

靶向细胞器的过氧亚硝酸盐荧光探针研究进展

潘淑芬, 马晓, 蓝庆春, 吴勇权*

(赣南师范大学 化学化工学院, 江西 赣州 341000)

摘要:过氧亚硝酸盐(ONOO^-)作为氧代谢的重要产物,在免疫应答、细胞信号转导等许多生理活动中起着重要作用。然而, ONOO^- 的水平异常会损伤细胞生物分子,与许多疾病密切相关。因此,迫切需要监测活细胞中 ONOO^- 的含量变化,而 ONOO^- 的功能很大程度上依赖于亚细胞区,所以开发亚细胞的 ONOO^- 水平变化的监测手段更有研究价值。为此,多种具有靶向细胞器的 ONOO^- 荧光探针被设计、开发和应用。重点介绍了近6年来具有线粒体、溶酶体和内质网靶向能力的 ONOO^- 荧光探针的代表性例子。综述了这些荧光探针的细胞器靶向策略、结构、荧光行为和生物学应用。

关键词:过氧亚硝酸盐;亚细胞水平;荧光探针;荧光检测;荧光成像

中图分类号:O65 文献标识码:A 文章编号:0258-3283(2024)05-0010-10

DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0749

Research Progress on Fluorescent Probes of Peroxynitrite for Targeting Organelles PAN Shu-fen, MA Xiao, LAN Qing-chun, WU Yong-quan* (College of Chemistry and Chemical Engineering, Gannan Normal University, Ganzhou 341000)

Abstract: As an essential product of oxygen metabolism, peroxynitrite (ONOO^-) plays an important role in various biological processes, including immune response and cell signal transduction. However, excessive ONOO^- production can lead to cellular biomolecule damage and is closely associated with numerous diseases. Therefore, there is an urgent need to monitor the level changes of ONOO^- in living cells. Given that the function of ONOO^- largely depends on subcellular compartments, it is particularly significant to develop probes capable of monitoring subcellular ONOO^- levels. To this end, a variety of ONOO^- fluorescent probes, specifically targeting organelles, have been designed, developed, and successfully employed. In this review, we highlighted representative cases of ONOO^- fluorescent probes with targeted capabilities for mitochondrial, lysosome, and endoplasmic reticulum (ER) from the last six years. The organelle-targeting strategy, structure, fluorescence behavior, and biological application of these probes were reviewed as well.

Key words: peroxynitrite; subcellular level; fluorescence probes; fluorescence detection; fluorescence imaging

过氧亚硝酸盐(ONOO^-)是一种重要的活性氮(RNS),在体内由一氧化氮和超氧化物反应形成^[1]。在生理条件下, ONOO^- 在细胞氧化还原稳态中起着至关重要的作用,它可以调节细胞内氧化还原平衡,参与信号转导过程。由于其强氧化性和亲核性,过量的 ONOO^- 可能通过破坏细胞内的生物活性分子^[2],包括DNA链、蛋白质和酶,导致细胞功能障碍,甚至会引发各种疾病的产生,如癌症、炎症性疾病、心血管疾病等^[3]。为了更好地探究 ONOO^- 在病理生理过程中的功能和作用方式,实时监测局部 ONOO^- 的变化将有助于解开其在生命系统中的复杂功能。

迄今为止,已经开发了几种用于 ONOO^- 检测的方法,包括化学发光^[4,5]、高效液相色谱(HPLC)^[6]、电子自旋共振^[7]、荧光光谱^[8,9]和电化学分析^[10]。其中,荧光光谱法因其操作简单、实时性好、重现性好、灵敏度高、无损检测等优点受到广泛关注,显示出良好的应用前景^[11]。目前

已经开发出多种荧光探针用于体外和体内特异性监测 ONOO^- ,这些探针大多通过自由扩散进入细胞,随机分布在细胞质中,缺乏细胞器靶向性或积累能力。

然而, ONOO^- 的功能很大程度上依赖于亚细胞区室。考虑到这些需求,一些具有靶向细胞器能力的 ONOO^- 荧光探针被设计和合成。本文总结了近6年来报道的具有靶向线粒体、溶酶体和

收稿日期:2023-11-23;网络首发日期:2024-01-26

基金项目:国家自然科学基金项目(21967001);江西省“双千计划”人才项目(jxsq2019201090);江西省自然科学基金项目(20224BAB203004)。

作者简介:潘淑芬(2000-),女,江西上饶人,硕士生,主要研究方向为有机荧光探针的合成及应用。

通讯作者:吴勇权, E-mail: wyq20622018@163.com。

引用本文:潘淑芬,马晓,蓝庆春,等.靶向细胞器的过氧亚硝酸盐荧光探针研究进展[J].化学试剂,2024,46(5):10-19。

内质网检测 ONOO^- 的荧光探针。根据上述不同细胞器分为 3 个部分,综述了这些探针的细胞器靶策略、结构、荧光行为和生物学应用。

1 线粒体靶向的 ONOO^- 荧光探针

在亚细胞水平上,线粒体被形象地称为细胞发电厂,参与多种细胞过程,包括 ATP 生成、中枢代谢和细胞凋亡^[12]。线粒体功能障碍可能来自于 ONOO^- 高表达、高粘度等微环境异常,这些被认为是机体疾病产生的可能因素^[13-15]。因此,如何准确地跟踪细胞线粒体 ONOO^- 的变化对疾病诊断具有重要意义。线粒体膜电位一般为 $-180 \sim -220 \text{ mV}$,因此具有离域正电荷的染料更容易穿透线粒体膜并随后在其内部积聚^[16]。常见的带正电荷线粒体靶向单元有三苯基膦阳离子单元 (TPP^+) 以及经过烷基化后的噻唑离子单元、喹啉离子单元、吡啶离子单元、吡咯离子单元等^[17-21],下面分别介绍这 5 个靶向单元的 9 个相关荧光探针,探针 1~9 的结构式见图 1。

