv.* **2016**, 6, 85838.
- [124] Zhuang, Z.; Yang, Q.; Zhang, Z.; Zhang, Q.; Zheng, G.; Zhan, F. *J. Photochem. Photobiol., A* **2017**, 344, 8.
- [125] Zhang, K. M.; Dou, W.; Li, P. X.; Shen, R.; Ru, J. X.; Liu, W.; Cui, Y. M.; Chen, C. Y.; Liu, W. S.; Bai, D. C. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, 64, 542.
- [126] Yang, Y.; Yang, D.; Yang, D.; Jia, R.; Ding, G. *Nephron. Exp. Nephrol.* **2014**, 128, 30.
- [127] Zeng, L.; Xia, T.; Hu, W.; Chen, S.; Chi, S.; Lei, Y.; Liu, Z. *Anal. Chem.* **2018**, 90, 1317.
- [128] Bai, X.; Huang, Y.; Lu, M.; Yang, D. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, 56, 12873.
- [129] Kim, M.; Ko, S. K.; Kim, H.; Shin, I.; Tae, J. *Chem. Commun.*

- 2013, 49, 7959.
- [130] Lu, D.; Zhou, L.; Wang, R.; Zhang, X.-B.; He, L.; Zhang, J.; Hu, X.; Tan, W. *Sens. Actuators, B* **2017**, 250, 259.
- [131] Gao, X.; Feng, G.; Manghnani, P. N.; Hu, F.; Jiang, N.; Liu, J.; Liu, B.; Sun, J. Z.; Tang, B. Z. *Chem. Commun.* **2017**, 53, 1653.
- [132] Zhang, Q.; Zhu, Z.; Zheng, Y.; Cheng, J.; Zhang, N.; Long, Y. T.; Zheng, J.; Qian, X.; Yang, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 18479.
- [133] Sivaraman, G.; Anand, T.; Chellappa, D. *ChemPlusChem* **2014**, 79, 1761.
- [134] Zhang, R.; Zhao, J.; Han, G.; Liu, Z.; Liu, C.; Zhang, C.; Han, M. Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 3769.
- [135] Yu, F.; Gao, M.; Li, M.; Chen, L. *Biomaterials* **2015**, 63, 93.
- [136] Ong, J. X.; Pang, V. Y. T.; Tng, L. M.; Ang, W. H. *Chemistry* **2018**, 24, 1870.

(Zhao, C.)