有机分子荧光探针成像检测线粒体内ROS的研究进展

肖海滨, 李平*, 张雯, 张卫, 唐波*

山东师范大学化学化工与材料科学学院; 分子与纳米探针教育部重点实验室, 济南 250014

*通讯作者, E-mail: tangb@sdu.edu.cn; lip@sdu.edu.cn

收稿日期: 2017-03-20; 接受日期: 2017-05-03; 网络版发表日期: 2017-07-21

国家重点基础研究发展计划(编号: 2013CB933800)、国家自然科学基金(编号: 21390411, 21535004, 21475079, 21675105)、长江学者奖励计划和教育部“创新团队发展计划”(编号: IRT_16R46)资助项目

摘要 线粒体是细胞的“能量工厂”, 它利用氧气进行氧化磷酸化产生三磷酸腺苷(ATP), 为细胞及生命体提供能量. 同时, 伴随着呼吸链中电子的泄漏, 多种活性氧物种(ROS)在线粒体内快速产生. 线粒体ROS在维持氧化还原平衡、参与调控细胞的增殖、分化、凋亡等行为方面发挥重要作用. 当ROS水平超过机体抗氧化防御能力时, 会导致疾病的发生. 因此, 发展准确检测线粒体ROS的方法, 对深入探究ROS的细胞功能调控及相关疾病的发生发展意义重大. 由于ROS存在浓度低、寿命短、反应活性高等特点, 对其进行精准检测是化学、生物学及医学领域的一大挑战. 荧光成像技术具有时空分辨率高、生物相容性好、灵敏度高等显著优势, 成为实时检测细胞及活体内ROS的有力工具. 近年来, 相继发展了诸多荧光探针, 实现了线粒体ROS的成像分析. 本文着重总结与评述了近年来发展靶向线粒体、荧光可视化多种ROS有机分子探针工作的研究进展, 并在构建新型线粒体荧光探针、进一步利用荧光成像方法深入剖析线粒体ROS的细胞学功能等方面进行了探讨与展望.

关键词 线粒体, 有机分子荧光探针, 活性氧物种, 活细胞, 荧光成像

1 引言

细胞是生命体最基本的结构与功能单元, 细胞内各种细胞器对细胞功能的发挥起到至关重要的作用^[1]. 其中细胞的“能量工厂”——线粒体, 利用氧气进行氧化磷酸化, 产生三磷酸腺苷(ATP), 为细胞及生命体提供能量^[2]. 同时, 伴随着呼吸链电子泄露, 线粒体成为多种活性氧物种(ROS)产生并相互转化的主要位点. 线粒体ROS在维持氧化还原平衡、参与调控细胞的增

殖、分化、凋亡等行为方面发挥重要作用. 此外, 当ROS水平超过机体抗氧化防御能力时, 会引起氧化应激, 最终会导致疾病的发生, 如神经退行性疾病、代谢类疾病、心血管疾病以及癌症^[3-5]. 因此, 准确检测线粒体ROS, 对于研究线粒体ROS的细胞功能调控以及在疾病发生发展过程中的作用至关重要.

线粒体ROS存在浓度低、寿命短、反应活性高等特点. 例如, 细胞内超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)浓度约为 10^{-10} M, 过氧化氢(H_2O_2)约为 10^{-7} M, 羟基自由基

引用格式: 肖海滨, 李平, 张雯, 张卫, 唐波. 有机分子荧光探针成像检测线粒体内ROS的研究进展. 中国科学: 化学, 2017, 47: 955-972
Xiao H, Li P, Zhang W, Zhang W, Tang B. Recent advances in mitochondria-targetable organic molecule fluorescent probes for imaging of ROS. *Sci Sin Chim*, 2017, 47: 955-972, doi: 10.1360/N032017-00054

($\bullet\text{OH}$)约为 10^{-15} M , 它们的半衰期分别约为 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-9} s ^[6]. 此外, 多种ROS之间是可以互相转化的. 图1展示了线粒体中多种ROS的产生和转化途径^[7]. 线粒体电子传递链(ETC)泄露的电子与氧气结合, 形成单电子还原产物 $\text{O}_2^{\bullet-}$, 它可以作为其他ROS的前体. 例如, $\text{O}_2^{\bullet-}$ 能够在超氧化物歧化酶(SOD)催化下产生 H_2O_2 ; 与一氧化氮(NO)产生过氧亚硝酸酐(ONOO^-). 线粒体内的 H_2O_2 除了由 $\text{O}_2^{\bullet-}$ 转化而来, 还可以通过单胺氧化酶(MAO)催化氧化脱氨反应得到. 在二价铁/铜离子介导的芬顿反应(Fenton reaction)或者髓过氧化物酶(MPO)作用下, H_2O_2 可分别转化为 $\bullet\text{OH}$ 或次氯酸(HClO). H_2O_2 还可与产生的 HClO 作用进一步生成单线态氧($^1\text{O}_2$). 在一氧化氮合酶(NOS)催化下, 氧气和L-精氨酸可以反应生成NO. 综上所述, 线粒体中多种ROS不仅具有浓度水平低、存在时间短等特点, 而且容易转化, 这为它们的精准检测带来了困难. 因此, 要想彻底了解线粒体ROS在信号转导等方面的细胞学功能, 急需发展高灵敏度、高选择性、亚细胞水平上的实时原位分析的新方法.

荧光成像技术具有时空分辨率高、生物相容性好、灵敏度高显著优势, 成为实时检测细胞及活体内生物活性分子的有力工具^[8-10]. 该技术的应用离不开性能优良的荧光探针, 探针与待测物反应前后, 荧光信号的变化可以指示待测物的浓度波动. 在已有的蛋白荧光探针、纳米荧光探针和有机分子荧光探针中, 荧光蛋白探针构建过程较为复杂, 纳米荧光探针稳定性欠佳, 从而造成这两类探针的广泛应用受到限制. 有机分子荧光探针尺寸小、合成相对简易、易改造, 因此更加适宜在亚细胞水平对活性分子进行精准检测. 近年来, 研究者们成功发展了一系列靶向线粒体, 定性或定量检测ROS的有机分子荧光探针^[7,11-15].

图1 线粒体中多种ROS的产生及相互转化示意图^[7] (网络版彩图)

利用这些探针, 实现了在细胞、组织、活体内线粒体ROS的荧光成像分析, 建立了高灵敏度、高选择性、实时成像研究线粒体ROS的新方法, 有力地推动了对线粒体ROS生物学作用的深入了解.

目前, 这些有机分子荧光探针定位线粒体通常的原理是, 基于线粒体具有 -180 mV 的内外膜电势差^[16], 利用探针结构中的脂溶性阳离子, 在线粒体膜电势的驱动下, 使探针聚集到线粒体内. 如图2所示, 这类靶向线粒体的荧光探针的定位结构大多分为两类: (1) 引入带正电荷的三苯基膦靶向基团($-\text{P}^+\text{Ph}_3$); (2) 自身具有线粒体定位能力的荧光团, 如带正电荷的季铵盐结构(如吡啶、喹啉、金属配合物等), 尤其是花菁、罗丹明等. 此外, 还有一些其他定位线粒体的方法, 如利用有机分子受体特异性结合线粒体内蛋白, 或利用靶向线粒体的多肽序列等. 为了方便地了解这些线粒体ROS探针的构建与成像应用, 认识线粒体ROS在生物学与化学方面的作用, 在这篇评述中, 我们根据线粒体ROS种类, 系统综述了近年来用于成像检测线粒体中ROS的有机分子荧光探针, 并在构建新型线粒体荧光探针、进一步利用荧光成像方法深入剖析线粒体ROS的细胞学功能等方面进行探讨与展望.

2 检测线粒体ROS的荧光探针

2.1 检测线粒体 $\text{O}_2^{\bullet-}$ 的荧光探针

$\text{O}_2^{\bullet-}$ 是线粒体中最重要和最先产生的ROS, 是其他

图2 通用的靶向线粒体的有机分子结构示意图(网络版彩图)

ROS的前体. $O_2^{\cdot-}$ 浓度的变化在一定程度上决定其他ROS的水平变化. 大量研究表明, $O_2^{\cdot-}$ 与众多生理学和病理学过程密切相关. 因此, 设计合成理想的靶向线粒体荧光检测 $O_2^{\cdot-}$ 的分子探针, 对于理解 $O_2^{\cdot-}$ 的生物学作用, 揭示相关疾病的发生发展过程至关重要.