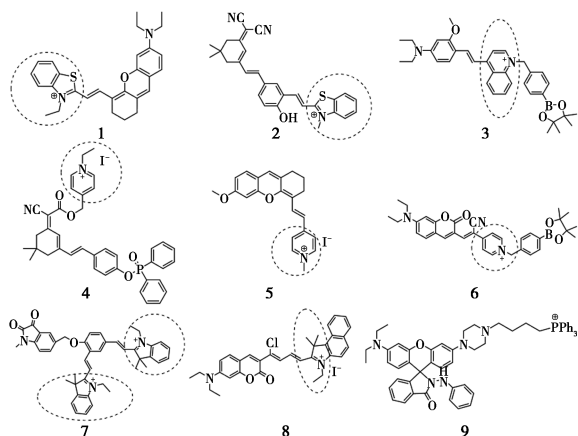


图 1 荧光探针 1~9 的结构式

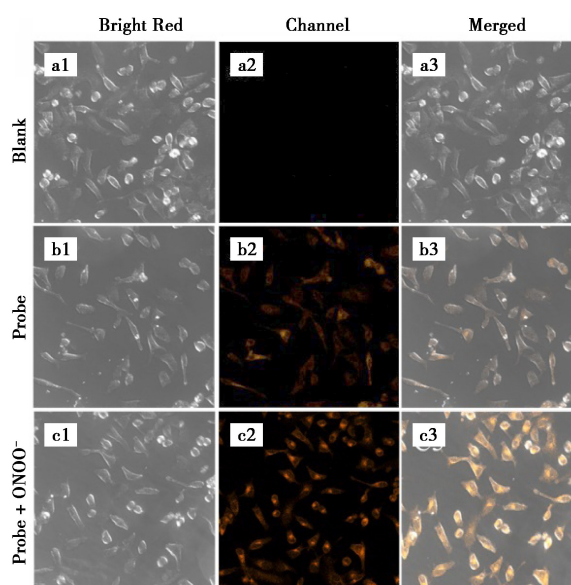
Fig.1 Structures of fluorescent probes 1~9

1.1 噻唑离子单元

含噻唑单元的染料具有摩尔消光系数大、光稳定性好、水溶性好、细胞膜渗透性好、易于合成等优点^[22]。此外,苯并噻唑半菁部分的吸电子能力会增强相邻双键对强亲电试剂的反应活性,从而加快响应速度并降低探针对 ONOO^- 的检出限。

2023 年, Liu 等^[23]设计并开发了一种具有两个非干扰通道的多功能线粒体靶向荧光探针 1,用于粘度和 ONOO^- 水平的双检测。探针 1 以杂萘核为荧光团,3-乙基苯并噻唑阳离子作为线粒

体靶向部分, ONOO^- 首先通过亲核加成反应进攻 $\text{C}=\text{C}$ 双键。在这之后由于加合物的高度不稳定性,加合物可以通过释放二氧化氮快速转化为中间体,而这个中间体可以快速转化为在 620 nm 处具有强发射的醛产物。同时,由于探针在粘性溶液中的自由旋转受到明显限制,因此有效地减少了非辐射途径,从而增强了荧光,由此探针可以进行粘度的响应。探针 1 可以灵敏地检测 HepG2 细胞的粘度和外源性/内源性 ONOO^- 水平。图 2 是探针 1 (图中“Probe”)应用于 HepG2 细胞外源性 ONOO^- 水平检测的共聚焦成像图。因此,该探针有望成为研究生物体内线粒体粘度与 ONOO^- 之间关系的一种有力工具。



a1~a3.细胞作为对照;b1~b3.细胞仅孵育 $10 \mu\text{mol/L}$ 探针 1 30 min ;c1~c3.细胞先与 $10 \mu\text{mol/L}$ 探针 1 孵育 30 min ,再与 10 mmol/L ONOO^- 孵育 30 min ($\lambda_{\text{ex}} = 561 \text{ nm}$; 标尺: $50 \mu\text{m}$)^[23]

图 2 外源性 ONOO^- 在 HepG2 细胞中的荧光成像

Fig.2 Fluorescence imaging of exogenous ONOO^- in HepG2 cells

2023 年, Chen 等^[24]开发了一种具有高选择性和灵敏度的线粒体靶向近红外荧光探针 2 用于监测生物系统中的 ONOO^- 。探针采用一种具有优异光物理性质的异佛尔酮衍生物作为荧光团,将 4-甲基苯并噻唑阳离子作为线粒体靶向基团与醛基结合,形成 $\text{C}=\text{C}$ 键作为 ONOO^- 的强氧化裂解位点。探针 2 具有 670 nm 的发射波长和 170 nm 的大 Stokes 位移,在复杂生物系统中具有优异的 ONOO^- 成像性能。此外,探针 2 自身溶液

的颜色为淡蓝色,响应 ONOO^- 后变为粉红色,便于 ONOO^- 的比色检测。当加入 ONOO^- 后,探针 2 的 $\text{C}=\text{C}$ 键被氧化生成新的近红外荧光团,从而恢复了分子内电荷转移 (ICT) 效应,响应机理见图 3。由于该探针具有优异的光学性能,它成功地应用于活细胞和斑马鱼炎症模型中内源性/外源性 ONOO^- 荧光成像。值得注意的是,探针 2 成功应用于缺铁性贫血和阿尔兹海默症疾病小鼠模型中线粒体 ONOO^- 成像,探针 2 有利于这两种疾病的诊断与治疗。

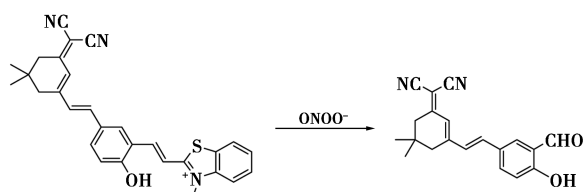


图 3 探针 2 的响应机理^[24]

Fig.3 Response mechanism of probe 2^[24]

1.2 喹啉离子单元

喹啉是一种具有芳香性质的化合物,具有很强的吸收紫外光和荧光发射的性质。因此,喹啉广泛用于荧光染料、指示剂和生物标记等方面^[25]。由于喹啉阳离子带有正电荷,它是一个很好的线粒体靶向单元。

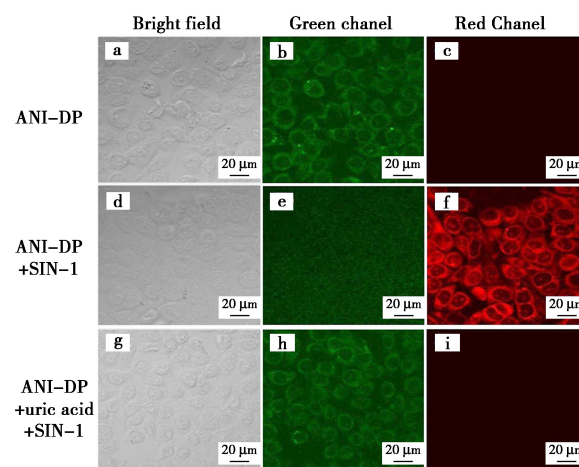
2023 年,Lei 等^[26]设计并合成了一种用于检测 ONOO^- 和线粒体自噬的近红外发射荧光探针 3,该探针使用喹啉阳离子作为线粒体靶向部分,芳基硼酸酯作为 ONOO^- 响应基团,并通过扭曲内部电荷转移 (TICT) 机制检测粘度的变化。该探针对脂多糖引起的炎症期间的粘度和饥饿诱导的线粒体自噬具有很好的响应。制霉菌素诱导斑马鱼的粘度变化表明,探针 3 能够在体内检测微粘度变化。此外,当探针 3 溶液加入 ONOO^- 后硼酸酯被氧化脱去,由于发生了分子内电荷转移 (ICT),荧光强度增强,探针自身发射在 670 nm 处,但是响应 ONOO^- 后发射在 570 nm。探针 3 在 ONOO^- 检测方面显示出良好的灵敏度,检测限为 6.2 nmol/L。该探针不仅成功地用于癌症细胞和正常细胞的成像和区分,还在检测细胞和斑马鱼体内的微粘度和 ONOO^- 方面显示出巨大的潜力。总的来说,探针 3 可以作为一种成像工具来示踪线粒体的粘度和 ONOO^- 相关的病理过程。

