

近红外 H₂S 荧光探针研究进展

宋江涛, 袁跃华, 朱永军, 王玉珍, 田茂忠*, 冯 锋*

山西大同大学化学与化工学院, 化学生物传感山西省重点实验室, 山西 大同 037009

摘要 硫化氢(H₂S)是一种具有臭鸡蛋气味的无色气体,其不但存在于外界环境中,而且是继一氧化氮(NO)和一氧化碳(CO)之后生物系统中第三种重要的内源性气体信号分子,近年来因其对人类健康和疾病的影响而越来越受关注。H₂S可以作为抗氧化剂清除人体内的活性氧(ROS)和活性氮(RNS),参与多种细胞的生理反应,包括细胞凋亡、血管舒张、神经调节等,是多种组织中的细胞保护剂和气体传递剂。现代医学研究已证实硫化氢含量与糖尿病、阿尔茨海默病、帕金森病等特定疾病密切相关,但人们尚不清楚 H₂S影响细胞信号传导和其他生理事件的具体分子机制,因此开发用于可视化内源性 H₂S的方法、研究其在细胞和生物体中的动态分布将具有非常重要的意义。目前检测 H₂S浓度的近红外(NIR)荧光探针是一个研究的热点,这是因为在生物样本分析时近红外荧光探针具有许多显著的优点:光损伤更小、能穿透更深的组织、背景自荧光干扰低。在分子水平上,H₂S表现出独特的化学特性,既是良好的还原剂,又是良好的亲核试剂,用于 H₂S选择性检测的近红外荧光探针设计策略主要包括叠氮化物和硝基的还原、亲核进攻、加成反应等。该文章综述了近三年近红外 H₂S荧光探针的设计合成、识别机理、探针的性能及其在细胞或生物体中的荧光成像研究与最新进展,最后,对该类探针的未来研究方向和发展趋势进行了展望。

关键词 近红外; 硫化氢; 荧光探针; 识别机理与性能; 生物成像; 研究进展

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** R **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2022)11-3321-09

引言

硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)是活性硫家族的成员之一,它在调节细胞内氧化还原状态和其他参与人类健康和疾病的基本信号传导过程中发挥重要作用。比如 H₂S可以调节免疫系统、内分泌、神经、介导炎症、细胞凋亡、血管扩张和胃肠系统等,但其代谢异常又会导致许多疾病:如亨廷顿病,帕金森病和阿尔茨海默氏病等。内源性 H₂S一般可在三种不同酶的作用下由 L-半胱氨酸产生:胱硫醚 β-合成酶(CBS),胱硫醚 γ-裂合酶(CSE)和 3-巯基丙酮酸磺基转移酶(3-MST),酶的催化使得在不同组织和细胞中产生的 H₂S含量不同。H₂S作为一种重要的信号分子,已引起人们对其与生理和病理相关的分子机制的关注,这也导致准确检测 H₂S浓度的迫切需求和重要性。目前,检测硫化氢的主要方法有:比色法、电化学法、气相色谱、金属诱导硫沉淀法等,相比较而言,荧光分子探针及成像技术具有灵敏度高、分辨率

高、非放射性、价格低、实时、对生物体无损伤等优点^[1]。为了更好地检测细胞和生物体内 H₂S浓度,很多科学家开发了近红外荧光探针(发射波长在 650~1700 nm),与短波长激发的荧光探针相比,NIR 荧光探针背景干扰少,可以穿透更深层次的组织,并且具有更高的信噪比,对细胞损伤也更小。

近年来,文献报道的近红外型 H₂S 荧光探针主要识别机理^[2]包括:(1)基于 H₂S 亲核取代反应;(2)基于 H₂S 还原反应;(3)基于二硫键反应;(4)基于加成反应。本文综述了近三年近红外荧光探针对于 H₂S 的识别机理、探针的性能及其在细胞或生物体中的荧光成像应用,并展望了近红外 H₂S 荧光探针的发展趋势和应用前景。

1 近红外 H₂S 荧光探针

1.1 基于亲核取代反应的近红外 H₂S 荧光探针

硫化氢(H₂S)在水溶液中依次水解成 HS⁻ 和 S²⁻,在生

收稿日期: 2021-09-03, 修订日期: 2022-03-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(21375083, 21175085), 山西省基础研究计划项目(20210302123479, 202103021224312), 大同市重点研发计划项目(2019019), 山西大同大学研究生教育创新项目(20CX06)资助

作者简介: 宋江涛, 1995 年生, 山西大同大学化学与化工学院硕士研究生 e-mail: 582011307@qq.com

* 通讯作者 e-mail: tmzhong2002@163.com; feng-feng64@263.net

理 pH 下主要以阴离子状态存在。HS⁻ 和 S²⁻ 是强亲核试剂, 这提供了选择性检测 H₂S 的可能性。基于亲核取代反应的 H₂S 荧光探针的识别基团多为强吸电子基团, 这些识别基团具有易修饰, 响应快, 选择性好等优点, 故被广泛用于构建近红外 H₂S 荧光探针。

