比率成像纳米探针在内源性小分子成像中的应用

殷晴晴¹, 陈梅芳¹, 陈斌龙¹, 王增辉¹, 汪贻广^{1,2*}

1. 北京大学药学院药剂学系, 北京 100191

2. 北京大学药学院天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191

*通讯作者, E-mail: yiguang.wang@pku.edu.cn

收稿日期: 2018-03-29; 接受日期: 2018-05-29; 网络版发表日期: 2018-10-09

国家重点研发计划(编号: 2017YFA0205600)和国家自然科学基金(编号: 81473157, 81622046)资助项目

摘要 内源性信号小分子在生命活动过程中起着重要的作用, 其浓度的变化和分布的异常与多种生理病理状态相关. 设计可实时检测其在体内动态变化的成像体系对疾病诊断、病因探讨及细胞信号转导机制的研究至关重要. 传统的检测方式多采用单一通道成像, 干扰因素较多难以精确定量. 近年来, 比率成像纳米探针借助其独特的优势被广泛应用于生物医学领域. 本文简要综述了响应于氢离子、活性氧/氮物种(ROS/RNS)和气体信号分子的比率成像纳米探针的设计原理及生物学应用.

关键词 比率成像, 纳米探针, pH敏感, ROS/RNS, 气体信号分子

1 引言

C、H、O、N等化学元素在体内以各种形式存在, 构成了一切生命活动的物质基础. 各种形式的无机物在生命活动过程中起着重要的作用. 例如, 氢离子维持体内的酸碱平衡, 活性氧/氮物种(reactive oxygen and nitrogen species, ROS/RNS)构成了机体氧化系统, 钙离子和一些气体分子作为信使参与众多信号通路的转导, 钾离子和钠离子维持细胞渗透压等. 这些小分子在体内的浓度变化和位置分布异常与很多生理病理状态相关, 因此对其进行实时可视化在体检测有着重要的意义.

基于荧光探针的分子成像技术由于其无创、灵敏度高、选择性好及时空分辨率高等优势, 在近20年来发展迅速^[1]. 然而, 单一的荧光信号可能探针局部浓度

和周围环境等因素影响, 难以实现待分析物的准确定量^[2], 特别是在体深层组织信号小分子的检测. 而同时具有两个发射峰的比率型荧光探针, 内置校正, 在成像时可有效地排除组织厚度、光漂白和激发光强度等因素的干扰, 因此设计比率成像探针对于提高微观检测和痕量分析准确性有着重要的意义^[3].

利用同一体系中两个或多个成像分子对内源性信号小分子的不同响应性, 检测两个发射峰比值的变化来定量待分析物常被用于比率成像纳米探针的设计. 改变成像分子光学性质的原理有光致电子转移(photo-induced electron transfer, PET)^[4]和分子内电荷转移(intramolecular charge transfer, ICT)^[5]等. 例如, 荧光素氟硼二吡咯质子化后PET作用被阻断而发出荧光^[6], 其可以和pH非敏感的荧光素搭配构建比率成像纳米探针. 此类纳米探针设计的关键是两个对待检测物响应性不

引用格式: Yin Q, Chen M, Chen B, Wang Z, Wang Y. Applications of ratiometric nanoprobe in endogenous signal micromolecules imaging. *Sci Sin Chim*, 2018, 48: 1376–1384, doi: 10.1360/N032018-00068

同的成像分子, 而对纳米载体的性质和组装形式无特殊要求. 近年来, 随着小分子荧光素的大量涌现, 该策略广泛地应用于氢离子、ROS/RNS等物质的检测. 除了对某一成像分子光学性质的直接改变外, 还可基于共振能量转移^[2]原理, 改变两个成像分子之间距离, 基于两个发射峰比值的变化来构建比率成像纳米探针. 共振能量转移包括荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)、生物发光共振能量转移(luminescent resonance energy transfer, LRET)和化学发光共振能量转移(chemiluminescence resonance energy transfer, CRET)等. 其设计原理为将能量共振转移的供体和受体分子同时连接在响应于待检测物而构象改变的分子上或纳米粒组装形态变化的载体上, 通过供受体分子间距离的远近, 改变两发射峰的比值实现比率成像. 因此, 智能的纳米载体是此类设计的关键. 在一些研究中, 两种策略可以联合使用.