1.3 吡啶离子单元

吡啶阳离子作为线粒体靶向基团具有优越的膜通透性,能使探针在短时间内迅速进入活细胞

线粒体中^[27]。

2021 年,Gu 等^[28]成功地开发了一种线粒体靶向比率型荧光探针 4 (ANI-DP),探针由异佛尔酮衍生物作为信号荧光基团、磷酸二苯酯作为 ONOO^- 响应基团、吡啶阳离子作为线粒体定位基团组成。探针 4 对 ONOO^- 表现出独特的比率荧光响应,当添加 ONOO^- 时,由于次磷酸根的裂解引起分子内电荷转移 (ICT),探针 4 的荧光强度比 (I_{628}/I_{535}) 随孵育时间的延长而显著增加,并在 9 min 后达到平稳,表明探针 4 与 ONOO^- 反应迅速,可用于 ONOO^- 的实时分析。探针 4 对 ONOO^- 的比率荧光检测具有高灵敏度 ($\text{LOD} = 13.3 \text{ nmol/L}$)、高选择性、良好的水溶性和大斯托克斯位移。此外,它被证明具有低毒性和线粒体靶向性。另外,该探针被成功地用于 HeLa 细胞和斑马鱼中 ONOO^- 的荧光成像,图 4 是探针 4 应用于 HeLa 细胞内源性 ONOO^- 的共聚焦显微镜成像,过氧亚硝酸盐发生剂 (SIN-1) 为 ONOO^- 供体,尿酸 (Uric Acid) 作为 ONOO^- 清除剂。因此,该探针可以作为研究和分析 ONOO^- 在生物中的病理生理功能的手段。



绿色通道: $\lambda_{\text{ex}} = 458 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 475 \sim 575 \text{ nm}$;

红色通道: $\lambda_{\text{ex}} = 514 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 600 \sim 700 \text{ nm}$

a~c. 细胞在 37 °C 下用 10 $\mu\text{mol/L}$ 探针 4 孵育 30 min;
d~f. 探针 4 孵育 30 min 后用 200 $\mu\text{mol/L}$ SIN-1 在 37 °C 下
孵育 30 min; g~i. 探针 4 孵育 30 min 后经 200 $\mu\text{mol/L}$
尿酸处理后,加入 200 $\mu\text{mol/L}$ SIN-1 再 37 °C 孵育 30 min

图 4 探针 4 对 HeLa 细胞内源性 ONOO^- 进行共聚焦显微镜成像^[28]

Fig.4 Confocal microscopy images of intracellular ONOO^- in HeLa cells using probe 4^[28]

2022 年,Han 等^[29]构建了一种由杂蒽和吡啶阳离子偶联合成的深红色比率型荧光探针 5 用于

检测 ONOO^- 。加入 ONOO^- 后探针溶液最大吸收峰由 520 nm 蓝移至 390 nm, 660 nm 处的荧光强度逐渐降低, 530 nm 处的荧光强度逐渐升高, 斯托克斯位移达到 130 nm。另外发现, 当 ONOO^- 浓度在 0~12 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, I_{530}/I_{660} 与 ONOO^- 浓度呈良好的线性关系, 计算得到其检出限为 84 nmol/L。探针 5 可以实现 HeLa 细胞内/外源性 ONOO^- 的检测, 具有良好的成像潜力。

2023 年, Huang 等^[30] 开发了基于 ICT 和 TICT 的线粒体靶向荧光探针 6, 它可以响应极性、粘度和 ONOO^- 。探针 6 由电子供体(二乙胺基)和电子受体(香豆素、吡啶阳离子和苯硼酸酯)组成, 其中带正电荷的吡啶阳离子单元为线粒体靶向部分。细胞成像结果显示, 该探针对于线粒体具有良好的靶向性能, 能够实现细胞内极性、粘度和内源性/外源性 ONOO^- 的可视化成像。该探针响应 ONOO^- 后显示出 658 nm 的近红外荧光发射。探针 6 对 ONOO^- 具体的响应机理见图 5。此外, 无论是极性通道还是粘度通道, 探针 6 在癌细胞线粒体中的荧光强度都远高于正常细胞, 这表明癌细胞线粒体呈现出低极性和高粘度的特征, 与癌细胞和正常细胞的极性和粘度结果一致。这些结果表明, 探针 6 可以作为单极性探针或单粘度探针来区分癌细胞和正常细胞, 双通道同时检测更为可靠, 由此该探针为多参数准确区分癌细胞和正常细胞提供了潜在的研究手段。该工作不仅证明了探针 6 可以作为一种极性、粘度和 ONOO^- 的成像工具, 而且为研究癌细胞中的线粒体提供了一条途径。

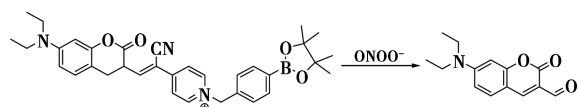


图 5 探针 6 的响应机理^[30]

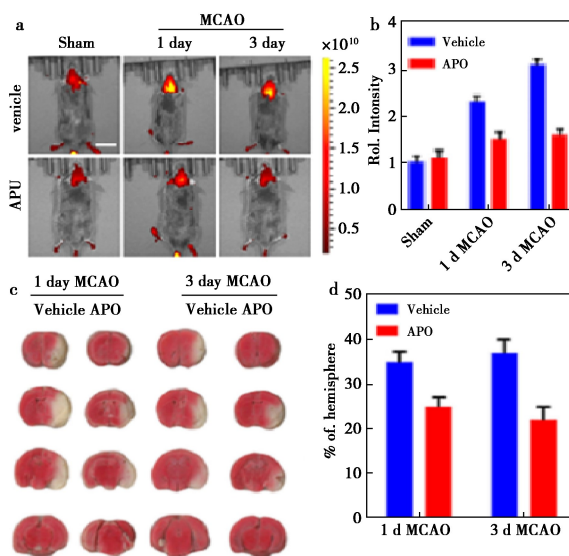
Fig.5 Response mechanism of probe 6^[30]

1.4 吡啶离子单元

吡啶基团具有刚性平面结构, 荧光性能良好。且其具有较长的吸收波长和荧光发射波长, 常被用于构建检测生物标志物的荧光探针^[31,32]。

2023 年, An 等^[33] 设计合成了一种以 1-甲基吡啶-2,3-二酮为特异性识别基团的“Turn-On”型花菁近红外 ONOO^- 荧光探针 7, 其自身带有正电荷的吡啶季铵盐杂环被用作线粒体的靶向基团。该探针响应 ONOO^- 后荧光发射达到了 719 nm, 具

