

细胞器靶向型半胱氨酸荧光探针研究进展

刘飞冉^a 敬 静^{*,a} 张小玲^{*,a,b}^(a) 北京理工大学化学与化工学院 北京 100081)^(b) 北京理工大学医学技术学院 北京 100081)

摘要 半胱氨酸作为一种重要的内源性小分子硫醇,参与众多生理过程,对细胞内氧化还原水平的调节和生物活性物质的合成具有重要意义。细胞器在生命过程中发挥着不可或缺的作用,不同细胞器具有各自独特的功能,而半胱氨酸在不同细胞器内的作用机制不尽相同。荧光探针的高灵敏度与原位检测能力提供了研究不同细胞器内半胱氨酸的方法,有助于更加全面了解半胱氨酸在不同亚细胞器中的作用机制。基于荧光探针所靶向的细胞器,总结了近年来报道的具有细胞器靶向性能的半胱氨酸荧光探针,并从其结构、响应机制、光谱学性质和生物应用等方面进行了比较和分析。

关键词 半胱氨酸; 细胞器; 靶向定位; 荧光探针

Research Progress of Fluorescent Probes for Cysteine Targeting Cellular Organelles

Liu, Feiran^a Jing, Jing^{*,a} Zhang, Xiaoling^{*,a,b}^(a) School of Chemistry and Chemical Engineering, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081)^(b) School of Medical Technology, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081)

Abstract As an important endogenous biothiol, cysteine is involved in various physiological processes. Besides, cysteine also plays an important role in the regulation of intracellular redox levels and the synthesis of bioactive substances. Cellular organelles all act an essential role in the life process, but different cellular organelles have their own unique functions, which makes the mechanism of cysteine in different organelles may be different. The high sensitivity and *in situ* analyze ability of fluorescent probes provide a method to monitor cysteine in different organelles, which is helpful to understand the mechanism of cysteine in physiological process more comprehensively. In this review, the recent reports on cysteine specific fluorescent probes are classified according to their targeted organelles. Besides, the property of those probes, including their structure, response mechanism, spectral properties and biological applications, is summarized.

Keywords cysteine; cellular organelles; targetable localization; fluorescent probe

作为一种含硫 α -氨基酸与小分子硫醇,半胱氨酸对于生理活动的正常运转具有重要的意义。一方面,半胱氨酸作为合成前体,参与体内包括谷胱甘肽、蛋白质、辅酶 A、牛磺酸和无机硫等重要物质的合成;另一方面,基于其所含硫元素的还原性与亲核性,半胱氨酸也是体内重要的抗氧化剂之一,其含量与体内氧化还原水平息息相关^[1]。细胞内半胱氨酸水平异常,可引起多种疾病,例如,缺乏半胱氨酸可导致水肿、儿童发育迟缓、毛发脱色、皮肤损伤等^[2-4];而半胱氨酸过量有可能存在神经毒性^[5]。尽管半胱氨酸与其他小分子硫醇(如谷胱甘肽

与同型半胱氨酸)具有相似的结构,且均与体内氧化还原平衡相关,但研究表明,半胱氨酸与其他小分子硫醇具有不同的生理作用^[6-8]。因此,开发灵敏、快速、高选择性的半胱氨酸检测方法对于揭示生物系统内半胱氨酸参与的生理过程有着极为重要的意义。

基于半胱氨酸自身的性质与其所处的生理环境,设计高效的半胱氨酸检测方法主要面临以下两点挑战:第一,半胱氨酸具有很高的活性,因此需要快速的原位检测;第二,半胱氨酸的检测容易受到其他小分子生物硫醇的干扰。半胱氨酸中的巯基和其他小分子生物硫醇中

* Corresponding authors. E-mail: zhangxl@bit.edu.cn; hellojane@bit.edu.cn

Received September 5, 2022; revised December 1, 2022; published online January 5, 2023.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 22174008, 22177013, 21974009, 22274010).

国家自然科学基金(Nos. 22174008, 22177013, 21974009, 22274010)资助项目。

的巯基均是强亲核试剂,具有相似的结构单元和反应性质,检测时难以区分。同时,其相对较低的含量(30~200 $\mu\text{mol/L}$)使得对于半胱氨酸的选择性检测难度更高^[9]。

在过去的几十年里,研究人员已经建立了一些半胱氨酸的高选择性检测方法,包括高效液相色谱^[10]、毛细管电泳^[11]、质谱^[12]等。近年来,荧光探针技术的快速发展为半胱氨酸的选择性检测提供了新的分析工具。荧光探针检测技术灵敏度高、选择性好;同时,荧光探针技术响应迅速的特点也为我们创造了动态观测特定生物分子的可能;特别是共聚焦显微镜的广泛应用也推动了荧光探针在生物成像领域的运用,使得研究人员可以在原位更直接地了解生物分子的时空分布、浓度及其随时间的动态变化^[9,13]。

细胞器是细胞质内具有特定形态与功能的亚结构,真核细胞的细胞器主要包括细胞核、线粒体、溶酶体、内质网、高尔基体和脂滴等。不同细胞器具有各自独特的功能,且均在细胞过程中起到不可缺少的作用。每个细胞器都需要适合自身功能要求的生物活性物质与适当的微环境才能发挥作用。由此可见,研究生理过程中特定细胞器内生物活性物质的变化,对于了解该物种的生理意义与作用机制具有极为重要的意义^[14-15]。

近年来,很多检测性能优异、具有优秀生物应用前景的半胱氨酸荧光探针已经被报道^[9,16-21]。为了更好地了解半胱氨酸在细胞内的作用,开发能够靶向至不同细胞器的高选择性半胱氨酸荧光探针是十分必要的,目前具有这种性能的探针报道较少。本文以探针所靶向的细胞器进行分类,总结了目前已报道的具有细胞器靶向性能的半胱氨酸荧光探针,并对其结构、功能和生物应用等方面进行归纳与整理。

1 线粒体靶向型半胱氨酸荧光探针

线粒体是一种双层膜细胞器,可分为外膜、膜间空间、内膜和基质等四个部分。作为真核细胞的标志性细胞器,线粒体通过氧化磷酸化合成腺嘌呤核苷三磷酸(ATP),为细胞提供能量。同时,线粒体作为一种高度活跃与动态的细胞器,其中蕴含的大量蛋白质及蛋白质复合物所形成的复杂信号传导网络在生物活性物质的合成与代谢、信号传导、应激反应和细胞凋亡等生理过程中起到至关重要的作用^[22-24]。半胱氨酸利用其巯基的还原性参与线粒体内部氧化还原水平的调节,从而实现对于多种生理过程的调控;而线粒体半胱氨酸的缺失则会导致线粒体膜电位超极化和脂质过氧化物的积累,进而诱导细胞铁死亡^[25-28]。

由于线粒体内膜中存在质子泵,线粒体基质中的质

子被泵入线粒体膜间区域,导致该区域带正电荷,而线粒体基质则带负电荷,形成跨膜电位,即线粒体膜电位。因此,如果能够跨越细胞膜和线粒体膜的亲脂性分子具有离域的阳离子,其所携带的正电荷就可以帮助探针分子在线粒体膜电位的作用下进入线粒体基质,使其具有线粒体靶向能力^[29]。

花菁类染料的结构一般由甲川基链连接两侧的共轭环状结构(如杂环、苯环、环烯等)组成,其较大的共轭体系使得该类染料具有大的摩尔吸光系数与较长的发射波长等优异光学性质。其中一部分花菁类染料的杂环部分含有正电荷,故常被用于设计具有线粒体靶向性能的荧光探针^[29-32]。Cy.7-Cl 系列花菁染料具有高摩尔吸光系数、近红外波段发射与生物毒性较低等诸多优势,并具有选择性靶向线粒体的能力,因此被广泛应用于线粒体相关成像工具的构建中(图1)。同时,其结构中的氯原子位点易于被识别基团取代。当识别基团反应离去后,该位点上残留的羟基暴露在外,使得探针的共轭结构可以从烯醇式转换为酮式,光谱发生明显变化,从而为目标分子的可视化提供了良好的光谱学基础^[33-34]。陈令新等对 Cy.7-Cl 荧光团进行修饰,分别于 2015 年^[35]与 2019 年^[36]报道了两例以对硝基苯甲酸酯和丙烯酸酯为识别基团的线粒体半胱氨酸荧光探针 **1** 与 **2**。其中,作者通过荧光探针 **2** 实现了三种不同肿瘤细胞系及其荷瘤小鼠的成像,并评估了由氨基甲酸乙酯构建的原位肺癌模型小鼠线粒体中半胱氨酸的含量变化。而 2022 年王志林等^[37]则以邻碘苯甲酸硫酯作为识别基团构筑了荧光探针 **3**,实现了双通道检测线粒体内半胱氨酸与高半胱氨酸。三种小分子硫醇均能取代硫酯识别基团,但由于谷胱甘肽无法发生分子内重排,反应后的结构没有荧光发射,而半胱氨酸与高半胱氨酸则发生该重排反应,在 740 nm 处发射出荧光。在发生取代反应时,半胱氨酸残基除留在荧光团上进而发生重排反应外,也可能跟随识别基团一起离去,从而使荧光团上的硫酯基团暴露在外,荧光团结构从烯醇式互变异构为酮式,在 625 nm 处产生发射。综合两个发射波长的荧光强度,便可以实现对于线粒体内半胱氨酸的选择性检测。除直接修饰现有的识别基团外,通过改变取代基数目、种类与位置调控识别位点电子密度或空间位阻,也可以实现对半胱氨酸的高选择性检测。2020 年,王建红等^[38]基于 Cy.7-Cl 设计合成了一系列具有单氯取代的苯甲酸酯结构作为备选识别基团的半胱氨酸荧光探针,并辅以乙二醇单甲醚修饰吡啶鎓离子提高探针的水溶性。当半胱氨酸取代氯原子后,具有邻位取代的荧光探针 **4** 更容易发生分子内成环反应使识别基团离去,从而表现出选择性检测线粒体内半胱氨酸的能力。而 2021 年,郭志前

等^[39]基于苯并吡啶杂环的 Cy-7-Cl 设计合成了一系列以具有不同取代基的苯硫醚作为半胱氨酸识别位点的荧光探针. 不论识别基团具有吸电子取代基(对三氟甲基或间二三氟甲基取代)或是给电子取代基(3,4-二甲氧基), 探针均能实现对线粒体半胱氨酸的选择性检测, 而具有给电子取代基(3,4-二甲氧基)的结构 **5-3** 具有更快的反应速率、更高的信噪比, 并且可以快速实现对荷瘤小鼠内源性半胱氨酸的可视化, 该过程仅需 5 min 即可完成. 林伟英等^[40]则于 2022 年报道了一例以硫代苯甲酰胺为识别基团的线粒体半胱氨酸荧光探针 **6**, 并将其应用于高糖刺激细胞和小鼠糖尿病模型中, 发现该过程中线粒体半胱氨酸水平显著降低, 这也意味着线粒体氧化应激程度增加. 同时, 研究人员利用该探针发现, 空气颗粒物污染可以通过破坏氧化还原平衡的方式, 使小鼠线粒体内半胱氨酸含量显著下降. 此外, 陈令新等^[41]于 2021 年报道了一例以新型近红外花菁染料^[42]为荧光团, 丙烯酸酯为识别基团的线粒体靶向型半胱氨酸荧光探针 **7**, 并利用该探针探究了在缺氧/再灌注应激模型中半胱氨酸的浓度变化及其与线粒体损伤之间的联

系, 证实了半胱氨酸对缓解缺氧/再灌注应激诱导的线粒体相关损伤的积极作用. 基于花菁染料的相关探针的结构如图 1 所示.