目前, 比率成像探针可检测的物质多种多样, 包括阳离子(H^+ 、 Ca^{2+} 、 Hg^+ 、 Mg^{2+} 等)、阴离子(Cl^- 、 F^- 、 CN^- 等)、ROS/RNS自由基($ONOO^-$ 、 ClO^- 、 $\cdot OH$ 等)和气体小分子(NO 、 CO 、 H_2S)等. 成像的形式不仅限于荧光, 还有光声成像^[7,8]、表面增强的拉曼光谱^[9]等. 本文综述了纳米尺度比率成像探针近几年在生物医学领域的应用, 小分子探针不在综述范畴内.

2 比率成像纳米探针在内源性小分子成像中的应用

2.1 pH响应型比率成像纳米探针

大量的研究表明, pH是机体非常重要的参数, 细胞作为生物体最基本的结构和功能单元, 各细胞器因其功能各异而有着不同的pH (图1)^[10]. 以受体介导的内吞过程为例, 首先细胞膜凹陷为囊泡, 囊泡融合后形成早期内涵体(early endosome, EE), pH在6.3左右, 其弱酸性环境有利于受体和配体的分离; “货物”转运经过晚期内涵体(late endosome, LE), pH逐渐降低至5.5, 最终到达pH 4.7的溶酶体(lysosome, Ly), 溶酶体中的多种水解酶在pH为4.7时活性最佳, 有利于内源和外源物质的分解^[11]. 若细胞器内pH (intracellular pH, pH_i)发生改变, 会影响细胞正常的功能, 导致异常的细胞生长和分化^[12,13].

正常组织细胞外pH (extracellular pH, pH_e)在

图1 细胞中各种亚细胞器的pH^[10] (网络版彩图)

Figure 1 pH of the different subcellular compartments [10] (color online).

7.2~7.4, 为体内一些化学反应和生物过程提供适宜的条件^[14,15]. 而 pH_e 的反常和很多病理状态相关, 如酸性微环境是肿瘤的特征之一, pH_e 在6.2~6.8 (图2), 这是由肿瘤的异常代谢造成的, 肿瘤细胞主要通过有氧糖酵解来获取能量, 此过程产生的大量乳酸堆积在细胞外, 致使微环境偏酸性^[16]. 酸性微环境有利于肿瘤的增殖、侵袭和迁移^[17]. 因此, pH_i 和 pH_e 的精确测量和高分辨时空成像对病理探讨和疾病诊断有着重要的意义.

2.1.1 基于DNA纳米机器的pH比率成像探针

近年来, DNA因其独特的纳米尺寸、自我识别能力、便于设计和易于合成等优势被广泛地研究, 科学家构建了大量可操控的新型DNA纳米结构, 正逐步地应用于生物物理学、诊断学、药物递送和蛋白质组装等领域^[18-21]. 目前, 基于DNA结构检测pH的纳米探针大多是通过DNA响应 H^+ 致其构型发生改变设计, 其中i-motif、A-motif和三链DNA结构最为常见^[22-24].

i-motif是一种富含胞嘧啶(cytosine, C)碱基的DNA片段, 在酸性条件下质子化的胞嘧啶(C^+)通过氢键和未质子化的C配对, 从而形成一种分子内的C四重体结构, C^+ 在碱性条件下去质子化而重新打开^[25]. 这种pH触发的构型改变有着快速的响应时间、能循环数个周期且没有毒性副产物.

Krishnan等^[26]将i-motif构型的改变和FRET效应相结合, 设计了名为I-switch的比率成像纳米机器, 它包含三段寡核苷酸, O1和O2富含C碱基且同时与O3互补, FRET受体和供体探针分别连在O1和O2上, 其工作

原理如图3所示, 酸性条件下O3剩余单碱基位置折叠, O1和O2反向平行形成分子内i-motif, FRET效应产生, 碱性条件下, i-motif结构解散, FRET效应消失. I-switch的pH响应范围为pH 5.5~6.8, 且在生理条件下荧光信号和同等pH溶液中相比并未衰减. 利用该纳米机器, 成功检测了活细胞中阴离子配体结合受体介导的内吞通路pH的变化. 基于I-switch的设计原理, Krish-

nan等^[27]又设计了可同时检测两个内吞通路pH变化的纳米探针——SimpHony, 即在两个独立的pH敏感DNA纳米机器上分别“装配”了两种靶向元素, 使其能分别沿着弗林蛋白酶通路和转铁蛋白通路入胞.