有 137 nm 的大斯托克斯位移, 随着 ONOO^- 浓度的增加, 探针在 719 nm 处的荧光强度增加了 41 倍, 通过线性计算出具有 25.4 nmol/L 的低检测限。它可以实现 PC12 和 BV-2 细胞外源性和内源性 ONOO^- 的可视化检测。此外, 作者建立了脑卒中(因脑血管外伤引起局部脑损害的脑血管疾病)诱导的细胞氧化应激(Oxidative Stress, OS)病理模型, 并在此过程中探针 7 实现了 OS 诱导的细胞和小鼠神经炎症的原位检测, 实验结果见图 6。因此, 探针 7 可以为生物体脑卒中的早期准确诊断提供更可靠的检测手段。



a. 假手术组; MCAO 组; 溶媒对照组; NADPH 氧化酶 2 抑制剂 APO 组; b. a 图的平均荧光强度直方图; c. 不同处理的对侧半球切片的 TTC 染色图像; d. c 图中对侧半球的大小百分比^[33]

图 6 大脑中动脉闭塞(MCAO)模型小鼠活体脑荧光成像

Fig.6 In vivo brain fluorescence imaging undergoing MCAO treatments

2023 年, Xue 等^[34] 通过偶联香豆素类衍生物和联苯吡啶碘化物开发了近红外探针 8, 其中 $\text{C}=\text{C}$ 双键作为 ONOO^- 特异性识别位点, 带正电荷的吡啶部分作为线粒体靶向位点, 连接的 $\text{C}=\text{C}$ 键可以与 ONOO^- 反应, 然后释放香豆素衍生物, 响应机理见图 7。

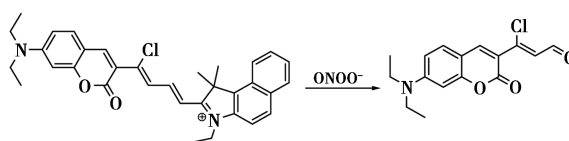


图 7 探针 8 的响应机理^[34]

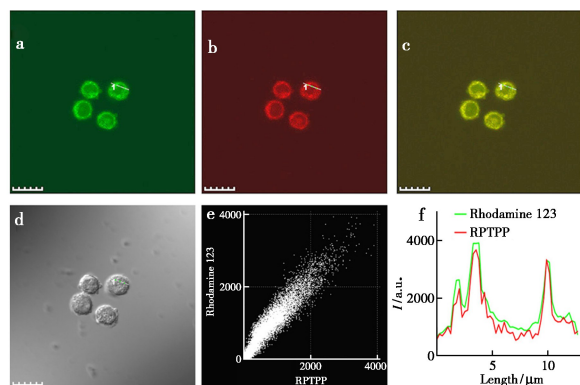
Fig.7 Response mechanism of probe 8^[34]

该探针显示出对 ONOO^- 的比率荧光响应,随着 ONOO^- 的加入,468 nm 处的荧光强度逐渐增强并红移至 484 nm,同时伴随着 723 nm 处的荧光强度逐渐减弱。 F_{484}/F_{723} 的比值增加了 52 倍,并具有大的斯托克斯位移(239 nm)。当 ONOO^- 浓度在 0.1~0.8 $\mu\text{mol/L}$ 时,探针 8 的荧光强度与 ONOO^- 浓度呈良好的线性关系,计算得到检测限为 41.88 $\mu\text{mol/L}$ 。应用方面,该探针实现了 HepG2 细胞 ONOO^- 内源性/外源性成像。探针 8 表现出更加特别的线粒体靶向能力,当与 ONOO^- 反应时,靶向部分从探针上解离,然后产生的荧光团不能靶向线粒体,这样可以避免假阳性信号的产生,这为构建准确监测线粒体 ONOO^- 的荧光探针提供了思路。

1.5 三苯基膦离子单元

荧光探针在线粒体内积聚是由膜电位驱动的,带有三苯基膦阳离子(TPP^+)单元的探针可以选择性地聚集在线粒体^[35]。

2017 年, Li 等^[36] 报道了一种线粒体靶向 ONOO^- 荧光探针 9, 探针以罗丹明为荧光团, 苯肼为识别部分, 三苯基膦阳离子为线粒体靶向基团。当探针与 ONOO^- 反应时, ONOO^- 对苯肼的氧化和之后的水解打开了非荧光螺环结构, 从而触发荧光的开启, 这为 ONOO^- 的检测提供了一种灵敏和高选择性的方法。共定位和线粒体解偶联处理实验证实了探针 9 的线粒体靶向性(图 8)。探针 9



a. 罗丹明 123 通道 ($\lambda_{\text{ex}}=488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=500\sim545 \text{ nm}$); b. 探针 9 通道 ($\lambda_{\text{ex}}=559 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=570\sim670 \text{ nm}$); c. 图像 a 和 b 的合并图像; d. 对应的差分干涉对比度 (DIC) 图像 (a~d 图标尺: 20 μm); e. 罗丹明 123 与探针 9 的强度相关图 (Pearson 系数 0.97, 重叠系数 0.98); f. 罗丹明 123 和探针 9 在线性 ROI 1 内的强度分布图

图 8 探针 9 的 RAW264.7 细胞共定位实验^[36]

Fig.8 Co-localization experiments with RAW264.7 cells for probe 9^[36]

对线粒体 ONOO^- 的灵敏性和选择性高于其他 ROS, 响应后发射波长为 578 nm, 计算检测限为 55 nmol/L。此外, 探针 9 对活细胞内 ONOO^- 的成像结果显示该探针具有很好的膜透性以及良好的成像效果, 可以实现 RAW264.7 细胞 ONOO^- 内源性/外源性成像。

2 溶酶体靶向的 ONOO^- 荧光探针

溶酶体是细胞中处于 pH 4.0~5.5 之间的重要酸性细胞器^[37]。溶酶体 pH 值的变化可以反映机体代谢过程和细胞状态^[38]。一旦溶酶体 pH 异常, 细胞功能受损, 可引起神经退行性、溶酶体贮积障碍等疾病。最近的研究也表明, 异常水平的 ONOO^- 可诱导溶酶体膜透性 (LMP) 并导致细胞死亡^[39]。所以, 开发可以靶向溶酶体的 ONOO^- 荧光探针具有重要的现实意义^[40]。利用溶酶体内酸性 (pH 4.5~5.5) 的生理环境, 采用胺类结构的本身为弱碱性小分子探针, 能够选择性地酸性环境中积累, 从而达到靶向溶酶体的效果^[41]。靶向溶酶体的 ONOO^- 荧光探针 10~12 结构见图 9。