半花菁结构是花菁染料的一部分, 常作为电子受体出现于电子给体-电子受体(D-A)结构的荧光团中. 相比于花菁染料, 基于半花菁结构制备的荧光团具有光谱特性可调、光稳定性高、Stokes 位移大等突出优点^[43]. 2015 年, 李富友等^[44]利用花菁类染料与间苯二酚制备了一种含有苯并吡啶基团的近红外半花菁染料, 并以丙烯酸酯识别基团修饰羟基合成了荧光探针 **8**. 2016 年, Kim 等^[45]则利用吡啶鎓离子与对羟基苯甲醛制备近红外染料分子, 并同样以丙烯酸酯识别基团修饰羟基合成了荧光探针 **9**. 同时, 该结构中吡啶氮原子上取代的乙基醇可以与吡啶发生分子内成环, 破坏共轭结构, 从而使得探针在与半胱氨酸反应前后具有更大的荧光强度变化, 并可通过紫外-可见吸收光谱进行定量分析. 2018 年, 谭蔚泓等^[46]在前人研究的系列近红外染料^[47]的基础上, 进一步修饰氟原子, 制备了一种在 pH 6.8~8.1 区间内拥有稳定信号的近红外荧光团, 并结合丙烯酸酯识别基

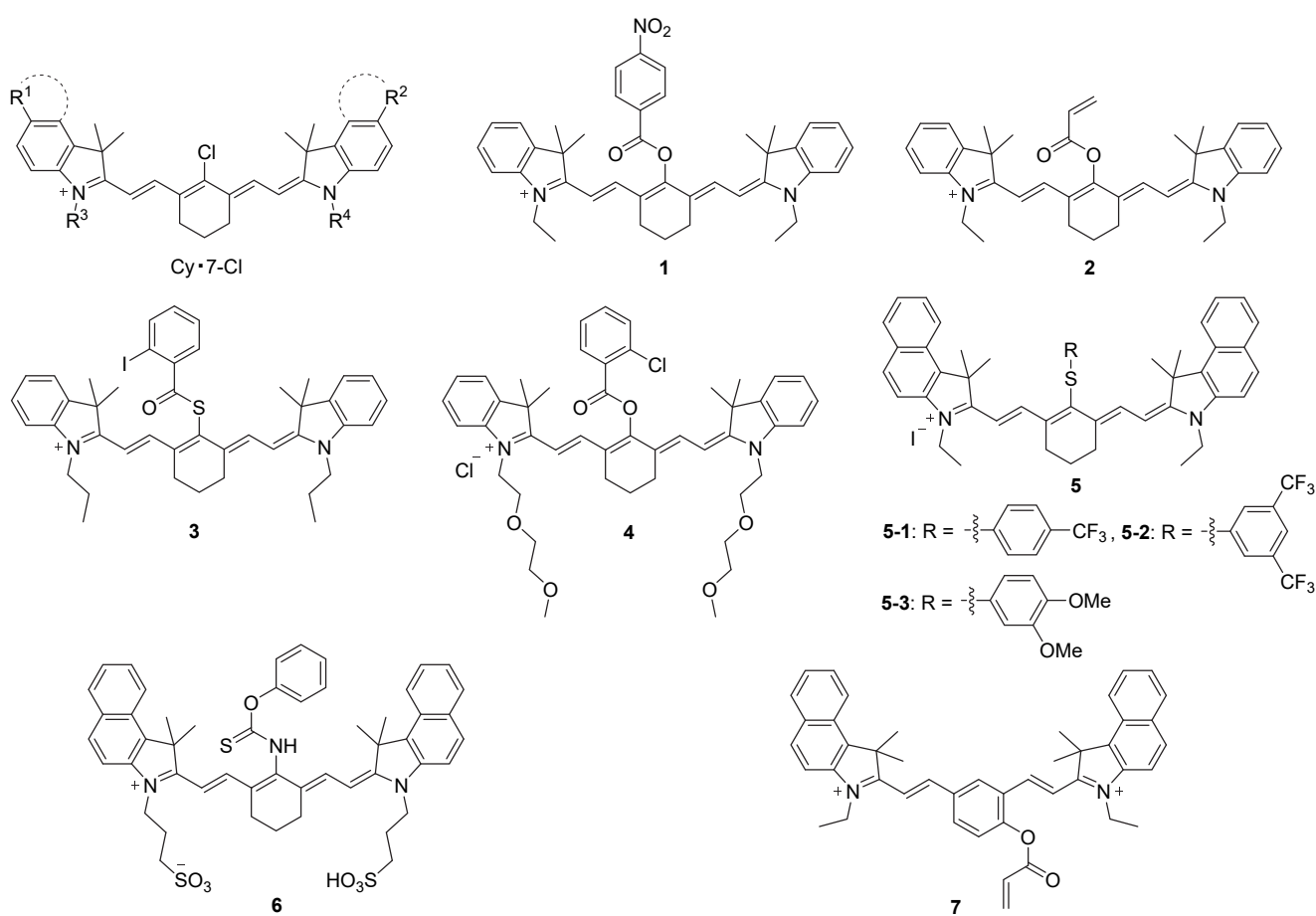


图 1 基于花菁染料的线粒体靶向型半胱氨酸荧光探针结构

Figure 1 Structures of fluorescent probes for cysteine targeting mitochondria based on cyanine dyes

团合成了半胱氨酸荧光探针 **10**, 从而实现了对线粒体内半胱氨酸的近红外比率成像, 并且检测信号不会受到 pH 波动的干扰. 2020 年, 宋大千等^[48]利用苯并吡啶鎓离子与 2-(2-羟基苯基)苯并噻唑(HBT)构建荧光团, 并以丙烯酸酯为识别基团, 合成了线粒体半胱氨酸荧光探针 **11**. 该探针除能较好地对线粒体半胱氨酸进行检测外, 其反应后的羟基产物可以通过与 RNA 结合的方式实现细胞核靶向, 并产生更强的荧光. 同年, 唐波等^[49]基于半花菁染料设计合成了近红外线粒体半胱氨酸荧光探针 **12**, 验证了抑郁模型小鼠大脑细胞线粒体内半胱氨酸含量下降的现象, 并通过利用这一现象实现了对于抗抑郁药物平衡氧化还原状态能力的评估. 2021 年, 李平等^[50]则利用苯并吡啶鎓离子与对羟基苯甲醛构筑了一种双光子荧光团, 并以丙烯酸酯识别基团修饰羟基合成了荧光探针 **13**. 研究人员利用该探针, 通过模型小鼠揭示了由 λ -卡拉胶诱导的关节炎可引起线粒体氧化应激和半胱氨酸的过量消耗. 类似地, 王建红等^[51]于同年报道了一例以 2-氯苯甲酸酯为识别基团的线粒体半胱氨酸荧光探针 **14**. 2022 年, 曾宪顺等^[52]利用花菁类染料与 3-羟基苯硫酚制备了含有苯并吡啶基团的一种近红外半花菁染料, 并以丙烯酸酯识别基团修饰羟基, 合成了荧光探针 **15**. 硫原子的引入令荧光团 HOMO 能级与 LUMO 能级之间的能级差进一步降低, 这使得荧光探针 **15** 对于线粒体半胱氨酸检测, 实现了 803 nm 的发射波长与 68 nm 的 Stokes 位移, 二者均大于已被报道的类似结构. 相关探针的结构如图 2 所示.

与半花菁结构类似, 一些含氮杂环也可以通过构筑鎓离子的方式实现线粒体靶向的功能, 并可作为 D-A 结构中的电子受体使用. 同时, 鎓离子所带的正电荷也可能与氨基酸残基发生静电相互作用, 从而实现半胱氨酸的选择性检测. 吡啶鎓离子制备简便, 水溶性好, 已被广泛用于 D-A 体系的构筑中. 2016 年, 董川等^[53]基于吡啶鎓离子与丙烯酸酯识别基团构筑了半胱氨酸荧光探针 **16**. 该探针在水相中具有良好的双光子特性, 在 750 nm 激发下可以实现 150 μm 的组织穿透深度. 2019 年, 汤立军等^[54]以 HBT 与吡啶鎓离子构筑荧光团, 并以丙烯酸酯为识别基团制备了荧光探针 **17**. 当硫醇与丙烯酸酯基团发生加成后, 吡啶鎓离子与氨基酸残基发生静电相互作用, 从而使荧光探针 **17** 能够选择性检测半胱氨酸. 同时, 基于 HBT 基团本身的激发态分子内质子转移效应, 以及借助吡啶鎓离子实现的分子内电荷转移效应, 荧光探针 **17** 具有 210 nm 的 Stokes 位移与 607 nm 的深红色发射. 同年, 樊丽等^[55]基于萘与吡啶鎓离子构筑荧光团, 以 2,4-二硝基苯磺酰为识别基团, 设计合成了比率型半胱氨酸荧光探针 **18**. 基于萘的双光子特性, 荧光探针 **18** 也可以在 750 nm 激发下实现对细胞的双光子成像. 与前文所述不同的是, 赵伟利等^[56]于 2021 年设计合成了一系列在 8 位修饰具有不同取代位置的吡啶或吡啶鎓离子的硫醚作为识别基团的 1,7-二苯基-BODIPY 衍生物. 1 位与 7 位上两个苯基的引入可以限制硫醇对硫醚识别位点取代后的分子内重排, 而硫醚上不同的取代基则限制了不同硫醇对于该硫醚识别位

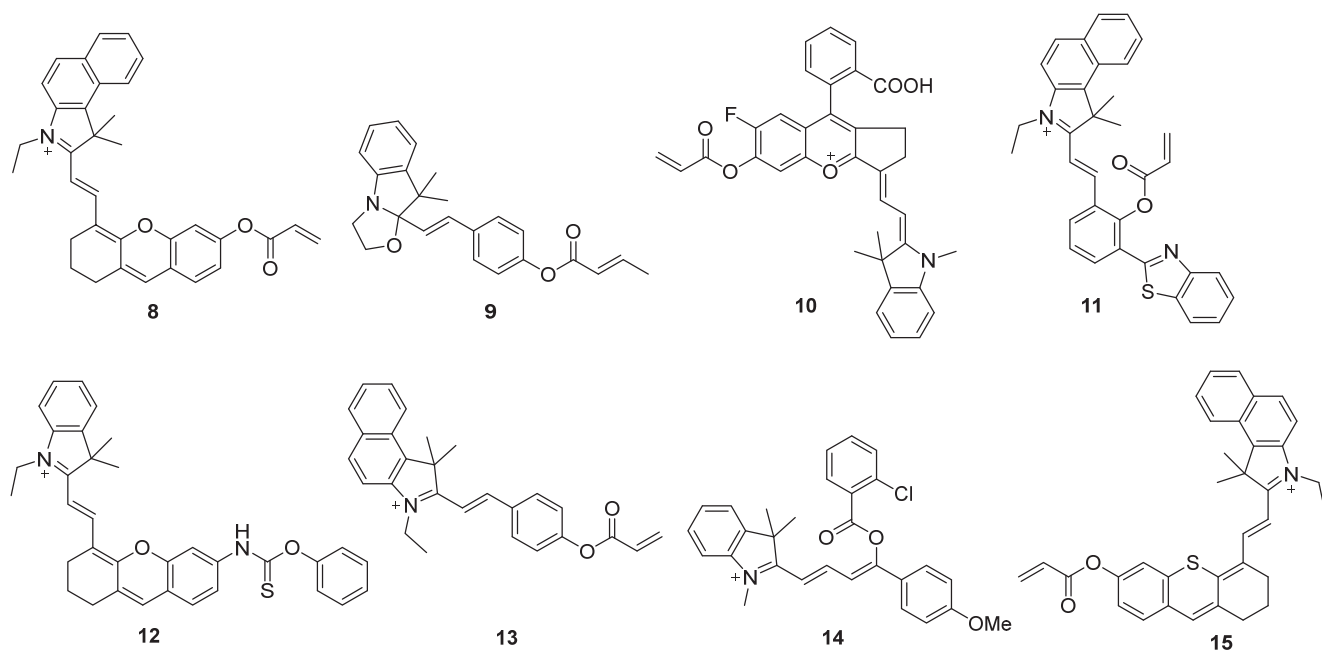


图 2 基于半花菁染料的线粒体靶向型半胱氨酸荧光探针结构

Figure 2 Structures of fluorescent probes for cysteine targeting Mitochondria based on hemi-cyanine dyes

点的反应能力, 由此实现半胱氨酸的选择性检测. 其中, 具有邻位取代的吡啶鎓离子的荧光探针 **19** 具有最佳的检测性能, 可以在 2 min 内实现对线粒体半胱氨酸的选择性检测.