三链DNA是指单链的DNA可与Watson-Crick碱基对中的嘌呤通过Hoogsteen氢键配对而特异性地结合到双螺旋的大沟里, 形成三链DNA结构, 常见的三碱

图 2 正常组织和肿瘤的细胞外pH^[16] (网络版彩图)
Figure 2 The pH values of normal and tumor cells ^[16] (color online).

图 3 (a) I-switch在低pH条件下“打开”, 高pH条件下“关闭”的工作原理示意图; (b) I-switch响应于pH打开(青色)和关闭(紫色)的响应时间; (c) 细胞对I-switch探针不同摄取时间供体荧光/受体荧光的伪彩成像; (d) I-switch探针测量的不同内吞时间各隔室的pH^[26] (网络版彩图)

Figure 3 (a) Schematic of the working principle of the I-switch in the “closed” state at low pH and in the “open” state at high pH. (b) Representative traces of response time for the formation of the open (cyan) and closed (magenta) states of the switch in response to pH change. (c) Pseudocolour D/A map of haemocytes pulsed with I-switch (Alexa-488/647) at the indicated chase times. Scale bar, 5 mm. (d) The table summarizes endosomal pH variation as a function of time ^[26] (color online).

基体系是 C^+ -G-C、T-A-T、A-A-T和G-G-C^[28]。Tan等^[29]利用FRET效应和 C^+ -G-C所处环境pH降低后可由双链DNA转化成三链DNA的性质设计了t-switch比率成像纳米探针, 为防止其在体内被降解, 在纳米探针表面修饰了PEI, 其pH响应范围为4.6~7.8, 可用于活细胞中内吞通路pH的检测。

2.1.2 基于纳米材料的pH比率成像探针

目前, 用于检测pH的纳米材料很广泛, 有聚合物^[6]、量子点^[30]和二氧化硅^[31]等, 相比于DNA纳米机器, 基于纳米材料的pH探针由于其独特的纳米尺寸可通过高渗透性和滞留效应(enhanced permeability and retention effect, EPR)蓄积在肿瘤部位, 来检测肿瘤微环境的pH, 而且一个纳米粒上可同时修饰多个成像单元, 增强成像效果。

Andresen等^[32,33]巧妙地设计了以粒径60 nm的聚丙烯酰胺纳米粒为载体、共价连接3种荧光素的三标比率成像纳米探针, 如图4所示。该体系中有两种pH敏感的荧光素——荧光素(FS)和俄勒冈绿(OG), 两者有着相同的发射峰(493 nm)但不同的 pK_a (相差2个pH), 这使其相比于单个pH敏感探针有着更宽的响应范围(pH 3.1~7.0)和更灵敏的检测能力, 另一pH非敏感探针罗丹明B (561 nm)作为内参。该纳米探针通过尼日利亚菌素处理过的HepG2细胞对不同pH下的荧光信号进行了校正, 确保在胞内pH测量的准确性。HeLa细胞摄取该探针后, 通过共聚焦显微镜能够实时观察到内吞过程的pH变化, 同时也可观察到经巴弗洛霉素A处理过的细胞, 溶酶体的pH由4.4升至6.5。

Wang等^[34]结合光和声的优势, 在前人研究^[35]的基

础上以聚丙烯酰胺纳米粒为载体包载比率pH光声探针SNARF-5F, 该探针在酸性条件下吸收光谱由600变成565 nm, 根据两者信号强度的比值可以检测pH变化, 灵敏度可达到0.1个pH^[36]。另外, 为了消除背景光声信号、增强对比度, 他们采用了四波长采集技术, 除了600和565 nm处信号外, 还额外采集了氧合血红蛋白和脱氧血红蛋白在576和584 nm的信号, 然后通过拆分技术得到更准确的光声信号, 可精确定量肿瘤微环境的pH。

