

文章编号:1674-2869(2019)01-0001-11

反应型小分子荧光探针在疾病检测研究中的应用

黄鑫,刘子欣,胡利明*

北京工业大学生命科学与生物工程学院,北京市环境与病毒肿瘤学重点实验室,北京 100124

摘要:反应型小分子荧光探针能与生物标志物特异性响应而实现荧光“开-关”效应,与传统方法相比具有良好的选择性和更高的灵敏度。阴离子、阳离子、还原性物质、活性氧和酶常用于疾病研究中的生物标志物。综述了反应型小分子荧光探针在疾病标志物检测研究中的应用,介绍了探针类型、作用机理、设计思路以及不足之处,并对这类探针的发展进行展望。这类探针按作用机理主要分为三种类型:“Turn-on”型,“Turn-off”型和比率型。其难点是:实现可逆性检测的同时,保持较好的安全性、稳定性与灵敏度,并使吸收和发射波长达到近红外区域。随着纳米技术的飞速发展,与纳米材料相结合的新型探针将在疾病的预防、诊断与治疗中发挥更为重要的作用。

关键词:反应型荧光探针;生物标记物;细胞成像;疾病检测

中图分类号:Q74 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1674-2869.2019.01.001

Application of Reactive Small Molecular Fluorescent Probes in Disease Detection

HUANG Xin, LIU Zixin, HU Liming*

College of Life Science and Bioengineering & Beijing Key Laboratory of Environmental and Oncology,
Beijing University of Technology, Beijing 100124, China

Abstract: The reactive small molecule fluorescent probes, which can achieve the fluorescence "on-off" effect with the specific recognition of biomarker, possess good selectivity and higher sensitivity compared with the traditional methods. The anions, cations, reducing substances, reactive oxygen species and enzymes are usually used as biomarkers in disease research. We reviewed the applications of reactive small molecule fluorescent probes in disease detection research including the types, mechanism, design strategies, shortcomings and the future prospection. According to the reaction mechanism, the reactive fluorescent probes can be divided into three types: "Turn-on", "Turn-off" and ratio. The pivotal study in the future is to develop the probes with good reversibility detection, security, stability and sensitivity, which can adsorb and emit wavelength in the near infrared region. With the advances of nanomaterials and nanotechnology, novel fluorescence probes will play important roles in the prevention, diagnosis and treatment of diseases.

Keywords: reactive fluorescent probe; biomarkers; cell imaging; disease detection

荧光探针在生物、食品安全、环境、医学检测与成像等方面越来越受到人们的重视。近年来,纳米材料的引入,具有特异性识别功能的荧光探

针在生物医学、临床诊断以及癌症治疗等方面展现出了巨大的潜力^[1-3]。分子荧光探针具有灵敏度高、操作简便、时空分辨能力强、膜穿透性好等特

收稿日期:2018-11-23

基金项目:国家自然科学基金(21272020)

作者简介:黄鑫,硕士研究生。E-mail:huangxin007@emails.bjut.edu.cn。

*通讯作者:胡利明,博士,教授,博士研究生导师。E-mail:huliming@bjut.edu.cn

引文格式:黄鑫,刘子欣,胡利明.反应型小分子荧光探针在疾病检测研究中的应用[J].武汉工程大学学报,2019,41(1):1-11.

点,可进行细胞、活体组织荧光检测研究。与荧光成像技术结合,分子荧光探针适用于生物体系中目标分子的实时原位无损检测,可实现活细胞与活体中生物分子及其生物过程的监测。目前,分子荧光探针已成为生命科学及疾病诊断等领域不可或缺的研究手段,在细胞信号通路研究、疾病早期诊断、成像引导手术治疗等领域发挥着越来越重要的作用。分子荧光探针的设计、合成及其生物成像的应用已经成为当前跨学科的前沿交叉研究领域^[4-5]。

细胞内各种活性生物小分子和酶参与各种生物化学反应,影响细胞的多种生理过程。活性生物小分子主要包括还原性物质,如谷胱甘肽、半胱氨酸、硫化物等;活性氧类物质如过氧化氢、超氧阴离子、羟基自由基等;活性氮类物质如一氧化氮、亚硝酰等;金属阳离子如 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 等;阴离子如 Cl^- 、 SO_4^{2-} 、 NO_3^- 等;酶如硝基还原酶、细胞色素P450、酪氨酸酶等。这些活性小分子或酶参与基因表达、细胞凋亡调控、神经信号传递、细胞信号转导、离子通道调节等过程。

按识别基团与被测物的响应类型可将探针分为三类:反应型荧光探针、配位型(或称螯合型)荧光探针和专用荧光探针,如线粒体标记探针、离子通道荧光探针、受体荧光探针等^[6-8]。

反应型的荧光探针主要通过探针与目标物质发生不可逆的化学反应,从而导致其荧光性质发生变化,实现疾病相关标志物的检测^[9]。相较于其他类型,这类探针的主要优势在于:可以与很多特异性的化学反应原理结合来设计探针结构。所以这类荧光探针在应用时,不仅选择性优异,还具有更高的灵敏度。反应型荧光探针按作用机理主要分为三类:“Turn-on”型,“Turn-off”型和比率型,如图1所示。

本文主要介绍近年来基于反应的小分子荧光探针在疾病检测研究中的进展。根据其应用的对象不同进行分类介绍,并分析各种探针的反应类型、作用机理以及设计思路。根据发展现状和各类探针的优缺点,提出在发展过程中存在的问题以及对今后趋势进行展望。

1 反应型阴离子荧光探针

氟离子在牙齿保护方面有很重要的作用,然而氟化物一旦过多对人体危害也很大,氟离子可以渗透到人体内,导致氟中毒、尿石症或癌症。因此,监测氟离子在生物或环境样品中含量十分重

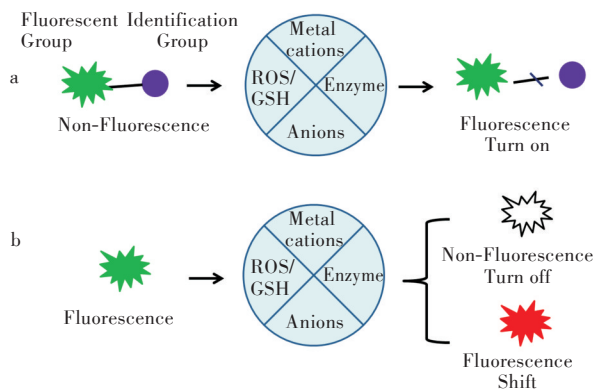


图1 反应型荧光探针的一般作用机制示意图:

(a)“Turn-on”型探针的机制,

(b)“Turn-off”型和比率型荧光探针的机制

Fig. 1 Schematic diagram of general mechanisms of reaction-based fluorescent probes:

(a)“Turn-on” type, (b)“Turn-off” and ratio types

要。Hu等^[10]设计、合成了一种用于氟离子的检测的羟基喹啉类荧光探针,如图2所示。

该探针QF基于6-羟基-喹啉-2-苯并噻唑(b-hydroxyl-quinoline-z-benzothiazole, HQB)作为荧光团,叔丁基二苯基甲硅烷基团用于特异性识别氟。QF作为比率型荧光探针,特点在于荧光团HQB在连接硅烷基后,分子内电荷转移效应(intramolecular charge transfer, ICT)被抑制,荧光减弱。氟离子可以特异性使“硅醚键”发生断裂,出现ICT效应,荧光强度增强。这种荧光探针可应用于体外水样品的检测,也可在HeLa细胞和斑马鱼中实现氟离子的双光子显微成像,间接测定其含量。

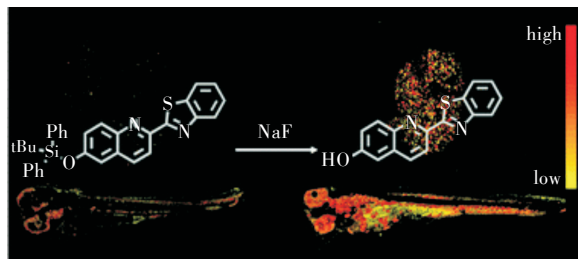


图2 检测氟离子的荧光探针

Fig. 2 Fluorescent probe for detecting fluoride ions

基于无机氰化物的剧毒属性,极低浓度可造成鱼类或哺乳动物等死亡。Xu等^[11]设计、合成了一种高选择性的比率型氰化物荧光探针N2。探针以萘二甲酰亚胺作为荧光母核,甲基化三氟乙酰胺基团作为识别 CN^- 的受体。甲基巧妙地取代三氟乙酰胺基中的“活性”H原子,提高了识别基团的选择性。当氰基阴离子进攻探针中三氟乙酰胺基的羰基而发生“亲核加成”反应时,探针的ICT效应增强伴随光谱红移并发射黄光。荧光探针N2

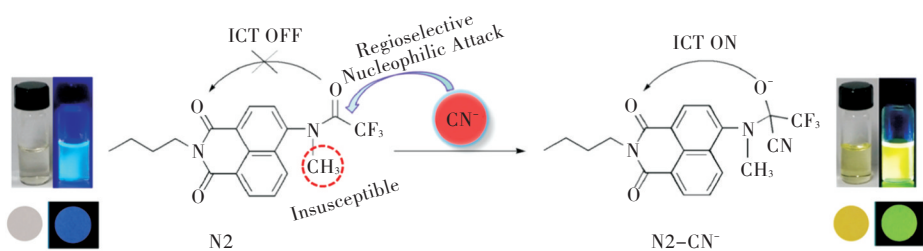


图3 检测氰离子的荧光探针

Fig. 3 Fluorescent probe for detecting cyanide ions

应用于痕量氰化物检测,能够发生肉眼可见的变化。该探针不足是:探针的吸收和发射波长均在短波长区域,可能会限制其在成像领域应用,且该研究未涉及细胞水平和活体内检测。

2 反应型金属阳离子荧光探针

许多金属阳离子与生理或病理发生过程相关,实时监测这些离子的浓度对疾病诊断和预防十分重要。过去几年,该领域取得了许多进展,发现一些高灵敏度和选择性的探针并用于活体金属离子的监测。

威尔逊病是一种铜离子在组织中积聚相关的疾病。Liu等^[12]设计、合成了一种针对铜离子的近红外罗丹明类探针,如图4所示。目前,多数基于铜的荧光探针波长检测范围都在紫外和可见光范围内^[13-18],这就导致此类探针穿透深度有限且难以与背景荧光区分,在模型动物中使用受到很大限制。Liu等选择近红外罗丹明衍生物作为荧光母核,利用肼对其羧基进行修饰,设计合成出分子内螺环探针NRh,在激发光作用下无荧光发射。铜离子与探针作用后,酰肼键发生水解断裂,螺环开环使得荧光强度增强(约600倍)。该探针不仅用于细胞水平的铜离子含量测定,还可以应用于组织、动物及人的体液,为威尔逊病的诊断提供了有效手段。

重金属离子是环境污染、急性中毒等疾病的重要源头,对其进行实时监控十分必要。汞或汞

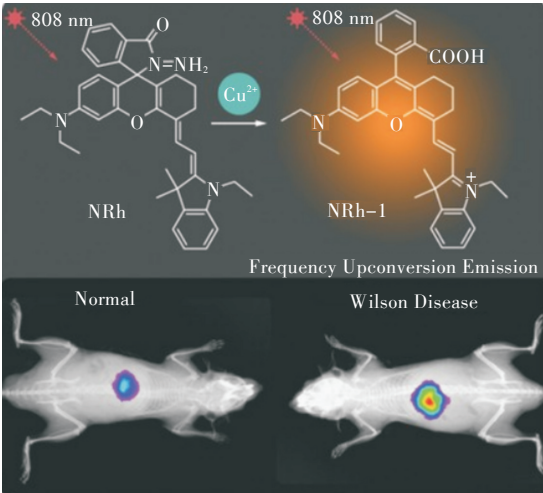


图4 检测铜离子的荧光探针

Fig. 4 Fluorescent probe for detecting copper ions

离子是典型的污染物,不论汞蒸气还是可溶性汞盐,即使在低浓度下也会对人体和其他生命体产生极大的毒性,因此环境和生物样品中痕量Hg²⁺离子的检测十分重要。Huang等^[19]设计、合成了一种氨基萘类探针(SAN)用于汞离子的检测。氨基萘类荧光物质主要依赖分子内ICT效应发光,而经过1,2-乙二硫醇修饰后ICT效应被抑制,荧光大大减弱。当探针(SAN)与汞离子作用,缩酮键水解,ICT效应不再被抑制,荧光强度增强。凭借双光子荧光探针的优点,SAN可以检测活组织中痕量的Hg²⁺,如图5所示。该探针的不足是对银离子和铅离子的抗干扰能力略差于其它离子。

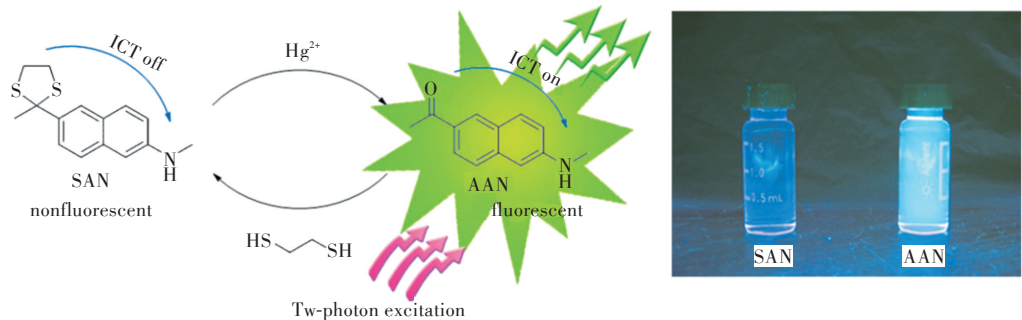


图5 检测汞离子的荧光探针

Fig. 5 Fluorescent probe for detecting mercury ions

在过渡金属中,铁在氧摄取、代谢、电子转移等生化反应中起着至关重要的作用。另一方面,过量的 Fe^{3+} 与各种疾病如癌症、肝炎、肝脏或心脏和胰腺功能障碍等有关。近年来,国内外利用荧光探针针对 Fe^{3+} 的定性定量检测开展了大量研究,难点在于避免 Cr^{3+} 和 Hg^{2+} 的干扰。Belfield等^[20]设计并合成了一种用于检测 Fe^{3+} 的新型硼二吡咯甲烷(bipyrrometheneboron difluorides, BODIPY)荧光开启型传感器,如图6所示。探针选择BODIPY荧光母核连接新型 Fe^{3+} 识别基团,该识别部位由双环穴状配体组合而成,具有高选择性和可逆性。探针可应用于水体系中并能够检测活细胞中的 Fe^{3+} 。