同样地, 苯并噻唑鎓离子也可以实现类似的作用. 2014 年, 郭炜等^[57]以苯并噻唑鎓离子与香豆素构筑 D-A 结构, 并以对甲苯基硫酯作为识别基团, 设计合成了半胱氨酸荧光探针 **20**. 在该探针中, 苯并噻唑鎓离子除作为荧光团的一部分外, 其电荷也参与识别过程, 通过与氨基酸残基上的羧基或氨基发生静电相互作用, 选择性地使半胱氨酸在取代硫酯后发生分子内重排及成环过程, 从而实现对于半胱氨酸的选择性检测. 而王建华等^[58]于 2021 年则利用苯并噻唑鎓离子与茚构建 D-A 结构, 以丙烯酸酯为识别基团, 制备了一例线粒体靶向的比率型半胱氨酸探针 **21**. 基于不同鎓离子的半胱氨酸荧光探针的结构如图 3 所示.

此外, 其他一些自身具有电荷的荧光染料往往也具有线粒体靶向性能(图 4). 2018 年, 张晓兵等^[59]通过结合荧光素等多种染料^[60], 设计了一类具有良好光稳定性的新型近红外染料, 并利用其中一种结构与丙烯酸酯识别基团构筑了一例线粒体靶向型近红外半胱氨酸荧光探针 **22**. 探针在与半胱氨酸反应前带有电荷, 可以快速聚集于线粒体内, 而与半胱氨酸反应后, 探针呈电中性, 从而避免探针在聚集至线粒体过程中与半胱氨酸反应所引起的信号干扰. 同时, 该探针被用于监测线粒体半胱氨酸的水平差异以区分正常细胞和癌细胞. 2019 年, Liu 等^[61]报道了一例线粒体半胱氨酸荧光探针 **23**. 该探针以二乙氨基香豆素为电子供体, 罗丹明为电子受体, 哌嗪为桥连基团, 设计合成了一例基于荧光共振能量转移(FRET)效应的近红外荧光团, 并以间二氟甲

基苯硫酯作为半胱氨酸识别基团, 通过控制罗丹明部分的开环或闭环, 调控荧光团整体的 FRET 效应, 实现对线粒体内半胱氨酸的比率检测, 且荧光信号具有 224 nm 的 Stokes 位移. 2020 年, 葛健锋等^[62]以修饰了吡啶鎓离子的 9-氨基-9*H*-氧杂蒽为荧光团, 丙烯酸酯为识别基团, 设计合成了线粒体靶向的比率型半胱氨酸荧光探针 **24**; 而江玉亮等^[63]于 2021 年以双黄酮衍生物作为荧光团, 丙烯酸酯为识别基团, 设计合成了荧光探针 **25**. 由于该探针分子的激发态分子内质子转移性质的存在, 使得荧光探针 **25** 可以实现肉眼检测半胱氨酸, 并具有极大的 Stokes 位移.

除直接利用带电荷的荧光团实现线粒体靶向外, 三苯基膦也被用作线粒体的特异性靶向基团对探针进行修饰. 相比于其他线粒体靶向方式, 经三苯基膦修饰的结构制备过程简单、稳定性好, 且三苯基膦基团在可见光及近红外区吸收与发射较低, 这些优势使得三苯基膦被广泛应用于线粒体靶向型功能分子的构建中^[31]. 2017 年, 郭志前等^[64]以二氟硼姜黄素为母核, 集成三苯基膦靶向基团和丙烯酸酯识别基团, 构筑了线粒体靶向型半胱氨酸荧光探针 **26**. 与半胱氨酸反应后, 探针在 680 nm 处出现新的发射峰, 原本在 560 nm 处的发射峰强度降低. 研究人员利用该探针发现 Hela 细胞在葡萄糖剥夺过程中, 细胞内半胱氨酸水平显著升高, 由此证明了该探针应用于生物体系内半胱氨酸成像的潜力. 2018 年, 孟祥明等^[65]在吡啶的 N 原子上修饰三苯基膦作为靶向基团, 在 3 位与 6 位对称修饰, 以炔基连接的苯甲醛作为半胱氨酸识别基团, 构筑了比率型半胱氨酸荧光探针 **27**. 相比于单侧修饰识别基团, 对称修饰的荧光探针 **27** 对半胱氨酸具有更好的选择性. 半胱氨酸的存在使得吸电子的醛基转化为给电子的五元环结构, 极大地抑制了

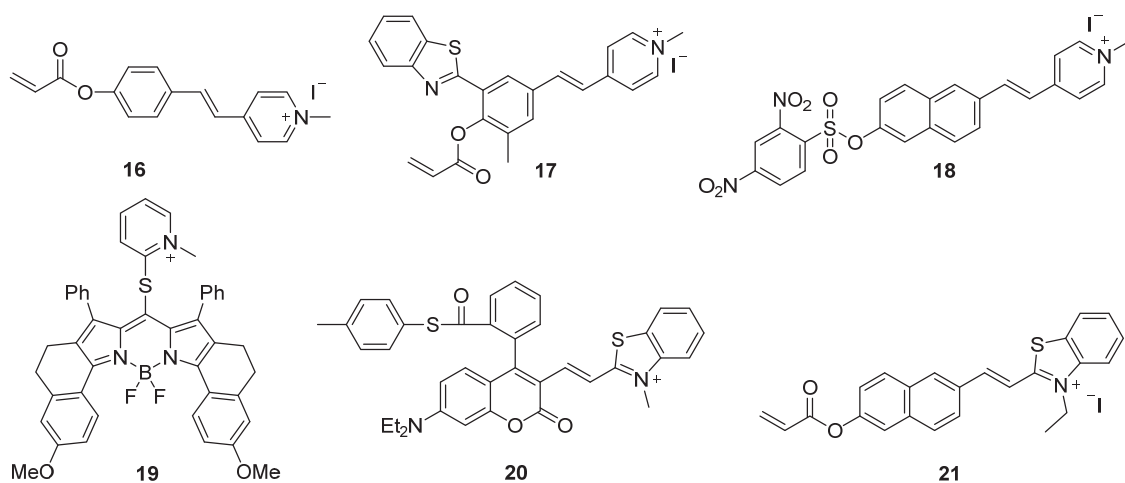


图 3 基于鎓离子的线粒体靶向型半胱氨酸荧光探针结构

Figure 3 Structures of fluorescent probes for cysteine targeting mitochondria based on onium ion

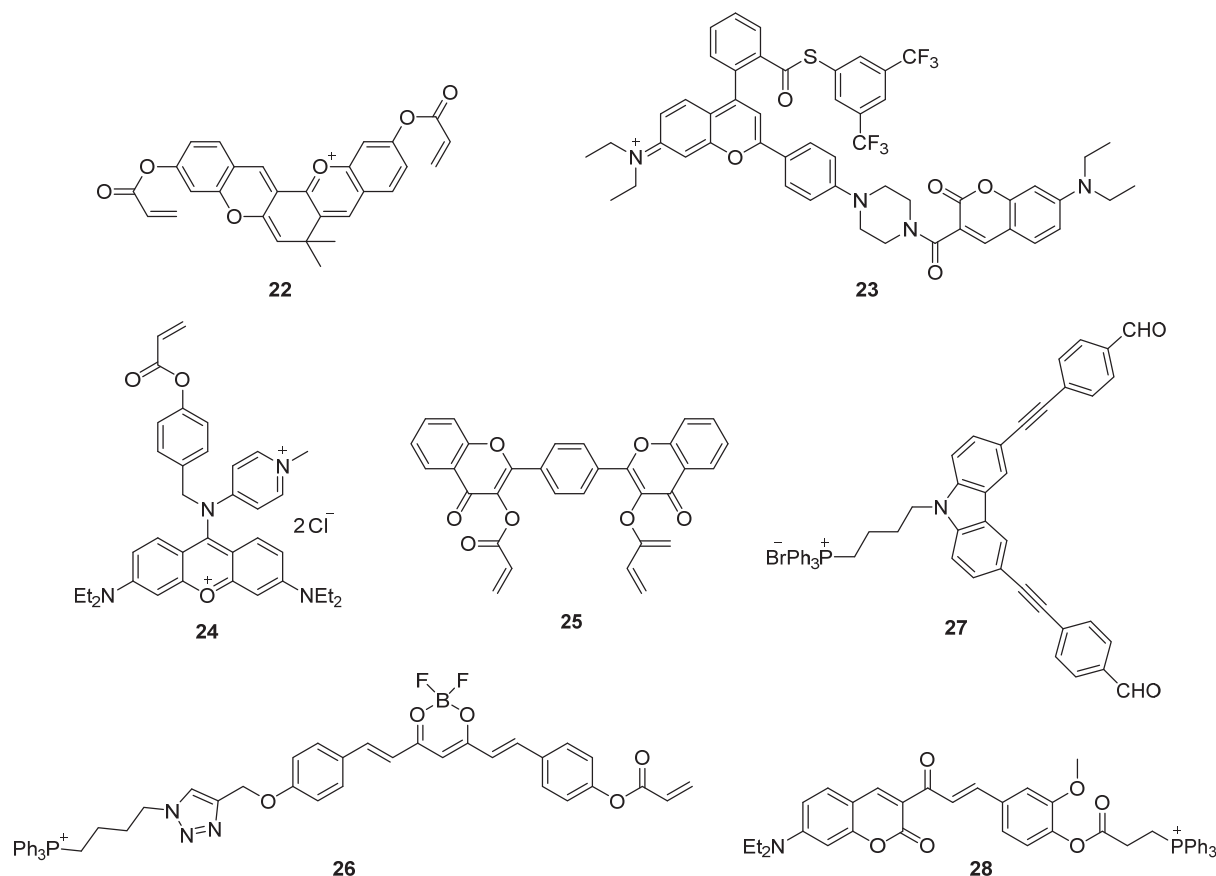


图4 基于其他靶向结构的线粒体半胱氨酸荧光探针结构

Figure 4 Structures of fluorescent probes for cysteine within mitochondria based on other targetable group

分子内电荷转移效应,从而使该探针具有 119 nm 的 Stokes 位移. 研究人员利用该探针对于过氧化氢引起的氧化应激过程中线粒体半胱氨酸的含量变化进行了成像,并通过监测线粒体中氧化应激水平实现对脂多糖诱导的细胞凋亡的早期实时跟踪与可视化. 2020 年,阴彩霞等^[66]利用乙酰香豆素构筑 α,β -不饱和酮作为半胱氨酸识别基团,设计合成了一例以三苯基磷为靶向基团的线粒体半胱氨酸荧光探针 **28**. 该探针在线粒体所处的微碱性环境(pH=8)下,对半胱氨酸具有极佳的响应性能,并能避免其他生物硫醇对检测过程的干扰. 随后,研究人员利用该探针在亚细胞水平评价了白藜芦醇对细胞抗氧化系统的激活作用,并首次证明了白藜芦醇可以有效上调线粒体中半胱氨酸的含量,且该过程可能存在于各类细胞系中.

此外,具备多通道同时检测不同物种能力的荧光探针可以为我们提供多种目标物在同一生理状态下的状况,并能消除由于引入两个不同探针所造成的干扰与分布差异^[67]. 硫化氢与半胱氨酸同属活性硫物种(RSS),它们均在线粒体相关的生理、病理过程中起到关键作用,例如细胞分化、信号传递和凋亡等^[68-69]. 2020 年,祁争

健等^[69]设计合成了一例双通道检测线粒体硫化氢和半胱氨酸的荧光探针 **29**. 如图 5 所示,该探针以丙烯酸酯修饰的香豆素衍生物作为半胱氨酸识别区域,并以吡啶和哌嗪苯构筑 D-A 体系作为硫化氢识别区域,两部分由哌嗪进行连接. 哌嗪基的引入,一方面作为给电子基团,另一方面作为两部分间的桥连基团,实现了从香豆素到吡啶的 FRET 效应. 因此,探针在 410 nm 波长激发下原本具有 596 nm 的荧光发射,当探针与硫化氢反应时,探针在 596 nm 处的荧光强度降低,反应过程约 200 s;而当探针与半胱氨酸反应时,探针在 468 nm 处出现新的发射峰,反应过程约 8 min,同时,两个检测过程的光谱不会发生干扰. 此后,研究人员利用 HepG2 细胞和斑马鱼验证了荧光探针 **29** 检测外源性与内源性硫化氢和半胱氨酸的能力,并展示了该探针分别、连续或同时对硫化氢和半胱氨酸进行成像的优异能力.

