

# 线粒体内活性硫有机荧光小分子探针研究进展

杨志广, 张璐瑶, 陈亚红, 李运林

(周口师范学院 化学化工学院, 河南 周口 466001)

**摘要:** 该文综述了近年来有机单、双光子线粒体内 H<sub>2</sub>S、SO<sub>2</sub>、巯基、多硫化氢及苯硫酚活性硫物种 (RSS) 荧光探针研究现状, 重点讨论了荧光探针选择性、灵敏度、识别机理、细胞毒性以及生物监测成像等方面的性能, 并提出这类荧光探针存在的问题以及未来的发展趋势, 旨在为构建新型线粒体荧光探针和进一步剖析线粒体内 RSS 的细胞学功能提供重要的理论和实践意义。

**关键词:** 线粒体; 活性硫; 荧光探针; 双光子; 检测

**中图分类号:** O657.3      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1003-5214 (2018) 06-0901-09

## Research Progress of Organic Fluorescent Small Molecule Probes for Reactive Sulfur Species in Mitochondria

YANG Zhi-guang, ZHANG Lu-yao, CHEN Ya-hong, LI Yun-lin

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Zhoukou Normal University, Zhoukou 466001, Henan, China)

**Abstract:** In this paper, we review the recent research status of organic one- and two-photon fluorescent probes for RSS in mitochondria, such as H<sub>2</sub>S, SO<sub>2</sub>, sulfydryl, hydrogen polysulphides (H<sub>2</sub>S<sub>n</sub>, n > 1) and thiophenol. The properties of fluorescent probe including selectivity, sensitivity, recognition mechanism, cell toxicity and biological monitoring imaging are emphatically discussed. Moreover, the existing problems and future development of this kind of fluorescent probes are proposed. This review is significantly meaningful in theory and practice for the construction of novel mitochondrial fluorescent probes and further dissection of the cellular function of RSS.

**Key words:** mitochondria; reactive sulfur species; fluorescent probe; two-photon; detection

**Foundation items:** Key Research Project of Henan Higher Education Institute (16B416001, 17B610009)

生物细胞内存在着多种细胞器, 其中, 线粒体是真核细胞中一种非常重要的细胞器, 主要为细胞活动提供能量, 被誉为细胞的“动力工厂”。另外, 线粒体还承担了许多其他生理功能, 如参与细胞分化、细胞信息传递和细胞凋亡等过程, 对细胞的存亡起着至关重要的作用。线粒体是细胞内活性硫物种(Reactive sulfur species, RSS)的主要来源。线粒体内 RSS 在生命体的生理和病理过程中发挥着至关重要的作用<sup>[1-4]</sup>。细胞内 RSS 是活性含硫生物分子的一种统称, 在许多生理和病理过程中扮演着十分重要的角色, 如硫化氢 (H<sub>2</sub>S)、二氧化硫 (SO<sub>2</sub>)、半胱氨酸 (Cys)、高半胱氨酸 (Hcy)、还原型谷胱甘肽 (GSH) 等在调节环境和维持人体内氧化还原动

态平衡中具有重要的作用。RSS 在生物体内具有双重作用, 适量的 RSS 是对人体有益的, 过量或大量减少时则会对细胞造成伤害, 从而诱发多种疾病。大量研究表明, 线粒体及 RSS 确实与多种疾病, 如心脏病、动脉硬化、糖尿病、帕金森综合征、神经退行性疾病、衰老等密切相关<sup>[5-9]</sup>。

与其他生物检测技术相比, 荧光分析法因具有操作简单、选择性好、灵敏度高、快速反应、易于原位实时观测等优点, 已成为检测细胞内活性物种的一种重要方法。双光子荧光探针技术不同于传统的单光子荧光探针技术, 具有长波激发 (700~1100 nm)、空间分辨率高、穿透深度大、可以实时原位检测、无损伤, 以及能够延长活细胞和组织

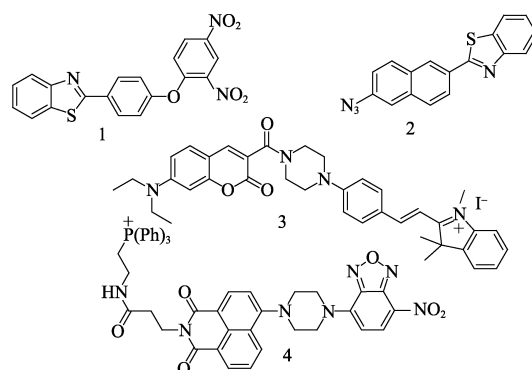
观察时间等独特优势,克服了单光子荧光探针技术存在的激发波长短(350~550 nm)、光漂白、光损伤和细胞自发荧光等问题,在生物医学研究中得到广泛的应用<sup>[10-12]</sup>。目前,检测生物体内 RSS 的荧光探针已有很多,尤其是近些年已有很多能够精准到亚细胞器—线粒体内检测 RSS 的荧光探针被报道,亚细胞水平精确检测和成像不仅可以了解 RSS 的生物学功能,又对某些疾病的早期诊断和预防具有重要的指导作用。因此,设计能够实现快速检测线粒体内 RSS 含量变化的双光子荧光探针对于了解 RSS 的生理功能与人类疾病之间的关系有着十分重要的生物学意义。本文在简要分析一般性的 RSS 荧光探针基础上,重点介绍了近年来有机单、双光子线粒体内 RSS 荧光探针的研究现状,并对其存在的问题以及未来的发展趋势进行了探讨。

## 1 有机单、双光子线粒体内 RSS 荧光探针研究现状

线粒体作为真核细胞内一种非常重要而独特的细胞器,其结构与功能的异常往往与人体内许多疾病密切相关。目前报道的能够特异性定位活细胞中线粒体的荧光探针主要有两种<sup>[13]</sup>:一种是基于线粒体磷脂双分子层的膜电位(约-180 mV),对带有正电荷的荧光染料中的三苯基季磷盐阳离子(或吡啶阳离子)具有强吸引力,进而精确定位活细胞中线粒体的荧光探针;另一种是商用线粒体荧光探针,如罗丹明 123 (Rh123)、四甲基罗丹明甲酯(TMRM)、菁染料(如 MitoTracker Green/Red/Deep Red FM 系列)等,这些商用探针可以轻易地渗透进入活细胞中,且进入细胞后就能快速和选择性结合线粒体,因而借助激光共聚焦显微镜在活细胞内检测的荧光就能特异性地监测线粒体的形态变化。三苯基季磷盐常被认为是一种高效的线粒体定位阳离子基团,具有较强的疏水性,能够有效穿透疏水性的质膜进入线粒体,连接在活性小分子荧光团上可以实现对细胞中线粒体内活性物质的检测和荧光成像<sup>[14-15]</sup>。通常人们主要利用硫解反应、亲核加成反应、氧化还原反应、亲核取代反应、醛基与氨基和巯基共同作用等反应机理设计合成识别细胞内 RSS 荧光探针。一般测定线粒体 RSS 的方法是将对 RSS 具有识别作用的荧光基团(带有识别基团,如丙烯酸酯键、叠氮基、醛基等)与具有线粒体靶向作用的亲脂性阳离子(如三苯基季磷盐,吡啶阳离子基团等)进行连接,进而设计合成检测线粒体内 RSS 的荧光探针。下面就近年来有机单、双光子线粒体内 RSS 荧光探针研究现状进行详细探讨。