杨丹等^[17]设计合成的探针**1**, 实现了对线粒体中 $O_2^{\cdot-}$ 的高选择性和高灵敏度的成像检测. 该探针以荧光素为发色团, 以带有正电荷的三苯基膦为线粒体靶向单元, 三氟甲基磺酸酯为识别位点. 通过 $O_2^{\cdot-}$ 与三氟甲基磺酸酯的亲核重排反应, 引起磺酸酯键的断裂, 使内酯型非共轭的荧光素结构形成强荧光的开环共轭结构. 该课题组基于该探针灵敏度高的优势, 实现了人类THP-1细胞在静息状态及抗霉素A刺激下, 线粒体中 $O_2^{\cdot-}$ 浓度变化的荧光可视化成像. 钟文婉等^[18]以2,4-二硝基磺酸酯为 $O_2^{\cdot-}$ 识别单元, 荧光素为发色团, 通过氨基与荧光素上的异硫氰酸的偶联作用, 得到了带有线粒体定位肽链(MLSP)的荧光探针**2**. 利用该探针, 该课题组可视化了在佛波醇-12-豆蔻酸酯-13-乙酸酯(PMA)和单壁纳米管刺激作用下活细胞线粒体中 $O_2^{\cdot-}$ 的产生(图3).

陈令新课题组^[19,20]报道了两个基于七甲川花菁染料的荧光探针**3**和**4**, 实现了线粒体 $O_2^{\cdot-}$ 和多硫化物

(H_2S_n)的连续监测. 探针中花菁结构中的亲脂性氮正离子及苄基氯结构, 有助于探针选择性聚集到线粒体内. 探针碳氮单键首先被 $O_2^{\cdot-}$ 氧化生成七甲川花菁荧光团, 然而由于存在 H_2S_n 识别单元的光诱导电子转移(PET)的荧光猝灭作用, 此时花菁荧光只有一定程度增强. 随后, 在 H_2S_n 作用下, 探针结构分别发生两种变化: H_2S_n 识别基团中的硝基转变为氨基, PET作用被阻断, 导致探针荧光强度进一步增强; 或转变为变酮式花菁结构, 探针的光谱移动. 在此基础上, 该课题组实现了活细胞线粒体中外源性和PMA刺激下内源性 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2S_n 的检测, 由于其良好的组织穿透能力, 探针还被成功用于活体小鼠在PMA或脂多糖(LPS)刺激下 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2S_n 的荧光可视化成像(图4).

唐波等^[21]报道了检测线粒体 $O_2^{\cdot-}$ 的双光子荧光探针**5**. 该探针以茚为双光子荧光发色团, 三苯基膦为线粒体靶向基团, 以苯并噻唑啉为 $O_2^{\cdot-}$ 的特异性识别单元. 探针被 $O_2^{\cdot-}$ 氧化后, PET效应被阻断, 荧光增强. 利用该探针高灵敏度、高选择性、瞬时响应、光稳定性好等优点, 该课题组利用双光子荧光成像观察了人肝癌细胞系(HepG2)和人宫颈癌细胞系(HeLa)细胞线粒体在PMA刺激下及炎症小鼠模型腹腔内 $O_2^{\cdot-}$ 的浓度升高(图5).

图3 基于磺酸酯型线粒体 $O_2^{\cdot-}$ 探针**1**和**2**及其响应机理(网络版彩图)

图4 连续检测线粒体 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 和 H_2S_n 的探针3和4及其响应机理(网络版彩图)

图5 以茚为荧光母体的线粒体双光子 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 探针5及其响应机理(网络版彩图)

2.2 检测线粒体 H_2O_2 的荧光探针

H_2O_2 作为重要的ROS之一,在细胞信号转导过程中发挥至关重要的作用.大量证据表明,线粒体中 H_2O_2 的异常变化与多种疾病息息相关,对细胞尤其是线粒体中 H_2O_2 浓度和分布等变化进行精准定量监测,有利于揭示 H_2O_2 相关疾病发生发展的分子机制,为疾病的早期诊疗、药物筛选等方面提供可靠的新方法.硼酸/硼酸频哪醇酯是最为常见和广泛的 H_2O_2 识别单元, H_2O_2 与含有该结构的探针反应后,导致硼酸/硼酸频哪醇酯脱落,探针分子结构发生变化,荧光信号改变.

Chang等^[22,23]设计合成了线粒体 H_2O_2 探针6.该探针在荧光素氧杂蒽结构两侧分别连接线粒体定位基团三苯基膦以及硼酸频哪醇酯. H_2O_2 与探针反应后,硼酸频哪醇酯脱落,使内酯螺环开环,荧光素共轭体系恢复,荧光明显增强.该探针被成功用于检测在百草枯

刺激下线粒体中 H_2O_2 浓度的升高.在此基础上,根据相似的识别原理,Chang等^[24]将SNAP标签受体苄基-2-氯-6-氨基嘧啶与东京绿荧光团及硼酸频哪醇酯组合在一起,形成探针7,利用SNAP标签受体与线粒体靶蛋白融合的SNAP-tag特定定位点上的半胱氨酸(Cys)的偶联反应进行靶向定位,实现了对线粒体内 H_2O_2 浓度变化的荧光可视化研究(图6).

易涛等^[25]构建了能够靶向线粒体DNA检测 H_2O_2 的荧光探针8.该探针中间含有一段线粒体DNA结合肽,两端分别连接 H_2O_2 受体硼酸单元和带有正电荷的苯乙烯染料.在线粒体膜电势作用下,探针选择性聚集到线粒体内,肽链能够与线粒体DNA沟槽结合,使环境敏感的苯乙烯染料插入DNA的碱基中,非极性环境导致其646 nm波长处的红色荧光增强.当有 H_2O_2 存在时,探针上的硼酸单元脱落,探针发出增强的萘二甲

图6 基于硼酸频哪醇酯利用三苯基膦或SNAP-tag技术靶向线粒体的 H_2O_2 荧光探针6和7及其响应机理(网络版彩图)

酰亚胺的绿色荧光(555 nm). 利用绿色与红色荧光的比率可以定量分析在线粒体DNA附近 H_2O_2 的浓度水平变化, 该探针实现了在百草枯刺激下线粒体DNA附近 H_2O_2 浓度上升的荧光比率成像(图7).

邵士俊等^[26,27]以苯硼酸频哪醇酯为 H_2O_2 识别基团, 利用含有季铵盐正离子的吡啶或喹啉结构定位线粒体, 设计合成了两种荧光开关型检测 H_2O_2 的探针9和10. 由于PET的猝灭作用, 探针本身荧光很低, 与 H_2O_2

反应后, 苯硼酸频哪醇酯脱落, 不带电荷的吡啶或喹啉形成, 阻断分子内PET过程, 探针荧光恢复. 两个探针都具有较好的水溶性和生物相容性. 两个探针被分别用于肝癌细胞、肝细胞、HeLa细胞以及灰色神仙鱼活体中 H_2O_2 的荧光成像研究(图8).

林伟英等^[28]报道了一类新型近红外外部花菁荧光染料, 以此为荧光团, 探针11被合成并应用于检测线粒体 H_2O_2 . 探针自身的亲脂性氮正离子易于聚集在线粒

图7 线粒体 H_2O_2 探针8及其响应机理(网络版彩图)

图8 线粒体 H_2O_2 探针

体中, 苯硼酸结构作为 H_2O_2 的识别位点, 探针与 H_2O_2 反应后, 苯硼酸基团脱落, 形成强烈的推-拉电子体系, 荧光增强. 利用该探针, 该课题组实现了活细胞线粒体外源性和内源性 H_2O_2 的检测, 同时, 探针被成功用于研究LPS诱导的炎症模型小鼠腹腔的 H_2O_2 上升情况. 此外, 林伟英等^[29]报道了能够同时荧光检测线粒体 H_2O_2 和黏度的探针**12**. 由于扭曲的分子内电荷转移机理(TICT), 探针本身荧光很弱. 当周围环境黏度增加时, 探针内部单键旋转受限制, TICT被抑制, 发出增强的607 nm荧光; 当与 H_2O_2 反应后, H_2O_2 识别单元苯硼酸频哪醇酯脱落, TICT消失, 形成分子内电荷转移(ICT)结构, 探针在510 nm处荧光显著上升. 这样, 利用该探针不同波长的荧光变化分别成像检测了线粒体内 H_2O_2 和黏度的水平变化(图8).