2 溶酶体靶向型半胱氨酸荧光探针

溶酶体是一种单层膜细胞器,其中含有约 60 种水解酶,以实现溶酶体的分解代谢功能. 同时,溶酶体具有质子泵,能够维持腔内环境在 pH 4.6~5.0 范围内,为

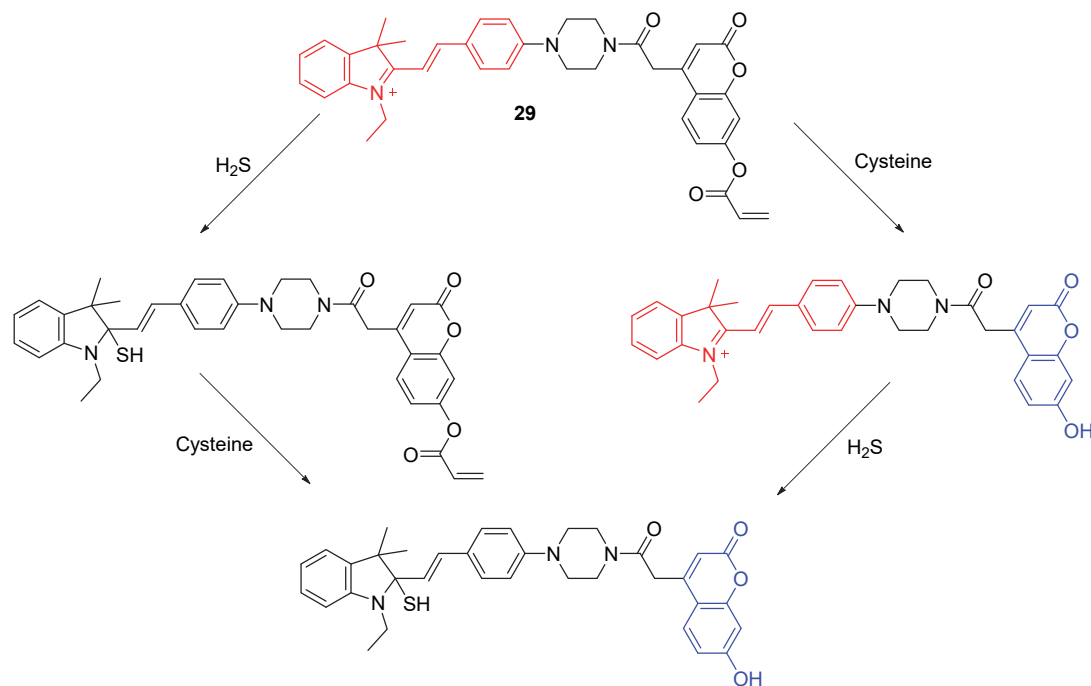


图5 双功能荧光探针 29 的结构与识别机理

Figure 5 Structures and recognition mechanism of difunctional fluorescent probe 29

水解酶提供所需的酸性环境^[70]。除降解功能外,溶酶体在细胞损伤时也会与质膜融合,在某些类型的细胞中还更具有更专一的分泌功能^[71]。此外,溶酶体在细胞代谢与细胞应激等方面发挥着主导作用,并与诸多神经退行性疾病息息相关^[72-73]。作为一种含巯基的游离氨基酸,半胱氨酸在溶酶体内对蛋白质二硫键的水解过程起到至关重要的作用,并拥有相对独立的溶酶体运输系统^[74-76]。同时,溶酶体内的半胱氨酸可能与帕金森症、胱氨酸病等多种疾病相关^[77-79]。

丙烯酸酯是最常见的半胱氨酸选择性识别基团。半胱氨酸对丙烯酸酯结构进行亲核加成,并发生环化-裂解反应,脱去七元环化合物,使得荧光团的羟基重新暴露。而结构更大的同型半胱氨酸和谷胱甘肽一般难以发生该过程,由此实现对半胱氨酸的选择性检测^[9]。2018年,刘伟生等^[80]设计合成了具有溶酶体靶向性能的半胱氨酸荧光探针 30(图 6)。该探针以 V 型双香豆素为荧光团^[81],丙烯酸酯为识别基团,香豆素母核上供电子的二乙氨基作为溶酶体靶向基团。该探针可在 850 nm 激发下实现 250 μm 深度的组织成像。类似地,阴彩霞等^[82]于 2020 年报道了一例溶酶体靶向型半胱氨酸荧光探针 31。该探针基于二脲异佛尔酮与 7-羟基香豆素构建近红外荧光团,丙烯酸酯为识别基团,并通过使用吗啉取代香豆素 4 位的氯原子一步法构筑溶酶体靶向基团。蒲守智等^[83]于 2022 年报道了一例同样以香豆素作为荧光团、吗啉为溶酶体靶向基团的半胱氨酸荧光探针

32, 该探针能在 pH 4~10 的区间内对半胱氨酸产生稳定的响应信号。除香豆素外,丙烯酸酯也被用于修饰其他荧光团构建半胱氨酸荧光探针。2019 年,余孝其等^[84]开发了一例具有溶酶体靶向能力的吡啶-硅杂蒽近红外荧光团,并对其修饰丙烯酸酯识别基团,构建了溶酶体靶向型近红外半胱氨酸荧光探针 33。2021 年林伟英等^[85]设计合成了以萘酰亚胺为荧光团的溶酶体靶向型半胱氨酸荧光探针 34,并将其用于脂多糖(LPS)与过氧化氢诱导的氧化应激过程中溶酶体内半胱氨酸含量变化的监测。

2019 年,唐波等^[86]利用吡啶鎓离子与香豆素构建近红外荧光团,设计合成了具有溶酶体靶向能力的近红外半胱氨酸荧光探针 35。研究人员将荧光探针 35 用于小鼠肺部纤维化过程溶酶体半胱氨酸水平的检测中,并利用该探针以光声成像的方式发现肺部纤维化的小鼠肺部细胞内溶酶体半胱氨酸水平更高,而肺部纤维化常常伴随的谷胱甘肽合成受限症状并不是由半胱氨酸缺乏引起的。2020 年,曾宪顺等^[87]在荧光探针 35 的基础上引入硫原子,设计合成了半胱氨酸荧光探针 36。硫原子对氧原子的替换使探针发射进一步红移,发射波长达到了 770 nm。此后,该课题组^[88]于 2021 年报道的荧光探针 37 则是将吡啶鎓离子替换为苯并噻唑鎓离子,实现了 742 nm 的近红外发射。同时,该探针在与半胱氨酸反应后产生的具有裸露羟基的荧光团仍然具有溶酶体靶向性能,一方面使得荧光信号可信度更高,另一方面

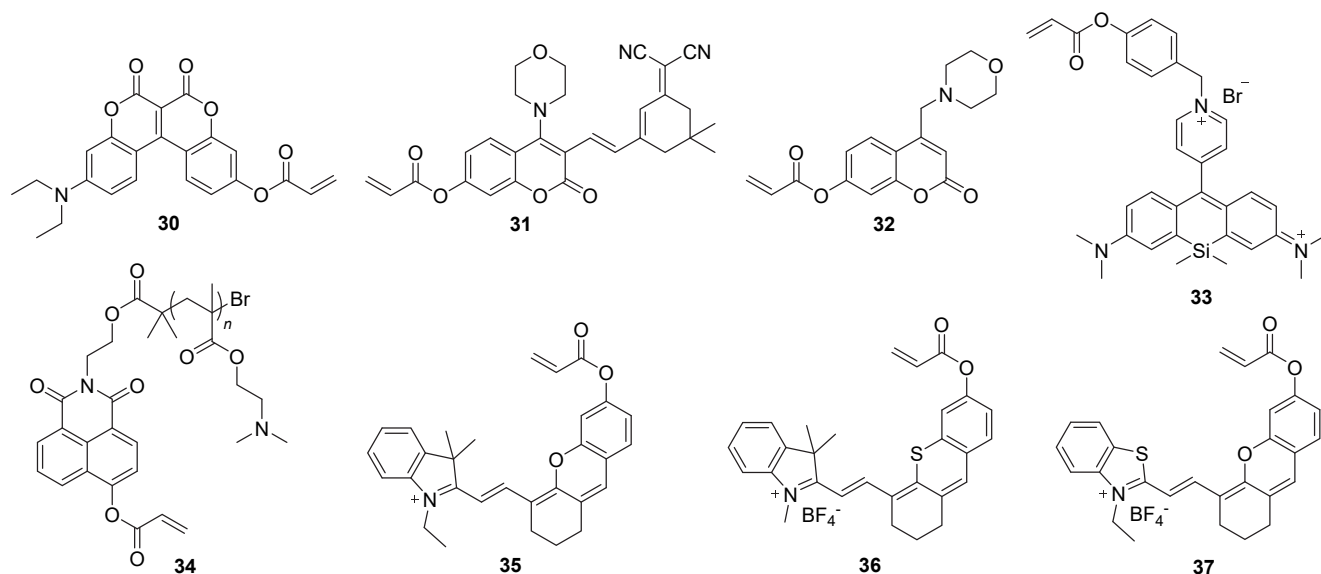


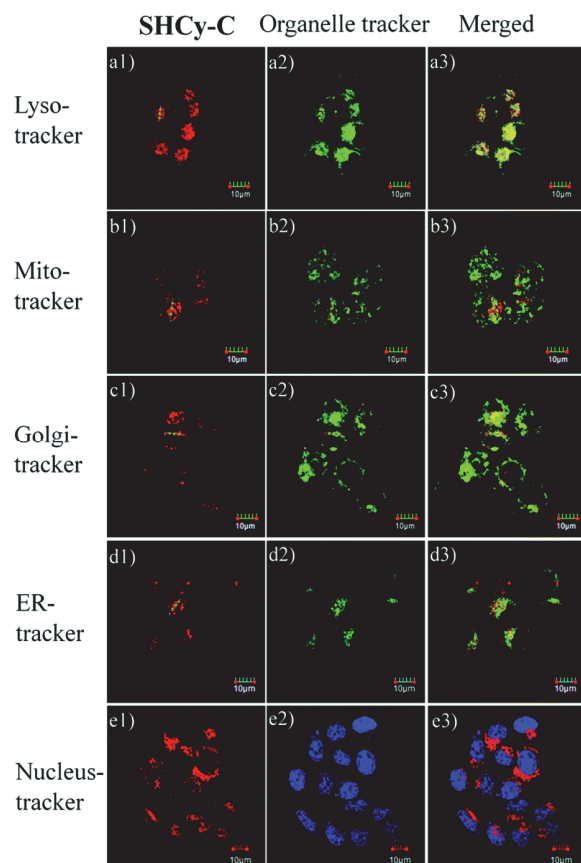
图6 基于丙烯酸酯识别基团的溶酶体靶向型半胱氨酸荧光探针结构

Figure 6 Structures of fluorescent probes for cysteine targeting lysosome based on the acrylate group

证明了该荧光团不需要可能干扰细胞内的 pH 值和细胞活性的碱性氨基便可以实现溶酶体靶向性能。

需要指出的是, 尽管上述部分溶酶体靶向型半胱氨酸荧光探针(如荧光探针 33, 35~37)的结构中存在正电荷, 可能导致探针聚集于线粒体, 但其定位实验表明, 这些探针可以选择性地靶向至溶酶体。以荧光探针 36 为例, 如图 7 所示, 荧光探针 36 可以聚集于溶酶体内, 与溶酶体商业染料的皮尔森系数为 0.87, 而与线粒体、高尔基体、内质网商业染料的皮尔森系数分别为 0.25、0.47 和 0.48。产生这一现象的机制目前尚不明确, 可能由于探针的结构和自身性质, 使得探针以内吞等方式进入细胞, 并驻留于溶酶体内。

与丙烯酸酯识别基团类似, α,β -不饱和酮也可以通过巯基对该结构的迈克尔加成与不同硫醇空间位阻作用的区选择性地识别半胱氨酸。2018 年, 阴彩霞等^[89]设计合成了一例溶酶体靶向的可逆型半胱氨酸荧光探针 38(图 8)。该探针由乙酰基香豆素和对叠氮苯甲醛构建 α,β -不饱和酮识别位点, 并通过叠氮基与炔基的 Click 反应将吗啉靶向基团与主体结构连接。同时, 吗啉环与 Click 反应形成的三唑结构可以提高探针的水溶性。荧光探针 38 可以在溶酶体内部的酸性环境(pH 5)下选择性地检测半胱氨酸, 而在生理环境(pH 7.2~7.4)下则不能与同型半胱氨酸所产生的信号相区别。共定位实验表明, 该探针可以选择性定位于溶酶体, 且定位过程迅速, 不会使检测信号受到探针靶向过程中在生理 pH 环境下与同型半胱氨酸反应而产生的干扰; 而探针在与半胱氨酸反应后仍可以长时间驻留于溶酶体中。该探针被应用于监控由地塞米松诱导的细胞凋亡过程中半胱氨酸含