### 1.1 有机单、双光子线粒体内 H<sub>2</sub>S 荧光探针

H<sub>2</sub>S 是继 NO 和 CO 之后第 3 个具有生物活性的气体信号分子,具有调节细胞生长、传递调控神经信号、保护心血管系统、抑制发炎以及抗氧化等多种生理作用,同时 H<sub>2</sub>S 含量的异常还与阿尔兹海默氏症、神经系统疾病、心血管疾病、糖尿病和肝硬化等多种疾病密切相关<sup>[16-22]</sup>。因此,发展能够快速、实时、准确检测活细胞中 H<sub>2</sub>S 浓度变化的荧光探针对于相关疾病的诊断具有非常重要的意义。Liu<sup>[23]</sup>等基于 H<sub>2</sub>S 与间二硝基苯醚的硫解反应,报道了一个实时监测的苯并噻唑类 H<sub>2</sub>S 荧光探针 1(结构如下所示)。该探针选择性好、灵敏度高、检出限低(108 nmol/L),并成功地进行了活细胞和活组织中 H<sub>2</sub>S 的生物成像研究。Mao<sup>[24]</sup>等以萘为荧光团,叠氮基为识别基团,报道了一个水溶性好、灵敏度高、检出限低(20 nmol/L)的专一性检测活细胞中 H<sub>2</sub>S 的双光子荧光探针 2(结构如下所示),实现了活细胞中 H<sub>2</sub>S 的双光子荧光成像。探针 1 和 2 结构简单、合成方便,但它们只是检测细胞中 H<sub>2</sub>S 的单、双光子荧光探针,而没有涉及到线粒体内 H<sub>2</sub>S 的检测。Feng<sup>[25]</sup>等利用香豆素和部花青为荧光团,通过荧光共振能量转移机理(FRET),设计合成了一个检测线粒体内 H<sub>2</sub>S 的比率荧光探针 3(结构如下所示)。该探针具有较高的选择性和灵敏度,检出限低(40 nmol/L)、光稳定性好、生物相容性好,实现了活细胞中线粒体内 H<sub>2</sub>S 的比率荧光成像。Pak<sup>[26]</sup>等利用 1,8-萘二甲酰亚胺为荧光团,通过硫解作用,设计合成了一个检测线粒体内 H<sub>2</sub>S 的荧光探针 4(结构如下所示)。该探针选择性好、灵敏度高、检出限低(2.46 μmol/L)、不受 pH 干扰、细胞毒性低,实现了活细胞中线粒体内 H<sub>2</sub>S 的荧光成像。相比于探针 1 和 2,探针 3 和 4 能够专一性检测线粒体内 H<sub>2</sub>S,但均不是双光子荧光探针。双光子荧光探针较单光子荧光探针具有近红外光源激发、暗场成像、避免荧光漂白和光致毒、高横向和纵向分辨率以及降低细胞组织自发荧光干扰等优势,为生命科学研究提供了更为有利的工具。然而能够精准定位线粒体,实现对线粒体内 H<sub>2</sub>S 成像的双光子荧光探针还较为鲜见。



Bae<sup>[27]</sup>等以 4-叠氮基苯-氨基甲酸酯为识别位点, 设计合成了一个检测线粒体内 H<sub>2</sub>S 的双光子比率荧光探针 5, 结构见图 1。该探针具有选择性好、检出限低 (0.4 μmol/L)、光稳定性好、细胞毒性低、不受 pH 干扰等特点, 实现了活细胞和活组织 (成像深度 >100 μm) 中线粒体内 H<sub>2</sub>S 的双光子比率荧光成像。Liu<sup>[28]</sup>等也以 4-叠氮基苯-氨基甲酸酯为识别位点, 设计合成了一个检测线粒体内 H<sub>2</sub>S 的双光子比率荧光探针 6, 结构见图 1, 实现了活细胞中线粒体内 H<sub>2</sub>S 的双光子比率荧光成像。

Liu<sup>[29]</sup>等利用 S<sup>2-</sup>与 Cu<sup>2+</sup>的强亲和力, 设计合成了一个识别线粒体内 H<sub>2</sub>S 的铜配合物型双光子荧光探针 7 (结构如下式所示)。该探针选择性和灵敏度高、检出限低 (47 nmol/L)、光稳定性好, 并具有良好的水溶性和生物相容性, 该配合物本身没有荧光, 当加入 H<sub>2</sub>S 后, 形成不溶性的 CuS 沉淀, 荧光

团荧光恢复, 荧光强度显著增强, 实现了活细胞中线粒体内 H<sub>2</sub>S 的双光子荧光成像。Zhou<sup>[30]</sup>等以间-二硝基苯醚为识别基团, 报道了一个检测线粒体内 H<sub>2</sub>S 的双光子荧光探针 8 (结构如下式所示)。该探针选择性好、灵敏度高、检出限低 (83 nmol/L)、细胞毒性低、双光子活性吸收截面大 (160 GM, 1GM = 1.0 × 10<sup>-50</sup> cm<sup>4</sup>·s/photon), 实现了活细胞和活组织 (成像深度 ~350 μm) 中线粒体内 H<sub>2</sub>S 的双光子荧光成像, 为研究 H<sub>2</sub>S 的生理与病理功能提供了理论基础和技术支撑。尽管线粒体内 H<sub>2</sub>S 的双光子荧光探针得到了一定程度的发展, 但探针水溶性、双光子吸收截面、细胞穿透性等仍然是亟待解决的问题, 这制约了其进一步的发展与应用。因此, 设计大双光子吸收截面、水溶性好以及良好的细胞穿透性的线粒体内 H<sub>2</sub>S 的双光子荧光探针成为人们关注的热点。

