

用于活体检测  $\text{H}_2\text{S}_2$  的 NIR-II 荧光/光声双比率探针

杨 侠\* 赵春红

(中国科学院上海有机化学研究所 上海 200032)

A NIR-II Fluorescence/Photoacoustic Dual Ratiometric Probe for  $\text{H}_2\text{S}_2$  *in vivo*

Yang, Xia\* Zhao, Chunhong

(Shanghai Institute of Organic Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032)

荧光成像是一种利用样品中激发的荧光信号构建图像, 以实现样本观察和分析的技术. 其中利用近红外二区(NIR-II, 900~1700 nm)荧光探针的成像技术, 相较于正电子发射断层扫描(PET)、磁共振成像(MRI)和计算机断层扫描(CT)等传统影像技术, 通常具有探针设计灵活、专一性强、灵敏度高、空间分辨率高、组织穿透力强、能动态实时成像、生物安全性高、成本低和易用性强等优势, 在生命科学研究和临床应用中展现出广阔前景<sup>[1]</sup>.

光声成像是一种融合光学和超声技术的先进成像方式, 它通过激光照射生物组织, 激发产生光声效应成像, 从而获取高对比度的组织结构和功能信息. 相比之下, 荧光成像主要依赖荧光分子的发光来可视化生物组织, 容易受限于光散射效应, 成像深度和分辨率较低. 此外, 光声成像能够实现 3D 成像, 提供比荧光成像更为全面的空间信息. NIR-II 探针具有较低的光散射和组织吸收特性, 能实现更深层组织的高分辨率成像, 减少背景噪声, 增强信噪比, 在光声成像中引入 NIR-II 探针可以显著提高选择性、成像深度和清晰度, 尤其适合对深部组织和肿瘤环境的研究. 具有荧光/光声双模态的 NIR-II 探针研发和应用已成为当前的热点<sup>[2]</sup>.

二硫化氢( $\text{H}_2\text{S}_2$ )是硫代谢的重要中间体, 其在细胞信号传导和氧化还原生物学中扮演着重要角色, 定量可视化生物体深层组织中的  $\text{H}_2\text{S}_2$ , 对于直接获取相关病理生理过程的可靠信息有重要意义. 然而, 由于其在体内的浓度低且难以捕捉, 实现  $\text{H}_2\text{S}_2$  在深层组织中的高精度定量成像是一项挑战. 近年虽然报道了一些  $\text{H}_2\text{S}_2$  探针, 但在选择性、灵敏度和成像深度方面还存在不足<sup>[3]</sup>.

近期, 广西师范大学化学与药学院陈华和沈星灿

课题组<sup>[4]</sup>设计合成了一种新型 NIR-II 荧光/光声双比率型  $\text{H}_2\text{S}_2$  探针, **NIR-II- $\text{H}_2\text{S}_2$** (图 1). 其核心由 NIR-II 花菁荧光骨架和 1,3-二氯基团组成, 通过经典花菁染料合成方法构建. 其中 1,3-二氯基团可作为识别位点, 通过与  $\text{H}_2\text{S}_2$  发生反应生成五元环二硫, 从而改变 **NIR-II- $\text{H}_2\text{S}_2$**  的光谱性质; 花菁荧光骨架用于确保探针的吸收和发射波长接近或位于 NIR-II, 以提升深层组织的信号穿透力; 另外, 磺酸基的引入可进一步增加探针的水溶性和

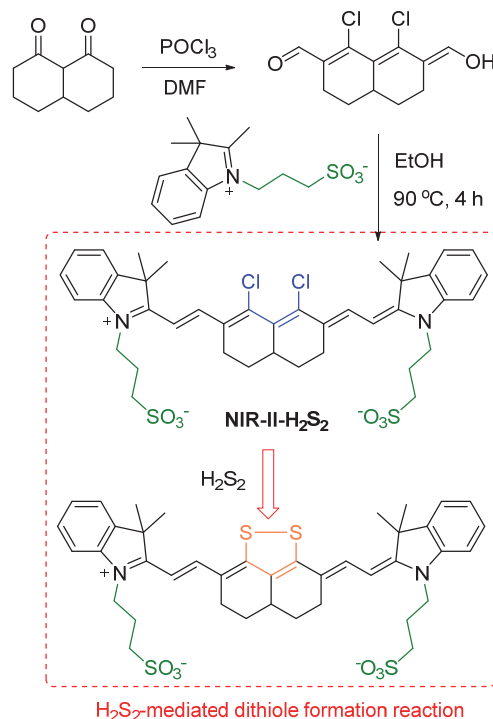


图 1 NIR-II- $\text{H}_2\text{S}_2$  探针的设计合成及识别原理

Figure 1 Design, synthesis and recognition mechanism of NIR-II- $\text{H}_2\text{S}_2$  probe

\* Corresponding author. E-mail: yangxia@sioc.ac.cn. Published online April 12, 2025.