图7 HeLa 细胞与荧光探针 36 (SHCy-C)、半胱氨酸以及 5 种靶向不同细胞器的商业染料的共定位图像^[87]Figure 7 Images of HeLa cells co-incubated with the fluorescent probe 36 (SHCy-C), cysteine and five different organelle-trackers^[87]

量的变化, 并发现在细胞自噬过程中, 溶酶体膜不会破

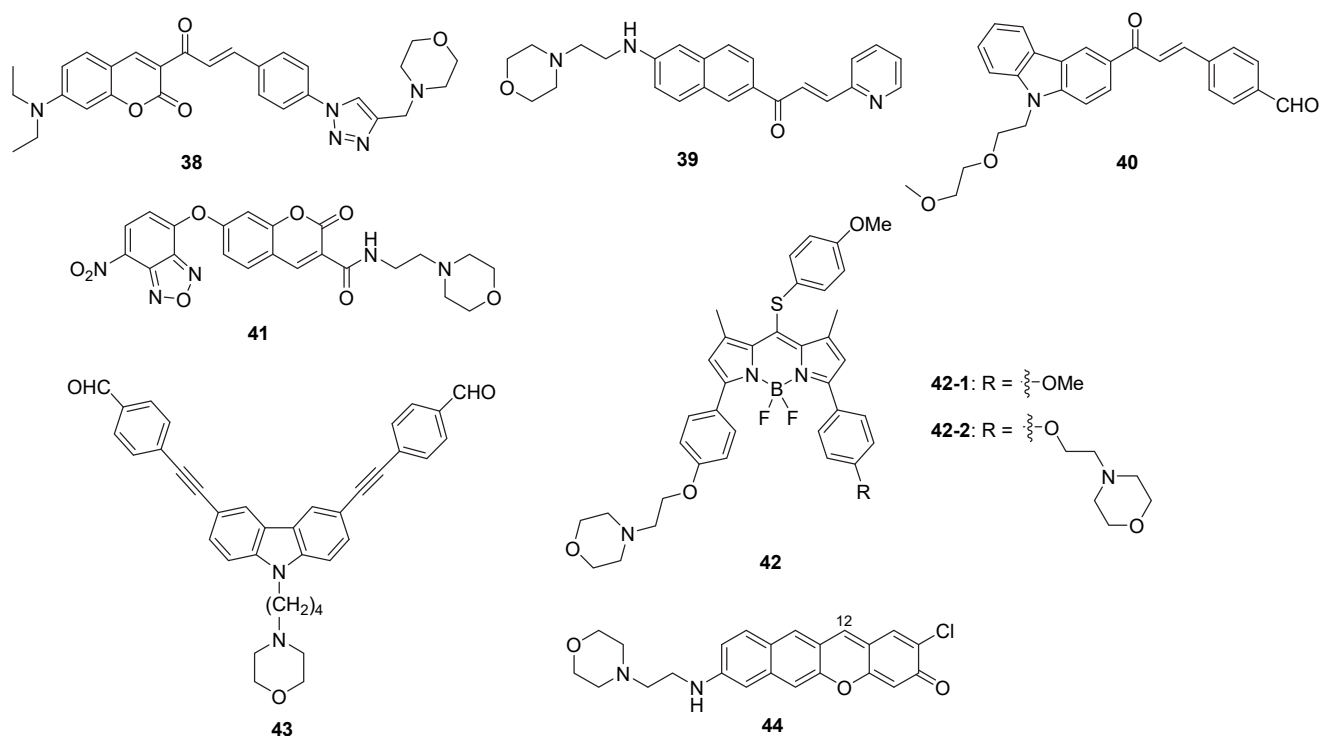


图8 基于其他识别基团的溶酶体靶向型半胱氨酸荧光探针结构

Figure 8 Structures of fluorescent probes for cysteine targeting lysosome based on other recognition groups

损. 在该课题组之后的研究中, 荧光探针 **38** 与 **28** 共同使用, 在亚细胞水平评价了白藜芦醇对细胞抗氧化系统的激活作用, 并首次证明白藜芦醇能有效上调溶酶体半胱氨酸水平^[66].

2019 年, 姜筱叮等^[90]设计合成了一例以蔡作为荧光团, 吗啉环作为溶酶体靶向基团的半胱氨酸荧光探针 **39**. 该探针利用吡啶-2-甲醛构筑 α,β -不饱和和酮识别结构, 吡啶基团的引入一方面调整了分子内电荷分布, 提高了探针对于半胱氨酸识别的选择性; 一方面增强了探针的水溶性. 荧光探针 **39** 对半胱氨酸的检测迅速, 约 5 min 即可达到强度峰值. 此外, 该探针具有双光子特性, 可在 770 nm 激发下进行组织成像, 在 小鼠心脏组织中的穿透深度可达 184 μm . 类似地, 董川等^[91]于同年设计合成了一例溶酶体靶向型半胱氨酸荧光探针 **40**. 该探针以咪唑作为荧光团, 与对苯二甲醛构筑 α,β -不饱和和酮, 并在咪唑氮原子上修饰二乙二醇单甲醚作为溶酶体靶向基团. 该探针被应用于 SMMC-7721 细胞中, 检测由脂多糖或过氧化氢诱导的氧化应激中溶酶体半胱氨酸的变化, 展现出了较好的生物分析应用前景.

7-硝基-2,1,3-苯并氧杂噻二唑(NBD)具有优秀的光学性质, 并可以通过在 4 位构筑醚与胺实现对于活性硫物种的检测. 由于不同活性硫物种对于这类结构的反应机制并不相同, NBD 结构也常被用于活性硫物种的多通道共同检测^[92]. 2020 年, 林伟英等^[93]设计合成了一例基

于 NBD 醚衍生物的溶酶体靶向性半胱氨酸荧光探针 **41**, 实现了对溶酶体半胱氨酸的双通道高选择性检测. 该探针以香豆素为母核, 吗啉为溶酶体靶向基团, 并利用香豆素 7 位的羟基与 NBD 结构通过醚键连接. 该醚键可以被硫化氢与三种小分子硫醇(谷胱甘肽、半胱氨酸与同型半胱氨酸)打断, 产生香豆素荧光团与硫醚取代的 NBD 结构. 香豆素荧光团在 465 nm 处发射荧光, 而硫醚取代的 NBD 结构不发出荧光. 但由于半胱氨酸结构中存在亲核氨基, 具有半胱氨酸残基的 NBD-硫醚会发生分子内 *Smile* 重排, 形成 NBD-NHR 结构, 并在 565 nm 处发射出荧光, 而同型半胱氨酸由于其结构重排位阻较大, 难以发生这一过程. 荧光探针 **41** 可对 HeLa 细胞和斑马鱼中的外源半胱氨酸进行成像, 为探索溶酶体半胱氨酸的生理学作用提供了一种潜在的工具.

赵伟利等^[94]发现, 在 BODIPY 的 8 位修饰对甲氧基苯硫醚作为识别基团的情况下, 可以通过对 1 位与 7 位进行修饰, 利用位阻效应限制小分子硫醇对硫醚结构的亲核进攻, 实现小分子硫醇的选择性检测; 同时, 在 3 位和 5 位修饰苯基, 则可以显著使 BODIPY 的发射红移. 基于此, 2019 年, 该课题组^[94]设计了半胱氨酸荧光探针 **42-1** 和 **42-2**. 两者均是在 BODIPY 结构的 1 位和 7 位修饰甲基限制小分子硫醇的反应, 3 位和 5 位修饰苯基使波长红移, 并在苯基的对位非对称(**42-1**)或对称(**42-2**)修饰乙氧基吗啉作为溶酶体靶向基团.

芳香环上的醛基也可能成为半胱氨酸的选择性识别基团。2019年,孟祥明等^[95]基于该课题组在咪唑基分子内电荷转移荧光团的研究成果,设计合成了首例溶酶体靶向的比率型半胱氨酸荧光探针 **43**。该探针在咪唑 3 位和 6 位对称修饰以炔基连接的苯甲醛识别基团,并在 N 原子上修饰烷基吗啉作为溶酶体靶向基团。与半胱氨酸反应后,探针结构从吸电子的醛基转化为给电子的五元环结构,抑制了分子内电荷转移效应,使得探针在 720 nm 激发下,发射波长从 521 nm 蓝移至 402 nm,波长位移达到 119 nm。

一些共轭结构中的双键同样可能作为半胱氨酸的选择性识别位点。2020年,Ahn等^[96]基于苯并蒽设计合成了一种近红外荧光团,并对其修饰吗啉环作为溶酶体靶向基团,制备了具有溶酶体靶向性能的近红外比率型半胱氨酸荧光探针 **44**。荧光团上位于 C-12 的双键可以选择性地被半胱氨酸加成,其残基进一步发生分子内成环重排,使得荧光团的发射波长从 685 nm 蓝移至 510 nm,从而实现对溶酶体半胱氨酸的比率检测。

3 内质网靶向型半胱氨酸荧光探针

内质网是大多数真核细胞中最大的细胞器,在蛋白质的合成与转运、脂质合成、碳水化合物代谢和细胞内 Ca^{2+} 储存等细胞过程中发挥着重要作用^[97]。内质网分为光面内质网和粗面内质网,每种内质网执行不同的细胞功能。光面内质网不含核糖体蛋白,主要负责脂质合成、 Ca^{2+} 存储和信号转导等;粗面内质网中核糖体密度

高,主要负责蛋白质合成、折叠与转运,分泌蛋白在此经翻译后移动至内质网腔中进行折叠和修饰,形成成熟蛋白质^[98]。在正常生理状态下,内质网通过释放半胱氨酸与谷胱甘肽抵消由巯基介导的内质网滞留过程,并通过维持内质网内部氧化还原水平,诱导蛋白质形成二硫键^[99]。此外,半胱氨酸在缓解内质网应激的信号通路中同样发挥着重要作用^[100-103],而摄取高剂量的半胱氨酸则会引起内质网应激并诱导细胞凋亡^[104]。

图9列举了已报道的内质网靶向型半胱氨酸荧光探针的结构。2015年,Das等^[105]报道了一例内质网靶向的 Off-On 型半胱氨酸荧光探针 **45**。该探针基于 BODIPY 荧光团设计,并利用丙烯酸酯结构作为识别基团。该探针被应用于 Hct116 细胞内质网中内源性半胱氨酸的成像,并实现了对 *N*-乙酰-*L*-半胱氨酸在 HepG2 细胞中释放半胱氨酸过程的监测。

2015年,张志强等^[106]基于香豆素设计合成了一例具有内质网靶向能力的 On-Off 型二价铜离子探针 **46**。该探针除实现对铜离子检测外,还可以通过依次孵育二价铜离子与半胱氨酸,实现对二者的可逆检测,且该可逆过程反应迅速,并具有较好的可重复性。随后,研究人员制备了 **46**- Cu^{2+} 配合物,直接用于检测内质网中的内源性半胱氨酸。随着外加的 *N*-乙基马来酰亚胺(NEM, 硫醇清除剂)浓度增高,细胞内荧光强度逐渐降低。该结果表明配合物 **46**- Cu^{2+} 能够实现对内质网中半胱氨酸进行实时监测。