1.1.1 基于 2,4-二硝基苯醚(DNP)硫解的近红外 H₂S 荧光探针

2,4-二硝基苯本身带有强吸电子的硝基, 因此 2,4-二硝基苯基探针一般呈猝灭荧光态, 本身荧光量子产率低; 但在

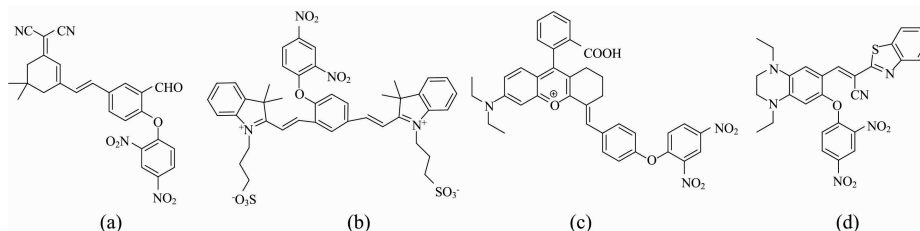


图 1 基于 DNP 的 H₂S 荧光探针结构

Fig. 1 Chemical structures of DNP-based fluorescent probes for H₂S

采用花菁染料, Lin 等^[4]研制出一种新型高水溶性硫化氢 NIR 荧光探针[图 1(b)]. 此探针对于 H₂S 的快速响应时间为 2 min, 在 PBS 缓冲水溶液中对 H₂S 的 LOD 为 11 nmol · L⁻¹, 具有大的斯托克斯位移(90 nm), 对 H₂S 检测具有高选择性, 无需有机溶剂或表面活性剂的辅助。当和 H₂S 反应后, 光诱导电子转移(PET)过程被阻断, 探针在 680 nm 处荧光增强了 115 倍。在纯生物环境中此探针快速检测有利于体内和体外样品中 H₂S 的监测。探针具有溶酶体靶向性, 能够检测酶促/非酶促生物合成 H₂S。该探针已成功用于活体小鼠 H₂S 检测。

Zhao 等^[5]选择具有良好化学稳定性的长沙近红外染料 CS-OH 作为荧光团设计合成了一种新的线粒体靶向 NIR 硫化氢荧光探针[图 1(c)]. 在 PBS 缓冲液(pH 7.4, 包含 1% DMSO 作为溶剂)中加入 H₂S, 探针在 660 nm 处出现一个新的荧光发射峰; 碱性条件下(670 nm 激发), 在 720 nm 处出现新的荧光发射峰, 这分别归因于 CS-OH 的酚形式和酚酸根离子形成。该探针化学稳定性好, 对 H₂S 响应快速, 可高灵敏、高选择检测 H₂S, LOD 为 89.3 nmol · L⁻¹。此探针还成功实现了对活 HeLa 细胞中外源性与内源性 H₂S 荧光成像。

亚氨基香豆素苯并噻唑(ICBT)荧光团因其高光稳定性和高荧光量子产率而备受关注, 2020 年, 基于 HS⁻ 引发的两步串联反应(硫解和环化反应)形成 ICBT 骨架导致荧光增强机理, Zhong 等^[6]报道了一种 NIR 硫化氢荧光探针[图 1(d)]. 在 PBS 和 THF 的混合溶液中(10 mmol · L⁻¹, pH 7.4, 30% THF), 探针本身不发荧光, 当加入 10 当量的 HS⁻ 时, 用 562 nm 波长的光激发下, 该探针发出红色荧光, 652 nm 处荧光强度增强了 200 倍。该探针具有大斯托克斯位移(126 nm), 对 H₂S 表现出优异的选择性, 其 LOD 为 38.3 nmol · L⁻¹。应用研究表明, 此探针可以灵敏地检测红酒、天然水、活细胞中的 H₂S, 并且可以用于定性检测 H₂S 试

和 H₂S 反应后, 2,4-二硝基苯离去, 探针荧光恢复。基于易于制备的二氰基异佛尔酮荧光团, Qian 等^[3]设计合成了一种在生物系统中使用的邻甲醛基辅助硫解 DNP 醚 NIR 荧光探针[图 1(a)]. 此探针对于 H₂S 具有高灵敏度和选择性, 加入 H₂S 后, 荧光增强 160 倍, 响应时间 15 min, 检测限(LOD)为 58.797 nmol · L⁻¹, 斯托克斯位移(Stokes)为 170 nm。该探针成功应用于生物系统(活细胞、组织和小鼠)中 H₂S 荧光成像。

纸条。

1.1.2 基于硝基苯并噻二唑(NBD)亲核取代的近红外 H₂S 荧光探针

以 NBD 醚为反应位点 Gong 等^[7]设计合成了一种新型 NIR 硫化氢荧光探针[图 2(a)], 该探针在 37 °C 的 Tris-HCl 缓冲液(含 20% THF)中可以选择性识别 H₂S, 可对 H₂S 快速响应(小于 3 min), 具有大 Stokes 位移(166 nm)和高灵敏度(LOD: 26 nmol · L⁻¹)。随着 H₂S 的加入, 探针在 744 nm 处形成一个新的荧光发射峰, 荧光强度增大 40 倍。该探针已成功应用于活细胞中外源性和内源性 H₂S 的荧光成像以及活小鼠中 H₂S 的快速成像。