除了上述体系外, 还有很多基于有机小分子和荧光蛋白的pH比率成像探针, 不在本文综述的范畴内。pH的示踪检测是比率成像纳米探针应用最为广泛的领域之一, 通过比率成像可精确测定内吞细胞器和肿瘤微环境的pH, 尤其是三标比率成像纳米探针, 检测范围为pH 3.2~7.0, 涵盖了生理条件下内吞过程所有pH的变化。

2.2 靶向活性氧/氮物种

众多病理过程都伴随着机体内活性氧/氮物种产生水平的提高, 从急性细菌感染到一系列慢性疾病, 如癌症、心血管疾病、糖尿病和关节炎等^[37]。除此之外, 一些ROS/RNS (如 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$)对胞内信号转导级联和转录因子的调节起着重要的作用^[38]。这驱动着研究者利用各种各样的材料检测和定量内源性ROS/RNS, 如小分子荧光素^[39-41]、单壁碳纳米管^[42]、量子点^[43]、基因编码蛋白质^[44]及一些偶联探针的无机纳米粒^[45,46]等。

鉴于ROS/RNS具有较高的反应活性, 许多用于体内检测的近红外探针必须能耐受ROS/RNS对其荧光

图4 (a) 三标聚丙烯酰胺纳米粒示意图; (b) 体外对FS、IOG和OG-FS pH响应性的标定; (c) HepG2细胞摄取三标探针24 h后的共聚焦成像^[33] (网络版彩图)

Figure 4 (a) Schematic of the cross-linked polyacrylamide nanoparticle. (b) *In vitro* calibration of the triple-labeled sensor with both OG and FS, and two dual-labeled sensors with either OG or FS. (c) *In vitro* calibration of the triple-labeled sensor with both OG and FS, and two dual-labeled sensors with either OG or FS ^[33] (color online).

信号的漂白, 以避免造成假阴性结果. 但一些探针在高氧化性ROS/RNS存在的条件下并不稳定, 如量子点^[47]和某些小分子探针^[48]等. Rao等^[8,49-51]独辟蹊径, 利用光稳定的半导体聚合物纳米粒(semiconducting polymer nanoparticles, SPNs)设计了比率成像纳米探针用于检测和定量ROS/RNS. Rao等^[51]最早报道了一种简称为DRONE的纳米粒, 可以利用FRET效应在体检测炎症微环境. DRONE是在ROS/RNS惰性的SPN (FRET供体)上修饰了对ROS/RNS敏感的小分子近红外探针(FRET受体), 该探针对ONOO⁻、ClO⁻和·OH都有较好的响应性, 当这3种物质存在时, FRET效应消失, 通过发射光谱的变化可检测炎症微环境.

与传统的荧光成像相比, 光声成像有着更强的穿透深度. 共轭半导体聚合物纳米粒由于其独特的光学性质, 除了应用于荧光成像外, 还可作为光声成像的造影剂. 利用这一性质, Rao等^[8]制备了两种可用于光声成像的半导体聚合物纳米粒SPN1和SPN2, 并利用具有更优光声信号的SPN1作为对ROS/RNS惰性的载体, 其在700 nm处的光声强度为Always-On信号, 包载对ROS敏感的花青染料IR775S, 其在820 nm处的光声强度为可变信号, 通过两种光声信号强度的对比示踪炎症部位(图5).

几乎与此同时, Rao等^[50]又利用SPN这一体系, 整

合FRET和CRET效应设计了可同时分别检测药物毒性诱导肝脏产生ROS和RNS的靶向比率成像纳米传感器, 实现在活体动物水平评价药物导致的肝毒性^[8]. 随后, Pu等^[7,52]也利用SPN体系进行了一系列ROS/RNS的光声成像研究, 设计出了特异性响应于某种ROS/RNS的比率光声成像纳米探针, 其中用于检测ONOO⁻的半导体纳米探针检测限为100 nM, 可检测生理静息状态下的ONOO⁻浓度, 相比于单一荧光探针检测限明显降低, 如基因编码荧光探针pGFP对ONOO⁻检测限为553 nM^[44].