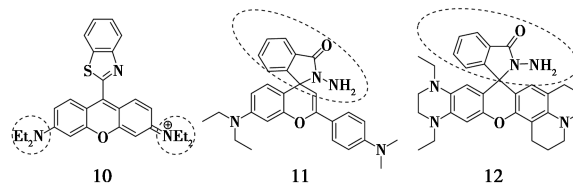


图 9 荧光探针 10~12 的结构式

Fig.9 Structures of fluorescent probes 10~12

2019 年, Ren 等^[42] 开发了一种红光发射吡咯蛋白染料 BTP。该染料在各种溶剂中荧光较差, 但在高粘性甘油中荧光较强, 可作为反映粘度变化的分子转子。重要的是, 该染料可以特异性靶向溶酶体, 并被溶酶体粘性微环境有效激活, 已成功应用于药物刺激溶酶体粘度变化的成像。基于 BTP 平台, 进一步开发了其还原的“二氢”衍生物探针 10 (HBTP), 并评估了其对 ONOO^- 的检测性能。由于非共轭结构, 探针 10 在可见光区域没有表现出任何吸收, 在加入 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 ONOO^- 后, 于 5 s 内在 590 nm 处出现了一个新的吸收带, 并伴随着从无色到蓝色的颜色变化, 表明探针 10 可以被 ONOO^- 快速氧化以产生 BTP, 从而可以特异性地识别 ONOO^- 。鉴于溶酶体粘度和 ONOO^- 均与溶酶体功能密切相关, 该研究将为研究溶酶体相关的病理生理过程提供有前景的工具。

同年, Feng 等^[43]开发了一种针对 ONOO^- 的溶酶体靶向近红外荧光探针 11 (Lyso-ONOO)。该探针基于罗丹明类苯并吡喃 (BP650) 荧光团, 并使用螺吡啶作为 ONOO^- 反应位点。该探针制备简单, 并显示出许多优秀的 ONOO^- 传感特性, 包括快速响应 (25 s)、高选择性和灵敏度 (检出限低至 16 nmol/L)。由于螺内酰胺的结构, 探针 11 溶液在 400 nm 以上没有表现出吸收, 并且是无色和非荧光的 ($\Phi < 0.001$, 使用甲酚紫作为标准)。然而, 在加入 30 $\mu\text{mol/L}$ ONOO^- 后, 探针溶液的颜色从无色迅速变为深蓝色, 相应地在 590 nm 处出现了新的吸收峰。同时, 溶液的荧光强度在 650 nm 处得到了显著的增强 (~ 220 倍), 响应机理见图 10。表明探针 11 对 ONOO^- 具有独特的比色和近红外荧光开启检测过程。

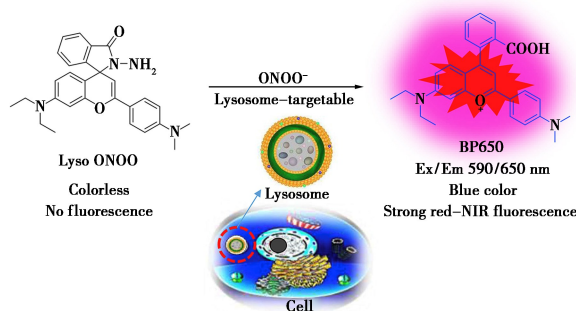
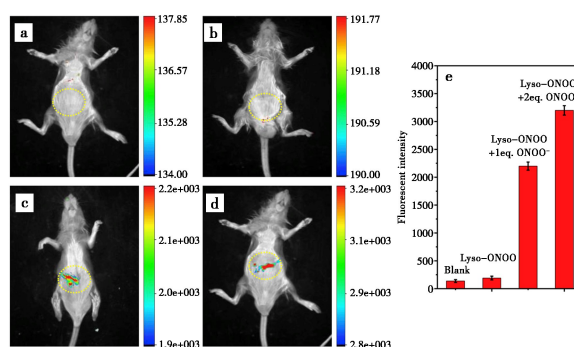


图 10 探针 11 的响应机理^[43]

Fig.10 Response mechanism of probe 11^[43]

此外, 该探针具有溶酶体靶向性, 可用于低细胞毒性活细胞中外源性和内源性 ONOO^- 的成像。该探针也适用于活体小鼠 ONOO^- 成像, 成像结果见图 11。总之, 这项工作为检测生理 ONOO^- 提供了一种靶向溶酶体的近红外荧光探针。

2021 年, Xia 等^[44]报道了一种新型的罗丹明衍生物 (NIR-Rh) 的近红外荧光探针 12, 该探针可以靶向溶酶体并且跟踪溶酶体 pH 变化, 并在活细胞中成像内源性/外源性 ONOO^- 。探针 12 能够响应 pH 值, 酸性 pH 条件下, 在 686 nm 附近显示快速响应的“Turn-On”型近红外荧光, pK_a 值为 5.41。在测试条件下, 探针 12 由于其螺内酰胺结构, 在可见光区无吸收, 呈无色无荧光溶液。而加入 ONOO^- 后, 其吸收光谱和发射光谱发生了显著变化, 在 595 nm 处出现吸收带, 响应后溶液的颜色迅速变为蓝色。同时, 溶液在 678 nm 处表现出明显的荧光增强。细胞成像实验表明, 探针 12 在成像和跟踪溶酶体 pH 变化以及细胞外源性



采用激发光为 590 nm, 发射波长为 650 nm 的体内成像系统对小鼠进行成像

a. 空白组小鼠, 只给予 50 μL 生理盐水灌胃 5 min; b. 对照组小鼠, 仅腹腔注射 50 μL (50 $\mu\text{mol/L}$) 探针 11 时间 5 min; c. 小鼠腹腔注射 50 μL (50 $\mu\text{mol/L}$) ONOO^- , 然后腹腔注射 50 μL (50 $\mu\text{mol/L}$) 探针 11 时间 5 min; d. 小鼠腹腔注射 50 μL (100 $\mu\text{mol/L}$) ONOO^- , 然后腹腔注射 50 μL (50 $\mu\text{mol/L}$) 探针 11 时间 5 min; e. a~d 小鼠腹部荧光强度定量 (与对照组比较 $P < 0.05$)

图 11 探针 11 应用于小鼠体内 ONOO^- 成像^[43]

Fig.11 Fluorescent images of ONOO^- in mice with probe 11^[43]

和内源性 ONOO^- 方面具有很大的潜力。

3 内质网靶向的 ONOO^- 荧光探针

内质网是蛋白质合成、加工和运输的主要位点^[45-47]。在亚细胞水平上, 内质网 (ER) 是内源性 ONOO^- 的直接靶点, 氧化过程可能导致内质网功能障碍^[48]。另一方面, ONOO^- 可以消耗与 ER 相关的 Ca^{2+} , 导致人类血管内皮的 ER 应激和细胞凋亡^[49]。因此, 对内质网中 ONOO^- 的原位精确检测对深入研究其生物学作用具有重要意义。苯磺酸基结构作为已经报道常用的内质网靶向基团, 如下 3 篇文献介绍了以不同荧光团连接苯磺酸基结构达到靶向内质网的研究。探针 13~15 的结构式见图 12。