基于双氰基异佛尔酮 Huang 等^[8]开发了一种 NIR 硫化氢荧光探针[图 2(b)]. H₂S 可以特异性诱导 NBD 胺键硫解, 从探针上裂解 NBD 部分, 从而释放出双氰基异佛尔酮基团。在 PBS 溶液中, 随着 Na₂S 浓度(0~100 μmol · L⁻¹)的不断增加, 探针 7 在 670 nm 处的荧光明显增强, 斯托克斯位移为 186 nm, 对 H₂S 的 LOD 为 0.03 μmol · L⁻¹。该探针对于 H₂S 具有很高的选择性, 已成功应用于不同肿瘤细胞和肝组织中的内源性 H₂S 成像。

以香豆素类荧光团为受体, 4-氨基-硝基苯并噻二唑和 1,8-萘二甲酰亚胺作为能量供体, Zhang 等^[9]报道了两种基于荧光共振能量转移(FRET)的比率 H₂S 荧光探针[图 2(c, d)]. 探针识别机理是 HS⁻ 和酰亚胺碳的亲核加成破坏了花菁荧光团的大共轭体系, 导致其近红外吸收的急剧减弱, 阻断了 FRET 过程, 绿色荧光增强。在 PBS 水溶液中, 随着 NaHS 量增加, 探针[图 2(c)]在 665 nm 处的荧光强度明显减弱, 而 530 nm 处的荧光强度明显增强, 当 H₂S 的浓度从 0 增加到 200 μmol · L⁻¹ 时, 荧光强度比 F₅₃₀/F₆₆₅ 从 0.75 增加到 7.6, 量子产率从 0.6% 增大到 5.0%, 该探针的 LOD 约为 0.5 μmol · L⁻¹, 并已成功应用于 HepG-2 细胞中外源性和内源性 H₂S 的荧光成像。探针[图 2(d)]的 FRET 效率较

低, LOD 约为 $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 加入 H₂S 后, F_{540}/F_{660} 从 2.6 增加到 7.8, 量子产率从 0.3% 增大到 1.5%。

2020 年, 基于亚甲蓝荧光团 Wei 等^[10]开发了一种 NIR 硫化氢荧光探针[图 2(e)]。在 C₂H₅OH : PBS 缓冲水溶液中, 加入 H₂S 后, NBD 基团裂解离去, 684 nm 处的荧光强度增强, 显示出强红色荧光, 其荧光强度增大约 60 倍, 检测 H₂S 的 LOD 为 $4.3 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该探针可用于细胞荧光成像, 还可作为解硫化物中毒的药物。

1.1.3 基于 2,4-二硝基苯磺酰(DNBS)的近红外 H₂S 荧光探针

使用 BODIPY 衍生的三苯胺作为荧光团, Li 等^[11]构建了一种用于 H₂S 检测的新型 NIR 荧光探针[图 3(a)], 该探针在 THF 和 PBS 缓冲液的混合溶液中, 加入 H₂S 后, 探针在 716 nm 处荧光强度明显增强。探针具有以下优点: 对 H₂S 响应迅速(<150 s), 灵敏度高(LOD 为 $6.74 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 近红外发射(716 nm), 选择性好。该探针已成功用于 HCT116 细胞内源 H₂S 的荧光成像。

基于具有优异性能的二氰基佛尔酮荧光染料, Hong 等^[12]设计合成了一种新型 NIR 硫化氢荧光探针[图 3(b)], 该探针引入 DNBS, 首次利用磺酰胺作为 H₂S 的反应位点, 更重要的是它对 H₂S 具有快速(响应时间小于 1 min)、高选择性和高灵敏度(LOD: $6 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)响应, 具有明亮的近红外荧光输出(荧光增强大于 130 倍), 具有显著的大 Stokes 位移(221 nm)。而且, 它具有较低的细胞毒性, 已成功用于活 HeLa 细胞和活鼠体内 H₂S 的跟踪和成像。

基于四氢喹啉亚胺胺香豆素 Feng 等^[13]开发了一种 NIR 硫化氢荧光探针[图 3(c)]。该探针具有快速、明显的近红外荧光开启检测 H₂S 的过程, 具有很高的选择性和灵敏度(LOD 为 $10 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。加入 NaHS 后, 在 2 min 内探针在 652 nm 处的荧光强度增大约 35 倍。此外, 该探针具有显著的大 Stokes 位移(128 nm)和低细胞毒性, 已成功用于活 HeLa 细胞外源性 H₂S 和活 RAW264.7 细胞内源性 H₂S 的荧光成像, 同时, 此探针也成功用于活鼠实时成像。