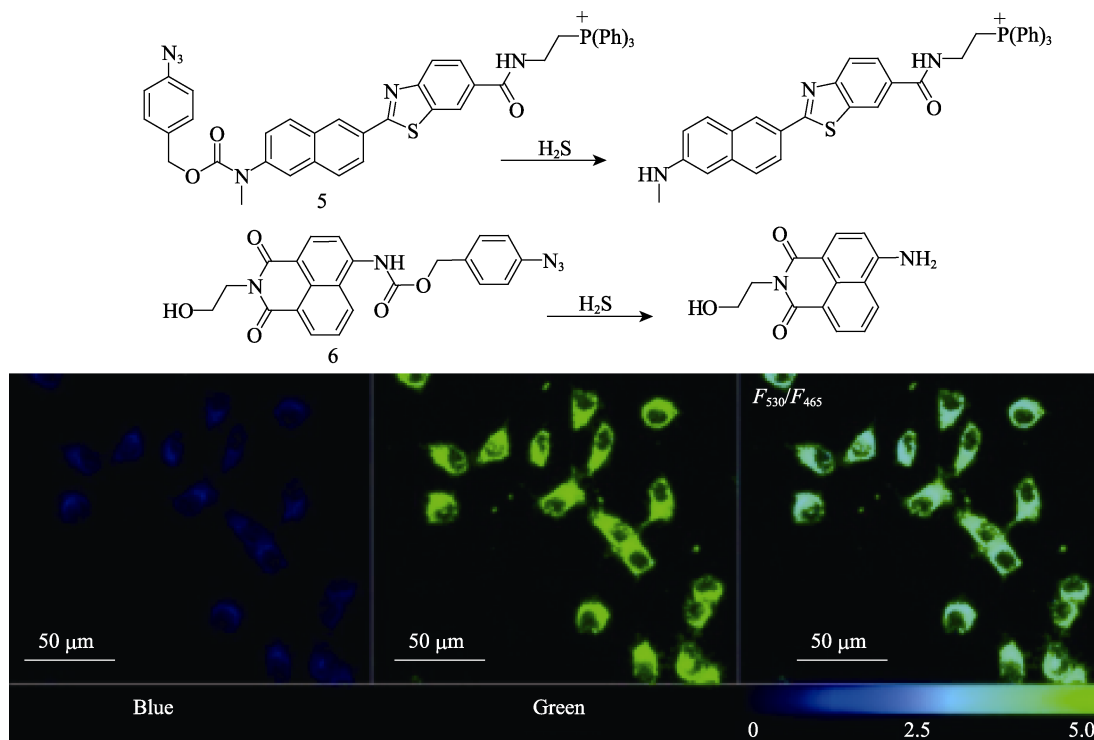
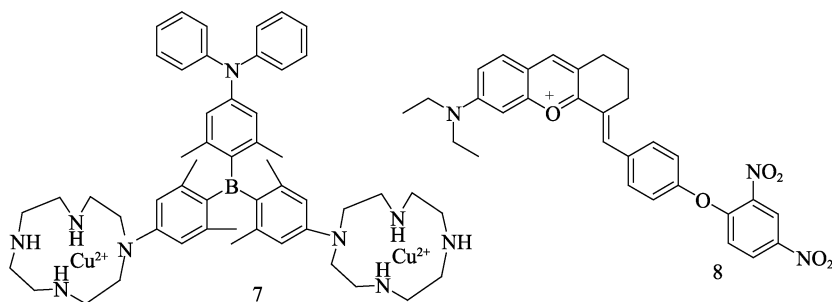


图 1 探针 5 和 6 与 H<sub>2</sub>S 可能的作用机理及探针 6 的细胞成像图

Fig. 1 Proposed recognition mechanisms to H<sub>2</sub>S of probes 5 and 6 and fluorescent images in living cells of probe 6

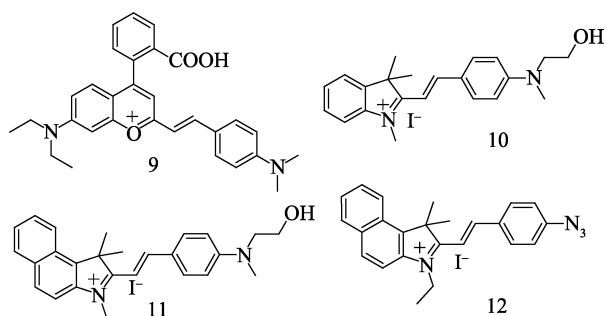


## 1.2 有机单、双光子线粒体内 SO<sub>2</sub> 荧光探针

SO<sub>2</sub> 被公认为是一种有毒的环境污染物, 与水

结合生成 H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 其很快水解形成衍生物 SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>和 HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>。流行病学研究表明, 暴露在过量的 SO<sub>2</sub> 环境

中不仅会引起一些呼吸道疾病,还会诱发肺癌、心血管疾病和神经系统疾病等。 $\text{SO}_2$  在生物体内主要存在于细胞的线粒体中,具有多种生物活性,例如抗氧化、舒张血管、降低血压等,其水平的异常通常与神经系统疾病和肺癌相关<sup>[31-33]</sup>。因此,实时监测生物体内  $\text{SO}_2$  衍生物亚硫酸盐和亚硫酸氢盐 ( $\text{SO}_3^{2-}$  和  $\text{HSO}_3^-$ ) 的含量变化具有重要的生物学意义。Shang<sup>[34]</sup>等报道了一个新型的检测  $\text{SO}_2$  衍生物的近红外比率荧光探针 9 (结构如下所示),实现了活细胞中  $\text{SO}_2$  衍生物的比率荧光成像。Li<sup>[35]</sup>等报道了两个专一性检测  $\text{SO}_2$  衍生物的双光子比率荧光探针 10 和 11 (结构如下式所示),实现了活细胞中  $\text{SO}_2$  衍生物的双光子比率荧光成像。Li<sup>[36]</sup>等以半花菁染料为荧光团,设计合成了一个快速响应、灵敏度高的检测线粒体内  $\text{SO}_2$  衍生物的单光子比率荧光探针 12 (结构如下式所示),实现了活细胞中线粒体内  $\text{SO}_2$  衍生物的比率荧光成像。这些探针均没有对线粒体内  $\text{SO}_2$  衍生物进行双光子荧光成像研究,虽然已有许多  $\text{SO}_2$  荧光探针被报道,但能够实现细胞特别是活细胞成像的线粒体内  $\text{SO}_2$  双光子荧光探针却十分稀少。



Yang<sup>[37]</sup>等基于 FRET 机理,设计合成了一个检测活细胞中线粒体内  $\text{SO}_2$  衍生物的双光子比率荧光探针 13 (结构如图 2 所示)。该探针双光子活性吸收截面大(100 GM)、选择性好、响应速度快(3 min)、细胞毒性低、染色能力强、细胞穿透性好,可以定量检测  $\text{SO}_2$ ,检出限低(50 nmol/L),实现了活细胞和活组织(成像深度 0~200  $\mu\text{m}$ )中线粒体内  $\text{SO}_2$  衍生物的双光子比率荧光成像(如图 2a 所示),为生物学中研究含硫活性物种的新陈代谢提供了一个强有力的分子工具。Wang<sup>[38]</sup>等基于分子内电荷转移机理设计合成了一个检测活细胞中线粒体内  $\text{SO}_2$  衍生物的双光子比率荧光探针 14 (结构如图 2 所示)。

该探针具有水溶性好、选择性好、响应速度快(10 min)、检出限低(2.21 nmol/L)、双光子活性吸收截面大(193.88 GM)、斯托克斯(Stokes)位移大(134 nm)、细胞毒性低以及良好的生物相容性等突出优点,与商品化线粒体染料 Mito Tracker Red

FM 具有高的复染系数(共定位率:0.89),对线粒体具有很好的定位效果,实现了活细胞中线粒体内  $\text{SO}_2$  衍生物的双光子荧光成像(如图 2b 所示),为进一步研究线粒体内  $\text{SO}_2$  衍生物潜在的生物功能提供了一个强有力的实用工具。虽然双光子线粒体内  $\text{SO}_2$  荧光探针研究取得了一定的进展,然而目前报道的还是较少。因此,研究新型荧光团和识别基团的种类、开发具有较好双光子性能的线粒体内  $\text{SO}_2$  荧光探针是目前需要解决的问题。