唐波等^[30]设计合成了近红外荧光探针**13**, 实现了高效、可逆地检测活细胞内经典的氧化还原对 H_2O_2 和谷胱甘肽(GSH). 该探针以七甲川花菁为荧光团和线粒体定位基团, 以Se-N键为识别位点. GSH的亲核性使Se-N键被打断, 产物结构中的PET效应使花菁的荧光猝灭, 随后与 H_2O_2 的反应重新形成Se-N键, 荧光恢

复. 利用该探针荧光成像的结果, 发现在丁硫氨酸-亚砷亚胺(BSO)诱导的细胞凋亡过程中, 肝癌细胞线粒体内 H_2O_2 的浓度升高, 说明细胞的氧化性增强; 当BSO洗去后, 肝癌细胞表现出凋亡逆转, GSH的浓度升高, 说明还原性增强. 而同样的凋亡逆转情况在正常肝细胞中没有发生. 基于探针近红外荧光穿透能力深的优势, 探针被成功应用于斑马鱼幼体外伤部位的荧光可视化分析, 发现伤口周围 H_2O_2 浓度水平的上升. 唐波等^[31,32]还报道了基于部花菁结构的线粒体 H_2O_2 探针**14**和**15**. 该探针以部花菁为荧光发色团和线粒体定位基团, 以苯硼酸或硼酸频哪醇酯为 H_2O_2 识别单元. 探针与 H_2O_2 反应后, 形成强烈的推-拉电子体系, 荧光增强. 探针**14**实现了在鱼藤酮及解偶联剂羰基氰化物间氯苯腈(CCCP)诱导下, 线粒体中 H_2O_2 的产生、分布的可视化成像. 此外, 与另一个内质网 H_2O_2 探针连用, 发现在(BSO)诱导凋亡过程中线粒体和内质网中 H_2O_2 的浓度水平同时上升. 利用探针**15**以及另外一个检测线粒体锌离子的近红外荧光探针, 实现了在LPS和BSO刺激下, 线粒体中 H_2O_2 和锌离子的同时成像, 进一步实验表明, 在斑马鱼伤口愈合过程中伴随着 H_2O_2 和锌

离子浓度的上升(图8).

Kim等^[33]设计合成了双光子 H_2O_2 荧光探针**16**. 探针由三苯基磷定位基团、双光子荧光团、 H_2O_2 识别单元苯硼酸频哪醇酯组成. 探针与 H_2O_2 反应后荧光信号发生红移, 实现比率荧光检测 H_2O_2 . 基于探针的双光子组织穿透深的优势, 成功可视化了大鼠海马区切片中的 H_2O_2 浓度变化, 其穿透深度为 $100\ \mu\text{m}$, 显示了探针**16**作为双光子 H_2O_2 探针在生物成像应用中的优势(图8).

2.3 检测线粒体 HClO/ClO^- 的荧光探针

HClO/ClO^- 是一类强氧化剂, 在免疫系统抵抗外源性病原体入侵时发挥重要的防御作用. HClO/ClO^- 在调控炎症反应及细胞凋亡等方面也发挥重要作用, 尤其是亚细胞区域分布的 HClO/ClO^- 与许多炎症相关的信号通路及疾病密切相关. 因此, 在亚细胞水平检测 HClO/ClO^- 的水平浮动意义重大.

彭孝军等^[34]以脲基为识别基团设计合成了关开型荧光探针**17**. 探针引入三苯基磷作为线粒体定位基团, 探针自身为粉红色, 基本没有荧光, 遇到 NaClO 后,

迅速反应, 颜色变为黄色, 同时发色团氟化硼络合二吡咯甲川(BODIPY)的荧光增强35倍. 利用该探针实现了人乳腺癌细胞系(MCF-7)线粒体中外源性和内源性(LPS和PMA刺激) HClO 浓度上升的高选择性和高灵敏度成像. 随后, 彭孝军等^[35]又设计了含Se的近红外荧光探针**18**. 该探针以七甲川花菁染料为荧光团, 利用Se的氧化还原性质高选择性识别 HClO . 高浓度的探针在水溶液中由于聚集作用荧光被猝灭, 与 HClO 反应后二价Se被氧化为 $\text{Se}=\text{O}$, 聚集的探针逐渐解聚, 荧光显著增强. 实验表明, 探针可对胎牛血清中的 HClO 高选择性检测, 并成像观察到小鼠在LPS和PMA刺激下内源性 HClO 浓度的升高(图9).

余孝其等^[36]设计合成了荧光关-开型荧光探针**19**和**20**用于 ClO^- 高选择性检测. 探针将三苯基磷或带正电的吡啶盐与内酯型罗丹明通过酰肼连接, 与 ClO^- 反应后, 酰肼部分氧化水解, 生成开环的罗丹明, 荧光增强. 实验结果显示, 探针可用于可视化活细胞线粒体以及活体裸鼠中外源性 ClO^- 的高选择性荧光成像. 随后, 余孝其等^[37]根据相似的反应识别机理, 构建了比率检测 ClO^- 的荧光探针**21**和**22**. 通过哌嗪基团共价连

图9 线粒体 HClO/ClO^- 探针结构

接香豆素单元和罗丹明, 利用两者之间荧光强度的比率变化可实现 ClO^- 的定量检测. 利用探针**22**, 成功可视化了多种正常和肿瘤细胞线粒体中 ClO^- 的浓度差异, 结果表明, 癌细胞线粒体内显示更高的 ClO^- 浓度. 此外, HeLa细胞在不同浓度CCCP以及百草枯刺激下线粒体中 ClO^- 浓度的浮动被成功检测, 结果显示, 低浓度CCCP会抑制 ClO^- 的产生, 而高浓度的CCCP及百草枯会诱导产生 ClO^- (图9).

尹桂等^[38]报道了对 ClO^- 快速响应的荧光探针**23**. 该探针以吩噻嗪为荧光团, 吡啶季铵盐为线粒体定位基团, 与 ClO^- 反应后探针中硫醚结构被氧化为亚砜, 荧光显著上升. 该探针具有水溶性好、灵敏度高等优点, 被成功用于活细胞线粒体中 ClO^- 的成像分析, 并进一步被用于LPS和PMA诱导炎症的小鼠体内, 观察到 ClO^- 的浓度升高现象. 利用相同的荧光团, 尹桂等^[39]设计合成了比色和荧光比率型 ClO^- 探针**24**. 该探针以三苯基膦为线粒体定位基团, 吩噻嗪以双键连接二氰基作为 ClO^- 识别位点. 与 ClO^- 反应后, 双键被氧化断裂, 形成共轭程度较小的醛基, 探针吸收降低, 同时640 nm处的荧光降低, 522 nm处荧光显著增加. 利用该探针的比率荧光成像, 发现巨噬细胞在刺激下 ClO^- 浓度的上升, 并进一步观察到LPS刺激下小鼠体内 ClO^- 的升高(图9).

马会民等^[40]报道了基于硫螺内酯与HClO特异性反应的荧光探针**25**. 该探针以三苯基膦线粒体定位基团, 与HClO反应后, 罗丹明荧光团硫代螺内酯开环, 生成共轭体系, 荧光明显增强. 利用该探针, 成功检测了在细菌感染巨噬细胞过程中HClO的产生(图9).

Chang等^[41]将巯基乙醇保护Acedan荧光团, 连接三苯基膦定位基团合成了双光子HClO探针**26**. 与HClO反应后, 探针恢复推-拉电子体系, 荧光增强. 该探针显示出响应迅速、灵敏度和选择性高等优势. 基于此, 探针被成功用于活细胞线粒体外源性LPS/PMA刺激下的内源性HClO的成像. 由于其良好的双光子穿透性质, 探针被用于LPS诱导炎症时小鼠后爪组织的HClO浓度升高的可视化检测(图9).