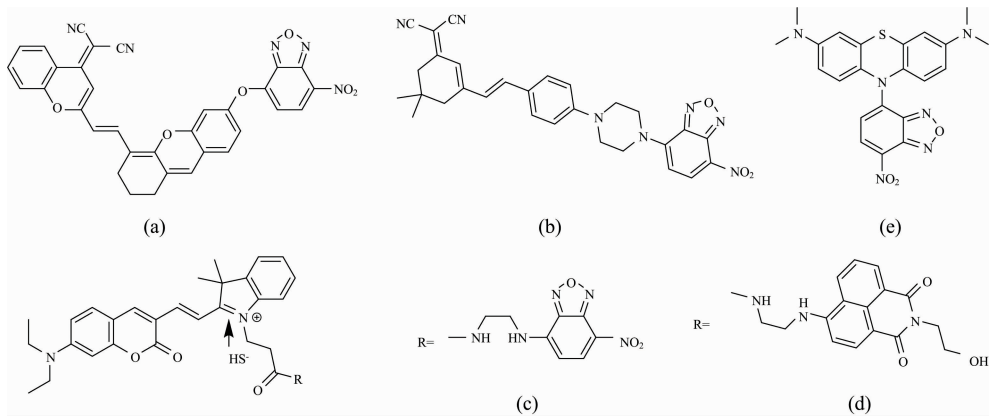


图 2 基于 NBD 的 H₂S 荧光探针结构

Fig. 2 Chemical structures of NBD-based fluorescent probes for H₂S

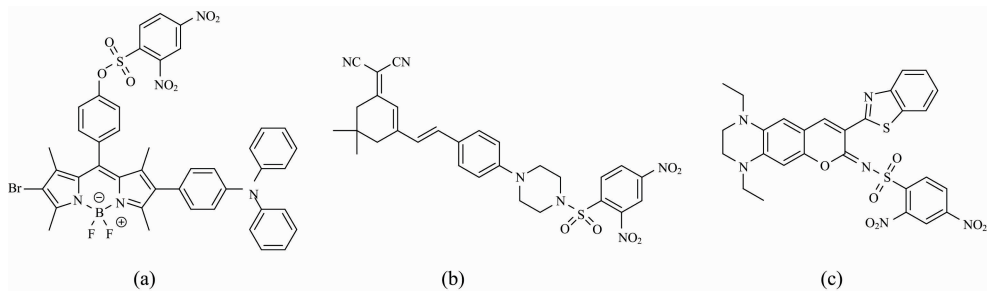


图 3 基于 DNBS 的 H₂S 荧光探针结构

Fig. 3 Chemical structures of DNBS-based fluorescent probes for H₂S

1.1.4 其他基于亲核取代反应的近红外 H₂S 荧光探针

可激活近红外二区(NIR-II)荧光探针在深层组织成像中应用前景广阔。Dou 等^[14]提出了一种灵活的策略来调节 NIR-II 荧光探针的发射波长, 基于 D- π -A 分子骨架设计合成了四种 NIR-II 的 H₂S 荧光探针[图 4(a-c)]。通过延长 BODIPY 荧光团 π 共轭体系和增强供体的供电子能力, 这些探针被 H₂S 激活时的最大荧光发射峰可以从 925 nm 红移至

1 205 nm。经过光物理性能评价, 探针[图 4(c)]在 H₂S 激活后表现出高灵敏度(LOD 为 $51 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)和高选择性, 斯托克斯位移大(>215 nm)、快速响应和长波段 NIR-II 荧光发射(最大荧光发射峰在 1 140 nm)的理想组合, 该探针已成功应用于荷瘤小鼠内源性 H₂S 生成和波动的实时监测。此外, 通过荧光成像发现 H₂S 浓度与肿瘤进展呈正相关。

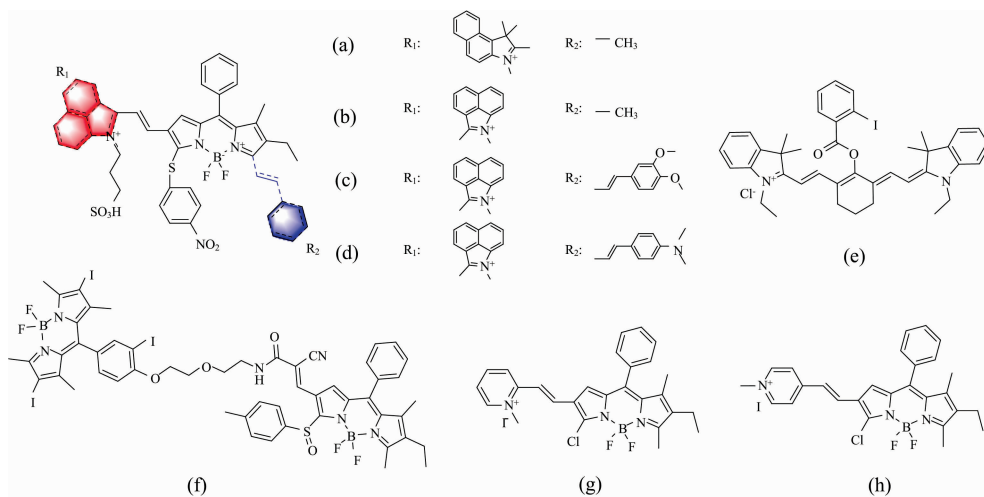


图 4 其他基于亲核反应 H_2S 荧光探针结构

Fig. 4 Chemical structures of other H_2S fluorescent probes based on nucleophilic attack