生物兼容性。

研究表明,该探针具有较强的稳定性,在磷酸缓冲溶液(PBS)、生理盐水和杜尔贝科改良伊格尔培养基(DMEM)溶液中,6 h 内吸收光谱基本保持不变;随着 $\text{Na}_2\text{S}_2$ 浓度的增加,吸收峰从900 nm向800 nm转移,呈现显著的线性相关,可用于 $\text{H}_2\text{S}_2$ 的比色检测;荧光强度在1000 nm的峰值减弱,同时在840 nm形成新峰,出现约160 nm的大幅发射位移。荧光强度比值( $I_{840}/I_{1000}$ )增强可达107倍,与 $\text{Na}_2\text{S}_2$ 浓度呈线性关系,检测限为1.8 nmol/L,灵敏度与已报道的数值相当。随着 $\text{Na}_2\text{S}_2$ 浓度增加,800 nm处的光声信号(PA)显著增强,900 nm处信号减弱, $\text{PA}_{800}/\text{PA}_{900}$ 比值从0.91增加至5.91,呈线性增长趋势,增强约6.5倍。探针具有高选择性,能避免其他生物性还原硫化物(如GSH、Cys、Hcy、 $\text{Na}_2\text{S}$ 、 $\text{Na}_2\text{S}_4$ 和 $\text{S}_8$ 等)干扰,仅对 $\text{Na}_2\text{S}_2$ 有显著响应。探针与 $\text{Na}_2\text{S}_2$ 迅速反应在8 min内可达到饱和。考察pH对识别反应的影响,结果显示从弱酸性到碱性pH范围探针均能有效工作。此外,作者还通过质谱和分子模拟研究进一步验证了探针识别反应生成五元环的机理。这些结果表明NIR-II- $\text{H}_2\text{S}_2$ 是一款可用于体外定量检测 $\text{H}_2\text{S}_2$ 的NIR-II FL/PA双比率探针。

接下来,作者对探针的穿透深度和外源性 $\text{H}_2\text{S}_2$ 成像进行了研究。NIR-II- $\text{H}_2\text{S}_2$ 在NIR-II区域( $>1000$  nm)显示出卓越的组织穿透性能,在模拟组织(1%脂肪乳溶液)中,其信号清晰可辨的深度达到7 mm,而NIR-I染料Cy-Cl仅为1 mm;对于在5 mm深度下,NIR-II- $\text{H}_2\text{S}_2$ 的信噪比约为11.3,显著高于Cy-Cl的1.1,表明其成像分辨率和对比度更高,适合深层组织成像应用。细胞毒性测试和动物实验表明NIR-II- $\text{H}_2\text{S}_2$ 具有良好的生物相容性与安全性。体外检测和体外成像实验表明NIR-II- $\text{H}_2\text{S}_2$ 能对 $\text{Na}_2\text{S}_2$ 有效响应,其中在小鼠腹腔内注射探针和 $\text{Na}_2\text{S}_2$ 后,NIR-II荧光比率( $I_{840}/I_{1000}$ )在20 min内从0.83增至1.94,约提升2.33倍;光声比率( $\text{PA}_{800}/\text{PA}_{900}$ )也从0.90增至1.51,提升约1.7倍。多光谱光声断层成像(3D MSOT)显示了小鼠腹腔内外源 $\text{H}_2\text{S}_2$ 的具体位置,证实了探针在体内的高效可视化能力。