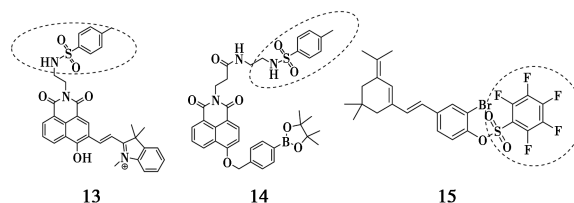


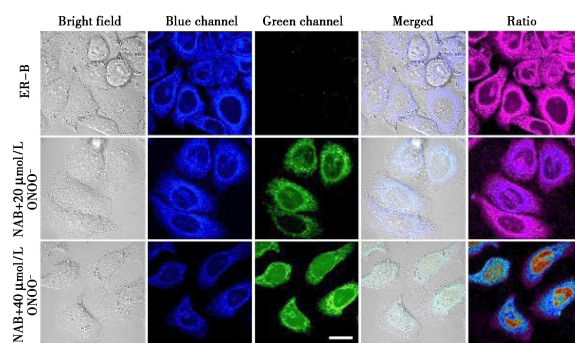
图 12 荧光探针 13~15 的结构式

Fig.12 Structures of fluorescent probes 13~15

2022 年, Liu 等^[50]构建了一种双功能比率型荧光探针 13, 它可以特异性地检测内质网中的粘度和 ONOO^- 。该探针具有良好的粘度和 ONOO^-

响应性能,可实现粘度(I_{638}/I_{453})和 ONOO^- (I_{527}/I_{634}) 的比率检测。在 ONOO^- 不存在的情况下,探针 13 在 547 nm 处有一个主吸收峰。然而,当加入不同浓度的 ONOO^- 时,547 nm 处的吸收峰逐渐减小,在 420 nm 处出现一个新的吸收峰。此外,加入 ONOO^- 后,探针 13 在 527 nm 处荧光发射峰明显增强,同时 634 nm 处荧光小幅增强, ONOO^- 浓度和荧光强度比(I_{527}/I_{634})呈良好的线性关系,计算得到检出限为 0.93 $\mu\text{mol/L}$ 。探针 13 不仅可以用于粘度水平的双通道比率荧光检测,还具有同时检测细胞和斑马鱼不同通道 ONOO^- 变化的能力。此外,使用探针 13 监测发现 ONOO^- 可以导致内质网粘度增加。

同年,Sun 等^[51]提出了一种比率型双光子和内质网 ER 靶向探针 14(NAB),用于检测活细胞中的 ONOO^- 。探针 14 以 4-溴甲基苯硼酸酯为 ONOO^- 识别位点,在与 ONOO^- 反应后,探针 14 的 4-溴甲基苯基硼酸酯单元脱去转化为羟基,导致探针的荧光颜色从强蓝色变为黄色,最大发射波长在 558 nm。探针 14 对 ONOO^- 表现出快速灵敏的反应(6 s)和良好的选择性。荧光探针 14(图 13 NAB)和 ER 商用染料(图 13 ER-B)的细胞共定位的 Pearson 系数为 0.93,证明探针 14 有优异的 ER 靶向性。比率双光子细胞成像表明,探针 14 可用于检测 ER 中的外源性 ONOO^- 以及二甲双胍诱导的细胞内源性 ONOO^- ,细胞成像结果见图 13。此外,探针 14 能有效监测脑组织 ONOO^- 水平的变化,揭示了抑郁疾病模型小鼠海马组织 ER 的 ONOO^- 含量变化。



蓝色通道: $\lambda_{\text{em}} = 425 \sim 475 \text{ nm}$;绿色通道: $\lambda_{\text{em}} = 500 \sim 550 \text{ nm}$;
 $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$;比例尺 = 10 μm

图 13 HeLa 细胞的 ONOO^- 荧光成像^[51]

Fig.13 ONOO^- fluorescence imaging of the HeLa cells^[51]

2023 年,Yang 等^[52]开发了以双氧异佛酮

(DCM)为荧光团,五氟苯磺酸为识别基团构建的近红外荧光探针 15(DCM-Br- ONOO^-)用于检测 ONOO^- 。该工作在荧光团中加入 Br 原子延长成像的生理 pH 范围,并通过增加成像的 pKa 范围提高信噪比。当探针溶液加入不同浓度 ONOO^- 后,探针溶液最大吸收峰由 400 nm 红移至 570 nm 并呈现出明显的增加,同时在 680 nm 处荧光发射明显增强,斯托克斯位移达到了 110 nm。探针 15 表现出对 ONOO^- 快速响应(<3 min),良好的灵敏度($\text{LOD} = 2.3 \text{ nmol/L}$)以及内质网靶向性。特别的是,该课题组建立了急性肺损伤(ALI)细胞模型和利用脂多糖(LPS)诱导小鼠的 ALI 模型,用探针 15 孵育小鼠肺器官(图 14)。与对照组小鼠相比,LPS 诱导处理后的小鼠肺部荧光信号明显增加,结果表明 ONOO^- 水平在 ALI 中逐渐升高。因此,探针 15 实现了内质网中 ONOO^- 水平升高的观察,这可能揭示了 ONOO^- 在内质网相关疾病中的关系。

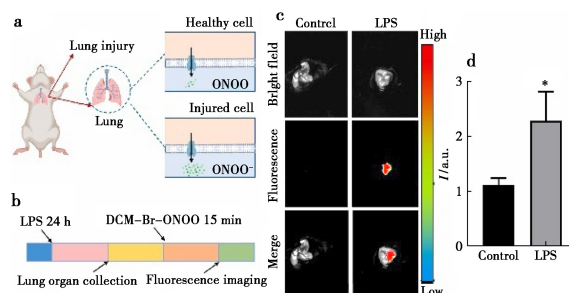


图 14 a.ALI 小鼠应激引起的 ONOO^- 变化图;b.以探针 15 监测 ALI 小鼠 ONOO^- 变化的实验程序;c.探针 15 应用于 LPS 处理和不处理小鼠肺器官染色图像;d.c* 与对照组图像的相对荧光强度($\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 695 \text{ nm}$)^[52]

Fig.14 a.An illustration of ONOO^- produced by stress in ALI mice;b.An experimental procedure using probe 15 for monitoring ONOO^- in mice;c.Images of probe 15 staining in the lung organs of mice treated with LPS or without;d.Relative fluorescence intensity of images in c* and control group($\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 695 \text{ nm}$)^[52]

4 总结和展望

过氧亚硝酸盐(ONOO^-)在生命过程中具有重要作用,因此其检测具有现实意义。与其他方法相比,荧光探针法表现出更优越的性能。其中,靶向细胞器的 ONOO^- 荧光探针更能揭示细胞器中 ONOO^- 的生理作用。本文对靶向线粒体、溶酶体、内质网的 ONOO^- 荧光探针进行了综述,并讨