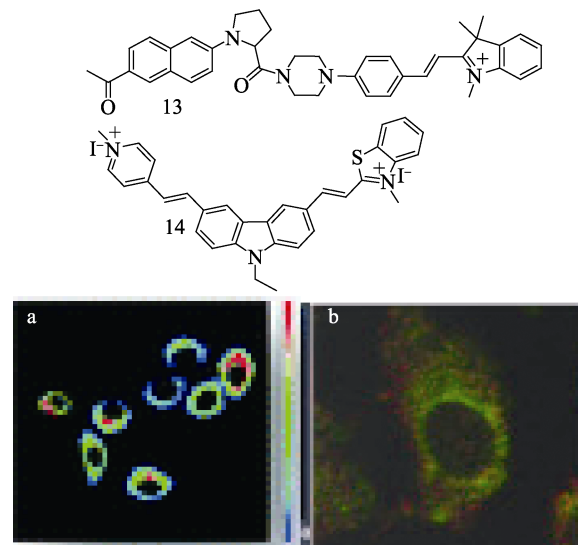
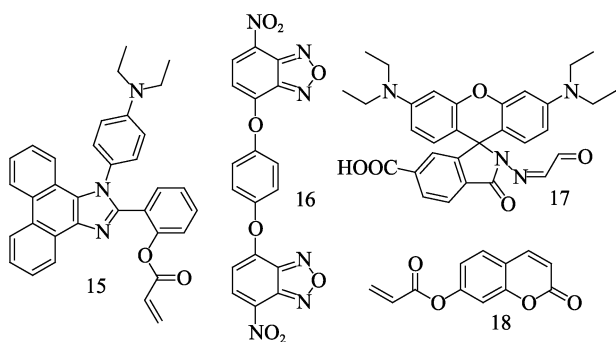


图 2 探针 13 和 14 的化学结构式及细胞成像图  
Fig. 2 Chemical structures of probes 13 and 14 and their fluorescent images in living cells

### 1.3 有机单、双光子线粒体内巯基荧光探针

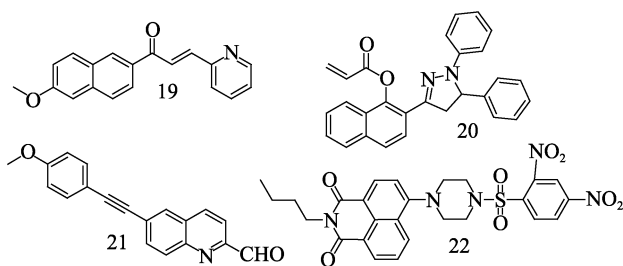
生物体内许多巯基生物小分子,如 Cys、Hcy 和 GSH 等在人体生理活动中扮演着重要角色。尽管它们结构极为相似,但生物功能却完全不同。例如体内 Cys 缺乏会引起许多疾病,如儿童生长缓慢、头发褪色、浮肿、肝脏疾病、皮肤松弛、身体虚弱等,而含量过高则与神经毒性相关联<sup>[39-40]</sup>;Hcy 是蛋氨酸循环和 Cys 代谢的重要中间产物,体内不能合成,其含量过高会导致阿尔茨海默氏症、神经中枢缺陷、心血管疾病、糖尿病、骨质疏松等疾病<sup>[41-42]</sup>。GSH 是由半胱氨酸、谷氨酸和甘氨酸组成的三肽分子,是细胞内含量最多的非蛋白类含巯基的生物小分子,对维持细胞的氧化还原动态平衡起着重要作用,其浓度的异常与癌症、阿尔茨海默氏症和神经性疾病等相关<sup>[43-44]</sup>。因此,实时、快速地对这些巯基生物小分子进行高选择性和高灵敏度的检测具有十分重要的生物学意义和科学价值。目前,关于专一性识别 Cys、Hcy 或 GSH 等含巯基生物小分子的荧光/磷光探针已有相关报道<sup>[45-48]</sup>。近年来,由于新兴荧光成像技术的广泛应用,定量检测和专一性识别巯基生物小分子的荧光探针得到了迅速发展。

Lv<sup>[49]</sup>等基于激发态分子内质子转移机理设计合成了专一性检测 Cys 的荧光探针 15 (结构如下所示)。该探针反应快 (约 10 min)、灵敏度高、检出限低 (0.64  $\mu\text{mol/L}$ ), 本身无荧光, 加入 Cys 后, 丙烯酸酯键断裂, 荧光强度增强 20 倍, 选择性好, 不受 Hcy、GSH 以及其他氨基酸等物质的影响, 实现了活细胞中 Cys 的荧光成像。Wang<sup>[50]</sup>等利用荧光团 4-氯-7-硝基苯-2-氧-1,3-二唑 (NBD-Cl) 设计合成了一个专一性检测 Hcy 的荧光探针 16 (结构如下所示)。该探针具有灵敏度高、专一性强、水溶性好、细胞毒性低等特点, 实现了活细胞中 Hcy 的荧光成像。Yang<sup>[51]</sup>等设计合成了以罗丹明 6G 为母体选择性识别 GSH 的荧光探针 17 (结构如下所示)。该探针检出限低 (27 nmol/L), 水溶性好, 本身无荧光, 加入 GSH 后, 荧光强度增强 69 倍, 选择性好, 不受 Cys、Hcy 以及其他氨基酸等物质的影响, 实现了活细胞中 GSH 的荧光成像。Wei<sup>[52]</sup>等以香豆素为母体, 利用 Michael 加成反应, 设计合成了一个同时识别 Cys 和 Hcy 的荧光探针 18 (结构如下所示)。该探针检出限低 (Cys: 65 nmol/L; Hcy: 79 nmol/L)、水溶性好、选择性强、不受 GSH 以及其他氨基酸等物质的影响, 实现了活细胞中 Cys 和 Hcy 的荧光成像。以上报道的专一性识别 Cys、Hcy 或 GSH 以及同时识别生物体系中 Cys 和 Hcy 的荧光探针均为单光子荧光探针, 均没有涉及到双光子细胞成像研究, 同时也没有涉及到线粒体成像研究。

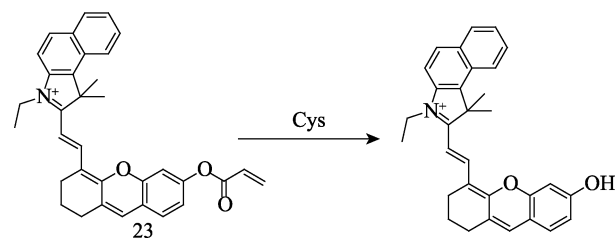


Wang<sup>[53]</sup>等设计合成了一个快速检测 Cys 的双光子荧光探针 19 (结构如下所示)。该探针响应速度快 (约 20 min), 细胞毒性低, pH 影响小, 不受 Hcy、GSH 及其他生物分析物的干扰, 实现了 Cys 的高选择性识别以及活细胞中的双光子荧光成像。Dai<sup>[54]</sup>等利用 Michael 加成反应, 以蔡-吡啶为荧光团, 设计合成了一个专一性识别 GSH 的双光子荧光探针 20 (结构如下所示)。该探针响应速度快 (10 min 以内)、检出限低 ( $1.5 \times 10^{-8}$  mol/L)、选择性好、不受 Cys、Hcy 及其他含巯基生物分析物的影响, 实现了在小牛血清样本和活细胞中 GSH 的双光子荧光成像。Meng<sup>[55]</sup>等基于巯基分子中氨基和巯基可