孟祥明等^[42]构建了 ClO^- 双光子探针**27**. 该探针以咪唑为荧光团, 吡啶季铵盐为线粒体靶向单元, 肟基为 ClO^- 识别位点. ClO^- 将肟基氧化脱氢为氧化腈结构, 使咪唑荧光恢复. 实验表明, 该探针具有较好的线粒体定位能力, 能够对CHO细胞中外源性 ClO^- 浓度升高

进行双光子荧光成像(图9).

巢晖等^[43]设计合成了一系列铈复合物磷光探针**28**用于线粒体 ClO^- 检测. 探针还有不同的金属配体, 导致其磷光发射光谱从绿色到红色. 探针自身的正电荷利于聚集到线粒体内, 与 ClO^- 反应后, 猝灭基团二氨基顺丁烯二腈转化为羧基, 猝灭作用消失, 使探针磷光显著增加. 实验表明, 探针能很好地定位线粒体, 并对外源性和LPS/PMA刺激下内源性 ClO^- 进行可视化成像(图9).

袁景利等^[44]设计合成了含铈复合物探针**29**用于HClO的冷光成像研究. 探针以三苯基膦作为线粒体定位基团, 与HClO反应后, 探针被打断, 铈原子脱落, 探针冷光下降. 探针具有快速响应、高灵敏度和选择性等优点. 利用该探针, 实现了活细胞以及大型蚤中外源性和LPS刺激下内源性HClO的冷光成像(图9).

周礼义等^[45]设计合成了比率荧光探针**30**用于检测线粒体中HClO. 探针以带正电的部花菁结构靶向线粒体, 与HClO反应后, 探针被氧化断裂为两部分, 荧光由575 nm逐渐蓝移至435 nm, 两处的荧光强度比值可实现HClO的比率检测. 探针具有低毒性、高选择性和灵敏度、响应迅速等特点, 被成功用于A375活细胞在LPS刺激下线粒体内HClO浓度上升的比率荧光成像(图9).

Yoon等^[46]报道了双光子荧光探针**31**用于检测线粒体 ClO^- . 探针以三苯基膦作为线粒体定位单元, 以咪唑啉-2-硫酮为 ClO^- 识别位点. 探针与 ClO^- 反应后, 生成强荧光的咪唑鎓盐结构, 实验结果表明, 探针可用于活细胞线粒体外源性和LPS/干扰素- γ (IFN- γ)/PMA刺激下的可视化荧光成像, 成像观察到内源性 ClO^- 的水平上升(图9).

2.4 检测线粒体 $^1\text{O}_2$ 的荧光探针

$^1\text{O}_2$ 是处于最低激发态的分子氧的存在形式, 它与许多生理和病理学过程密切相关. 例如, $^1\text{O}_2$ 能氧化多种生物分子, 包括蛋白、DNA、脂质等, 因此, 在光动力学治疗(PDT)杀伤癌细胞方面发挥关键作用. 此外, 它在信号转导调控相关基因表达等方面也扮演重要角色. 因此, 在细胞尤其是亚细胞水平上的 $^1\text{O}_2$ 进行准确、快速的检测, 有助于示踪PDT治疗的效果及相关信号通路的揭示.

Majima等^[47]以Si罗丹明为荧光团, 蒽为 $^1\text{O}_2$ 识别基

团构建了近红外荧光探针**32**, 用于检测在PDT治疗过程中活细胞线粒体内产生的 $^1\text{O}_2$. 由于PET的猝灭作用, 探针本身的荧光很弱, 与 $^1\text{O}_2$ 反应后, 蒽形成内过氧化物, PET作用消失, Si罗丹明的荧光恢复. 利用该探针, 成功可视化了多种常用光敏剂在PDT过程中线粒体内 $^1\text{O}_2$ 的产生情况, 并发现在PDT过程中单个线粒体微管内 $^1\text{O}_2$ 的浓度升高(图10).

张晓兵等^[48]设计合成了检测 $^1\text{O}_2$ 的双光子荧光探针**33**. 探针利用三苯基膦基团定位线粒体, 蒽识别 $^1\text{O}_2$, 萘二甲酰亚胺作为双光子荧光指示团. 实验结果表明, 该探针不仅可用于检测PDT过程中活细胞线粒体内 $^1\text{O}_2$ 的产生, 也可用于肝脏组织切片中的 $^1\text{O}_2$ 双光子荧光成像(图10).

同样利用蒽结构作为 $^1\text{O}_2$ 识别基团, 袁景利等^[49]报道了线粒体定位的含铈复合物探针**34**用于 $^1\text{O}_2$ 的冷光成像. 探针本身由于蒽的PET猝灭作用, 冷光很弱, 与 $^1\text{O}_2$ 反应后, 蒽变为内过氧化物, 对探针猝灭作用消失, 探针冷光增强. 利用该探针, 检测了在对HepG2细胞PDT过程中 $^1\text{O}_2$ 的产生(图10).

唐波等^[50]报道了近红外荧光探针**35**用于活细胞中 $^1\text{O}_2$ 的检测. 探针以七甲川花菁为近红外荧光团和线粒体定位单元, 以组氨酸为 $^1\text{O}_2$ 反应位点. 组氨酸与 $^1\text{O}_2$ 进行1,4-环加成反应后, 花菁的荧光恢复. 该探针显示出反应迅速、高灵敏度和高选择性等优点, 利用该探针, 成功荧光成像分析了在PMA刺激下巨噬细胞线粒体内 $^1\text{O}_2$ 的产生(图11).

2.5 检测线粒体NO的荧光探针

NO是细胞内重要的信使分子, 在心血管、神经、免疫系统疾病中发挥调控作用. 线粒体是内源性NO合成的主要场所, 因此对线粒体NO进行实时监测对NO的生物学功能研究意义重大.

肖义等^[51]报道了“关-开”型NO荧光探针**36**. 探针以三苯基膦为线粒体定位基团, 通过点击反应连接罗丹明, 并将作为NO识别单元的邻苯二胺连接至罗丹明内酯螺环处形成内酰胺. 探针与NO反应后, 内酰胺螺环开环, 荧光强度增加60倍. 利用该探针, 成像观察了MCF-7及巨噬细胞RAW264.7线粒体中外源性和L-精氨酸/干扰素 γ (IFN- γ)/LPS刺激下内源性产生的NO(图12).

郭炜等^[52]设计合成了“关-开”型NO荧光探针**37**. 该探针以派洛宁为荧光团和线粒体靶向单元, 将NO识别单元邻苯二胺中其中的一个氨基直接与荧光团连接, 由于生成的三唑产物中没有多余氢原子, 有效排除了pH和脱氢抗坏血酸(DHA)等物质的干扰, 提高了探针的选择性. 此外, 生成的含有三唑结构产物(红色荧光)可进一步与谷胱甘肽(GSH)或半胱氨酸(Cys)反应, 生成新的红色或绿色荧光产物, 可用于双通道检测NO, 提高了检测方法的准确性. 利用该探针, 成像分析了小鼠黑色素瘤B16细胞及巨噬细胞RAW264.7线粒体中IFN- γ /LPS/L-精氨酸刺激下内源性产生的NO(图12).

图10 含有蒽结构单元的线粒体 $^1\text{O}_2$ 探针

图 11 近红外 $^1\text{O}_2$ 荧光探针**35**及其响应机理

图 12 基于邻苯二胺型的NO荧光探针

2.6 检测线粒体 $\cdot\text{OH}$ 的荧光探针

$\cdot\text{OH}$ 是ROS中最具氧化性和反应性的物种之一,它能造成蛋白质、核酸、脂质等生物大分子的氧化损伤.因此, $\cdot\text{OH}$ 的过量产生会导致细胞受损,进而引发多种疾病.由于 $\cdot\text{OH}$ 特殊的毒性和攻击性,对其进行高选择性、高灵敏度检测一直是关注的重点问题.

许玫英等^[53]报道了高选择性检测 $\cdot\text{OH}$ 的荧光探针**38**.探针主体结构为吩噻嗪偶联部花菁,利用部花菁自身的季铵盐定位线粒体,与 $\cdot\text{OH}$ 反应后,硫醚结构被氧化为亚砷,探针荧光增强.利用该探针,实现了在活细胞及多种细菌中 $\cdot\text{OH}$ 的荧光成像,并发现了在不同尺寸 TiO_2 纳米粒子刺激下斑马鱼体内的 $\cdot\text{OH}$ 爆发(图13).