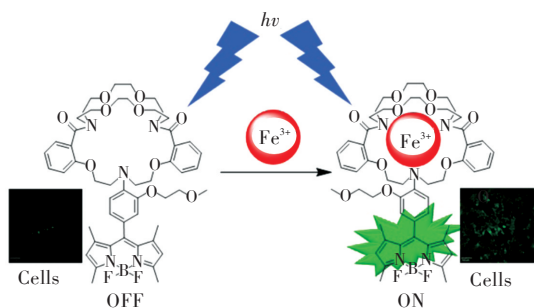


图6 用于检测铁离子的荧光探针

Fig. 6 Fluorescent probe for detecting ferric iron ions

3 反应型活性氧荧光探针

人体内发生各种生化反应,其中活性氧(reactive oxygen species, ROS)发挥着十分重要的作用。在正常生理浓度范围内,活性氧不仅参与细胞的氧化还原反应,还与细胞的生长、凋亡密切相关^[21]。当ROS水平超过机体抗氧化防御能力时,会引起氧化应激,最终导致疾病的发生,如神经退行性疾病、代谢类疾病、心血管疾病以及癌症等。近年来,针对细胞内活性氧类物质检测的荧光探针不断被报道。ROS有很多种类且能相互间转化,如次氯酸根、单线态氧、羟基自由基、过氧化氢、超氧根自由基等,这些自由基反应活性高、寿

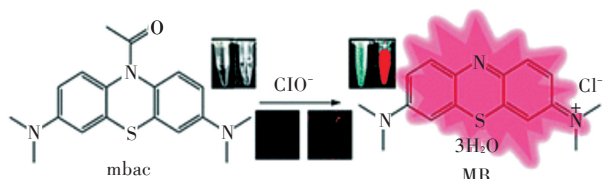


图7 检测次氯酸根离子的荧光探针

Fig. 7 Fluorescent probe for detecting hypochlorite ions

命短,一般的分析方法难免选择性差、副反应较多等缺点,而新型荧光探针能克服这些缺点。

Hu等^[21]设计、合成了一种基于亚甲蓝的近红外荧光探针,用于选择性检测次氯酸根离子。通过将乙酰基引入亚甲蓝框架中合成乙酰化亚甲蓝,可以特异性识别外源性和内源性 ClO^- 。该探针的检测限为 $0.1 \mu\text{mol/L}$,与次氯酸根离子作用后的荧光强度增加约200倍,其优点在于原料廉价且安全、合成简单、检测迅速而且在近红外发射避免了背景干扰。该探针不足在于这类荧光母核的量子产率较低,导致响应时荧光增强倍数不高。

细胞中的 H_2O_2 是通过超氧歧化酶催化或者自发歧化形成的,而体内的抗氧化性酶,如过氧化物酶(Peroxiredoxin, Prx)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx),则将体内的 H_2O_2 浓度保持在比较稳定的范围^[22]。实时监测过氧化氢的浓度在化学、生物、医学等多领域都十分重要。Lin等^[23]利用 H_2O_2 对氧鎓的亲核性,设计了近红外荧光探针,如图8所示。探针BC与 H_2O_2 作用,水得到香豆素羧酸,从而实现了 H_2O_2 的荧光识别。并且成功应用于斑马鱼中 H_2O_2 荧光成像。

Stains等^[24]通过对罗丹明进行结构改造,将母核中的氧原子换成硅酸得到探针 SiOH_2R ,如图9所示。该探针可对 H_2O_2 高效识别且具有较强的细胞膜渗透能力,与过氧化氢作用后的斯托克位移(Stoke's Shift)很大,使其在细胞内具有良好的成像能力。

另一重要的活性氧物质是羟基自由基(hydrox-

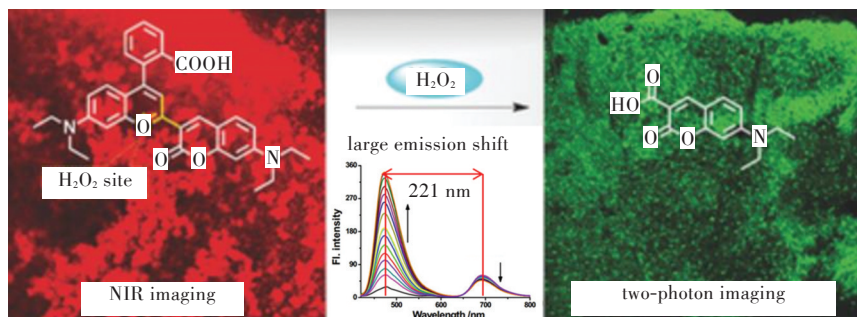


图8 检测过氧化氢的荧光探针

Fig. 8 Fluorescent probe for detecting H_2O_2

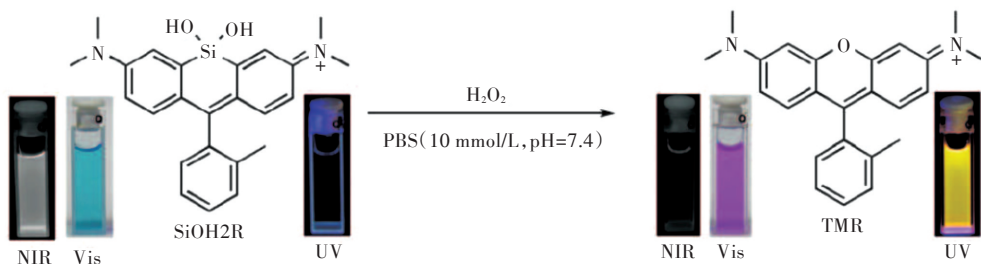


图9 荧光探针SiOH2R被过氧化氢氧化后的颜色和荧光变化

Fig. 9 Changes of color and fluorescence of probe-SiOH2R with the oxidation by H₂O₂

yl radical, $\cdot\text{OH}$),它在人体内参与DNA和蛋白质等生物大分子的降解过程,并在癌症放射治疗中发挥着重要作用。Xu等^[25]报道了一种新型荧光探针MPT-Cy2显示出活细胞和细菌中内源性 $\cdot\text{OH}$ 成像能力,探针MPT-Cy2与羟基自由基作用后荧光增强显著,如图10所示。该探针可用于产生内源性 $\cdot\text{OH}$ 的斑马鱼体内成像,还可用于定性检测各种细菌受到药物刺激后的 $\cdot\text{OH}$ 升高水平。