2019年,林伟英等^[107]以对甲苯磺酰胺为内质网靶

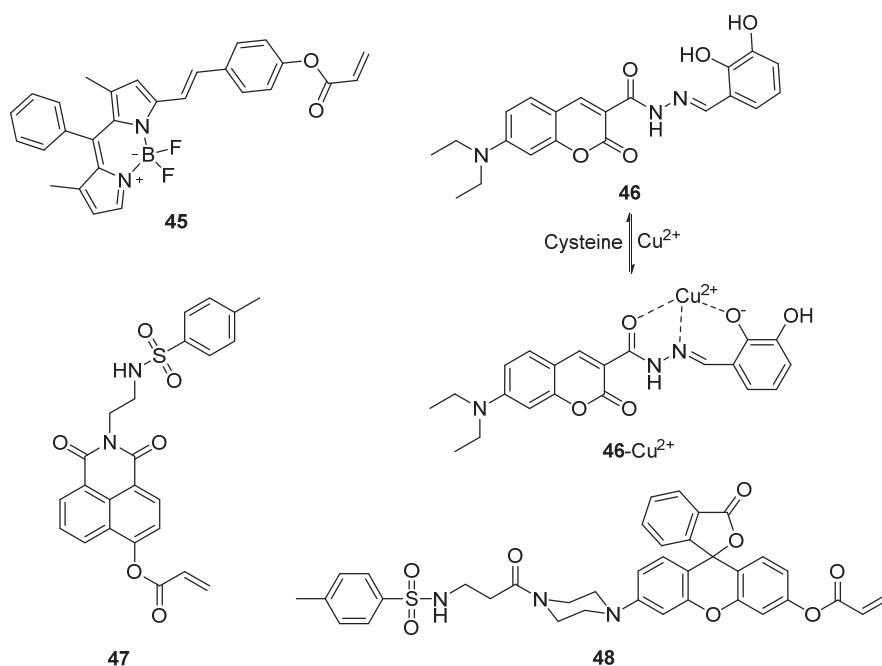


图9 内质网靶向型半胱氨酸荧光探针的结构

Figure 9 Structures of fluorescent probes for cysteine targeting endoplasmic reticulum

向基团, 萘酰亚胺为荧光团, 丙烯酸酯结构为识别基团, 设计合成了一例内质网靶向的比率型半胱氨酸荧光探针 **47**. 与半胱氨酸反应后, 探针在 440 nm 处的发射峰强度降低, 并在 550 nm 处出现新的发射峰. 两个发射峰强度的比值与所加入的半胱氨酸浓度具有良好的线性关系, 且具有较高的信噪比. 该探针被应用于检测由过氧化氢引起的氧化还原失衡过程中内质网中半胱氨酸的含量变化. 在此基础上, 江成世等^[108]则将荧光团更换为荧光素结构, 于 2020 年报道了内质网靶向型半胱氨酸荧光探针 **48**, 展现出了类似的检测性能.

4 高尔基体靶向型半胱氨酸荧光探针

高尔基体是脂质和蛋白质翻译后修饰的主要完成位点, 完成包括糖基化、乙酰化、磷酸化、甲基化、棕榈酰化等一系列修饰过程, 其中一些修饰过程更是仅发生于高尔基体中^[109]. 同时, 高尔基体作为分泌途径中的关键节点, 对于细胞内脂质与蛋白质的包装与运输起到十分重要的作用^[110]. 研究表明, 高尔基体半胱氨酸对于细胞具有重要的保护作用. 例如, 当细胞发生高尔基体胁迫过程时, 高尔基体从合成与转运两方面提高高尔基体中半胱氨酸的含量, 促进下游信号传递, 产生硫

化氢等还原性小分子, 进而实现对细胞的保护^[111-114]. 因此, 追踪高尔基体中半胱氨酸的含量变化, 对阐明其细胞保护功能具有重要意义.

2019 年, 陈晓峰等^[115]设计合成了一系列 2,4-二取代-7-氨基喹啉衍生物. 共定位实验表明, 2-三氟甲基-4-苯基-7-氨基喹啉与 2-三氟甲基-4-萘基-7-氨基喹啉两例喹啉衍生物可以定位于高尔基体区域. 相比于传统的高尔基体靶向基团, 这两例合成简便, 靶向能力强, 并且具有良好的光学性质, 有望成为研究高尔基体内生理活动的利器.

同年, 朱宝存等^[116]首次报道了高尔基体靶向型半胱氨酸荧光探针 **49**. 该探针以 2-三氟甲基-4-苯基-7-氨基喹啉作为高尔基体靶向基团与荧光团, 二硫酯结构作为半胱氨酸识别基团. 二硫酯结构的引入导致氨基给电子性降低, 从而减弱荧光团的荧光发射. 而探针与半胱氨酸共同孵育后, 碳硫双键被破坏, 从而使氨基的给电子能力恢复, 探针在 518 nm 处发出荧光. 该探针对于半胱氨酸具有极好的选择性, 检测时间约为 30 min. 生物实验表明, 荧光探针 **49** 可以靶向细胞高尔基体(图 10), 并能灵敏地检测细胞与斑马鱼中外源性与内源性半胱氨酸. 此外, 该探针也展示出检测由莫能菌素诱导的高尔

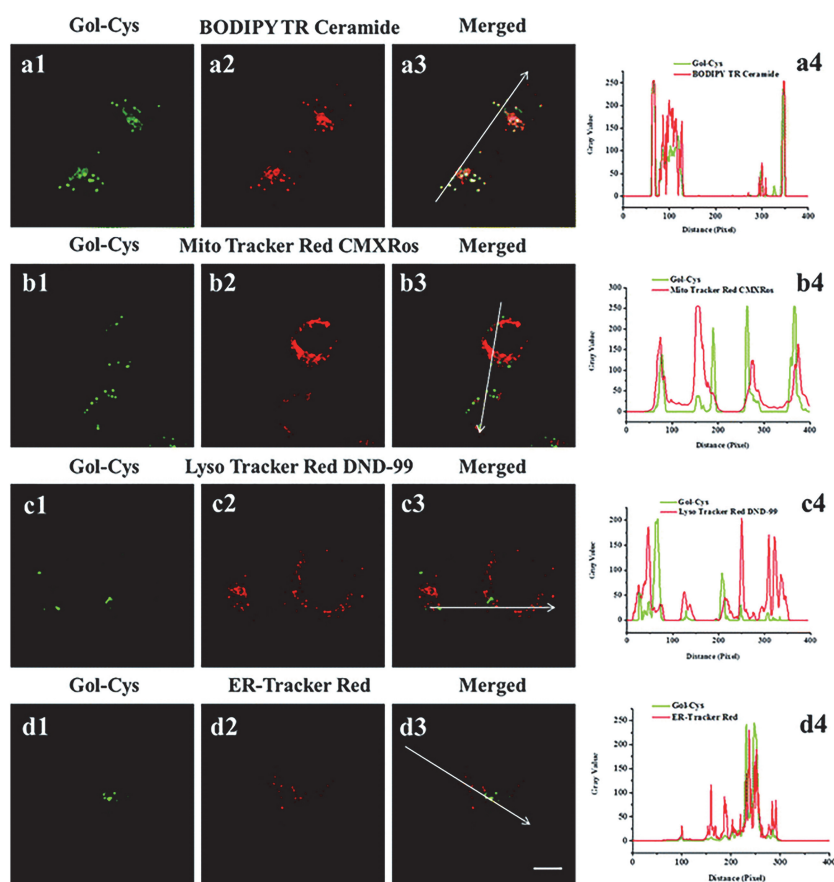


图 10 HeLa 细胞与荧光探针 **49** (Gol-Cys)、半胱氨酸以及四种靶向不同细胞器的商业染料共定位图像^[116]

Figure 10 Images of HeLa cells co-incubated with the fluorescent probe **49** (Gol-Cys), cysteine and four different organelle-trackers^[116]

基体胁迫状态下细胞与斑马鱼内半胱氨酸含量变化的优秀性能. 此后, 该课题组在荧光探针 **49** 的基础上, 优化半胱氨酸识别基团, 于 2020 年与 2022 年分别报道了高尔基体靶向型半胱氨酸荧光探针 **50**^[117] 与 **51**^[118], 其中, 荧光探针 **50** 以硫代羰基苯酯作为识别基团, 荧光探针 **51** 以异硫氰酸酯作为识别基团. 与荧光探针 **49** 类似, 荧光探针 **50**、**51** 均具有选择性检测半胱氨酸的能力, 并被用于细胞与斑马鱼的高尔基体外源性与内源性半胱氨酸, 以及高尔基体胁迫状态下半胱氨酸的检测. 这三例高尔基体靶向型半胱氨酸荧光探针的机理如图 11 所示.

5 脂滴靶向型半胱氨酸荧光探针

脂滴是由中性疏水的脂质核心和具有多种蛋白质修饰的磷脂单分子层组成的高度动态的细胞器, 在脂质储存与能量稳态调控中起到关键作用, 并与细胞新陈代谢过程密切相关. 脂滴中的脂质既作为能量储存的形式, 也可以作为合成原料用于磷脂等结构的合成. 此外, 脂滴还可以缓冲细胞中潜在的毒性脂质, 并在缓解氧化应激方面发挥重要作用^[119-120]. 研究表明, 脂滴的积累会引起肝脏脂肪变性并进一步诱发其他肝脏疾病, 该过程伴随高半胱氨酸水平的升高, 而高半胱氨酸是半胱氨酸代谢过程中的重要中间体^[121-122]. 此外, 半胱氨酸的

抗氧化能力可能在细胞发生应激过程时抑制脂滴的积累, 并提高细胞对于脂滴内脂质的调用能力^[123-124].

2020 年, 陈宏丽等^[125]设计合成了具有脂滴靶向能力的半胱氨酸荧光探针 **52**(图 12). 该探针基于唐本忠等^[126]报道的脂滴靶向型聚集诱导发光(AIE)荧光团设计, 并修饰丙烯酸酯基团作为识别基团. 基于该荧光团优异的光学性质, 荧光探针 **52** 具有 200 nm 的大 Stokes 位移, 且在测试体系中无需添加大量有机溶剂. 同时, 该探针具有良好的生物相容性, 在多种细胞系中均展现出类似的性能, 为研究人员进一步了解半胱氨酸与脂滴相关的生理过程之间的联系提供了一种强大的成像工具.

6 总结与展望

总结了半胱氨酸在不同细胞器内所承担的生理作用, 并汇总了目前能够对各个细胞器内半胱氨酸进行可视化的荧光探针. 目前已有一些探针能够在细胞器内高选择性检测半胱氨酸水平的变化, 结合其所具有的双光子发射、近红外发射、大 Stokes 位移等优异光学性质, 这些探针已被应用于细胞内不同应激过程, 以及疾病模型下细胞器内半胱氨酸含量变化的成像分析中, 但为了实现真正的实时动态可视化, 细胞器靶向型半胱氨酸荧光探针仍需在以下方面进行改进: (1)设计开发抗干扰能力

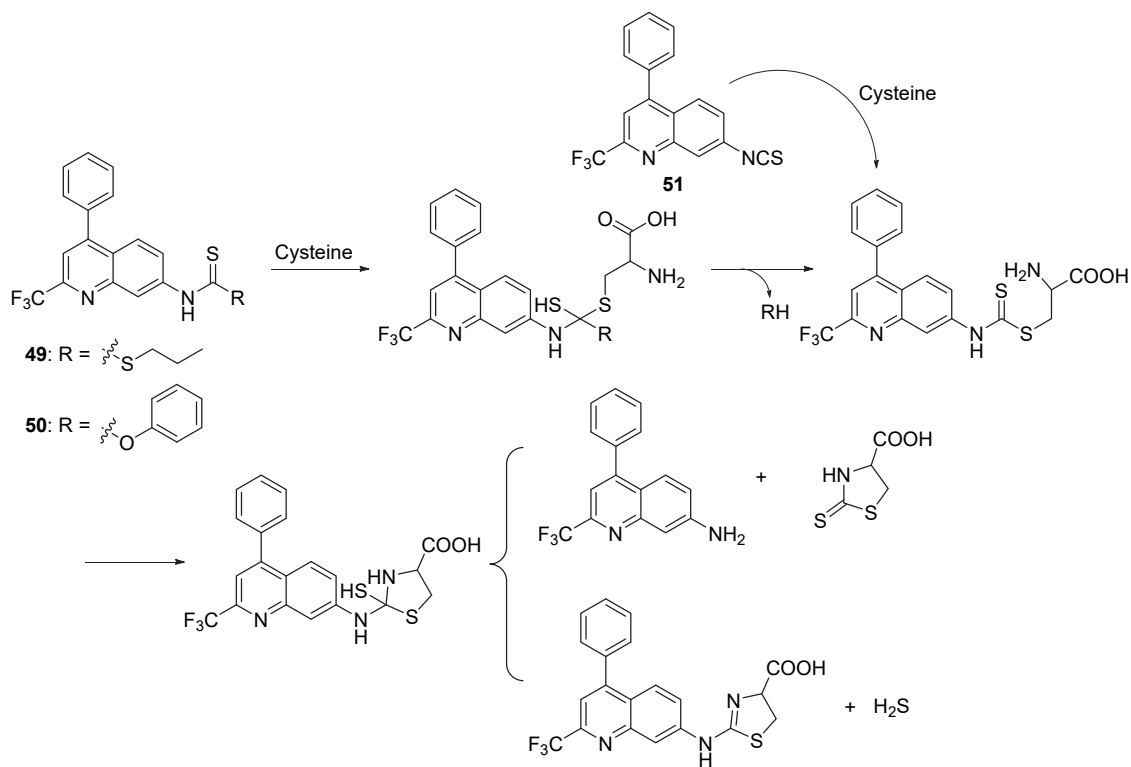


图 11 高尔基体靶向型半胱氨酸荧光探针结构与识别机理

Figure 11 Structures and recognition mechanism of fluorescent probes for cysteine targeting Golgi apparatus