论了它们的靶向策略、荧光行为及其在细胞及活体荧光成像中的应用。总的来说,靶向细胞器的 ONOO⁻ 荧光探针设计取得了重要的进展,对于许多疾病的预防、诊断以及病理的研究具有十分重要的意义,也有助于更好地了解亚细胞器中 ONOO⁻ 水平在生理和病理过程中的影响。

然而,靶向细胞器的 ONOO⁻ 荧光探针的研究仍有进步空间:1) 目前,报道的靶向细胞器的 ONOO⁻ 荧光探针,其发射波长只有少部分位于近红外区(>650 nm),大部分发射在可见光区域,因此需要开发出具有近红外发射靶向细胞器的 ONOO⁻ 荧光探针来扩大其在生物学研究中的应用。2) 荧光探针导致特定细胞器的生理状态发生变化,可能会使探针从细胞器中逃逸。因此,可以尝试构建能够结合特定细胞结构(包括但不限于蛋白质、脂质和 DNA)的荧光探针,将是一种提供准确定位和更精细研究的有力手段。3) 细胞器靶向 ONOO⁻ 荧光探针通常应用于细胞和生物体中,对测试条件中的水含量有一定的要求,目前报道的一些探针难以在纯水或水含量高的条件下进行测试与应用。4) 已报道的荧光探针存在荧光量子产率低的问题,因此也可以继续开发高荧光产率的新型荧光母体。

总之,对于 ONOO⁻ 荧光探针的研究还在不断进行优化。未来可以开发出近红外区、定位精准、水溶性好、荧光量子产率高的靶向细胞器 ONOO⁻ 荧光探针。相信这些荧光探针将成为化学家、生物学家和医学家进行疾病诊断和生理病理机制研究的有力分子工具。

参考文献:

- [1] FERRER-SUETA G, CAMPOIO N, TRUJILLO M, et al. Biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration [J]. *Chem. Rev.*, 2018, **118**(3): 1 338-1 408.
- [2] FERRER-SUETA G, RADI R. Chemical biology of peroxynitrite: Kinetics, diffusion, and radicals [J]. *ACS Chem. Biol.*, 2009, **4**: 161-177.
- [3] DUCROCQ C, BLANCHARD B, PIGNATELLI B, et al. Peroxynitrite: An endogenous oxidizing and nitrating agent [J]. *Cell. Mol. Life Sci.*, 1999, **55**: 1 068-1 077.
- [4] INOUE S, KAWANISHI S. Oxidative DNA damage induced by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide [J]. *FEBS Lett.*, 1995, **371**(1): 86-88.
- [5] WANG B, WANG Y, WANG Y, et al. Oxygen-embedded pentacene based near-infrared chemiluminescent nano-probe for highly selective and sensitive visualization of peroxynitrite in vivo [J]. *Anal. Chem.*, 2020, **92**(5): 4 154-4 163.
- [6] PROLO C, RIOS N, PIACENZE L, et al. Fluorescence and chemiluminescence approaches for peroxynitrite detection [J]. *Free Radical Biol. Med.*, 2018, **128**: 59-68.
- [7] YERMILOV V, RUBIO J, OHSHIMA H. Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxynitrite in vitro and its rapid removal from DNA by depurination [J]. *FEBS Lett.*, 1995, **376**(3): 207-210.
- [8] 张春香, 张向阳, 申有名, 等. 基于快速响应的红色 ONOO⁻ 荧光探针及其细胞成像 [J]. *化学试剂*, 2023, **45**(4): 1-7.
- [9] WANG W, XIONG J, SONG X, et al. Activatable two-photon near-infrared fluorescent probe tailored toward peroxynitrite in vivo imaging in tumors [J]. *Anal. Chem.*, 2020, **92**(19): 13 305-13 312.
- [10] SHI A, ZENG Y, XIN D, et al. Real-time visualization of the antioxidative potency of drugs for the prevention of myocardium ischemia-reperfusion injury by a nir fluorescent nanoprobe [J]. *ACS Sens.*, 2022, **7**(12): 3 867-3 875.
- [11] VASILESCU A, GHEORGHIOU M, PETEU S. Nanomaterial-based electrochemical sensors and optical probes for detection and imaging of peroxynitrite: A review [J]. *Microchim. Acta.*, 2017, **184**: 649-675.
- [12] YANG S, ZHANG Z, DAI C, et al. Visualizing voltage in mitochondria via a unique polarity-responsive fluorescent probe [J]. *Chem. Eng. J.*, 2023, **451**: 139 032.
- [13] VEGA-NAREDO I, LOUREIRO R, MESQUITA K A, et al. Mitochondrial metabolism directs stemness and differentiation in P19 embryonal carcinoma stem cells [J]. *Cell Death Differ.*, 2014, **21**(10): 1 560-1 574.
- [14] WANG Y, LI B, SONG X, et al. Mito-specific ratiometric terbium (III)-complex-based luminescent probe for accurate detection of endogenous peroxynitrite by time-resolved luminescence assay [J]. *Anal. Chem.*, 2019, **91**(19): 12 422-12 427.
- [15] CHENG D, PAN Y, WANG L, et al. Selective visualization of the endogenous peroxynitrite in an inflamed mouse model by a mitochondria-targetable two-photon ratiometric fluorescent probe [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2017, **139**(1): 285-292.
- [16] YANG L, CHEN Q, WAN Y, et al. A NIR molecular rotor photosensitizer for efficient PDT and synchronous mitochondrial viscosity imaging [J]. *Chem. Commun.*, 2022, **58**(67): 9 425-9 428.
- [17] MODIC-NAPOLITANO J S, APRILLE J R. Delocalized