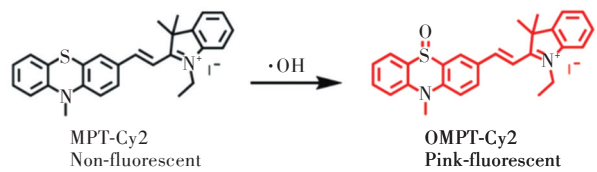


图10 探针MPT-Cy2的结构和与 $\cdot\text{OH}$ 的反应式

Fig. 10 Structure of probe MPT-Cy2 and reaction with $\cdot\text{OH}$

Cai等^[26]研究用于清除细胞内金黄色葡萄球菌的新型靶向材料,如图11所示。该工作设计、合成了由叶绿素-多肽-甘露糖三部分组成的缀合物,并以该缀合物与铜离子自组装形成的配合物二聚体作为治疗剂。进入免疫细胞的二聚体光敏剂在650 nm激光照射下能高效地产生活性氧,进而将

免疫细胞内部的细菌予以清除。

随后,Cai等^[27]报道了一种自组装增强光声信号多肽分子用于细菌感染生物成像检测。这种光声剂可以通过主动靶向、分子剪裁和顺序自组装的“动态过程”特异性地积聚在活化的巨噬细胞内。该光声剂的光声信号对细胞内感染的巨噬细胞具有很高的特异性,比主动靶向控制剂的信号增加超过2倍。该方法可通过体内光声信号检测来早期预警细菌感染,为顽固性感染疾病的检测和治疗提供了方法。

4 反应型酶类荧光探针

酶在维持生物体内稳态与生命活动的正常运行方面发挥着重要作用。某些特定酶含量及活性的异常与许多疾病的发生、发展密切相关。因此,生物体内特定酶的实时原位检测具有重要的意义。反应型小分子荧光探针因具有选择性好、灵敏度高及合成方法简便等优点,近年来研究者设计合成了大量的可用于生物体系内酶识别荧光探针,如酸性鞘磷脂酶、碱性磷酸酶和酪氨酸酶等的荧光检测探针。

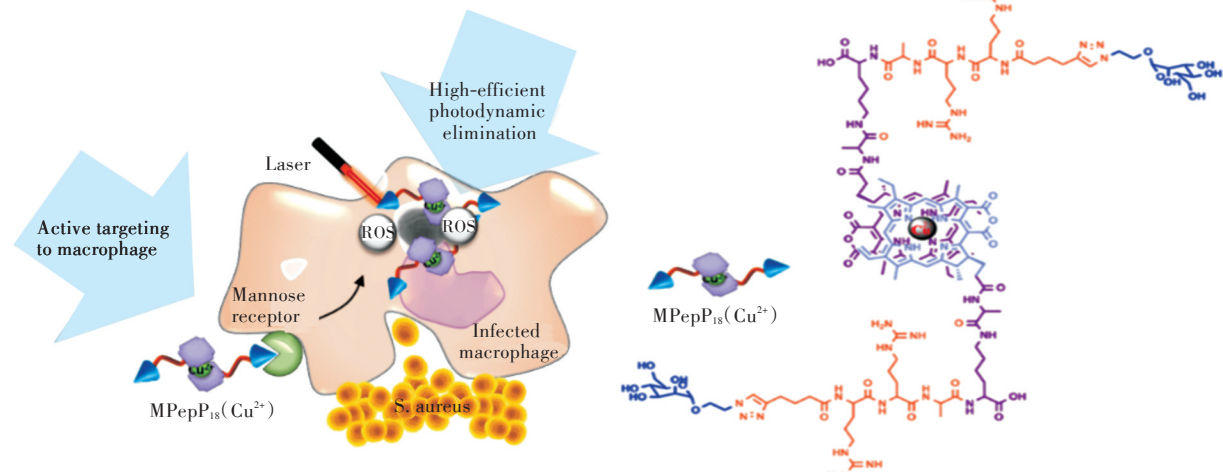


图11 光动力二聚体靶向清除细胞内的金黄色葡萄球菌

Fig. 11 Intracellular staphylococcus aureus killed by targeting photodynamic dimers

酸性鞘磷脂酶(acid sphingomyelinase, ASM)存在于所有真核细胞中,相关研究表明,ASM与急性肺损伤、癌症、肿瘤转移及重度抑郁症等疾病的发生密切相关^[28-31]。因此,ASM已被看作为多种疾病的生物标志物。

Pinkert等^[32]报道了一种基于荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)的新型小分子荧光探针,如图12所示。该探针分子以7-甲氧基-3-羧基香豆素衍生物(7-methoxycoumarin-3-carboxylic acid, MCC)作为FRET供体荧光基团,以硝基苯并噁二唑(nitrobenzoxadiazole, NBD)作为FRET受体荧光基团,该探针可被鞘磷脂衍生物识别并发生酶切反应,随着供、受体荧光基团距离的增大,FRET转移的效率显著下降,导致在550 nm处的荧光强度逐渐降低,400 nm处的荧光强度逐渐增加。因此,该探针能够在活细胞中特异性检测ASM。

碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)能够

催化碱性介质中磷酸基团的水解,是一种必需的酶。ALP水平的异常与多种疾病如乳腺癌、前列腺癌、糖尿病、骨质疏松、骨癌和肝功能异常等的发生发展相关^[33-36]。因此,建立一种可靠、简便且灵敏的ALP分析方法,对于进一步理解ALP在相关生物过程和临床实践中的作用具有重要意义。

Li等^[37]设计了一种用于检测ALP活性的近红外荧光探针,如图13所示。这种探针以半花菁染料为荧光团,以磷酸基团为识别基团。由于磷酸基团的淬灭作用,探针本身是无荧光的。体系中存在的ALP能够除去磷酸基团,使得探针在738 nm处产生荧光发射峰。该探针对ALP高度灵敏,能够被应用于生物样品中内源性ALP活性的检测。

近年来,Li等^[38]针对酪氨酸酶(tyrosinase, TYR)设计合成了几种反应型荧光探针。由于酪氨酸酶在黑色素瘤细胞中过量表达,并且其与肿瘤的恶性侵袭能力正相关,因此酪氨酸酶被认为是黑色素瘤的生物标志物。在发现、诊断黑色素