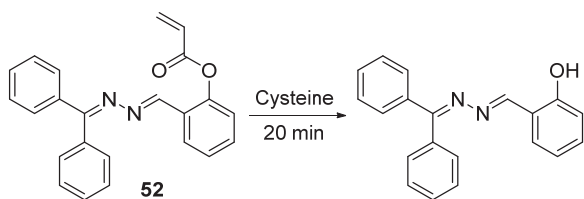


图 12 探针 52 的结构
Figure 12 Structure of probe 52

强的半胱氨酸高选择性识别基团。目前半胱氨酸的选择性识别基团主要基于不同小分子硫醇间的空间位阻差异与其巯基不同的亲核能力进行设计,但这种识别机理的选择性与反应速率会受到检测所处环境的影响,因此对于微环境并不相同的各个细胞器来讲,仍需要开发性能更加优异的半胱氨酸选择性识别基团。(2)设计具有更高浓度响应范围的半胱氨酸荧光探针。细胞内半胱氨酸的浓度一般位于 30~200 $\mu\text{mol/L}$ 区间,而现有的探针对于该区间覆盖能力不足,尤其是基本没有适合于检测细胞器内高浓度范围的半胱氨酸荧光探针。因此,设计具有更高浓度响应范围的荧光探针有利于进一步揭示半胱氨酸在不同生理功能中的作用。(3)开发具有理想解离常数的可逆型半胱氨酸荧光探针。在生理过程中,半胱氨酸的含量是动态变化的。因此,开发具有理想解离常数,能够可逆结合和解离半胱氨酸的荧光探针,有助于在整个生理过程中动态监测半胱氨酸的含量变化。然而,目前已报道的半胱氨酸探针大多是不可逆的,仅有少部分探针可以通过加入外源性物质(如金属离子、活性氧化物)的方式实现可逆反应,但这些探针均无法实现实时监测半胱氨酸含量的动态变化。因此,开发能够可逆结合和解离半胱氨酸的荧光探针,对于实现不同生理过程中半胱氨酸含量的动态监测是十分必要的。

综上所述,进一步优化探针结构,以实现更加符合细胞内半胱氨酸含量及所处环境、具有更高抗干扰能力、更快的识别响应速度及对半胱氨酸的实时可逆监测等将是未来细胞器靶向型半胱氨酸探针的重要研究方向。

辅助材料(Supporting Information) 本文总结的相关细胞器靶向型半胱氨酸荧光探针的性质与生物应用。这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载。

References

- [1] Paul, B. D.; Sbodio, J. I.; Snyder, S. H. *Trends Pharmacol. Sci.* **2018**, 39, 513.
- [2] Shahrokhian, S. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 5972.
- [3] Jung, H. S.; Chen, X.; Kim, J. S.; Yoon, J. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 6019.
- [4] Yin, C.; Huo, F.; Zhang, J.; Martínez-Máñez, R.; Yang, Y.; Lv, H.; Li, S. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 6032.

- [5] Janáky, R.; Varga, V.; Hermann, A.; Saransaari, P.; Oja, S. S. *Neurochem. Res.* **2000**, 25, 1397.
- [6] Anderson, C. L.; Iyer, S. S.; Ziegler, T. R.; Jones, D. P. *Am. J. Physiol.: Regul., Integr. Comp. Physiol.* **2007**, 293, R1069.
- [7] Jones, D. P.; Go, Y.-M.; Anderson, C. L.; Ziegler, T. R.; Kinkade Jr, J. M.; Kirilin, W. G. *FASEB J.* **2004**, 18, 1246.
- [8] Banjac, A.; Perisic, T.; Sato, H.; Seiler, A.; Bannai, S.; Weiss, N.; Kölle, P.; Tschoep, K.; Issels, R. D.; Daniel, P. T.; Conrad, M.; Bornkamm, G. W. *Oncogene* **2008**, 27, 1618.
- [9] Zhang, R.; Yong, J.; Yuan, J.; Ping Xu, Z. *Coord. Chem. Rev.* **2020**, 408, 213182.
- [10] Tcherkas, Y. V.; Denisenko, A. D. *J. Chromatogr. A* **2001**, 913, 309.
- [11] Jia, D.; Li, F.; Sheng, L.; Ren, Q.; Dong, S.; Xu, S.; Mu, Y.; Miao, Y. *Electrochem. Commun.* **2011**, 13, 1119.
- [12] Burford, N.; Eelman, M. D.; Mahony, D. E.; Morash, M. *Chem. Commun.* **2003**, 146.
- [13] Tang, Y.; Ma, Y.; Yin, J.; Lin, W. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, 48, 4036.
- [14] Zhu, H.; Fan, J.; Du, J.; Peng, X. *Acc. Chem. Res.* **2016**, 49, 2115.
- [15] Yin, J.; Huang, L.; Wu, L.; Li, J.; James, T. D.; Lin, W. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, 50, 12098.
- [16] Qi, Y.-L.; Wang, H.-R.; Chen, L.-L.; Duan, Y.-T.; Yang, S.-Y.; Zhu, H.-L. *Chem. Soc. Rev.* **2022**, 51, 7752.
- [17] He, D.; Zhang, L.; Sun, Y. *Coord. Chem. Rev.* **2022**, 461, 214507.
- [18] Dong, J.; Lu, G.; Tu, Y.; Fan, C. *New J. Chem.* **2022**, 46, 10995.
- [19] Liu, W.; Chen, J.; Xu, Z. *Coord. Chem. Rev.* **2021**, 429, 213638.
- [20] Yang, Q.; Lan, T.; He, W. *Dyes Pigm.* **2021**, 186, 108997.
- [21] Dai, J.; Ma, C.; Zhang, P.; Fu, Y.; Shen, B. *Dyes Pigm.* **2020**, 177, 108321.
- [22] Bock, F. J.; Tait, S. W. G. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**, 21, 85.
- [23] Pfanner, N.; Warscheid, B.; Wiedemann, N. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, 20, 267.
- [24] Chan, D. C. *Annu. Rev. Pathol.: Mech. Dis.* **2020**, 15, 235.
- [25] Bindoli, A.; Fukuto, J. M.; Forman, H. J. *Antioxid. Redox Signaling* **2008**, 10, 1549.
- [26] Bak, D. W.; Weerapana, E. *Mol. Biosyst.* **2015**, 11, 678.
- [27] Badgley, M. A.; Kremer, D. M.; Maurer, H. C.; DelGiorno, K. E.; Lee, H.-J.; Purohit, V.; Sagalovskiy, I. R.; Ma, A.; Kapilian, J.; Firl, C. E. M.; Decker, A. R.; Sastra, S. A.; Palermo, C. F.; Andrade, L. R.; Sajjakulnukit, P.; Zhang, L.; Tolstyka, Z. P.; Hirschhorn, T.; Lamb, C.; Liu, T.; Gu, W.; Seeley, E. S.; Stone, E.; Georgiou, G.; Manor, U.; Iuga, A.; Wahl, G. M.; Stockwell, B. R.; Lyssiotis, C. A.; Olive, K. P. *Science* **2020**, 368, 85.
- [28] Gao, M.; Yi, J.; Zhu, J.; Minikes, A. M.; Monian, P.; Thompson, C. B.; Jiang, X. *Mol. Cell* **2019**, 73, 354.
- [29] Wang, H.; Fang, B.; Peng, B.; Wang, L.; Xue, Y.; Bai, H.; Lu, S.; Voelcker, N. H.; Li, L.; Fu, L.; Huang, W. *Front. Chem.* **2021**, 9, 683220.
- [30] Sun, C.; Du, W.; Wang, B.; Dong, B.; Wang, B. *BMC Chem.* **2020**, 14, 21.
- [31] Zielonka, J.; Joseph, J.; Sikora, A.; Hardy, M.; Ouari, O.; Vasquez-Vivar, J.; Cheng, G.; Lopez, M.; Kalyanaraman, B. *Chem. Rev.* **2017**, 117, 10043.
- [32] Shindy, H. A. *Dyes Pigm.* **2017**, 145, 505.
- [33] Wang, M.; Yu, F.; Chen, L.; Chen, H.; Wang, L.; Zhang, W. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 11757.
- [34] Narayanan, N.; Patonay, G. J. *Org. Chem.* **1995**, 60, 2391.
- [35] Yin, K.; Yu, F.; Zhang, W.; Chen, L. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, 74, 156.
- [36] Zhang, X.; He, N.; Huang, Y.; Yu, F.; Li, B.; Lv, C.; Chen, L. *Sens. Actuators, B* **2019**, 282, 69.
- [37] Guo, T.; Chen, X.; Qu, W.; Yang, B.; Tian, R.; Geng, Z.; Wang, Z. *Anal. Chem.* **2022**, 94, 5006.
- [38] Niu, L.; Luo, Y.; Gan, Y.; Cao, Q.; Zhu, C.; Wang, M.; Wang, J.; Zhang, W.; Wang, J. *Talanta* **2020**, 219, 121291.
- [39] Zhang, H.; Yan, C.; Li, H.; Shi, L.; Wang, R.; Guo, Z.; Zhu, W.-H. *ACS Appl. Bio Mater.* **2021**, 4, 2001.
- [40] Yue, L.; Huang, H.; Song, W.; Lin, W. *Chem. Eng. J.* **2022**, 441, 135981.