综上, 研究者将对ROS/RNS敏感的荧光和光声成像分子与半导体聚合物结合起来, 巧妙地设计了一系列靶向示踪ROS/RNS的比率成像纳米探针, 既可以特异灵敏地响应于某种活性物种, 也可以同时检测多种物质, 与单一成像形式相比具有更优的检测灵敏度.

2.3 示踪气体信号分子

一氧化氮(NO)、一氧化碳(CO)和硫化氢(H₂S)被相继发现为内源性气体信号分子, 参与心血管、神经系统、免疫和肿瘤等多种生理过程, 具有重要的生物学功能^[53-55]. 然而, 随着研究的深入, 人们发现这类信号分子体内浓度的失稳会导致许多病理状态, 如NO的减少是导致肝脏缺血再灌注损伤的主要机制^[56],

图5 (a) 半导体聚合物纳米粒ROS传感机制; (b) 半导体聚合物纳米粒光声成像检测生理盐水(i)和酵母聚糖(ii)诱导的小鼠水肿部位产生的ROS, 比率成像的半导体聚合物纳米粒在酵母聚糖处理20 min后再肌肉注射入小鼠腿部^[8] (网络版彩图)

Figure 5 (a) Proposed ROS sensing mechanism. (b) Photoacoustic/ultrasound overlaid images of saline-treated (i) and zymosan-treated (ii) regions in the thigh of living mice ($n=3$). RSPN (3 mg in 50 mL) was intramuscularly injected into the thigh 20 min after zymosan treatment ^[8] (color online).

H₂S浓度升高会诱发高血糖症^[57]等。因此,在活细胞中实时追踪或捕获这类小分子,进一步探讨其在生物信号转导过程中的角色是亟待解决的科学问题。

传统检测气体信号分子的手段有电化学分析法、气相色谱法和比色法等,这些检测方法都难以实现在体实时检测。对于H₂S的检测,直到2011年,Chang等^[58]和He等^[59]先后利用小分子探针SF-1和SF-2验证了在活细胞中检测H₂S的可能性。其机理是利用小分子探针上叠氮基团与H₂S发生还原反应后,生成可发射荧光的罗丹明产物,用于荧光检测,但仍存在反应前后荧光强度增加不大、反应选择性差等缺点。为了解决上述问题,实现在体H₂S的可靠检测,Zhang等^[60]构建了基于LRET的比率型纳米探针。该探针以掺杂镧离子的上转化纳米粒(upconversion nanoparticles, UCNPs, NaYF₄: 20 mol% Yb, 1.8 mol% Er, 0.5 mol% Tm)为LRET效应的供体,以纳米粒表面修饰的能与H₂S特异性反应的香豆素型半菁(coumarin-hemicyanine, CHC1)染料为受体。CHC1与H₂S发生加成反应后,共轭体系被破坏,LRET效应减弱或消失,如图6所示。同时,以Tm离子在800 nm的激发光为内标。利用该体系实现了对HeLa细胞中经半胱氨酸激活的H₂S以及经脂多糖诱导炎症的小鼠体内H₂S高灵敏度、高选择性地实时成

像。无独有偶,同样基于LRET效应,Li等^[61]在UCNPs表面修饰的介孔二氧化硅里包载罗丹明B衍生物用于NO的成像。该UCNPs在540和656 nm处有两个发射峰,NO可使该探针的邻苯二胺发生开环反应,生成的新产物在500~600 nm处有很强的吸收,可与UCNPs形成LRET对,以 I_{656}/I_{540} 值的增加定量NO的浓度。该研究利用比率纳米探针证实了奥曲肽可以提高肝脏缺血再灌注损伤小鼠模型血液和肝脏中的NO浓度。

FRET效应也被广泛地应用于气体信号分子检测探针的设计,Zhu等^[62]将FRET效应供体BODInD-Cl和受体BODIPY 1两个探针,利用疏水相互作用包裹在PEG-DSPE胶束内核中,FRET受体BODInD-Cl和H₂S反应后能有效地关闭FRET效应。利用该体系证实了经氟伐他汀刺激后的巨噬细胞胞内H₂S浓度的升高与胱硫醚-γ-裂解酶(cystathione-γ-lyase, CSE)表达上调有关,并通过对比加入丝/苏氨酸蛋白酶Akt抑制剂前后H₂S产生量的变化,确定了Akt通路的激活和CSH/H₂S水平的提高有相关性。