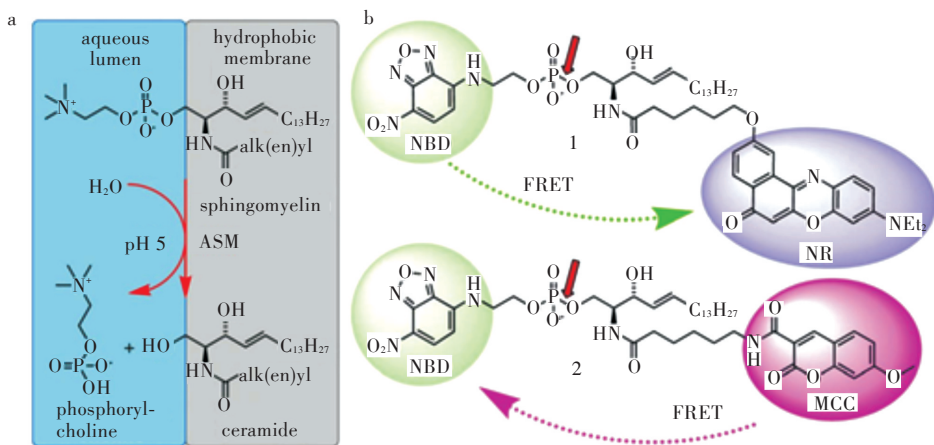


图12 基于FRET荧光探针的酸性鞘磷脂酶活性检测:(a)由ASM催化的脂-水界面处的鞘磷脂水解,(b)合成的探针NBD和MCC红色箭头表示ASM水解位点

Fig. 12 Detection of ASM activity by FRET-based fluorescence probe : (a) Sphingomyelin hydrolysis at the lipid-water interface catalyzed by ASM, (b) Synthesized NBD and MCC probes. The red arrow indicates the ASM hydrolysis site

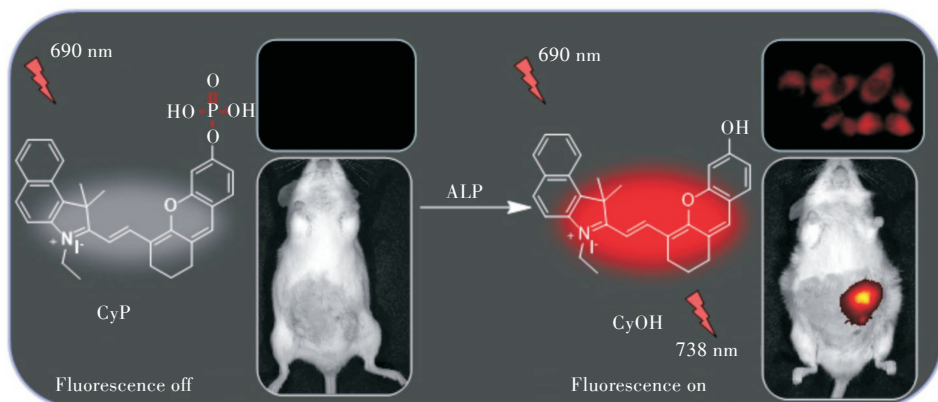


图13 体内ALP活性检测的荧光探针

Fig. 13 Fluorescence probe for detection of ALP activity in vivo

瘤进程中,设计、合成选择性较高的酪氨酸酶荧光探针具有十分重要的意义。首先,设计合成了香豆素类TYR荧光探针,并对其生物学效应进行研究。荧光母核选用7-氨基-4-三氟甲基香豆素基团,如图14所示,连接4种不同的酶识别基团合成出四种TYR荧光探针(F1-F4),经过筛选发现探针F2性质具有优良的荧光性质^[39]。由于7-氨基-4-三氟甲基香豆素基团的斯托克位移较长,能够有效地避免光学成像过程中的自淬灭和增益误差^[40],该探针得以在细胞水平上高选择性、高灵敏度地检测TYR。这类探针的不足是在分子水平和细胞水平检测TYR活力的时间较长,增加了检测的难度和准确度。

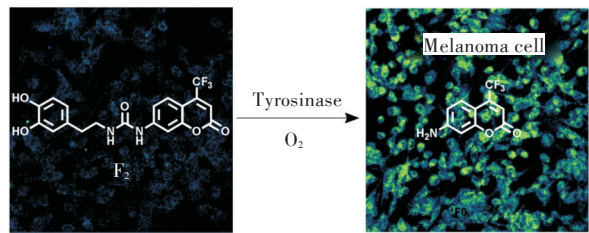


图14 在酪氨酸酶存在下探针F2的降解

Fig. 14 Degradation of probe F2 in the presence of TYR

Li等^[41]还通过计算该类探针水解过程中吉布斯自由能的变化,优选释放最大自由能的“脲”结构,如图15所示。以“试卤灵”为荧光基团设计了一种新型TYR荧光探针Res1。在水溶液中,Res1有更好的灵敏度、选择性以及更快的反应速率。但是在细胞水平进行测定时,其响应时间较长,所以考虑对探针Res1的荧光母核结构进行改变。该探针的不足在于其分子内含有3个酚羟基,极性较大,容易在碱性环境中电离生成酚羟基负离子。而酚羟基的理化性质会影响探针的细胞膜穿透能力,进而影响探针发挥作用的时效性。

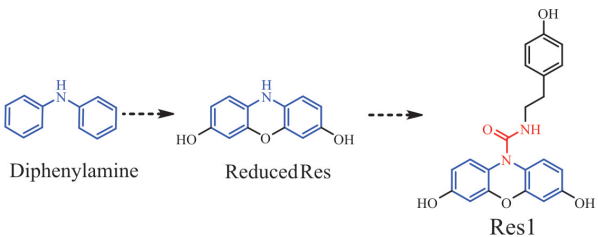


图15 新型TYR荧光探针Res1的设计

Fig. 15 Design of a novel fluorescent probe Res1 for TYR

采用吩噻嗪类荧光母核合成了近红外TYR探针MB1。该探针不但可以用于诊断,还可以杀伤黑色素瘤细胞,如图16所示。探针MB1可以选择性地对黑色素瘤细胞快速响应^[42],解决了前期研究中的不足。另外,在近红外区域激光照射下,探

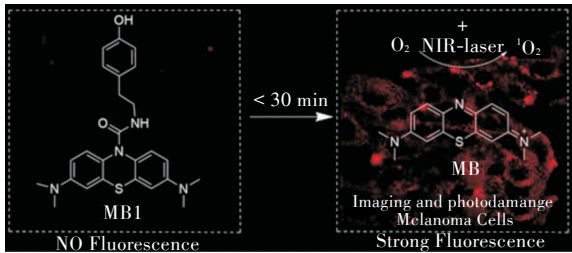


图16 在酪氨酸酶存在下探针MB1的降解

Fig. 16 Degradation of probe MB1 in the presence of TYR

针还可通过生成单线态氧达到杀伤黑色素瘤细胞目的。

5 反应型谷胱甘肽荧光探针

谷胱甘肽(glutathione, GSH)是真核细胞中含量最多的硫醇类化合物,其在生物体的许多生理过程中发挥着重要作用。GSH水平的异常改变与儿童发育迟缓、肝功能损伤、皮肤病、艾滋病、阿尔茨海默病、癌症、糖尿病、心血管疾病等直接相关^[43-44],所以细胞内谷胱甘肽含量的检测对细胞功能研究和病理分析都具有重要的意义。以荧光探针为基础的荧光分析法因其操作简便、灵敏度高和专一性强等优点而备受大家关注,并且有机小分子荧光探针还可以应用于活体细胞和生物体的成像技术。