通过荧光成像和光声成像优势互补, Chen 等^[15]报道了比率光学/PA 双模态 H_2S 探针[图 4(e)], 该探针通过苯甲酰氯与中位羟基取代七甲川菁染料反应合成, 识别 H_2S 是基于酮-烯醇异构化传感机理。在 HEPES 缓冲溶液中, 探针的最大荧光发射峰在 805 nm 处, 随着 H_2S 浓度的增加, 其 630 nm 处的荧光强度逐渐增强, 805 nm 处的荧光强度随之减弱, 发射比 F_{630}/F_{805} 呈线性增强, 荧光强度增大 183 倍, 对 H_2S 的 LOD 为 $0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 该探针选择性好。通过光学/PA 双模成像证实了 s-腺苷-甲硫氨酸刺激的内源性 H_2S 在肝脏中增强, 证明比率光学/PA 双模成像是追踪活鼠和组织中信号小分子浓度增大的有效方法, 这将预示光学和 PA 成像结合起来具有广阔的应用前景。

Wang 等^[16]研制了一个由 H_2S 激活荧光成像探针[图 4(f)]。在 PBS 缓冲液中, 加入 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2S , 500 nm 处的吸收峰强度明显下降, 同时 655 nm 处出现了新的吸收峰, 探针红移 155 nm, 在 712 nm 处荧光增强 137 倍。该探针对于 H_2S 的检测灵敏度高, NIR 荧光随 H_2S 浓度 ($0 \sim 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 呈线性增加, LOD 为 $21 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。所设计的探针具有 H_2S 引发近红外荧光点亮与有效生成 $^1\text{O}_2$ 的优点, 能够选择性地可视化富含 H_2S 的癌症。这种可控的光动力抗癌治疗使治疗效率最大化, 副作用最小化。值得注意的是, 纳米封装的设计加速了探针对于 H_2S 的响应反应。报道说该项工作将促进在癌症的精确诊断和治疗方面的明显进步。

2020 年, Wang 等^[17]报道开发出对 H_2S 聚集增强响应的 NIR 小分子探针[图 4(g, h)], 其可用于体内富含 H_2S 癌症的靶向成像。探针设计引入的 N-乙基吡啶对亲水性和亲脂性平衡的微妙调节使这些探针具有在生理条件下自发组装成纳米探针的能力。处于聚集态而不是分子溶解态的这种探针在 H_2S 特异性激活时显示近红外荧光, 光声信号打开, 根据体内 H_2S 含量差异实现癌症的可视化和分化。在 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{Tris-HCl}$ 缓冲体系中, 加入 H_2S 后, 探针和 H_2S 发生反应, 在 718 nm 处的荧光明显增强, 聚集态的探针[图 4

(g)]对 H_2S 的 LOD 为 $60 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 该探针已成功应用于 HCT116 细胞和荷瘤小鼠中内源性 H_2S 的成像, 且可用于区分癌症细胞和正常细胞, 此外, 在对探针的识别机理探究中发现探针的正电荷密度对 HS^- 富集有重要影响, 它可以诱导和加快反应速度。当探针[图 4(h)]在 FW(80%~100%) 缓冲体系中时出现聚集状态, 该聚集态探针可对 H_2S 进行特异性识别, 744 nm 的 NIR 吸收峰明显增强, 探针在聚集态下对 H_2S 的 LOD 为 $760 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2 基于还原反应的近红外 H_2S 荧光探针

H_2S 是一种强的还原剂, 叠氮基与硝基都会被 H_2S 还原, 还原成氨基后, 其电子性质有明显不同, 此外, 荧光母体上易引入叠氮基与硝基官能团, 因此, 一些基于还原反应的近红外 H_2S 荧光探针已被成功构建。

1.2.1 基于叠氮化物还原的近红外 H_2S 荧光探针

为了确定细胞内 Ca^{2+} 在 H_2S 体内平衡中的作用, Wen 等^[18]制备了一种 NIR 硫化氢荧光探针[图 5(a)], 该探针由 4-氨基苯甲醇和 NaN_3 合成了 4-叠氮基苯甲醇, 然后, 利用 4-叠氮基苯甲醇与亚甲基蓝的氨基甲酰氯衍生物之间的缩合反应获得探针。 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的探针在 DMSO/PBS 缓冲水溶液中没有明显的荧光。加入 $160 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na_2S 后, 探针在 687 nm 处的荧光明显增强, 与 H_2S 反应后, 探针的荧光量子产率从 0.02 增加到 0.13, 探针对 H_2S 的 LOD 为 $0.32 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 响应时间为 60 min。使用该探针, 他们对 Ca^{2+} 触发 HeLa 细胞中过量的 H_2S 水平进行了成像, 并研究了它们之间的依赖效应。此外, 报道还提供了一个 Ca^{2+} 介导的活细胞 H_2S 浓度剧增的潜在途径, 为活细胞复杂的信号转导提供了新的见解。