同时与醛基发生特异性成环反应的特点设计合成了一个检测 Cys 和 Hcy 的双光子比率荧光探针 21 (结构如下所示)。该探针与 Cys 作用后, 荧光和紫外吸收光谱都发生明显蓝移, 410 nm 和 505 nm 的荧光发射强度比值 ( $I_{410}/I_{505}$ ) 由 0.28 迅速增到 2.70, 具有细胞毒性低、选择性好、细胞膜穿透性好等特点, 实现了活细胞中的双光子比率荧光成像。Zhu<sup>[56]</sup>等以 *N*-丁基蔡二甲酰亚胺为荧光团, 2,4-二硝基-苯磺酰基为识别基团, 设计合成了一个用来检测含巯基生物分子的双光子荧光探针 22 (结构如下所示)。该探针本身无荧光, 一旦与 Cys、Hcy 和 GSH 等含巯基生物分子作用后, 荧光迅速增强, 具有细胞毒性低、生物兼容性好、不受 pH 干扰等特点, 实现了活细胞和活组织 (成像深度 50~250  $\mu\text{m}$ ) 中生物巯基分子的双光子荧光成像。虽然目前有许多专一性识别巯基生物分子的单、双光子荧光探针报道, 但专一性识别 Hcy 的双光子荧光探针还未见报道, 且能够实现活细胞成像的线粒体内巯基生物分子荧光探针还比较少。

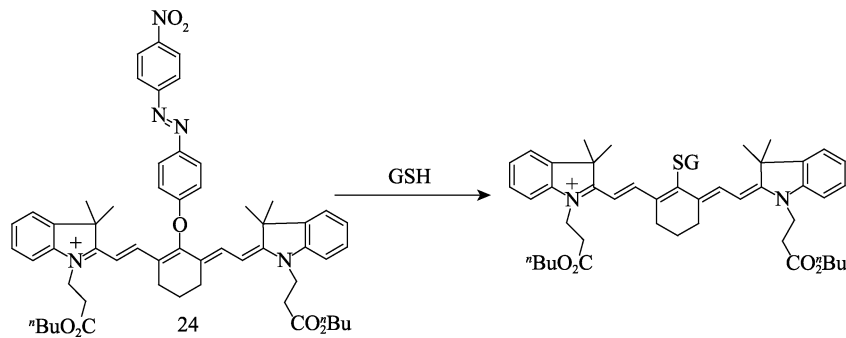


Han<sup>[57]</sup>等以荧光素衍生物为荧光团, 丙烯酸酯基为识别基团, 设计合成了一个专一性检测线粒体内 Cys 的近红外荧光探针 23 (结构如下式所示)。该探针含有定位线粒体的亲脂性阳离子基团, 本身荧光较弱, 与 Cys 作用后, 荧光迅速增强, 具有选择性强、灵敏度高、检出限低 (14.5 nmol/L)、细胞毒性低以及良好的细胞穿透性等特点, 实现了活细胞线粒体中 Cys 的荧光成像, 以及评估了活细胞中线粒体的氧化应激水平。



Lim<sup>[58]</sup>等基于七甲川-偶氮染料, 设计合成了一种检测线粒体内 GSH 的近红外荧光探针 24 (结构如下式所示)。该探针检出限低 (26 nmol/L)、选择性好、不受 Cys、Hcy 以及其他氨基酸的干扰, 实现了活细胞中线粒体内 GSH 的荧光成像。





Niu<sup>[59]</sup>等以部花青染料为荧光团,吡啶阳离子为线粒体定位基团,丙烯酸酯基为巯基识别基团,报道了一个检测线粒体内 Cys 的双光子比率荧光探针 25 (结构如图 3 所示)。该探针具有双光子活性吸收截面大(在波长 740 nm 和 760 nm 处激发时的活性吸收截面分别为 65.2 和 72.6 GM)、细胞毒性低、良好的生物兼容性和光稳定性、选择性好,不受 Hcy、GSH、氨基酸、各种金属离子及阴离子等生物分析物的影响等优点,实现了活细胞和活组织(成像深度达 150 μm)中线粒体内 Cys 的双光子比率荧光成像(如图 3 所示)。Lim<sup>[60]</sup>等以二硫键作为巯基识别基团,设计合成了一个检测线粒体内巯基分子的双光子比率荧光探针 26 (结构如图 3 所示)。当探针与巯基生物分子作用后,发射光颜色由蓝色变为黄色。该探针具有细胞毒性低、对 pH 不敏感、膜渗透性好、选择性好,不受非巯基氨基酸、金属离子及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 等生物分析物的影响等优点,表明该探针分子对巯基生物分子具有很好的专一性识别能力,实现了活细胞和活组织(成像深度 90~190 μm)中线粒体内巯基生物分子的双光子比率荧光成像。综上

所述,专一性识别线粒体内巯基分子的双光子荧光探针还很有限,尤其是专一性识别线粒体内 Hcy 的单、双光子荧光探针目前尚未见报道。因此,探索新型的、活性吸收截面大的、专一性识别线粒体内巯基分子的双光子荧光探针是科学工作者今后努力的方向。**1.4 有机线粒体内多硫化氢 (H<sub>2</sub>S<sub>n</sub>, n>1) 荧光探针**作为 H<sub>2</sub>S 的直接氧化形式,多硫化氢 (H<sub>2</sub>S<sub>n</sub>, n>1) 具有抗氧化活性、保护细胞以及传导氧化还原信号的作用,在细胞多种生理病理过程中发挥着重要作用<sup>[61-62]</sup>。因此,了解 H<sub>2</sub>S<sub>n</sub> 在正常和疾病状态下的产生、分布和生理功能对于阐明细胞信号传导机制有着重要的意义。Zeng<sup>[63]</sup>等以硝基氟化苯作为 H<sub>2</sub>S<sub>n</sub> 的响应基团,设计合成了一种检测活细胞内 H<sub>2</sub>S<sub>n</sub> 的双光子荧光探针 27 (结构如下式所示)。该探针加入 H<sub>2</sub>S<sub>n</sub> 后,进行分子内环化,荧光迅速增强,量子产率提高了 57 倍,探针选择性好、细胞毒性低,实现了 HeLa 细胞中内源性和外源性 H<sub>2</sub>S<sub>n</sub> 的双光子荧光成像,也能够用于检测斑马鱼胚胎模型中 H<sub>2</sub>S<sub>n</sub> 的浓度分布,但该探针没有对线粒体进行细胞成像研究。