Wu等^[45]近期设计并合成了一种GSH触发的新型“诊疗合一”的生物探针,如图17所示。该探针主要由抗癌药物喜树碱、双光子近红外荧光团和对硫醇类化合物特异性响应的二硝基苯磺酰基团,通过一个间隔基团相互连接所组成。由于二硝基苯磺酰基吸电子特性,可以通过光致电子转移(photoinduced electron transfer, PET)/ICT效应使近红外荧光团发生淬灭。体系中存在的GSH能够触发一系列反应并将喜树碱和近红外荧光团共同释放出来,由于光致电子转移作用的消失,荧光团的荧光逐渐恢复。因此该探针能够实现基于GSH响应的肿瘤诊断及治疗,将其应用在细胞与小鼠模型上,效果十分明显。

Jiang等^[46]报道了一种能够对活细胞中GSH动态变化进行实时定量监测的荧光探针,该探针与GSH之间的反应基于可逆的Michael加成反应,如图18所示。该探针引入了吸电子基团氰基,使解离平衡常数在合适的范围内。与此同时,借鉴前人的研究工作^[47],用四元氮杂环丁烷基取代二乙基氨基,显著提高了探针的量子产率。探针结构中羧基的引入使其具备了较好的水溶性,确保

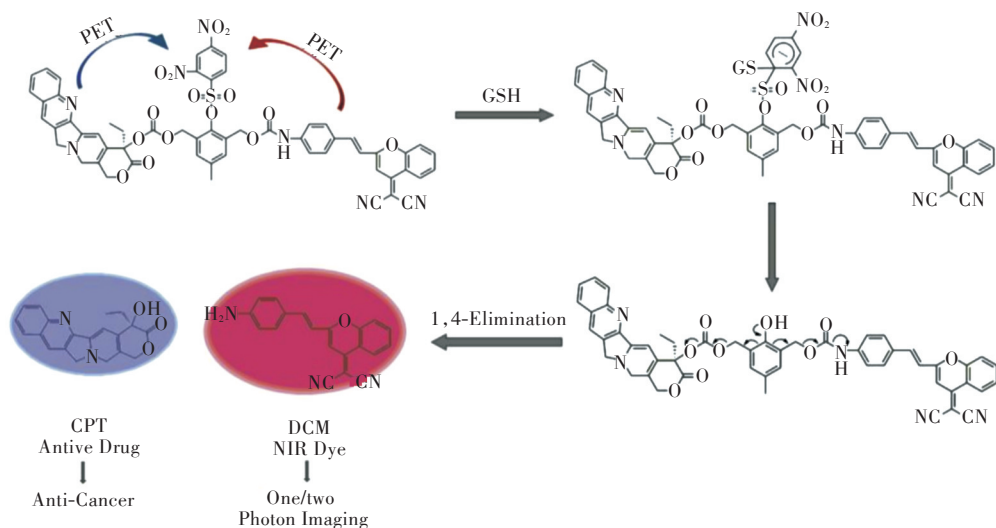


图17 谷胱甘肽激活的生物探针

Fig. 17 GSH-activated biological probe

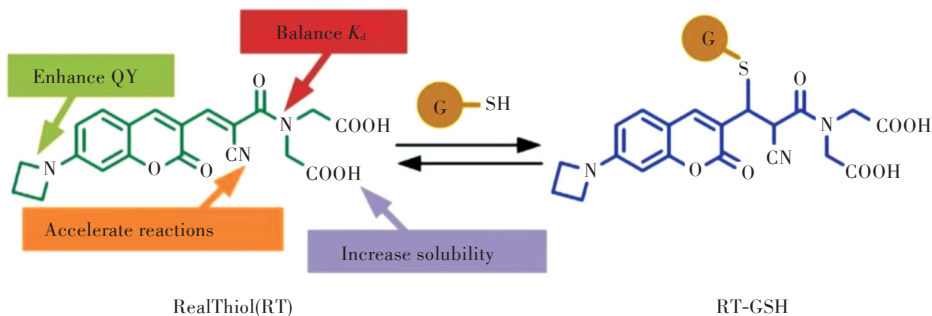


图18 基于 Michael 加成反应的 GSH 可逆荧光探针

Fig.18 Reversible fluorescence probe for GSH based on Michael addition reaction

了探针在细胞中的均匀分布。凭借对 GSH 宽动态范围的比率荧光响应,该探针能够用于单个细胞中 GSH 水平的共聚焦成像和基于流式细胞术的高通量定量分析。这项研究的不足之处在于:羧基的引入虽然提升了探针的水溶性,但也在一定程度上减缓了探针与 GSH 的反应速率。未来还应寻找更为合适的具有水溶性的阳离子基团以替代羧基。

Guo 等^[48]首次报道了一种用于 GSH 检测的二级比率荧光响应探针,如图 19 所示。利用表面活性剂 CTAB(cetyltrimethylammonium bromide)增强

GSH 与荧光探针的亲核取代反应,探针的 3 位和 5 位氯得以被 GSH 的巯基所取代。由于硫醚取代基能够促进 BODIPY 类染料的光谱发生红移,故单、双取代产物具有不同的荧光发射波长。凭借良好的特异性,该探针能够实现 GSH 的快速检测,且具有较高的灵敏度。

近年来,用于双重或多重分析物检测的荧光探针被广泛报道。这类探针能够实现分子逻辑门的构建以及更为精准的医学诊断。James 等报道了一种同时检测过氧亚硝酸根(peroxynitrite, ONOO^-)与 GSH 的新型“AND”逻辑荧光探针

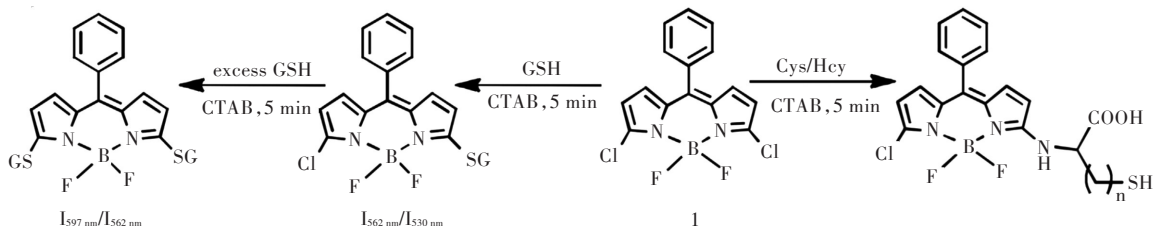


图19 用于 GSH 检测的二级比率荧光响应探针

Fig. 19 Two stages ratio metric fluorescent responsive probe for GSH detection

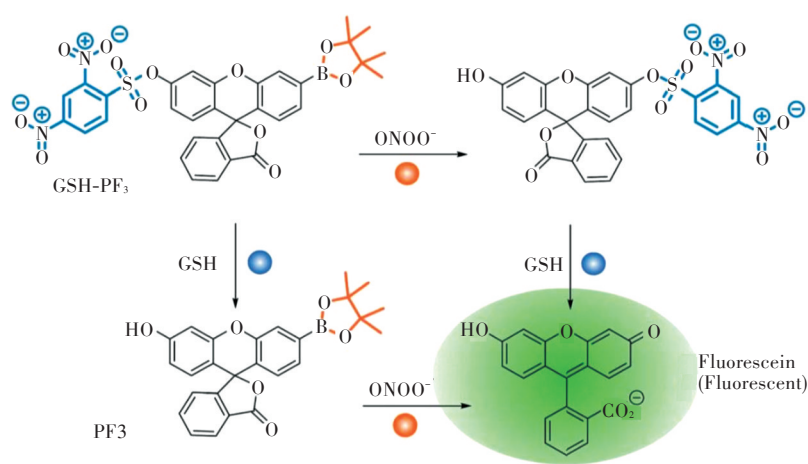


图 20 GSH-PF3 探针的结构与同时检测 GSH 和 ONOO⁻ 的机理

Fig. 20 Structure of GSH-PF3 probe and its mechanism for simultaneous detection of GSH and ONOO⁻