Turro等^[54]报道了以罗丹明为荧光团的 $\cdot\text{OH}$ 探针**39**.探针通过氮氧自由基捕获 $\cdot\text{OH}$ 与二甲基亚砷(DMSO)反应后产生的甲基自由基($\cdot\text{CH}_3$),同时导致罗丹明开环,荧光增强.利用该探针,成功可视化了HepG2细胞在PMA刺激下线粒体中 $\cdot\text{OH}$ 的产生(图13).

2.7 检测线粒体臭氧(O_3)的荧光探针

O_3 是一种对人类健康有害的分子,它在活细胞中浓度较低、寿命较短. O_3 与动脉粥样硬化、淀粉样蛋白沉积等病症密切相关.

唐波等^[55]合成了近红外线粒体 O_3 探针**40**.该探针以七甲川花菁为荧光团和线粒体靶向基团, L -色氨酸

图 13 两种线粒体 $\cdot\text{OH}$ 探针

为 O_3 的识别单元,由于扭曲的分子内电荷转移(TICT)机理,该探针荧光较弱,且表现出140 nm的Stokes位移.与 O_3 反应后, L -色氨酸单元被氧化, TICT被抑制,探针荧光增强.探针能快速、高灵敏地检测 O_3 .实验表明,在PMA刺激下, **40**能成功检测线粒体中产生的 O_3 (图14).

2.8 检测线粒体 ONOO^- 的荧光探针

细胞内 ONOO^- 是NO和 O_2^- 歧化耦合反应的产物,在氧化和硝化反应中发挥关键作用.研究表明, ONOO^- 涉及多种疾病,如心血管疾病、神经退行性疾病以及癌症.此外, ONOO^- 在信号转导和抗菌等方面发挥重要功能.线粒体是细胞内 ONOO^- 的主要产生位点,对线粒体 ONOO^- 的准确分析有利于阐明与 ONOO^- 相关

图 14 近红外 O_3 荧光探针40结构及其响应机理(网络版彩图)

的生理及病理学作用。

杨丹等^[56]报道了 $ONOO^-$ 探针41, 该探针以BODIPY为荧光发色团, 以苯酚衍生的酮为 $ONOO^-$ 识别单元。由于PET作用, 探针荧光很弱。探针与 $ONOO^-$ 反应后, 识别单元转变为二烯酮结构, PET被打断, BODIPY的荧光恢复。利用该探针, 可视化了小鼠J774.1巨噬细胞在LPS/IFN- γ /PMA刺激下线粒体中 $ONOO^-$ 的产生。随后, 杨丹等^[57]设计合成了荧光探针42用于细胞及组织中 $ONOO^-$ 的成像。探针以氧杂蒽为荧光发色团, 以对甲基氨基苯酚为 $ONOO^-$ 的识别反应位点。探针的对甲基氨基苯酚被 $ONOO^-$ 氧化, 芳基脱去, 猝灭了PET效应, 探针的荧光增强。利用该探针, 成像观察到小鼠RAW264.7巨噬细胞在LPS/IFN- γ /PMA刺激条件下及细菌入侵过程中 $ONOO^-$ 浓度的上升, 还发现在动脉粥样硬化小鼠心肌组织中具有更高的 $ONOO^-$ 水平(图15)。

韩克利等^[58]报道了近红外荧光探针43用于荧光成像分析活细胞及活体中 $ONOO^-$ 和GSH。探针以七甲川花菁为荧光团及线粒体定位基团, 利用含碲模拟酶分别与 $ONOO^-$ 和GSH的氧化还原反应调控花菁的荧光。 $ONOO^-$ 氧化碲原子, 使花菁荧光增强; GSH还原碲的氧化物, 荧光下降。利用该探针, 成功可视化了RAW264.7巨噬细胞线粒体内的氧化还原循环。进一步, 该探针被用于LPS/IFN- γ 刺激下小鼠腹腔中 $ONOO^-$ 和GSH的荧光成像(图15)。

郭炜等^[59]设计合成了响应快速、选择性好的 $ONOO^-$ 荧光探针44。探针以派洛宁为荧光团和线粒体靶向单元, 以4-羟苯基氨基甲基为 $ONOO^-$ 识别基团, 探针本身由于PET作用, 基本没有荧光。 $ONOO^-$ 能将苯酚氧化脱去, 阻断PET过程, 使派洛宁的荧光恢复。实验结果证实, 该探针可用于活细胞在IFN- γ /LPS刺激下线粒体中 $ONOO^-$ 的高选择性荧光成像。此外, 郭

炜等^[60]以BODIPY为荧光团, 以三苯基膦为线粒体定位基团, N,N -二苄基苯胺为 $ONOO^-$ 为识别位点合成了探针45。由于PET作用, 探针本身荧光很弱, 与 $ONOO^-$ 反应后, 氮原子被氧化或亚硝化, PET作用被阻断, 探针荧光增强。探针成像检测了RAW264.7巨噬细胞外源性和IFN- γ /LPS刺激下内源性产生的 $ONOO^-$ (图15)。

唐波等^[61]报道了近红外荧光探针46, 用于 $ONOO^-$ 和还原性抗坏血酸的可逆荧光成像检测。探针以七甲川花菁染料为荧光团和线粒体定位基团, 以苄基硒单元为响应受体, $ONOO^-$ 氧化硒原子后的产物存在PET效应, 使花菁荧光降低; 加入还原性抗坏血酸后, 硒的氧化物被还原, PET过程被阻断, 花菁的荧光也随之恢复。利用该探针, 成像分析了RAW264.7巨噬细胞中 $ONOO^-$ 和还原性抗坏血酸的氧化还原循环(图15)。

Yoon等^[62]报道了比率型 $ONOO^-$ 荧光探针47。探针主体为香豆素偶联部花菁, $ONOO^-$ 氧化断裂C=C双键后, 香豆素与部花菁分离, 探针在635 nm波长处的荧光降低, 出现逐渐增强的香豆素荧光峰值(515 nm), 利用两处的荧光比值, 可实现对 $ONOO^-$ 的比率成像。探针具有高选择性和灵敏度, 利用该探针, 实现了活细胞中外源性和LPS/IFN- γ /PMA刺激下内源性 $ONOO^-$ 的荧光成像(图15)。

袁林等^[63]报道了定位线粒体的 $ONOO^-$ 双光子比率荧光探针48。通过筛选19个合成或商品化的荧光染料对 $ONOO^-$ 的荧光响应情况, 成功挑选了对 $ONOO^-$ 敏感的苯并吡喃鎓盐结构及不敏感的香豆素结构, 将两部分以哌嗪结构连接在一起, 构建了荧光共振能量转移(FRET)型比率探针。由于其氧化性和亲核性, $ONOO^-$ 能将苯并吡喃鎓盐单元氧化为链烯羧酸结构, 导致探针两部分分离, FRET被阻断。因此, 探针651 nm处的荧光降低, 473 nm处的荧光增强, 利用两处荧光强度的比

图 15 检测 ONOO^- 的荧光探针

值, 实现了 ONOO^- 的比率检测. 探针具有响应迅速、高选择性、高灵敏度等优点, 被用于活细胞线粒体刺激条件下内源性 ONOO^- 的荧光比率成像, 并被成功用于LPS诱导的炎症模型中小鼠肝脏组织切片及活体中 ONOO^- 浓度升高的双光子比率荧光成像(图15).

韩峰等^[64]设计合成了一个“关-开”型双光子荧光探针49用于 ONOO^- 荧光成像. 探针以2-(2'-羟苯基)苯并噻唑为荧光母体, 以*N*-甲基对氨基苯酚为 ONOO^- 识别位点. 探针与 ONOO^- 反应后, 发生激发态分子内质子转移, 荧光大幅度增加. 探针具有响应快速、灵敏度和选择性好、双光子激发等优点, 另外, 利用该探针, 可视化了内皮细胞在硝化应激以及氧糖剥夺条件下 ONOO^- 的产生情况. 此外, 由于探针易于穿过血脑屏障进入大脑, 借助于双光子荧光共聚焦显微镜, 观察到了在小鼠大脑微血管损伤时 ONOO^- 的产生(图15).