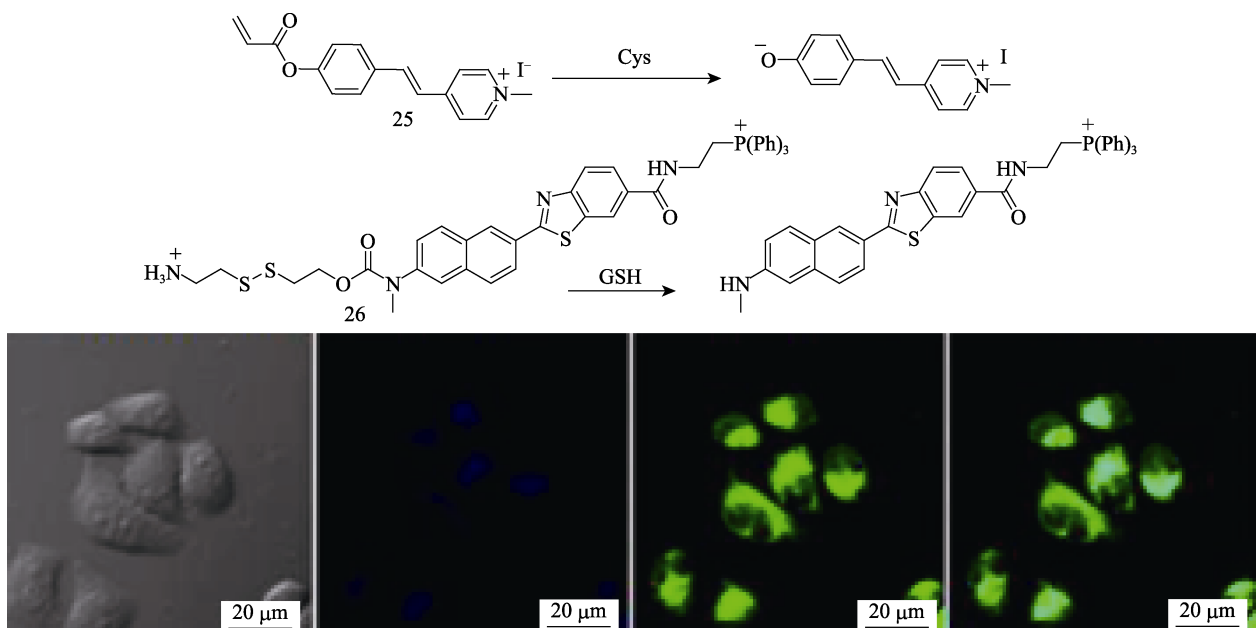
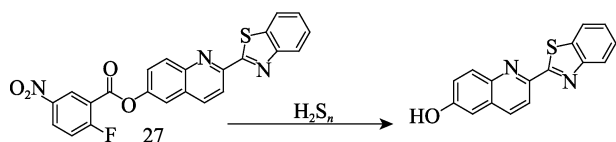
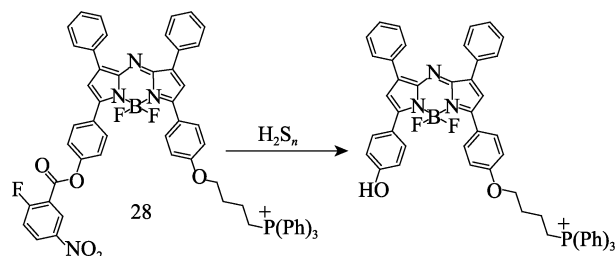


图 3 探针 25 和 26 与 Cys/GSH 可能的识别机理及探针 25 的细胞成像图

Fig. 3 Proposed recognition mechanisms to Cys/GSH of probes 25 and 26 and fluorescent images in living cells of probe 25



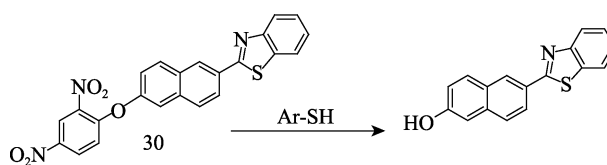
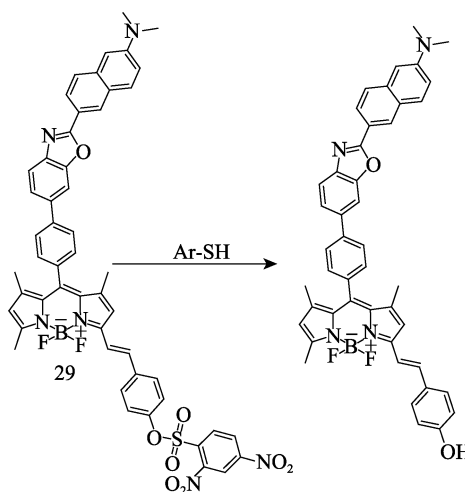
Gao<sup>[64]</sup>等以三苯基磷阳离子作为线粒体定位基团, 硝基氟化苯作为  $H_2S_n$  的响应基团, 报道了一种用于检测活细胞线粒体内  $H_2S_n$  的近红外荧光探针 28 (结构如下式所示)。该探针可以定位到线粒体, 对  $H_2S_n$  选择性好、灵敏度高, 实现了活细胞内源性以及外源性  $H_2S_n$  浓度变化的检测, 同时还成功将其应用于小鼠体内  $H_2S_n$  的荧光成像, 为研究生物体中  $H_2S_n$  的生理和病理过程提供了一个潜在的分析方法, 但双光子线粒体内  $H_2S_n$  荧光探针还未见报道。



### 1.5 有机双光子苯硫酚 (ArSH) 荧光探针

相对于脂肪族巯基分子, 芳香族巯基分子在有机合成中具有重要作用。作为重要的有机合成中间体, 苯硫酚主要用于医药、农药、高分子材料及有机合成的助剂等方面。另外, 苯硫酚具有强烈的毒性, 被人吸收后, 可引起咳嗽、头痛、呕吐、水肿, 甚至破坏中枢神经系统、肾脏, 导致肌肉萎缩、昏迷而致死亡<sup>[65-66]</sup>。因此, 发展一种能高效、快速地检测生物体系或环境样品中苯硫酚的荧光探针具有重要的理论意义和应用价值。Liu<sup>[67]</sup>等以 BODIPY 为母体环, 设计合成了一种利用磺酰酯键选择性识别 ArSH 的双光子荧光探针 29 (结构如下式所示)。该探针加入 ArSH 后, 荧光增强 163 倍, 选择性好、检出限低 (4.9 nmol/L), 实现了水样和活细胞以及活组织 (成像深度 90~220  $\mu\text{m}$ ) 中 ArSH 的双光子荧光成像, 对环境样品和生物体系中 ArSH 的检测具有良好的应用前景。

Ma<sup>[68]</sup>等以萘为荧光团, 硝基苯作为响应基团, 报道了一种用于检测 ArSH 的双光子荧光探针 30 (结构如下式所示)。该探针对 ArSH 具有选择性好、灵敏度高以及检出限低 (9.6 nmol/L) 等特点, 实现了水样和活细胞以及活组织 (成像深度 40~155  $\mu\text{m}$ ) 中 ArSH 的双光子荧光成像。但探针 29 和 30 均为双光子 ArSH 荧光探针, 而与线粒体相关的 ArSH 荧光探针还未见报道。



## 2 展望

本文主要介绍了生物体内常见的 RSS 荧光探针, 特别是对最近几年报道的有机单、双光子线粒体内 RSS 荧光探针研究进展进行了系统的综述。基于不同的反应机理、荧光基团和识别基团, 近年来已经有很多线粒体内 RSS 荧光探针被报道, 也取得了一定的进展, 但多数为单光子荧光探针, 存在水溶性差、背景干扰大、Stokes 位移小、光稳定性差、透膜性不好等不足, 使之不能很好地应用于生物体系研究。同时有机双光子线粒体内 RSS 荧光探针仍然很少, 并且对探针的生物学机制研究还不够透彻。因此, 线粒体内 RSS 荧光探针, 尤其是有机双光子线粒体内 RSS 荧光探针仍存在着众多的工作需要探索: (1) 寻找具有大双光子活性吸收截面、大 Stokes 位移和专一性识别响应的有机双光子线粒体内 RSS 荧光探针; (2) 目前专一性识别线粒体内 Hcy 的荧光探针还未见报道。加大探针结构与其选择性识别性能的构效关系研究, 开发能够实时追踪线粒体内 Hcy 动态变化的荧光探针; (3) 发展灵敏度高、水溶性好、生物透膜性好、细胞毒性很低甚至无毒, 能够成像活细胞和活组织的有机双光子线粒体内 RSS 荧光探针; (4) 开发比率型有机双光子线粒体内 RSS 荧光探针, 以消除荧光探针浓度、激发强度以及样品厚度等因素所引起的误差, 有利于改善探针的灵敏度和准确度; (5) 加大荧光探针与 RSS 的反应机理以及生物学机制研究, 为生物研究和医学诊断提供理论基础。