- lipophilic cations selectively target the mitochondria of carcinoma cells [J]. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2001, **49**(1): 63-70.
- [18] YANG Q, WANG S, LI D, et al. A mitochondria-targeting nitroreductase fluorescent probe with large Stokes shift and long-wavelength emission for imaging hypoxic status in tumor cells [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2020, **1** **103**: 202-211.
- [19] ZHANG R, NIU G, LIU Z, et al. Single AIEgen for multiple tasks: Imaging of dual organelles and evaluation of cell viability [J]. *Biomaterials*, 2020, **242**: 119-124.
- [20] 杨志刚, 熊佳, 张炜, 等. 可用于活细胞线粒体随机光学重构超分辨成像的分子内可逆环化五甲川菁染料探针 [J]. *化学学报*, 2020, **78**(2): 130.
- [21] HOROBIN R W, RASHID-DOUBELL F, PEDIANI J D, et al. Predicting small molecule fluorescent probe localization in living cells using QSAR modeling. 1. Overview and models for probes of structure, properties and function in single cells [J]. *Biotech. Histochem.*, 2013, **88**(8): 440-460.
- [22] ZHANG W, LIU T, HUO F, et al. Reversible ratiometric fluorescent probe for sensing bisulfate/H₂O₂ and its application in zebrafish [J]. *Anal. Chem.*, 2017, **89**(15): 8 079-8 083.
- [23] LIU Q, DONG C, ZHANG J, et al. A mitochondria-targeted ratiometric NIR fluorescent probe for simultaneously monitoring viscosity and ONOO⁻ based on two different channels in living HepG2 cells [J]. *Dyes Pigm.*, 2023, **210**: 111-124.
- [24] CHEN S, HUANG W, TAN H, et al. A large Stokes shift NIR fluorescent probe for visual monitoring of mitochondrial peroxynitrite during inflammation and ferroptosis and in an Alzheimer's disease model [J]. *Analyst*, 2023, **148**(19): 4 637-4 654.
- [25] TABASSUM R, ASHFAQ M, OKU H. Current pharmaceutical aspects of synthetic quinoline derivatives [J]. *Mini-Rev. Med. Chem.*, 2021, **21**(10): 1 152-1 172.
- [26] LEI P, LI M, DONG C, et al. Multifunctional mitochondria-targeting near-infrared fluorescent probe for viscosity, ONOO⁻, mitophagy, and bioimaging [J]. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2023, **9**(6): 3 581-3 589.
- [27] KUMAR N, BHALLA V, KUMAR M. Development and sensing applications of fluorescent motifs within the mitochondrial environment [J]. *Chem. Commun.*, 2015, **51**(86): 15 614-15 628.
- [28] GU B, LIU M, DAI C, et al. Rational construction of a novel ratiometric far-red fluorescent probe with excellent water solubility for sensing mitochondrial peroxynitrite [J]. *Sens. Actuat. B Chem.*, 2021, **344**: 130-146.
- [29] HAN R, SHU W, KANG H, et al. A deep red ratiometric fluorescent probe for accurate detection of peroxynitrite in mitochondria [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2022, **1** **203**: 339-352.
- [30] HUANG Y, LI M, ZAN Q, et al. Mitochondria-targeting multifunctional fluorescent probe toward polarity, viscosity, and ONOO⁻ and cell imaging [J]. *Anal. Chem.*, 2023, **95**(27): 10 155-10 162.
- [31] WAKELIN L P G, BU X, ELEFThERIOU A, et al. Bis-intercalating threading diacridines: Relationships between DNA binding, cytotoxicity, and cell cycle arrest [J]. *J. Med. Chem.*, 2003, **46**(26): 5 790-5 802.
- [32] 尹宏鹭, 邢乃果, 何菱. ¹⁸F 标记吡啶苯醌衍生物分子探针的合成及正电子发射型计算机断层显像 [J]. *合成化学*, 2022, **30**(10): 777-781.
- [33] AN Q, SU S, CHAI L, et al. Imaging of peroxynitrite in mitochondria by a near-infrared fluorescent probe with a large Stokes shift [J]. *Talanta*, 2023, **253**: 124-131.
- [34] XUE X L, ZHANG H, CHEN G H, et al. Coumarin-cyanine hybrid: A ratiometric fluorescent probe for accurate detection of peroxynitrite in mitochondria [J]. *Spectrochim. Acta*, 2023, **292**: 122-133.
- [35] MURPHY M P, SMITH R A J. Targeting antioxidants to mitochondria by conjugation to lipophilic cations [J]. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2007, **47**: 629-656.
- [36] LI H, LI X, WU X, et al. Observation of the generation of ONOO⁻ in mitochondria under various stimuli with a sensitive fluorescence probe [J]. *Anal. Chem.*, 2017, **89**(10): 5 519-5 525.
- [37] PAUL L J, PRYOR P R. Lysosomes: Fusion and function [J]. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2007, **8**: 622-632.
- [38] ROOS A, BORON W F. Intracellular pH [J]. *Physiol. Rev.*, 1981, **61**(2): 296-434.
- [39] BOYA P, KROEMER G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death [J]. *Oncogene*, 2008, **27**(50): 6 434-6 451.
- [40] APPELQVIST H, WASTER P, KAGEDAL K, et al. The lysosome: From waste bag to potential therapeutic target [J]. *J. Mol. Cell Biol.*, 2013, **5**(4): 214-226.
- [41] NIU G, ZHANG P, LIU W, et al. Near-infrared probe based on rhodamine derivative for highly sensitive and selective lysosomal pH tracking [J]. *Anal. Chem.*, 2017, **89**(3): 1 922-1 929.
- [42] REN M, WANG L, LV X, et al. Development of a benzothiazole-functionalized red-emission pyronin dye

- and its dihydro derivative for imaging lysosomal viscosity and tracking endogenous peroxynitrite [J]. *J. Mater. Chem. B*, 2019, **7**(40): 6 181-6 186.
- [43] FENG W, FENG G. A lysosome-targetable fluorescent probe for imaging ONOO⁻ in living cells and animals [J]. *Dyes Pigm.*, 2019, **164**: 174-181.
- [44] XIA Q, FENG S, HONG J, et al. One probe for multiple targets: A NIR fluorescent rhodamine-based probe for ONOO⁻ and lysosomal pH detection in live cells [J]. *Sens. Actuat. B Chem.*, 2021, **337**: 129 732.
- [45] DONG B, LU Y, ZHANG N, et al. Ratiometric imaging of cysteine level changes in endoplasmic reticulum during H₂O₂-induced redox imbalance [J]. *Anal. Chem.*, 2019, **91**(9): 5 513-5 516.
- [46] GOUGIN A, COIOM A, STRAKOVA K, et al. Mechano-sensitive fluorescent probes to image membrane tension in mitochondria, endoplasmic reticulum, and lysosomes [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2019, **141**(8): 3 380-3 384.
- [47] RAO R V, BREDESEN D E. Misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration [J]. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2004, **16**(6): 653-662.
- [48] DICKHOUT J G, HOSSAIN G S, POZZA L M, et al. Peroxynitrite causes endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human vascular endothelium: Implications in atherogenesis [J]. *Arterioscl. Throm. Vas.*, 2005, **25**(12): 2 623-2 629.
- [49] WU L, WANG Y, WEBER M, et al. ESIPT-based ratiometric fluorescence probe for the intracellular imaging of peroxynitrite [J]. *Chem. Commun.*, 2018, **54**(71): 9 953-9 956.
- [50] LIU Y, MA Y, LIN W. Construction of a bi-functional ratiometric fluorescent probe for detection of endoplasmic reticulum viscosity and ONOO⁻ in cells and zebrafish [J]. *Sens. Actuat. B Chem.*, 2022, **373**: 132 742.
- [51] SUN Y, WANG R, WANG J, et al. Construction of a ratiometric two-photon ER-targeting fluorescent probe for the imaging of peroxynitrite in living systems [J]. *Sens. Actuat. B Chem.*, 2022, **370**: 132 439.
- [52] YANG K, LIU Y, DENG M, et al. Imaging peroxynitrite in endoplasmic reticulum stress and acute lung injury with a near-infrared fluorescent probe [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2023, **1 286**: 342 050.