钱旭红等^[65]报道了基于FRET原理的线粒体比率

ONOO^- 探针50. 探针由花菁3 (Cy3)共价偶联花菁5 (Cy5)构成FRET供体-受体对, 由于Cy5易被 ONOO^- 氧化分解, 探针与 ONOO^- 反应前后呈现不同的FRET比率信号, 因此可实现对 ONOO^- 的荧光比率成像. 利用该探针, 实现了活细胞线粒体外源性和LPS/IFN- γ /PMA刺激条件下内源性 ONOO^- 的荧光比率成像(图15).

2.9 检测线粒体高活性氧物种 (ONOO^- 、 HClO 、 $\bullet\text{OH}$)的荧光探针

由于 ONOO^- 、 HClO 和 $\bullet\text{OH}$ 较强的氧化能力和反应活性, 它们被称为高活性氧物种(hROS), 有些探针可能会对这几种ROS都有响应, 亦或同一探针可由于不同的反应机理呈现出差异的光谱响应, 实现同一探针对不同ROS的检测.

Nagano等^[66]最早报道了荧光探针51和52, 用于线粒体中hROS的检测. 探针以罗丹明为荧光团及线粒

体靶向基团,用4-氨基/羟基苯基醚作为电子供体,通过PET机理猝灭罗丹明氧杂蒽的荧光.与hROS反应后,富电子基团脱落,PET效应被阻断,罗丹明荧光恢复,而其他活性氧(如 $O_2^{\cdot-}$ 、 $\cdot NO$ 、 H_2O_2)基本不会引起探针的荧光增强.利用探针**51**,实现了HeLa细胞线粒体在MPO/Cl⁻/H₂O₂条件下hROS的选择性检测(图16).

彭孝军等^[67]报道了一个检测hROS (HClO、 $\cdot OH$)的荧光探针**53**.该探针以吩噻嗪偶联部花菁为荧光发色团,吩噻嗪环上的硫原子和连接两部分的双键作为反应位点,hROS (HClO、 $\cdot OH$)能氧化硫原子为亚砷结构,同时伴随双键被氧化断裂,共轭体系被破坏,从而实现HClO和 $\cdot OH$ 的比率荧光成像.利用该探针,实现了HeLa细胞在PMA刺激下的hROS成像(图16).

最近,张忠平等^[68]设计合成了能区别检测HClO和 $\cdot OH$ 的单一荧光探针**54**.探针以荧光素为发色团,共价连接三甘醇增加水溶性和生物相容性.探针与HClO反应时,酰胺内酯螺环打开,呈现荧光素的绿色荧光;与 $\cdot OH$ 反应时,由于其更强的氧化性,荧光素其中一个芳环被氧化断裂,最终形成两个芳环共轭的青色荧光产物,由此,探针可同时区别检测HClO和 $\cdot OH$.利用该探针,实现了活细胞线粒体中HClO和 $\cdot OH$ 的瞬时荧光成像.进一步,在斑马鱼活体中可视化了HClO和 $\cdot OH$ 在多种器官中的代谢路径.此外,探针还荧光指示了在斑马鱼伤口处 $\cdot OH$ 的产生(图16).

2.10 其他ROS相关的线粒体荧光探针

(1) 各种线粒体ROS在产生、转化过程中会造成线粒体氧化应激、氧化还原状态改变、磷脂/脂质过氧化等,因此,对这些参数进行荧光可视化成像也是非常有必要的.

Shioji等^[69]报道了检测线粒体过氧化物(ROOH)的荧光探针**55**.该探针以三苯基膦定位线粒体,以苕为荧光团,以二苯基膦结构为过氧化物反应位点.当加

入亚油酸甲酯氢过氧化物(MeLOOH)、异丙苯过氧化氢(CumOOH)、叔丁基过氧化氢(*t*-BHP)、H₂O₂等,反应位点被氧化,产生磷氧化合物,探针荧光增强.利用该探针,实现了活细胞线粒体在谷氨酸盐刺激下导致的脂质过氧化程度增加的荧光成像分析(图17).

Murphy等^[70]设计合成了比率荧光探针**56**,用于评估线粒体内磷脂的过氧化程度.探针以BODIPY为荧光团,通过三苯基膦靶向线粒体,以二烯基偶联苯基作为反应位点,与异丙基过氧化氢反应后,双键被打断,590 nm处的荧光降低,520 nm处的荧光增强,利用两处的荧光强度比值实现对磷脂过氧化作用的比率荧光成像分析.利用该探针,成像分析了在分离出的线粒体及活细胞线粒体在H₂O₂刺激下的磷脂过氧化过程(图17).

Takeoka等^[71]报道了荧光探针**57**,实现了线粒体膜系统中呼吸链氧化还原反应的研究.探针以香豆素343作为荧光团,2,2,6,6-四甲基哌啶氮氧自由基(TEMPO)为识别位点和荧光猝灭单元.当TEMPO被还原后,猝灭作用消失,探针荧光急剧增加.利用该探针,发现在分离的线粒体中加入鱼藤酮后,线粒体的电子转移被抑制,复合物I介导的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)将探针还原,荧光信号增强.该探针有望成为研究线粒体呼吸链复合物I及电子传递链动态过程的有力工具(图17).

Cosa等^[72]报道了检测线粒体内膜抗氧化状态的荧光探针**58**.探针以BODIPY为荧光团,以三苯基膦为线粒体定位基团,与 α -生育酚结构相似的二乙醇醇为识别位点.由于PET作用探针荧光被猝灭,与脂质自由基反应后,PET作用被阻断,探针荧光恢复.利用该探针,可视化了在百草枯作用下,线粒体中氧化应激的发生(图17).

(2) 亚硝酸酐(HNO)是由NO单电子还原并且质子化形成的产物.它的生理学作用包括增强心肌的收缩

图16 同时或者区别检测hROS的探针结构

图 17 检测线粒体脂质过氧化/氧化应激的荧光探针

能力, 抑制血小板聚集, 与硫醇作用抑制乙醛脱氢酶等. 对HNO进行荧光可视化研究为心脑血管系统疾病等的研究至关重要.

Kim等^[73]设计合成了检测线粒体内HNO的荧光探针**59**. 该探针包括三苯基膦定位基团、香豆素荧光团以及2-二苯基膦苯甲酰基识别基团. HNO与2-二苯基膦苯甲酰基反应先生成氮杂内鎓盐, 氮杂内鎓盐亲核进攻酯键上的羰基, 从而释放香豆素荧光团, 荧光增

强. 探针检测限低至18.0 nM. 利用该探针, 实现了在HeLa细胞线粒体中外源性以及NO供体存在下内源性HNO的荧光可视化成像. 此外, 借助于此探针的双光子性质, 实现了HeLa细胞线粒体中外源性HNO的双光子荧光成像(图18).

杨小峰等^[74]设计了以部花菁骨架为荧光团, 2-二苯基膦苯甲酰基为识别基团的近红外荧光探针**60**, 用于检测线粒体HNO. 其中部花菁荧光团中的亲脂性氮

图 18 基于2-二苯基膦苯甲酰基的HNO荧光探针

正离子可以靶向线粒体. 该探针检测限为60 nM, 具有良好的选择性. 利用该探针, 实现了在人肝癌细胞(SMMC-7721)线粒体中外源性HNO的检测(图18).

利用2-二苯基膦苯甲酰基作为HNO识别基团, 多种^[75-77]分子荧光探针已被报道(探针61~63). 这些探针的开发和应用实现了在复杂生物样品、细胞及组织中HNO的荧光检测, 极大地丰富了人们对HNO的生物学认识(图18).

3 结论与展望

线粒体ROS在机体防御、细胞增殖分化、信号转导等生物学过程中发挥着重要作用, 与疾病的发生发展密切相关. 因此, 针对线粒体ROS浓度低、寿命短、易转化的特点, 发展新型靶向线粒体、特异性检测各类ROS的荧光探针, 建立高选择性、高灵敏度荧光成像分析的新方法, 对于详细阐明ROS发挥的化学生物学作用, 实现疾病的早诊早治、新型药物的开发具有重要意义.