目前,能够特异性地检测气体信号分子的比率成像小分子探针已经有较多的研究^[63-66],但是能够检测气体信号分子的纳米探针的研究仍然较为缺乏,且纳米载体多为无机材料,生物安全性有待提高。

3 总结与展望

近年来,比率成像纳米探针借助其独特的优势在环境检测、化学传感和生物可视化分析等众多领域取得了长足的发展。内源性信号小分子的高分辨时空成像对多种病理生理状态的研究有重要的意义,利用比率成像纳米探针在细胞和活体检测内源性信号小分子,可以有效地避免很多干扰因素,提供更准确可信的数据。但比率成像纳米探针并非完美,目前荧光比率成像的研究多集中在体外细胞水平,由于生物体自发荧光强、背景信号干扰等因素,在体长期实时示踪检测仍面临挑战,且比率成像纳米探针均只用于疾病的诊断,未能实现诊疗一体化,而多光子、近红外等背景干扰小,可用于光热、光动力治疗的探针在比率成像纳米探针的设计中应用较少。日后,随着小分子荧光探针和智能响应载体的不断开发,比率成像纳米探针进一步扩大检测对象,发展出能同时、分别检测多种物质的体系,为疾病的精确诊断提供多项参考。

图6 (a) 比率成像上转化纳米粒的设计及工作原理; (b) 小鼠肝脏内源性H₂S比率发光成像^[60] (网络版彩图)

Figure 6 (a) Schematic illustration of the LRET process between CHC1 and UCNPs. (b) Ratiometric UCL images of endogenous H₂S levels in mouse live tissues ^[60] (color online).