用 NIR 花菁染料作为荧光团 Zhou 等^[19]设计合成了一种新的基于 PET 的线粒体靶向 NIR 硫化氢荧光探针[图 5(b)]。在 HEPES/乙醇缓冲水溶液中, 当加入 H_2S 后, 探针在 736 nm 处发射强荧光, 其荧光量子产率由 0.002 增大到 0.05, LOD 为 $20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 响应时间为 30 min。在 $0 \sim 40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, 736 nm 处的荧光强度与 Na_2S 浓度之间

呈现很好的线性关系。该探针不受各种氨基酸和阴离子的干扰, 检测 H₂S 选择性好。其具有较低的细胞毒性、良好的膜

通透性和近红外发射优点, 已成功应用于活细胞线粒体和体内 H₂S 的成像。

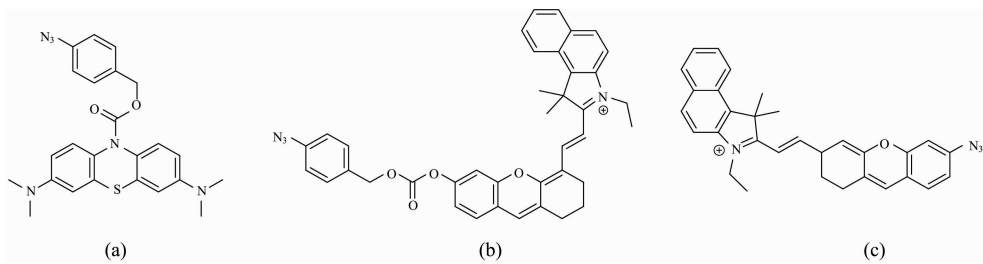


图 5 基于叠氮化物还原的 H₂S 荧光探针结构(a, b, c)

Fig. 5 Chemical structures of H₂S fluorescent probes based on azide reduction(a, b, c)

Yao^[20]等制备了基于叠氮基的一种高灵敏度和高选择性的 NIR 荧光探针[图 5(c)], 该探针具有良好的稳定性、低 LOD 和生物安全性。探针的叠氮基提供了 HS⁻ 的识别位点, 质子进一步诱导中间体分解生成荧光染料。在 pH 7.4 的 PBS 缓冲液中加入 NaHS, 625 nm 处的吸收峰强度降低, 而 710 nm 处的新吸收峰稳步增强, 溶液颜色由蓝色变为绿色, 同时, 735 nm 处的荧光强度增大。该探针 735 nm 处的荧光强度与 NaHS 浓度(1~14 当量)之间存在线性关系, LOD 为 26.0 nmol · L⁻¹, 响应时间为 30 min。重要的是, 该探针能够监测药物在活细胞和小动物体内释放的 H₂S。

1.2.2 基于硝基还原为胺的近红外 H₂S 荧光探针

基于 ICT 机理, Wu 等^[21]制备了一种基于异佛尔酮的 NIR 比率 H₂S 荧光探针[图 6(a)]。在 pH 7.4 的 PBS 缓冲溶液中加入 H₂S, 探针在 565 nm 处的荧光强度减弱, 650 nm 处出现新的荧光发射峰且荧光强度明显增强, 溶液颜色由黄色变为红色。该探针检测 H₂S 的灵敏度高(LOD 为 1.08 nmol · L⁻¹)和响应速度快(<120 s)。此外, MTT 结果显示, 该探针具有低毒性, 其可以对活癌细胞中 H₂S 进行荧光成像且已成功应用于小鼠成像。

Kumar 等^[22]设计并合成了含有 NO₂ 和丙炔氧基两个不同识别官能团的茚二酰亚胺类 H₂S 和 Pd⁰ 双分析 NIR 荧光探针[图 6(b)]。此探针具有高灵敏度和高选择性, 对 H₂S 的 LOD 为 1.21 nmol · L⁻¹(紫外), 6.6 nmol · L⁻¹(荧光)。此外, 该探针在血清、尿液和活 A549 细胞中检测 H₂S 和 Pd⁰ 的实际应用已得到证实。

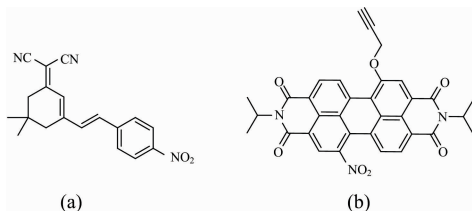


图 6 基于硝基还原为氨基的 H₂S 荧光探针结构(a, b)

Fig. 6 Chemical structures of H₂S fluorescent probes based on reduction of nitro groups to amines (a, b)