在这篇评述中, 阐述了线粒体ROS的产生及相互转化过程, 总结了现有有机分子荧光探针靶向线粒体的原理及方法, 并根据线粒体ROS种类, 系统地展示了近年来检测线粒体ROS的各种有机分子荧光探针. 介绍了这些探针的结构、识别机理以及在细胞及活体内的成像应用. 由于线粒体ROS的重要生物学作用, 这些探针在化学、生物学、医学等领域必将有广泛的应用前景, 为深入剖析线粒体ROS的生理学及病理学作用提供新材料和新方法. 本篇评述能够为研究者今后设计合成靶向线粒体探针提供重要的理论参考.

目前, 这些已有探针的靶向定位大多是以脂溶性阳离子, 利用线粒体膜电势, 使探针跨越线粒体膜, 进入线粒体. 此种依赖于线粒体膜电势的定位策略会带来一些问题. 如果线粒体膜电势异常, 这些探针的定位效果必将受到影响. 当过多的阳离子分子探针进入线粒体, 就会降低线粒体膜内外电势差, 在某种程度上讲, 这种外界刺激, 会干扰线粒体的正常生物学功能. 此外, 目前报道的线粒体ROS荧光探针大多需要

紫外或可见光激发, 易造成光损伤和较高的背景荧光干扰. 基于目前线粒体ROS探针的研究现状, 我们认为, 在未来几年, 发展新型线粒体ROS荧光探针应着重注意以下6个方面的问题. (1) 开发新型靶向线粒体的定位基团, 尤其是发展非依赖于线粒体膜电势的靶向基团. (2) 合成近红外或双光子甚至多光子型荧光探针, 从而增加探针的穿透性、减少光损伤、降低自发荧光干扰等, 有利于在组织、活体中原位成像研究. (3) 探针的生物成像功能应进一步开发与整合. 探针与ROS反应后, 在一定程度上降低了ROS的浓度水平, 换言之, 探针相当于ROS的清除剂(抗氧化剂), 这种ROS的特异性清除, 势必对疾病的发生发展产生影响. 因此, 如何利用线粒体ROS探针实现对疾病的诊疗一体化, 可能成为今后重要的研究方向之一. (4) 多种活性物种的共同检测. 线粒体ROS之间以及ROS与其他活性分子之间是协同发挥细胞调控作用的. 此外, 除了线粒体内, ROS也可以在其他亚细胞区域产生并发挥调控作用. 因此, 对同一亚细胞结构中多种ROS, 以及ROS和其相关的活性分子以及不同亚细胞结构的同种ROS、不同种ROS以及ROS和其相关的活性分子, 进行同时(连续)检测是非常有必要的. (5) 急需发展超高灵敏度的线粒体ROS探针. 目前线粒体ROS探针的检测限一般为微摩尔至纳摩尔级别, 因此, 往往需要外加ROS或利用PMA、LPS等刺激物刺激线粒体ROS水平的升高才能实现检测. 今后可结合聚合物分子导线的信号放大、纳米材料包裹、无光源激发的化学发光等方法构建复合型荧光探针, 实现在不外加刺激条件下的线粒体本真ROS的检测. (6) 结合超分辨光学成像技术实现单个线粒体的检测. 可构建适用于超分辨荧光显微镜的线粒体ROS荧光探针, 以实现在单个线粒体水平ROS的检测.

总之, 发展检测线粒体ROS的新型荧光探针将仍是今后荧光成像领域发展前沿的重要研究内容之一, 这将为阐明ROS在相关疾病发生发展过程中的信号转导作用提供重要的新材料和新方法.

参考文献

- 1 Satori CP, Henderson MM, Krautkramer EA, Kostal V, Distefano MD, Distefano MM, Arriaga EA. *Chem Rev*, 2013, 113: 2733–2811
- 2 Henze K, Martin W. *Nature*, 2003, 426: 127–128

- 3 Ishikawa K, Takenaga K, Akimoto M, Koshikawa N, Yamaguchi A, Imanishi H, Nakada K, Honma Y, Hayashi JI. *Science*, 2008, 320: 661–664
- 4 Lin MT, Beal MF. *Nature*, 2006, 443: 787–795
- 5 Finkel T, Serrano M, Blasco MA. *Nature*, 2007, 448: 767–774
- 6 Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci PG. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8: 722–728
- 7 Dickinson BC, Srikun D, Chang CJ. *Curr Opin Chem Biol*, 2010, 14: 50–56
- 8 Frangioni J. *Curr Opin Chem Biol*, 2003, 7: 626–634
- 9 Ntziachristos V, Bremer C, Weissleder R. *Eur Radiol*, 2003, 13: 195–208
- 10 Sevcik-Muraca EM. *Annu Rev Med*, 2012, 63: 217–231
- 11 Xu Z, Xu L. *Chem Commun*, 2016, 52: 1094–1119
- 12 Chen X, Wang F, Hyun JY, Wei T, Qiang J, Ren X, Shin I, Yoon J. *Chem Soc Rev*, 2016, 45: 2976–3016
- 13 Roopa R, Kumar N, Bhalla V, Kumar M. *Chem Commun*, 2015, 51: 15614–15628
- 14 Chen X, Tian X, Shin I, Yoon J. *Chem Soc Rev*, 2011, 40: 4783–4804
- 15 Dikalov SI, Harrison DG. *Antioxid Redox Sign*, 2014, 20: 372–382
- 16 Hoye AT, Davoren JE, Wipf P, Fink MP, Kagan VE. *Acc Chem Res*, 2008, 41: 87–97
- 17 Hu JJ, Wong NK, Ye S, Chen X, Lu MY, Zhao AQ, Guo Y, Ma ACH, Leung AYH, Shen J, Yang D. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 6837–6843
- 18 Si F, Liu Y, Yan K, Zhong W. *Chem Commun*, 2015, 51: 7931–7934
- 19 Huang Y, Yu F, Wang J, Chen L. *Anal Chem*, 2016, 88: 4122–4129
- 20 Yu F, Gao M, Li M, Chen L. *Biomaterials*, 2015, 63: 93–101
- 21 Li P, Zhang W, Li K, Liu X, Xiao H, Zhang W, Tang B. *Anal Chem*, 2013, 85: 9877–9881
- 22 Dickinson BC, Chang CJ. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 9638–9639
- 23 Dickinson BC, Lin VS, Chang CJ. *Nat Protoc*, 2013, 8: 1249–1259
- 24 Srikun D, Albers AE, Nam CI, Iavarone AT, Chang CJ. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 4455–4465
- 25 Wen Y, Liu K, Yang H, Liu Y, Chen L, Liu Z, Huang C, Yi T. *Anal Chem*, 2015, 87: 10579–10584
- 26 Xu J, Li Q, Yue Y, Guo Y, Shao S. *Biosens Bioelectron*, 2014, 56: 58–63
- 27 Xu J, Zhang Y, Yu H, Gao X, Shao S. *Anal Chem*, 2016, 88: 1455–1461
- 28 Yuan L, Lin W, Zhao S, Gao W, Chen B, He L, Zhu S. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 13510–13523
- 29 Ren M, Deng B, Zhou K, Kong X, Wang JY, Lin W. *Anal Chem*, 2017, 89: 552–555
- 30 Xu K, Qiang M, Gao W, Su R, Li N, Gao Y, Xie Y, Kong F, Tang B. *Chem Sci*, 2013, 4: 1079–1086
- 31 Xiao H, Li P, Hu X, Shi X, Zhang W, Tang B. *Chem Sci*, 2016, 7: 6153–6159
- 32 Xiao H, Li P, Zhang S, Zhang W, Zhang W, Tang B. *Chem Commun*, 2016, 52: 12741–12744
- 33 Masanta G, Heo CH, Lim CS, Bae SK, Cho BR, Kim HM. *Chem Commun*, 2012, 48: 3518–3520
- 34 Cheng G, Fan J, Sun W, Sui K, Jin X, Wang J, Peng X. *Analyst*, 2013, 138: 6091–6096
- 35 Cheng G, Fan J, Sun W, Cao J, Hu C, Peng X. *Chem Commun*, 2014, 50: 1018–1020
- 36 Hou JT, Wu MY, Li K, Yang J, Yu KK, Xie YM, Yu XQ. *Chem Commun*, 2014, 50: 8640–8643
- 37 Hou JT, Li K, Yang J, Yu KK, Liao YX, Ran YZ, Liu YH, Zhou XD, Yu XQ. *Chem Commun*, 2015, 51: 6781–6784
- 38 Xiao H, Xin K, Dou H, Yin G, Quan Y, Wang R. *Chem Commun*, 2015, 51: 1442–1445
- 39 Xiao H, Li J, Zhao J, Yin G, Quan Y, Wang J, Wang R. *J Mater Chem B*, 2015, 3: 1633–1638
- 40 Zhou J, Li L, Shi W, Gao X, Li X, Ma H. *Chem Sci*, 2015, 6: 4884–4888
- 41 Yuan L, Wang L, Agrawalla BK, Park SJ, Zhu H, Sivaraman B, Peng J, Xu QH, Chang YT. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 5930–5938
- 42 Li D, Feng Y, Lin J, Chen M, Wang S, Wang X, Sheng H, Shao Z, Zhu M, Meng X. *Sensor Actuat B-Chem*, 2016, 222: 483–491
- 43 Li G, Lin Q, Ji L, Chao H. *J Mater Chem B*, 2014, 2: 7918–7926
- 44 Ma H, Song B, Wang Y, Liu C, Wang X, Yuan J. *Dyes Pigments*, 2017, 140: 407–416
- 45 Zhou L, Lu DQ, Wang Q, Hu S, Wang H, Sun H, Zhang X. *Spectrochim Acta Part A-Mol Biomol Sp*, 2016, 166: 129–134
- 46 Xu Q, Heo CH, Kim JA, Lee HS, Hu Y, Kim D, Swamy KMK, Kim G, Nam SJ, Kim HM, Yoon J. *Anal Chem*, 2016, 88: 6615–6620
- 47 Kim S, Tachikawa T, Fujitsuka M, Majima T. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 11707–11715
- 48 Liu HW, Xu S, Wang P, Hu XX, Zhang J, Yuan L, Zhang XB, Tan W. *Chem Commun*, 2016, 52: 12330–12333
- 49 Sun J, Song B, Ye Z, Yuan J. *Inorg Chem*, 2015, 54: 11660–11668
- 50 Xu K, Wang L, Qiang M, Wang L, Li P, Tang B. *Chem Commun*, 2011, 47: 7386–7388
- 51 Yu H, Zhang X, Xiao Y, Zou W, Wang L, Jin L. *Anal Chem*, 2013, 85: 7076–7084
- 52 Sun YQ, Liu J, Zhang H, Huo Y, Lv X, Shi Y, Guo W. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 12520–12523