最后,作者考察了该探针在脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)/二甲双胍(metformin, MET)诱导的肝毒性中的NIR-II FL/PA双比率成像应用。在LPS诱导的肝损伤模型中,NIR-II- $\text{H}_2\text{S}_2$ 通过荧光和光声成像显示显著信号变化:荧光比率信号( $I_{840}/I_{1000}$ )随LPS剂量从0.88增至1.76( $\approx 2$ 倍),光声比率信号( $\text{PA}_{800}/\text{PA}_{900}$ )从0.93增至1.96( $\approx 2.11$ 倍)。在胱硫醚- $\gamma$ -裂解酶(cystathionine  $\gamma$ -lyase, CSE)抑制剂炔丙基甘氨酸(propargylglycine, PAG)组中,这些信号恢复至对照组水平,证实了CSE对 $\text{H}_2\text{S}_2$ 生成的调控作用。类似地,在MET诱导模型中,荧光比率信号从0.81增至1.73( $\approx 2.14$ 倍),光声比率信号从1.00增至2.21( $\approx 2.21$ 倍),且PAG抑制组信号下降至对照组水平。验证实验(丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)水平检测、肝组织苏木精-伊红(H&E)染色及CSE蛋白质免疫印迹分析)进一步验证了该NIR-II FL/PA双比率探针对于肝脏毒性成像分析的可靠性。这是首次通过NIR-II FL/PA双比率成像技术实现活体中 $\text{H}_2\text{S}_2$ 的实时定量检测,为进一步探究 $\text{H}_2\text{S}_2$ 在炎症性疾病中的作用和病理机制提供了重要工具。

总之,作者成功构建了可用于体内内源性 $\text{H}_2\text{S}_2$ 的定量检测和可视化的NIR-II荧光/光声双比率探针NIR-II- $\text{H}_2\text{S}_2$ 。该探针由NIR-II荧光团框架(信号报告单元)和1,3-二氯基团(识别位点)组成,基于 $\text{H}_2\text{S}_2$ 介导的二硫噻吩形成反应,对 $\text{Na}_2\text{S}_2$ 具有极高的选择性,而且不与其他生物性还原硫化物发生反应。体内外实验表明,该探针对于 $\text{Na}_2\text{S}_2$ 可产生显著的双比率响应,包括NIR-II荧光信号( $I_{840}/I_{1000}$ ,增强107倍)和光声信号( $\text{PA}_{800}/\text{PA}_{900}$ ,增强6.5倍),表现出高特异性、优异的灵敏度、良好的水溶性和深层组织穿透性。这一突破大幅提升了 $\text{H}_2\text{S}_2$ 探针的性能,克服了以往 $\text{H}_2\text{S}_n$  ( $n>1$ )探针无法在深层组织中准确区分不同 $\text{H}_2\text{S}_n$ 物种的局限。依托NIR-II荧光/光声双比率成像的优势,作者实现了对肝损伤小鼠深层肝组织中 $\text{H}_2\text{S}_2$ 的精确定量,首次揭示了 $\text{H}_2\text{S}_2$ 与LPS/MET诱导肝毒性之间的关系。该研究为探索 $\text{H}_2\text{S}_2$ 在活体中的生物学功能提供了一种有前景的工具,同时新发现的1,3-二氯识别位点有望推动下一代具有广泛生物应用的 $\text{H}_2\text{S}_2$ 成像探针的设计。

## References

- [1] (a) He, S. Q.; Song, J.; Qu, J. L.; Cheng, Z. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 4258.  
(b) Kenry; Duan, Y.; Liu, B. *Adv. Mater.* **2018**, *30*, 1802394.  
(c) Wang, F. F.; Zhong, Y. T.; Bruns, O.; Liang, Y. Y.; Dai, H. J. *Nat. Photonics* **2024**, *18*, 535.  
(d) Jiang, L.; Chen, Z.; Fan Y. *Acta Chim. Sinica* **2024**, *82*, 1069 (in Chinese).  
(蒋励, 陈子晗, 凡勇, 化学学报, **2024**, *82*, 1069.)
- [2] (a) Zhou, Y. Q.; Zhang, W.; Wang, X.; Li, P.; Tang, B. *Chem.-Asian J.* **2022**, *17*, e202200155.  
(b) Pan, W.; Rafiq, M.; Haider, W.; Guo, Y. Y.; Wang, H. A.; Xu, M. Y.; Yu, B.; Cong, H. L.; Shen, Y. Q. *Coord. Chem. Rev.* **2024**, *514*, 215907.
- [3] (a) Foslacht, K. G.; Pluth, M. D. *Chem. Rev.* **2024**, *124*, 4124.  
(b) Sivakumar R.; Lee, N. Y. *Coord. Chem. Rev.* **2024**, *501*, 215563.
- [4] Hu, B. P.; Liu, Q. N.; Jiang, Y. L.; Huang, Y. J.; Ji, H. Q.; Zhang, J. Q.; Wang, X.; Shen, X.-C.; Chen, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2024**, e202418378.

(Lu, Y.)