- [41] Zhang, X.; Zhang, L.; Wang, X.; Han, X.; Huang, Y.; Li, B.; Chen, L. *J. Hazard. Mater.* **2021**, *419*, 126476.
- [42] Zhang, X.; Huang, Y.; Han, X.; Wang, Y.; Zhang, L.; Chen, L. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 14728.
- [43] Li, H.; Kim, H.; Xu, F.; Han, J.; Yao, Q.; Wang, J.; Pu, K.; Peng, X.; Yoon, J. *Chem. Soc. Rev.* **2022**, *51*, 1795.
- [44] Han, C.; Yang, H.; Chen, M.; Su, Q.; Feng, W.; Li, F. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 27968.
- [45] Kim, C. Y.; Kang, H. J.; Chung, S. J.; Kim, H.-K.; Na, S.-Y.; Kim, H.-J. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 7178.
- [46] Zhu, X.; Yuan, L.; Hu, X.; Zhang, L.; Liang, Y.; He, S.; Zhang, X.-B.; Tan, W. *Sens. Actuators, B* **2018**, *259*, 219.
- [47] Wei, Y.; Cheng, D.; Ren, T.; Li, Y.; Zeng, Z.; Yuan, L. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 1842.
- [48] Zhao, L.; He, X.; Li, D.; Xu, S.; Huang, Y.; Li, X.; Wang, X.; Sun, Y.; Ma, P.; Song, D. *J. Mater. Chem. B* **2020**, *8*, 7652.
- [49] Wang, X.; Zha, J.; Zhang, W.; Zhang, W.; Tang, B. *Analyst* **2020**, *145*, 6119.
- [50] Wang, H.; Wang, H.; Zhang, X.; Dong, M.; Huang, F.; Li, P.; Tang, B. *Sens. Actuators, B* **2021**, *338*, 129749.
- [51] Niu, L.; Luo, Y.; Zhao, H.; Cao, Q.; Wang, J.; Wang, J. *Anal. Lett.* **2021**, *54*, 2666.
- [52] Cai, S.; Liu, Q.; Liu, C.; He, S.; Zhao, L.; Zeng, X.; Gong, J. *J. Mater. Chem. B* **2022**, *10*, 1265.
- [53] Niu, W.; Guo, L.; Li, Y.; Shuang, S.; Dong, C.; Wong, M. S. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 1908.
- [54] Tang, L.; Xu, D.; Tian, M.; Yan, X. *J. Lumin.* **2019**, *208*, 502.
- [55] Fan, L.; Zhang, W.; Wang, X.; Dong, W.; Tong, Y.; Dong, C.; Shuang, S. *Analyst* **2019**, *144*, 439.
- [56] Ji, X.; Wang, N.; Zhang, J.; Xu, S.; Si, Y.; Zhao, W. *Dyes Pigm.* **2021**, *187*, 109089.
- [57] Liu, J.; Sun, Y.-Q.; Zhang, H.; Huo, Y.; Shi, Y.; Shi, H.; Guo, W. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 64542.
- [58] Wei, Y.-N.; Lin, B.; Shu, Y.; Wang, J.-H. *Analyst* **2021**, *146*, 4642.
- [59] Ren, T.-B.; Zhang, Q.-L.; Su, D.; Zhang, X.-X.; Yuan, L.; Zhang, X.-B. *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 5461.
- [60] Yuan, L.; Lin, W.; Zhao, S.; Gao, W.; Chen, B.; He, L.; Zhu, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13510.
- [61] Xia, S.; Zhang, Y.; Fang, M.; Mikesell, L.; Steenwinkel, T. E.; Wan, S.; Phillips, T.; Luck, R. L.; Werner, T.; Liu, H. *ChemBioChem* **2019**, *20*, 1986.
- [62] Yang, X.-Z.; Wei, X.-R.; Sun, R.; Xu, Y.-J.; Ge, J.-F. *Talanta* **2020**, *209*, 120580.
- [63] Chen, Y.; Zhong, X.; Yang, X.; Zhu, S.; Jiang, Y.; Jin, C. *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 8198.
- [64] Zhang, P.; Guo, Z.-Q.; Yan, C.-X.; Zhu, W.-H. *Chin. Chem. Lett.* **2017**, *28*, 1952.
- [65] Huang, Y.; Zhou, Q.; Feng, Y.; Zhang, W.; Fang, G.; Fang, M.; Chen, M.; Xu, C.; Meng, X. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 10495.
- [66] Yue, Y.; Huo, F.; Pei, X.; Wang, Y.; Yin, C. *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 6598.
- [67] Li, H.; Shi, W.; Li, X.; Hu, Y.; Fang, Y.; Ma, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 18301.
- [68] Zhang, J.; Hao, X.; Sang, W.; Yan, Q. *Small* **2017**, *13*, 1701601.
- [69] Zhao, X.; Ji, H.; Hasrat, K.; Misal, S.; He, F.; Dai, Y.; Ma, F.; Qi, Z. *Anal. Chim. Acta* **2020**, *1107*, 172.
- [70] Luzio, J. P.; Pryor, P. R.; Bright, N. A. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 622.
- [71] Lawrence, R. E.; Zoncu, R. *Nat. Cell Biol.* **2019**, *21*, 133.
- [72] Lie, P. P. Y.; Nixon, R. A. *Neurobiol. Dis.* **2019**, *122*, 94.
- [73] Yim, W. W.-Y.; Mizushima, N. *Cell Discovery* **2020**, *6*, 6.
- [74] Mego, J. L. *Biochem. J.* **1984**, *218*, 775.
- [75] Lloyd, J. B. *Biochem. J.* **1986**, *237*, 271.
- [76] Pisoni, R. L.; Acker, T. L.; Lisowski, K. M.; Lemons, R. M.; Thoenes, J. G. *J. Cell Biol.* **1990**, *110*, 327.
- [77] Sulzer, D.; Zecca, L. *Neurotox. Res.* **1999**, *1*, 181.
- [78] Gahl, W. A.; Balog, J. Z.; Kleta, R. *Ann. Intern. Med.* **2007**, *147*, 242.
- [79] Lim, J.; Pellois, J.-P.; Simanek, E. E. *Biorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 6321.
- [80] Chen, C.; Zhou, L.; Liu, W.; Liu, W. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 6138.
- [81] Tasior, M.; Poronik, Y. M.; Vakuliuk, O.; Sadowski, B.; Karczewski, M.; Gryko, D. T. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 8723.
- [82] Zhang, Y.; Zhang, Y.; Yue, Y.; Chao, J.; Huo, F.; Yin, C. *Sens. Actuators, B* **2020**, *320*, 128348.
- [83] Lu, G.; Dong, J.; Fan, C.; Tu, Y.; Pu, S. *Bioorg. Chem.* **2022**, *119*, 105558.
- [84] Zhang, H.; Li, K.; Li, L.-L.; Yu, K.-K.; Liu, X.-Y.; Li, M.-Y.; Wang, N.; Liu, Y.-H.; Yu, X.-Q. *Chin. Chem. Lett.* **2019**, *30*, 1063.
- [85] Jing, X.; Yu, F.; Lin, W. *Anal. Chim. Acta* **2021**, *1174*, 338738.
- [86] Wang, H.; Zhang, Y.; Yang, Y.; He, Z.; Wu, C.; Zhang, W.; Zhang, W.; Liu, J.; Li, P.; Tang, B. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 9685.
- [87] Cai, S.; Liu, C.; Jiao, X.; Zhao, L.; Zeng, X. *J. Mater. Chem. B* **2020**, *8*, 2269.
- [88] Liu, Q.; Liu, C.; Jiao, X.; Cai, S.; He, S.; Zhao, L.; Zeng, X.; Wang, T. *Dyes Pigm.* **2021**, *190*, 109293.
- [89] Yue, Y.; Huo, F.; Yue, P.; Meng, X.; Salamanca, J. C.; Escobedo, J. O.; Strongin, R. M.; Yin, C. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 7018.
- [90] Long, Z.; Chen, L.; Dang, Y.; Chen, D.; Lou, X.; Xia, F. *Talanta* **2019**, *204*, 762.
- [91] Wang, X.-D.; Fan, L.; Ge, J.-Y.; Li, F.; Zhang, C.-H.; Wang, J.-J.; Shuang, S.-M.; Dong, C. *Spectrochim. Acta, Part A* **2019**, *221*, 117175.
- [92] Jiang, C.; Huang, H.; Kang, X.; Yang, L.; Xi, Z.; Sun, H.; Pluth, M. D.; Yi, L. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 7436.
- [93] Jing, X.; Yu, F.; Lin, W. *Spectrochim. Acta, Part A* **2020**, *240*, 118555.
- [94] Gao, J.; Tao, Y.; Zhang, J.; Wang, N.; Ji, X.; He, J.; Si, Y.; Zhao, W. *Chem.-Eur. J.* **2019**, *25*, 11246.
- [95] Huang, Y.; Ren, Q.; Li, S.; Feng, Y.; Zhang, W.; Fang, G.; Li, L.; Sun, C.; Wang, X.; Meng, X. *Sens. Actuators, B* **2019**, *293*, 247.
- [96] Tamima, U.; Song, C. W.; Santra, M.; Reo, Y. J.; Banna, H.; Islam, M. R.; Ahn, K. H. *Sens. Actuators, B* **2020**, *322*, 128588.
- [97] Kosuge, Y. *Exp. Ther. Med.* **2020**, *19*, 1565.
- [98] Bechtel, T. J.; Li, C.; Kisty, E. A.; Maurais, A. J.; Weerapana, E. *ACS Chem. Biol.* **2020**, *15*, 543.
- [99] Carelli, S.; Ceriotti, A.; Cabibbo, A.; Fassina, G.; Ruvo, M.; Sitia, R. *Science* **1997**, *277*, 1681.
- [100] Ashraf, N. U.; Sheikh, T. A. *Free Radical Res.* **2015**, *49*, 1405.
- [101] Ji, Y.; Wu, Z.; Dai, Z.; Sun, K.; Zhang, Q.; Wu, G. *Amino Acids* **2016**, *48*, 149.
- [102] Singh, V. K.; Rahman, M. N.; Munro, K.; Uversky, V. N.; Smith, S. P.; Jia, Z. *PLoS One* **2012**, *7*, e34680.
- [103] Kabil, O.; Yadav, V.; Banerjee, R. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 16418.
- [104] Liu, S.; Xin, D.; Wang, L.; Zhang, T.; Bai, X.; Li, T.; Xie, Y.; Xue, H.; Bo, S.; Liu, D.; Wang, Z. *Redox Biol.* **2017**, *13*, 528.
- [105] Ali, F.; H. A. A.; Taye, N.; Gonnade, R. G.; Chattopadhyay, S.; Das, A. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 16932.
- [106] Meng, Q.; Jia, H.; Succar, P.; Zhao, L.; Zhang, R.; Duan, C.; Zhang, Z. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *74*, 461.
- [107] Dong, B.; Lu, Y.; Zhang, N.; Song, W.; Lin, W. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 5513.
- [108] Zhou, L.; Li, Y.; Zhou, A.; Zhang, G.; Cheng, Z.-Q.; Ge, Y.-X.; Liu, S.-K.; Azevedo, R. B.; Zhang, J.; Jiang, S.; Jiang, C.-S. *J. Fluoresc.* **2020**, *30*, 1357.
- [109] Lowe, M. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2011**, *23*, 85.
- [110] Potelle, S.; Klein, A.; Foulquier, F. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2015**, *38*, 741.
- [111] Sasaki, K.; Yoshida, H. *J. Biochem.* **2015**, *157*, 185.
- [112] Lange, P. S.; Chavez, J. C.; Pinto, J. T.; Coppola, G.; Sun, C.-W.; Townes, T. M.; Geschwind, D. H.; Ratan, R. R. *J. Exp. Med.* **2008**, *205*, 1227.
- [113] Sbodio, J. I.; Snyder, S. H.; Paul, B. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, *115*, 780.
- [114] Paul, B. D. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1468.
- [115] Chen, J.; Liu, H.; Yang, L.; Jiang, J.; Bi, G.; Zhang, G.; Li, G.; Chen,

- X. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 954.
- [116] Zhang, X.; Liu, C.; Chen, Y.; Cai, X.; Sheng, W.; Zhu, H.; Jia, P.; Li, Z.; Huang, S.; Zhu, B. *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 1807.
- [117] Zhang, X.; Liu, C.; Cai, X.; Tian, B.; Zhu, H.; Chen, Y.; Sheng, W.; Jia, P.; Li, Z.; Yu, Y.; Huang, S.; Zhu, B. *Sens. Actuators, B* **2020**, *310*, 127820.
- [118] Zhu, H.; Liu, C.; Rong, X.; Zhang, Y.; Su, M.; Wang, X.; Liu, M.; Zhang, X.; Sheng, W.; Zhu, B. *Bioorg. Chem.* **2022**, *122*, 105741.
- [119] Ducharme, N. A.; Bickel, P. E. *Endocrinology* **2008**, *149*, 942.
- [120] Olzmann, J. A.; Carvalho, P. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2019**, *20*, 137.
- [121] Mashek, D. G.; Khan, S. A.; Sathyanarayan, A.; Ploeger, J. M.; Franklin, M. P. *Hepatology* **2015**, *62*, 964.
- [122] Dai, J.; Liang, K.; Zhao, S.; Jia, W.; Liu, Y.; Wu, H.; Lv, J.; Cao, C.; Chen, T.; Zhuang, S.; Hou, X.; Zhou, S.; Zhang, X.; Chen, X.-W.; Huang, Y.; Xiao, R.-P.; Wang, Y.-L.; Luo, T.; Xiao, J.; Wang, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, *115*, E5896.
- [123] Mok, W. J.; Hatanaka, Y.; Seoka, M.; Itoh, T.; Tsukamasa, Y.; Ando, M. *Food Chem.* **2014**, *147*, 340.
- [124] Yue, F.; Oprea, S. N.; Qiu, J.; Gu, L.; Zhang, L.; Chen, J.; Narayanan, N.; Deng, M.; Kuang, S. *Cell Rep.* **2022**, *38*, 110267.
- [125] Cheng, W.; Xue, X.; Zhang, F.; Zhang, B.; Li, T.; Peng, L.; Cho, D.-H.; Chen, H.; Fang, J.; Chen, X. *Anal. Chim. Acta* **2020**, *1127*, 20.
- [126] Wang, Z.; Gui, C.; Zhao, E.; Wang, J.; Li, X.; Qin, A.; Zhao, Z.; Yu, Z.; Tang, B. Z. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 10193.

(Cheng, F.)