总之, 相信在众多科学工作者的共同努力下,

上述问题将会得到逐渐解决。线粒体内 RSS 荧光探针, 尤其是有机双光子线粒体内 RSS 荧光探针将会得到进一步发展, 应用前景也将会更加广阔。

#### 参考文献:

- [1] McBride H M, Neuspiel M, Wasiak S. Mitochondria: More than just a powerhouse[J]. *Current Biology*, 2006, 16(14): R551-R560.
- [2] Yousef L F, Stewart K M, Kelley S O. Targeting mitochondria with organelle-specific compounds: strategies and applications[J]. *Chembiochem*, 2009, 10(12): 1939-1950.
- [3] McInnes J. Mitochondrial-associated metabolic disorders: foundations, pathologies and recent progress[J]. *Nutrition & Metabolism*, 2013, 10(63): 1-13.
- [4] Capodilupo A L, Vergaro V, Fabiano E, *et al.* Design and synthesis of fluorenone-based dyes: two-photon excited fluorescent probes for imaging of lysosomes and mitochondria in living cells[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2015, 3(16): 3315-3323.
- [5] Li J L, Li R J, Meng Z Q. Sulfur dioxide upregulates the aortic nitric oxide pathway in rats[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2010, 645(1/2/3): 143-150.
- [6] Kabil O, Banerjee R. Redox biochemistry of hydrogen sulfide[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(29): 21903-21907.
- [7] Li R J, Kou X J, Tian J J, *et al.* Effect of sulfur dioxide on inflammatory and immune regulation in asthmatic rats[J]. *Chemosphere*, 2014, 112: 296-304.
- [8] Zhang R R, Zhang J F, Wang S Q, *et al.* Novel pyrazoline-based fluorescent probe for detecting thiols and its application in cells[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2015, 137: 450-455.
- [9] Chen H, Tang Y H, Lin W Y. Recent progress in the fluorescent probes for the specific imaging of small molecular weight thiols in living cells[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2016, 76: 166-181.
- [10] Yao S, Belfield K D. Two-photon fluorescent probes for bioimaging [J]. *European Journal of Organic Chemistry*, 2012, 2012(17): 3199-3217.
- [11] Li R Q, Mao Z Q, Rong L, *et al.* A two-photon fluorescent probe for exogenous and endogenous superoxide anion imaging *in vitro* and *in vivo*[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 87: 73-80.
- [12] Zhang W, Xu K X, Yue L X, *et al.* Two-dimensional carbazole-based derivatives as versatile chemosensors for colorimetric detection of cyanide and two-photon fluorescence imaging of viscosity *in vitro* [J]. *Dyes and Pigments*, 2017, 137: 560-568.
- [13] Jiang Na (姜娜), Fan Jiangli (樊江莉), Yang Hongbao (杨洪宝), *et al.* Progress in research of mitochondrial fluorescence probes[J]. *CIESC Journal (化工学报)*, 2016, 67(1): 176-190.
- [14] James A M, Cochemé H M, Smith R A J, *et al.* Interactions of mitochondria-targeted and untargeted ubiquinones with the mitochondrial respiratory chain and reactive oxygen species[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(22): 21295-21312.
- [15] Ross M F, Prime T A, Abakumova I, *et al.* Rapid and extensive uptake and activation of hydrophobic triphenylphosphonium cations within cells[J]. *Biochemical Journal*, 2008, 411(3): 633-645.
- [16] Blackstone E, Morrison M, Roth M B. H<sub>2</sub>S induces a suspended animation-like state in mice[J]. *Science*, 2005, 308(5721): 518.
- [17] Eto K, Asada T, Arima K, *et al.* Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 293(5): 1485-1488.
- [18] Ryazantseva N V, Novitsky V V, Starikova E G, *et al.* Role of hydrogen sulfide in the regulation of cell apoptosis[J]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2011, 151(6): 702-704.
- [19] Kimura H. Hydrogen sulfide: its production, release and functions[J]. *Amino Acids*, 2011, 41(1): 113-121.
- [20] Li Q, Lancaster J R. Chemical foundations of hydrogen sulfide biology[J]. *Nitric Oxide*, 2013, 35: 21-34.
- [21] Peng H J, Cheng Y F, Dai C F, *et al.* A fluorescent probe for fast and quantitative detection of hydrogen sulfide in blood[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, 50(41): 9672-9675.
- [22] Lin V S, Lippert A R, Chang C J. Cell-trappable fluorescent probes for endogenous hydrogen sulfide and imaging H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent H<sub>2</sub>S production[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(18): 7131-7135.
- [23] Liu Y, Ding Y, Huang J, *et al.* A benzothiazole-based fluorescent probe for selective detection of H<sub>2</sub>S in living cells and mouse hippocampal tissues[J]. *Dyes and Pigments*, 2017, 138: 112-118.
- [24] Mao G J, Wei T T, Wang X X, *et al.* High-sensitivity naphthalene-based two-photon fluorescent probe suitable for direct bioimaging of H<sub>2</sub>S in living cells[J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(16): 7875-7881.
- [25] Feng X, Zhang T, Liu J T, *et al.* A new ratiometric fluorescent probe for rapid, sensitive and selective detection of endogenous hydrogen sulfide in mitochondria[J]. *Chemical Communications*, 2016, 52(15): 3131-3134.
- [26] Pak Y L, Li J, Ko K C, *et al.* Mitochondria-targeted reaction-based fluorescent probe for hydrogen sulfide[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(10): 5476-5481.
- [27] Bae S K, Heo C H, Choi D J, *et al.* A Ratiometric two-photon fluorescent probe reveals reduction in mitochondrial H<sub>2</sub>S production in parkinson's disease gene knockout astrocytes[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135(26): 9915-9923.
- [28] Liu X L, Du X J, Dai C G, *et al.* Ratiometric two-photon fluorescent probes for mitochondrial hydrogen sulfide in living cells[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2014, 79(20): 9481-9489.
- [29] Liu J, Guo X D, Hu R, *et al.* Molecular engineering of aqueous soluble triarylboron-compound-based two-photon fluorescent probe for mitochondria H<sub>2</sub>S with analyte-induced finite aggregation and excellent membrane permeability[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(1): 1052-1057.
- [30] Zhou L Y, Lu D Q, Wang Q Q, *et al.* Molecular engineering of a mitochondrial-targeting two-photon in and near-infrared out fluorescent probe for gaseous signal molecules H<sub>2</sub>S in deep tissue bioimaging[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 91: 699-705.
- [31] Qin G H, Wang J X, Huo Y J, *et al.* Sulfur dioxide inhalation stimulated mitochondrial biogenesis in rat brains[J]. *Toxicology*, 2012, 300(1/2): 67-74.
- [32] Yang J, Li K, Hou J T, *et al.* A novel coumarin-based water-soluble fluorescent probe for endogenously generated SO<sub>2</sub> in living cells[J]. *Science China Chemistry*, 2017, 60(6): 793-798.
- [33] Zhou Y, Wang Y, Xiao S Z, *et al.* A water-soluble fluorescent probe for SO<sub>2</sub> derivatives in aqueous solution and serum based on phenanthroimidazole dye[J]. *Journal of Fluorescence*, 2017, 27(3): 799-804.
- [34] Shang H M, Liu K Y, Lin W Y. Construction of a novel ratiometric near-infrared fluorescent probe for SO<sub>2</sub> derivatives and its application for biological imaging[J]. *Analytical Methods*, 2017, 9(25): 3790-3794.
- [35] Li D D, Shi Y N, Tian X H, *et al.* Fluorescent probes with dual-mode for rapid detection of SO<sub>2</sub> derivatives in living cells: Ratiometric and