参考文献

- 1 Dean KM, Palmer AE. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 512–523
- 2 Yang Y, Huang J, Yang X, Quan K, Wang H, Ying L, Xie N, Ou M, Wang K. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 8340–8343
- 3 Demchenko AP. *J Fluoresc*, 2010, 20: 1099–1128
- 4 Urano Y, Asanuma D, Hama Y, Koyama Y, Barrett T, Kamiya M, Nagano T, Watanabe T, Hasegawa A, Choyke PL, Kobayashi H. *Nat Med*, 2009, 15: 104–109
- 5 Lin W, Long L, Yuan L, Cao Z, Chen B, Tan W. *Org Lett*, 2008, 10: 5577–5580
- 6 Ohgaki R, Teramura Y, Hayashi D, Quan L, Okuda S, Nagamori S, Takai M, Kanai Y. *Sci Rep*, 2017, 7: 17484
- 7 Yin C, Zhen X, Fan Q, Huang W, Pu K. *ACS Nano*, 2017, 11: 4174–4182
- 8 Pu K, Shuhendler AJ, Jokerst JV, Mei J, Gambhir SS, Bao Z, Rao J. *Nat Nanotech*, 2014, 9: 233–239
- 9 Peng R, Si Y, Deng T, Zheng J, Li J, Yang R, Tan W. *Chem Commun*, 2016, 52: 8553–8556
- 10 Casey JR, Grinstein S, Orlowski J. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11: 50–61
- 11 McMahon HT, Boucrot E. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12: 517–533
- 12 Pérez-Sala D, Collado-Escobar D, Mollinedo F. *J Biol Chem*, 1995, 270: 6235–6242
- 13 Roos A, Boron WF. *Physiol Rev*, 1981, 61: 296–434
- 14 Lardner A. *J Leukoc Biol*, 2001, 69: 522–530
- 15 Arnett TR. *J Nutrit*, 2008, 138: 415S–418S
- 16 Cardone RA, Casavola V, Reshkin SJ. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5: 786–795
- 17 Zhang X, Lin Y, Gillies RJ. *J Nucl Med*, 2010, 51: 1167–1170
- 18 Raschle T, Lin C, Jungmann R, Shih WM, Wagner G. *ACS Chem Biol*, 2015, 10: 2448–2454
- 19 Alivisatos AP, Johnsson KP, Peng X, Wilson TE, Loweth CJ, Bruchez MP, Schultz PG. *Nature*, 1996, 382: 609–611
- 20 Li S, Jiang Q, Liu S, Zhang Y, Tian Y, Song C, Wang J, Zou Y, Anderson GJ, Han JY, Chang Y, Liu Y, Zhang C, Chen L, Zhou G, Nie G, Yan H, Ding B, Zhao Y. *Nat Biotechnol*, 2018, 36: 258–264
- 21 Seeman NC, Sleiman HF. *Nat Rev*, 2017, 3: 1–23
- 22 Huang J, He Y, Yang X, Wang K, Ying L, Quan K, Yang Y, Yin B. *Chem Commun*, 2014, 50: 15768–15771
- 23 Saha S, Chakraborty K, Krishnan Y. *Chem Commun*, 2012, 48: 2513–2515
- 24 Li XM, Song J, Cheng T, Fu PY. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405: 5993–5999
- 25 Mergny JL, Lacroix L, Han X, Leroy JL, Helene C. *J Am Chem Soc*, 1995, 117: 8887–8898
- 26 Modi S, M.-g. S, Goswami D, Gupta GD, Mayor S, Krishnan Y. *Nat Nanotech*, 2009, 4: 325–330
- 27 Modi S, Nizak C, Surana S, Halder S, Krishnan Y. *Nat Nanotech*, 2013, 8: 459–467
- 28 Chan PP, Glazer PM. *J Mol Med*, 1997, 75: 267–282
- 29 Yang M, Zhang X, Liu H, Kang H, Zhu Z, Yang W, Tan W. *Anal Chem*, 2015, 87: 5854–5859
- 30 Dennis AM, Rhee WJ, Sotto D, Dublin SN, Bao G. *ACS Nano*, 2012, 6: 2917–2924
- 31 Kim S, Pudavar HE, Prasad PN. *Chem Commun*, 2006, 71: 2071
- 32 Søndergaard RV, Henriksen JR, Andresen TL. *Nat Protoc*, 2014, 9: 2841–2858
- 33 Benjaminsen RV, Sun H, Henriksen JR, Christensen NM, Almdal K, Andresen TL. *ACS Nano*, 2011, 5: 5864–5873
- 34 Jo J, Lee CH, Kopelman R, Wang X. *Nat Commun*, 2017, 8: 471
- 35 Horvath TD, Kim G, Kopelman R, Ashkenazi S. *Analyst*, 2008, 133: 747–749
- 36 Ray A, Yoon HK, Koo Lee YE, Kopelman R, Wang X. *Analyst*, 2013, 138: 3126–3130
- 37 Dröge W. *Phys Rev*, 2002, 82: 47–95
- 38 Holmström KM, Finkel T. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15: 411–421
- 39 Koide Y, Urano Y, Kenmoku S, Kojima H, Nagano T. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 10324–10325
- 40 Kundu K, Knight SF, Willett N, Lee S, Taylor WR, Murthy N. *Angew Chem Int Ed*, 2009, 48: 299–303