GSH-PF3^[49],如图 20 所示。该探针单独与 GSH 或 ONOO⁻作用时,荧光响应均十分微弱,当体系中同时存在 GSH 与 ONOO⁻两种分析物时,其荧光强度有了显著的增强。该探针具有良好的选择性,能够监测代谢产物 GSH 与 ONOO⁻的共存。这一工作为开发其它的用于医学诊断的“AND”逻辑荧光探针提供了基础。

6 结 语

近年来,反应型小分子荧光探针这一领域迅速发展,研究者们可以根据不同的化学反应机理来设计各种不同结构的选择性探针。但是,一些问题也是普遍存在的,比如探针的水溶性、穿膜性能、细胞毒性、在细胞或器官中的保留和清除能力以及大动物荧光成像等。为了解决这些问题,设计出应用前景好的荧光探针,科研工作者需要不断地尝试,并将计算机模拟、化学反应机理与生物医学进行紧密的结合。同时,随着荧光分析仪器的不断发展进步,荧光成像已经可以达到细胞器级别。利用荧光探针对于未知的生理变化进行实时成像,能够更加清晰地揭示疾病的变化过程。

反应型荧光探针的不足之处:1)大部分这类探针受限于反应机制,难以实现可逆检测;2)这类探针的安全性研究多是关于探针在某细胞中的细胞毒性,极少研究其在活体动物内的代谢过程和其他影响;3)这类探针虽然普遍体外稳定性良好,但许多探针的生物稳定性仍有待研究,如:探针是否会与特定蛋白发生特异性结合而失去检测效力;4)部分探针受限于反应机制,灵敏度不高;5)目前所报道的反应型探针大部分都需要紫外或可见光激发,这有可能导致较高的背景荧光干扰,同时容易造成光损伤,从而限制其在生物系统中的

进一步应用。

开发性能优良的反应型小分子荧光探针一定会成为新的研究热点,致力于研究各类标志物的实时含量及其对生理、病理的影响、作用机制和分布等。这对疾病诊疗、药效评价、环境治理等领域的发展都具有重要的意义。未来,相关研究趋势可能涉及以下几个方面:

1)在疾病监测领域,设计诊疗、预防结合的新型探针。治疗型探针可通过释放药物或刺激局部产生杀伤肿瘤细胞的活性氧实现治疗;

2)与纳米材料结合,实现靶向递送;该类探针也可应用到活体蛋白质标记成像中。

今后探针研究发展的主要方向应该兼具以下特点:发射在(近)红外区域、水溶性好、高灵敏度、高选择性、高稳定性、响应迅速、低毒性并且活体内可降解。总之,在现有发展基础上,研究者还应探索新型荧光母核和识别基团,探索性质更优异的反应型小分子荧光探针。

参考文献

[1] SUN Y, CAO W P, LI S L, et al. Ultrabright and multicolorful fluorescence of amphiphilic polyethyleneimine polymer dots for efficiently combined imaging and therapy [J]. Scientific Reports, 2013, 3 (10):3036-3041.

[2] HU L M, SUN Y, LI S L, et al. Multifunctional carbon dots with high quantum yield for imaging and gene delivery [J]. Carbon, 2014, 67:508-513.

[3] SUN Y, CAO W P, HU L M, et al. Controlling fluorescence emission from oxygen-doped polyethylenimines and its potential for gene delivery combined with imaging [J]. Journal of Controlled Release, 2013, 172:E122.

- [4] TERA I T, NAGANO T. Fluorescent probes for bioimaging applications [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2008, 12(5):515–521.
- [5] HERMANSON G T. Bioconjugate techniques [M]. Rockford:Academic Press, 2013.
- [6] YU H B, LI M, WANG W P, et al. High throughput screening technologies for ion channels [J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2016, 37(1):34–43.
- [7] BAI M, BORNHOP D J. Recent advances in receptor-targeted fluorescent probes for in vivo cancer imaging [J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2012, 19(28):4742–4758.
- [8] SCHWALL C T, ALDER N N. Site-specific fluorescent probe labeling of mitochondrial membrane proteins [M]. Totowa N J: Humana Press, 2013:103–120.
- [9] CHAN J, DODANI S C, CHANG C J. Reaction-based small-molecule fluorescent probes for chemoselective bioimaging [J]. *Nature Chemistry*, 2012, 4(12):973–984.
- [10] HU W, ZENG L Y, WANG Y Y, et al. A ratiometric two-photon fluorescent probe for fluoride ion imaging in living cells and zebrafish [J]. *Analyst*, 2016, 141(18):5450–5455.
- [11] HAO Y Q, NGUYEN K H, ZHANG Y T, et al. A highly selective and ratiometric fluorescent probe for cyanide by rationally altering the susceptible H-atom [J]. *Talanta*, 2018, 176:234–241.
- [12] LIU Y, SU Q Q, CHEN M, et al. Near-infrared upconversion chemodosimeter for in vivo detection of Cu^{2+} in wilson disease [J]. *Advanced Materials*, 2016, 28(31):6625–6630.
- [13] HIRAYAMA T, VAN DE BITTNER G C, GRAY L W, et al. Near-infrared fluorescent sensor for in vivo copper imaging in a murine Wilson disease model [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(7):2228–2233.
- [14] YUAN L, LIN W Y, ZHENG K B, et al. ChemInform abstract: far-red to near infrared analyte-responsive fluorescent probes based on organic fluorophore platforms for fluorescence imaging [J]. *Cheminform*, 2013, 44(20):622–661.
- [15] IDRIS N M, JAYAKUMAR M K, BANSAL A, et al. Upconversion nanoparticles as versatile light nanotransducers for photoactivation applications [J]. *Chemical Society Reviews*, 2015, 44(6):1449–1478.
- [16] LIU Q, FENG W, YANG T S, et al. Upconversion luminescence imaging of cells and small animals [J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(10):2033–2044.
- [17] ZHOU B, SHI B Y, JIN D C, et al. Controlling upconversion nanocrystals for emerging applications. [J]. *Nature Nanotechnology*, 2015, 10(11):924–936.
- [18] ZHANG Y J, WANG X, ZHOU Y, et al. Influence of donor on the sensing performance of a series of through-bond energy transfer-based two-photon fluorescent Cu^{2+} probes [J]. *Photochemistry & Photobiology*, 2016, 92(4):528–536.
- [19] HUANG R, ZHENG X L, WANG C C, et al. Reaction based two-photon fluorescent probe for turn-on mercury (II) sensing and imaging in live cells [J]. *Chemistry an Asian Journal*, 2012, 7(5):915–918.
- [20] SUI B L, TANG S M, LIU T H, et al. Novel BODIPY-based fluorescence turn-on sensor for Fe^{3+} and its bioimaging application in living cells [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2014, 6(21):18408–184012.
- [21] HUANG X, LI Z, CAO T, et al. A methylene blue-based near-infrared fluorescent probe for rapid detection of hypochlorite in tap water and living cells [J]. *RSC Advances*, 2018, 8:14603–14608.
- [22] 后际挺, 李坤, 覃彩芹, 等. 活性氧簇的小分子荧光探针研究进展 [J]. *有机化学*, 2018, 38(3):612–628.
- [23] DONG B L, SONG X Z, KONG X Q, et al. Simultaneous near-infrared and two-photon in vivo imaging of H_2O_2 using a ratiometric fluorescent probe based on the unique oxidative rearrangement of oxonium [J]. *Advanced Materials*, 2016, 28(39):8755–8759.
- [24] ZHOU X Q, LESIAK L, LAI R, et al. Chemoselective alteration of fluorophore scaffolds as a strategy for the development of ratiometric chemodosimeters [J]. *Angewandte Chemie*, 2017, 129(15):4197–4200.
- [25] LIU F, DU J, SONG D, et al. A sensitive fluorescent sensor for the detection of endogenous hydroxyl radicals in living cells and bacteria and direct imaging with respect to its ecotoxicity in living zebra fish [J]. *Chemical Communications*, 2016, 52(25):4636–4639.
- [26] CAI Q, FEI Y, AN H W, et al. Macrophage-instructed intracellular *S. aureus* killing by targeting photodynamic dimers [J]. *ACS Applied Materials Interfaces*, 2018, 10:9197–9202.
- [27] CAI Q, FEI Y, HU L M, et al. Chemotaxis-instructed intracellular *S. aureus* infection detection by a targeting and self-assembly signal enhanced photoacoustic probe [J]. *Nano Letters*, 2018, 18(10):6229–6236.
- [28] G₅GGEL R, WINOTO-MORBACH S, VIELHABER G, et al. PAF-mediated pulmonary edema: a new role