- two-photon fluorescent sensors[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016, 233: 1-6.
- [36] Li H D, Yao Q C, Fan J L, *et al.* A fluorescent probe for ratiometric imaging of SO<sub>2</sub> derivatives in mitochondria of living cells[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2016, 55(6): 1477-1483.
- [37] Yang X G, Zhou Y B, Zhang X F, *et al.* A TP-FRET-based two-photon fluorescent probe for ratiometric visualization of endogenous sulfur dioxide derivatives in mitochondria of living cells and tissues[J]. *Chemical Communications*, 2016, 52(67): 10289-10292.
- [38] Wang Q, Wang W J, Li S Q, *et al.* A mitochondria-targeted colorimetric and two-photon fluorescent probe for biological SO<sub>2</sub> derivatives in living cells[J]. *Dyes and Pigments*, 2016, 134: 297-305.
- [39] Liu S R, Chang C Y, Wu S P. A fluorescence turn-on probe for cysteine and homocysteine based on thiol-triggered benzothiazolidine ring formation[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2014, 849: 64-69.
- [40] Kang Y F, Qiao H X, Meng Y L, *et al.* Selective detection of cysteine over homocysteine and glutathione by a simple and effective probe[J]. *Analytical Methods*, 2017, 9(11): 1707-1709.
- [41] Seshadri S, Beiser A, Selhub J, *et al.* Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2002, 346(7): 476-483.
- [42] Qiu X Y, Jiao X J, Liu C, *et al.* A selective and sensitive fluorescent probe for homocysteine and its application in living cells[J]. *Dyes and Pigments*, 2017, 140: 212-221.
- [43] Pastore A, Federici G, Bertini E, *et al.* Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2003, 333(1): 19-39.
- [44] Liu Z X, Zhou X, Miao Y, *et al.* A reversible fluorescent probe for real-time quantitative monitoring of cellular glutathione[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(21): 5812-5816.
- [45] Chen H L, Zhao Q, Wu Y B, *et al.* Selective phosphorescence chemosensor for homocysteine based on an iridium(III) complex[J]. *Inorganic Chemistry*, 2007, 46(26): 11075-11081.
- [46] Li H L, Fan J L, Wang J Y, *et al.* A fluorescent chemodosimeter specific for cysteine: effective discrimination of cysteine from homocysteine[J]. *Chemical Communications*, 2009, (39): 5904-5906.
- [47] Zhou X, Jin X J, Sun G Y, *et al.* A cysteine probe with high selectivity and sensitivity promoted by response-assisted electrostatic attraction[J]. *Chemical Communications*, 2012, 48(70): 8793-8795.
- [48] Niu L Y, Guan Y S, Chen Y Z, *et al.* BODIPY-based ratiometric fluorescent sensor for highly selective detection of glutathione over cysteine and homocysteine[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(46): 18928-18931.
- [49] Lv H M, Yuan D H, Liu W P, *et al.* A highly selective ES IPT-based fluorescent probe for cysteine sensing and its bioimaging application in living cells[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016, 233: 173-179.
- [50] Wang J M, Shao X M, Wang J H, *et al.* An NBD-based fluorescent turn-on probe for the detection of homocysteine over cysteine and its imaging applications[J]. *Chemistry Letters*, 2017, 46(4): 442-445.
- [51] Yang J O, Li C Y, Li Y F, *et al.* A rhodamine-based fluorescent probe with high water solubility and its application in the detection of glutathione with unique specificity[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017, 240: 1165-1173.
- [52] Wei L F, Thirumalaivasan N, Liao Y C, *et al.* Fluorescent coumarin-based probe for cysteine and homocysteine with live cell application[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2017, 183: 204-208.
- [53] Wang J Y, Liu Z R, Ren M G, *et al.* A fast-response two-photon fluorescent probe for the detection of Cys over GSH/Hcy with a large turn-on signal and its application in living tissues[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2017, 5(1): 134-138.
- [54] Dai X, Zhang T, Li Y, *et al.* An effective fluorescent probe to detect glutathione from other sulfhydryl compounds in aqueous solution and its living cell imaging[J]. *RSC Advances*, 2014, 4(97): 54650-54654.
- [55] Meng X M, Ye W P, Wang S X, *et al.* A ratiometric two-photon fluorescent probe for cysteine and homocysteine in living cells[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, 201: 520-525.
- [56] Zhu X Y, Li Y, Zan W Y, *et al.* A two-photon off-on fluorescence probe for imaging thiols in live cells and tissues[J]. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2016, 15(3): 412-419.
- [57] Han C M, Yang H R, Chen M, *et al.* Mitochondria-targeted near-infrared fluorescent off-on probe for selective detection of cysteine in living cells and *in vivo*[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, 7(50): 27968-27975.
- [58] Lim S Y, Hong K H, Kim D I, *et al.* Tunable heptamethine-azo dye conjugate as an NIR fluorescent probe for the selective detection of mitochondrial glutathione over cysteine and homocysteine[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(19): 7018-7025.
- [59] Niu W F, Guo L, Li Y H, *et al.* Highly selective two-photon fluorescent probe for ratiometric sensing and imaging cysteine in mitochondria[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(3): 1908-1914.
- [60] Lim C S, Masanta G, Kim H J, *et al.* Ratiometric detection of mitochondrial thiols with a two-photon fluorescent probe[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(29): 11132-11135.
- [61] Chen W, Rosser E W, Matsunaga T, *et al.* The development of fluorescent probes for visualizing intracellular hydrogen polysulfides [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2015, 54(47): 13961-13965.
- [62] Zhang J, Zhu X Y, Hu X X, *et al.* Ratiometric two-photon fluorescent probe for *in vivo* hydrogen polysulfides detection and imaging during lipopolysaccharide-induced acute organs injury[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(23): 11892-11899.
- [63] Zeng L Y, Chen S Y, Xia T, *et al.* Two-photon fluorescent probe for detection of exogenous and endogenous hydrogen persulfide and polysulfide in living organisms[J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(5): 3004-3010.
- [64] Gao M, Yu F B, Chen H, *et al.* Near-infrared fluorescent probe for imaging mitochondrial hydrogen polysulfides in living cells and *in vivo*[J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(7): 3631-3638.
- [65] Lin W Y, Long L L, Tan W. A highly sensitive fluorescent probe for detection of benzenethiols in environmental samples and living cells[J]. *Chemical Communications*, 2010, 46(9): 1503-1505.
- [66] Lin L, Zeng X Q, Shen Y N, *et al.* An ultrasensitive fluorescent probe for rapid determination of thiophenols[J]. *Talanta*, 2017, 165: 321-325.
- [67] Liu H W, Zhang X B, Zhang J, *et al.* Efficient two-photon fluorescent probe with red emission for imaging of thiophenols in living cells and tissues[J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(17): 8896-8903.
- [68] Ma Q J, Xu J H, Zhang X B, *et al.* A naphthalene-based two-photon fluorescent probe for selective and sensitive detection of thiophenols [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016, 229: 434-440.