- 41 Liu C, Wu H, Wang Z, Shao C, Zhu B, Zhang X. *Chem Commun*, 2014, 50: 6013–6016
- 42 Jin H, Heller DA, Kalbacova M, Kim JH, Zhang J, Boghossian AA, Maheshri N, Strano MS. *Nat Nanotech*, 2010, 5: 302–309
- 43 Mancini MC, Kairdolf BA, Smith AM, Nie S. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 10836–10837
- 44 Belousov VV, Fradkov AF, Lukyanov KA, Staroverov DB, Shakhbazov KS, Tersikh AV, Lukyanov S. *Nat Meth*, 2006, 3: 281–286
- 45 Panizzi P, Nahrendorf M, Wildgruber M, Waterman P, Figueiredo JL, Aikawa E, McCarthy J, Weissleder R, Hilderbrand SA. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 15739–15744
- 46 Liu R, Li S, Yu X, Zhang G, Zhang S, Yao J, Keita B, Nadjio L, Zhi L. *Small*, 2012, 8: 1398–1406
- 47 Yan Y, Wang S, Liu Z, Wang H, Huang D. *Anal Chem*, 2010, 82: 9775–9781
- 48 Touthkine A, Nguyen DV, Hahn KM. *Org Lett*, 2007, 9: 2775–2777
- 49 Pu K, Mei J, Jokerst JV, Hong G, Antaris AL, Chattopadhyay N, Shuhendler AJ, Kurosawa T, Zhou Y, Gambhir SS, Bao Z, Rao J. *Adv Mater*, 2015, 27: 5184–5190
- 50 Shuhendler AJ, Pu K, Cui L, Uetrecht JP, Rao J. *Nat Biotechnol*, 2014, 32: 373–380
- 51 Pu K, Shuhendler AJ, Rao J. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 10325–10329
- 52 Zhang J, Zhen X, Upputuri PK, Pramanik M, Chen P, Pu K. *Adv Mater*, 2017, 29: 1604764
- 53 Polhemus DJ, Lefer DJ. *Circul Res*, 2014, 114: 730–737
- 54 Farah C, Michel LYM, Balligand JL. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15: 292–316
- 55 Szabo C. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15: 185–203
- 56 Abu-Amara M, Yang SY, Quaglia A, Rowley P, de Mel A, Tapuria N, Seifalian A, Davidson B, Fuller B. *Clin Sci*, 2011, 121: 257–266
- 57 Suzuki K, Olah G, Modis K, Coletta C, Kulp G, Gerö D, Szoleczky P, Chang T, Zhou Z, Wu L, Wang R, Papapetropoulos A, Szabo C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 13829–13834
- 58 Lippert AR, New EJ, Chang CJ. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 10078–10080
- 59 Qian Y, Karpus J, Kabil O, Zhang SY, Zhu HL, Banerjee R, Zhao J, He C. *Nat Commun*, 2011, 2: 495
- 60 Zhou Y, Chen W, Zhu J, Pei W, Wang C, Huang L, Yao C, Yan Q, Huang W, Loo JSC, Zhang Q. *Small*, 2014, 10: 4874–4885
- 61 Wang N, Yu X, Zhang K, Mirkin CA, Li J. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 12354–12357
- 62 Zhao C, Zhang X, Li K, Zhu S, Guo Z, Zhang L, Wang F, Fei Q, Luo S, Shi P, Tian H, Zhu WH. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 8490–8498
- 63 Peng H, Cheng Y, Dai C, King AL, Predmore BL, Lefer DJ, Wang B. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 9672–9675
- 64 Dhara K, Lohar S, Patra A, Roy P, Saha SK, Sadhukhan GC, Chattopadhyay P. *Anal Chem*, 2018, 90: 2933–2938
- 65 Lin VS, Chen W, Xian M, Chang CJ. *Chem Soc Rev*, 2015, 44: 4596–4618
- 66 Zhou Y, Zhang X, Yang S, Li Y, Qing Z, Zheng J, Li J, Yang R. *Anal Chem*, 2017, 89: 4587–4594

Applications of ratiometric nanoprobe in endogenous signal micromolecules imaging

Qingqing Yin¹, Meifang Chen¹, Binlong Chen¹, Zenghui Wang¹, Yiguang Wang^{1,2*}

¹ Department of Pharmaceutics, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China

² State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China

*Corresponding author (email: yiguang.wang@pku.edu.cn)

Abstract: Endogenous signal micromolecules play important roles in the process of life activities. The changes in concentration and the anomalies of their distribution are related to a variety of physiological and pathological states. The design of specific probes for the real-time sensing and imaging of biomolecules *in vivo* is significant for disease diagnosis, etiological study and understanding of cell signal transduction mechanism. However, precise quantification by the conventional single-emission-based sensors is fraught with trouble. Ratiometric nanoprobe has unique strength in accurate and quantitative analyses, which have been widely used in the field of biomedicine. In this review, we provide an overview of the design principles of nanoprobe that have been exploited for the ratiometric detection of various pathophysiological substances, including H^+ , ROS/RNS and gasotransmitter in biological samples.

Keywords: ratiometric imaging, nanoprobe, pH-sensitive, ROS/RNS, gasotransmitter

doi: [10.1360/N032018-00068](https://doi.org/10.1360/N032018-00068)