- 53 Liu F, Du J, Song D, Xu M, Sun G. *Chem Commun*, 2016, 52: 4636–4639
- 54 Yapici NB, Jockusch S, Moscatelli A, Mandalapu SR, Itagaki Y, Bates DK, Wiseman S, Gibson KM, Turro NJ, Bi L. *Org Lett*, 2012, 14: 50–53
- 55 Xu K, Sun S, Li J, Li L, Qiang M, Tang B. *Chem Commun*, 2012, 48: 684–686
- 56 Sun ZN, Wang HL, Liu FQ, Chen Y, Tam PKH, Yang D. *Org Lett*, 2009, 11: 1887–1890
- 57 Peng T, Wong NK, Chen X, Chan YK, Ho DHH, Sun Z, Hu JJ, Shen J, El-Nezami H, Yang D. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 11728–11734
- 58 Yu F, Li P, Wang B, Han K. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 7674–7680
- 59 Zhang H, Liu J, Sun YQ, Huo Y, Li Y, Liu W, Wu X, Zhu N, Shi Y, Guo W. *Chem Commun*, 2015, 51: 2721–2724
- 60 Miao J, Huo Y, Liu Q, Li Z, Shi H, Shi Y, Guo W. *Biomaterials*, 2016, 107: 33–43
- 61 Xu K, Chen H, Tian J, Ding B, Xie Y, Qiang M, Tang B. *Chem Commun*, 2011, 47: 9468–9470
- 62 Zhou X, Kwon Y, Kim G, Ryu JH, Yoon J. *Biosens Bioelectron*, 2015, 64: 285–291
- 63 Cheng D, Pan Y, Wang L, Zeng Z, Yuan L, Zhang X, Chang YT. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 285–292
- 64 Li X, Tao RR, Hong LJ, Cheng J, Jiang Q, Lu YM, Liao MH, Ye WF, Lu NN, Han F, Hu YZ, Hu YH. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 12296–12303
- 65 Jia X, Chen Q, Yang Y, Tang Y, Wang R, Xu Y, Zhu W, Qian X. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 10778–10781
- 66 Koide Y, Urano Y, Kenmoku S, Kojima H, Nagano T. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 10324–10325
- 67 Liu F, Wu T, Cao J, Zhang H, Hu M, Sun S, Song F, Fan J, Wang J, Peng X. *Analyst*, 2013, 138: 775–778
- 68 Zhang R, Zhao J, Han G, Liu Z, Liu C, Zhang C, Liu B, Jiang C, Liu R, Zhao T, Han MY, Zhang Z. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 3769–3778
- 69 Shioji K, Oyama Y, Okuma K, Nakagawa H. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20: 3911–3915
- 70 Prime TA, Forkink M, Logan A, Finichiu PG, McLachlan J, Li Pun PB, Koopman WJH, Larsen L, Latter MJ, Smith RAJ, Murphy MP. *Free Radical Biol Med*, 2012, 53: 544–553
- 71 Hirosawa S, Arai S, Takeoka S. *Chem Commun*, 2012, 48: 4845–4847
- 72 Krumova K, Greene LE, Cosa G. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 17135–17143
- 73 Sunwoo K, Bobba KN, Lim JY, Park T, Podder A, Heo JS, Lee SG, Bhuniya S, Kim JS. *Chem Commun*, 2017, 53: 1723–1726
- 74 Gong X, Yang XF, Zhong Y, Chen Y, Li Z. *Dyes Pigments*, 2016, 131: 24–32
- 75 Mao GJ, Zhang XB, Shi XL, Liu HW, Wu YX, Zhou LY, Tan W, Yu RQ. *Chem Commun*, 2014, 50: 5790–5792
- 76 Zhu X, Xiong M, Liu H, Mao G, Zhou L, Zhang J, Hu X, Zhang XB, Tan W. *Chem Commun*, 2016, 52: 733–736
- 77 Zhou Y, Zhang X, Yang S, Li Y, Qing Z, Zheng J, Li J, Yang R. *Anal Chem*, 2017, 89: 4587–4594

Recent advances in mitochondria-targetable organic molecule fluorescent probes for imaging of ROS

Haibin Xiao, Ping Li^{*}, Wen Zhang, Wei Zhang, Bo Tang^{*}

Key Laboratory of Molecular and Nano Probes, Ministry of Education; College of Chemistry, Chemical Engineering and Materials Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China

^{*}Corresponding authors (email: tangb@sdnu.edu.cn; lip@sdnu.edu.cn)

Abstract: Mitochondria, as the “energy power house” of the cell, utilize the oxygen to engage in oxidative phosphorylation accompanying production of triphosphadenine (ATP), which will supply energy for the cell and organism. Meanwhile, various reactive oxygen species (ROS) will produce rapidly in mitochondria coupling with the electron leak in respiratory chain. The mitochondrial ROS plays important function in many processes, such as maintaining redox equilibrium, regulating cellular proliferation, differentiation and apoptosis. When the level of ROS exceeds the antioxidant defense capability of organism, various diseases will appear. Therefore, developing new methods to detect the level of ROS in mitochondria is of great importance for exploring the functional regulation effect of ROS. It’s still a huge challenge to accurately monitor ROS for chemistry, biology and medicine due to the properties of ROS, including low concentration, short lifetime and high reactivity. Fluorescence imaging is a powerful tool to track ROS in live cell and *in vivo*, because of its remarkable advantages, such as high temporal-spatial resolution, excellent biocompatibility and high sensitivity. In recent years, many fluorescent probes have been developed and applied for fluorescence imaging of ROS within mitochondria. In this review, we mainly summarize the progress of mitochondria-targetable organic small molecule fluorescent probes for detection of various ROS. Furthermore, future research directions for the construction of novel mitochondrial fluorescent probes as well as dissection of the cellular function of ROS by utilizing fluorescence imaging are prospected.

Keywords: mitochondria, organic molecule fluorescent probes, reactive oxygen species, live cells, fluorescence imaging

doi: [10.1360/N032017-00054](https://doi.org/10.1360/N032017-00054)