- for acid sphingomyelinase and ceramide [J]. *Nature Medicine*, 2004, 10: 155–160.
- [29] PETERSEN N H, OLSEN O D, GROTH-PEDERSEN L, et al. Transformation-associated changes in sphingolipid metabolism sensitize cells to lysosomal cell death induced by inhibitors of acid sphingomyelinase[J]. *Cancer Cell*, 2013, 24: 379–393.
- [30] CARPINTEIRO A, BECKER K A, JAPTOK L, et al. Regulation of hematogenous tumor metastasis by acid sphingomyelinase [J]. *EMBO Molecular Medicine*, 2015, 7: 714–734.
- [31] GULBINS E, PALMADA M, REICHEL M, et al. Acid sphingomyelinase-ceramide system mediates effects of antidepressant drugs [J]. *Nature Medicine*, 2013, 19: 934–938.
- [32] PINKERT T, FURKERT D, KORTE T, et al. Amplification of a FRET probe by lipid-water partition for the detection of acid sphingomyelinase in live cells [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56: 2790–2794.
- [33] LORENTE J A, VALENZUELA H, MOROTE J, et al. Serum bone alkaline phosphatase levels enhance the clinical utility of prostate specific antigen in the staging of newly diagnosed prostate cancer patients [J]. *European Journal of Nuclear Medicine*, 1999, 26 (6): 625–632.
- [34] KINUE O, KATSUYA S, YOSHITAKA M, et al. High-molecular intestinal alkaline phosphatase in chronic liver diseases [J]. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2007, 21: 133–139.
- [35] COLOMBATTO P, RANDONE A, CIVITICO G, et al. Hepatitis G virus RNA in the serum of patients with elevated gamma glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase: a specific liver disease [J]. *Journal of Viral Hepatitis*, 1996(3): 301–306.
- [36] COUTTENYE M M, D'HAESE P C, VAN HOOFF V O, et al. Low serum levels of alkaline phosphatase of bone origin: a good marker of adynamic bone disease in haemodialysis patients [J]. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 1996, 11: 1065–1072.
- [37] LI S J, LI C Y, LI Y F, et al. Facile and sensitive near-infrared fluorescence probe for the detection of endogenous alkaline phosphatase activity in vivo [J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89: 6854–6860.
- [38] FREEMAN R, ELBAZ J, GILL R, et al. Analysis of dopamine and tyrosinase activity on ion-sensitive field-effect transistor (ISFET) devices [J]. *Chemistry A European Journal*, 2007, 13(26): 7288–7293.
- [39] LI Z P, WANG Y F, ZHANG X, et al. A tyrosinase-triggered oxidative reaction-based "Turn-on" fluorescent probe for imaging in living melanoma cells [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017, 242: 189–194.
- [40] XUE X D, JIN S B, LI Z P, et al. Through-bond energy transfer cassette with dual-stokes shifts for "double checked" cell imaging [J]. *Advanced Science*, 2017(4): 1700229–1700235.
- [41] 李志鹏. 酪氨酸酶荧光探针的设计、合成及生物学效应研究[D]. 北京: 北京工业大学, 2018.
- [42] LI Z P, WANG Y F, ZENG C C, et al. Ultrasensitive tyrosinase-activated turn-on near-infrared fluorescent probe with a rationally designed urea bond for selective imaging and photodamage to melanoma cells [J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90: 3666–3669.
- [43] YIN C X, HUO F J, ZHANG J J, et al. Thiol-addition reactions and their applications in thiol recognition [J]. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42: 6032–6059.
- [44] TAPIERO H, TOWNSEND D M, TEW K D, et al. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds [J]. *Biomed Pharmacoth*, 2003, 57: 134–144.
- [45] WANG Z Q, WU H, LIU P L, et al. A self-immolative prodrug nanosystem capable of releasing a drug and a NIR reporter for in vivo imaging and therapy [J]. *Biomaterials*, 2017, 139: 139–150.
- [46] JIANG X Q, CHEN J W, BAJIC' A, et al. Quantitative real-time imaging of glutathione [J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 16163–16174.
- [47] GRIMM J B, ENGLISH B P, CHEN J J, et al. A general method to improve fluorophores for live-cell and single-molecule microscopy [J]. *Nature Methods*, 2015, 12(3): 244–250.
- [48] GONG D Y, RU J X, CAO T, et al. Two-stage ratiometric fluorescent responsive probe for rapid glutathione detection based on BODIPY thiol-halogen nucleophilic mono-or disubstitution [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 258: 72–79.
- [49] SEDGWICK A C, HAN H H, GARDINER J E, et al. The development of a novel AND logic based fluorescence probe for the detection of peroxynitrite and GSH [J]. *Chemical Science*, 2018 (9) : 3672–3676.