1.3 基于二硫键反应的近红外 H₂S 荧光探针

当 H₂S 在硫中心发生亲核进攻之后, 生成的中间体也

是一种硫醇, 这种硫醇可以进行第二次亲核加成。这种双亲核性质是 H₂S 所特有的, 一些基于二硫键反应的近红外 H₂S 荧光探针已被成功开发。

基于亲核取代环化反应 Men 等^[23]制备了新型近红外 H₂S 荧光探针[图 7(a)]。在 DMSO-PBS 缓冲水溶液中, 当加入 S²⁻ 的浓度为 20 μmol · L⁻¹ 时, 探针的荧光强度达到最大, 680 nm 处的荧光强度与 H₂S 浓度(0~10 μmol · L⁻¹)呈线性关系, 探针对 H₂S 的 LOD 为 1.1 nmol · L⁻¹。此探针在没有 H₂S 存在下对 pH 不敏感(pH 5.0~10.0)。该探针生物相容性较好, 已成功应用于活 HeLa 细胞中 H₂S 的荧光成像。

基于“连续”亲核取代反应 Wang 等^[24]开发了新型近红外 H₂S 荧光探针[图 7(b)]。加入 H₂S, 探针荧光强度增大 22 倍(639 nm), 对 H₂S 的 LOD 为 36 nmol · L⁻¹。此探针可以用于靶向线粒体, 可用于检测 HeLa 细胞中外源性和内源性 H₂S 含量, 由于其信噪比高, 也适用于小鼠 H₂S 的荧光成像。

1.4 基于加成反应近红外 H₂S 荧光探针

HS⁻ 作为良好的亲核试剂, 可以加成到荧光分子缺电的碳碳双键上, 导致探针分子的 π 共轭体系破坏, 引起荧光发射波长位移, 此方法已被用于近红外 H₂S 荧光探针的开发。

基于亲核加成反应 Ma 等^[25]制备出具有优异 H₂S 传感性能的新型 NIR 荧光探针[图 7(c)]。此探针对其他生物相关的阴离子、阳离子、活性硫和小分子具有很强的选择性, 加入 S²⁻, 在 655 nm 处荧光强度逐渐降低, 伴随产生一个新的、中心在 595 nm 处荧光强度逐渐增加的发射带, 两个发射带的强度比 F₅₉₅/F₆₅₅ 从 0.37 增加到 3.43。对 H₂S 有较低的 LOD(7.33 nmol · L⁻¹)。此外, 探针对 H₂S 响应快(反应在 20 s 内完成), 肉眼观察其颜色由深蓝色变为浅绿色。研究发现该探针具有线粒体靶向能力, 对 HeLa 细胞具有较低的细胞毒性, 并已成功用于活细胞和斑马鱼体内的 H₂S 荧光成像与检测。

基于激发态分子内质子转移机理, Du 等^[26]设计合成了一种新型的近红外线线粒体靶向荧光探针[图 7(d)]。加入 H₂S 后, 探针和 H₂S 发生亲核加成反应导致共轭骨架被破坏, 最大发射峰从 658 nm 蓝移至 470 nm。该探针具有响应快(<30 s)、选择性好和斯托克斯位移大(188 nm)等优点。此探针已成功用于 HepG2 细胞线粒体中外源性 H₂S 荧光成像。

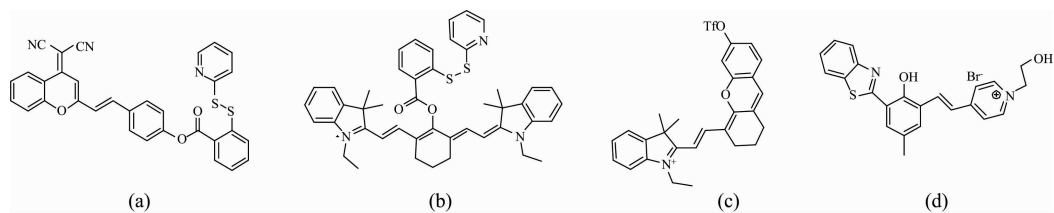


图 7 基于二硫键反应(a和b)与加成反应(c和d)的H₂S荧光探针结构

Fig. 7 Chemical structures of H₂S fluorescent probes based on disulfide exchange (a and b) and addition reaction (c and d)

1.5 纳米近红外 H₂S 荧光探针

将有机染料小分子引入纳米粒子内, 不仅大大提高了被包裹荧光染料的光稳定性, 而且可以防止染料泄露, 降低对细胞的毒性, 更重要的是, 可实现荧光信号放大。基于此已成功设计开发了一些纳米近红外 H₂S 荧光探针。

基于亲核取代反应 Shi^[27] 等开发了一种肿瘤生物标志物激活的光热传感器作为按需释放药物的纳米探针(图 8), 其特点是硫化氢介导原位产生近红外光热剂, 用于成像引导和光控药物释放。用热敏性纳米材料将染料 InTBOD-Cl 与药物 CPT-11 封装包裹起来。在 CH₃CN 和 PBS 的混合溶液中, 加入 NaHS 后, InTBOD-Cl 和 NaHS 发生反应, 生成 InT-BOD-SH, 在 808 nm 光激发下, InTBOD-SH 产生明亮的 NIR-II 荧光, 而在 592 nm 处的荧光被猝灭, 纳米探针可以高灵敏、高特异性识别 H₂S, 对富含 H₂S 癌症是一种很有前途的诊断工具, 纳米探针的 NIR-II 荧光强度与 0 ~ 50 mmol · L⁻¹ 范围 NaHS 浓度具有好的线性关系, LOD 为 79 nmol · L⁻¹。该探针已成功应用于 HCT116 小鼠的肿瘤测试。

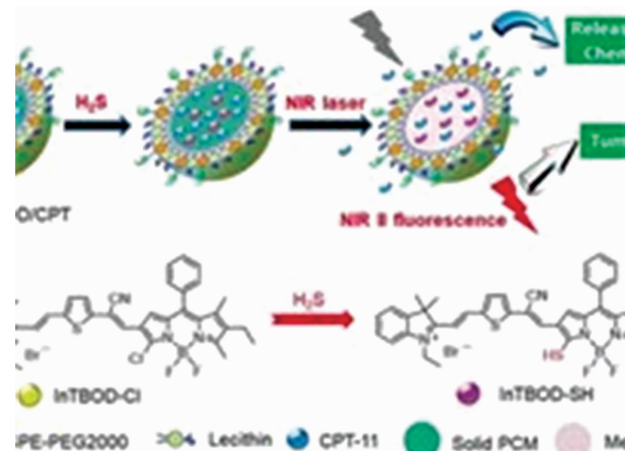


图 8 H₂S 纳米探针(NPs@BOD/CPT)示意图^[27]

Fig. 8 Schematic illustration of nanoprobe (NPs@BOD/CPT) for H₂S^[28]

Li 等^[28] 研制了一种基于酸激活策略的激发波长为 980 nm 比率上转换发光(UCL)纳米探针(图 9), 用于溶酶体辅助线粒体靶向 H₂S 的检测和生物成像。将菁染料衍生物探针(TPAMC)改性的上转化纳米荧光粉 UCNP(NaYF₄: 20% Yb, 2% Er, 0.2% Tm)作为靶标和响应组分, UCNPs 和

TPAMC 之间的强烈发光共振能量转移(LRET)效应使得可以通过比率 UCL 信号灵敏地检测 H₂S。为提高纳米探针在血液循环中的空间位阻稳定性, 用对 pH 敏感的聚乙二醇把 TPAMC-UCNP 包裹起来。此探针不仅成功用于活细胞中线粒体产生 H₂S 的 UCL 比率成像, 通过 NIR-UCL 成像定位 HCT116(人结肠癌细胞系)肿瘤, 而且也可以用于监测结肠癌小鼠模型中线粒体 H₂S 水平。

基于电致变色材料 Wu 等^[29] 报道了一种基于有机 π 电子结构的 EM 1²⁺ 作为 H₂S 响应发色团, 通过掺杂到半导体聚合物纳米颗粒(SPNs)开发出 H₂S 激活 NIR 荧光探针(图 10)。

在 PBS 缓冲液中, 加入 H₂S, 探针在 830 nm 处荧光明显增强, LOD 为 0.7 μmol · L⁻¹。探针在 830 nm 的近红外荧光可以提供更深的成像穿透, 提高了非侵入性实时检测小鼠肝脏 H₂S 水平的灵敏度, 有助于研究 H₂S 相关的体内肝脏功能障碍。通过方便的荧光成像, 提供了高灵敏度、特异性和快速动力学, 可以准确测量人血浆中内源性 H₂S 浓度, 此外在小鼠体内注射探针和近红外光照射后, 基于 H₂S 相关肿瘤的荧光成像实现了可激活光动力治疗(PDT), 提高了肿瘤治疗的特异性和疗效。

Xu 等^[30] 通过将 H₂S 响应的荧光探针 ZX-NIR 和一种内参比惰性染料 aza-BOD 封装到核壳硅纳米复合材料的疏水内部开发了 H₂S 近红外二区纳米探针(图 11)。该探针具有 H₂S 激活的比率荧光和 900 ~ 1 300 nm 的 NIR-II 发光。在 CH₃CN/PBS 缓冲液中, 加入 H₂S, 5 min 内 600 nm 处探针的荧光完全猝灭, 但是, 当激发波长为 780 nm 时, H₂S 激活了一个新的 NIR-II 发射峰, 最大发射峰为 900 nm。比率检测 H₂S 灵敏度高, LOD 为 37 nmol · L⁻¹。探针通过双色成像方式可以选择性鉴定富含 H₂S 的结肠癌细胞。此外, 论文进一步探索了 H₂S 触发的探针 NIR-II 成像, 显示了增强的深层组织穿透和空间分辨率。

为了开发内源性 H₂S 激活的光学探针用于特异性诊断结肠直肠癌, Deng 等^[31] 研发了一种基于 Ag-鸡蛋清(Ag-CEW)复合物的 H₂S 可激活 NIR-II 发射纳米探针(图 12)。所设计的 Ag-CEW 配合物通过内源性 H₂S 诱导的原位化学反应形成 Ag₂S 量子点, 在 1 090 nm 附近有一个很强的 NIR-II 发射峰。通过检测得到 LOD 为 35 nmol · L⁻¹。设计的 Ag-CEW 配合物具有良好的光稳定性和生物相容性, 通过内源性 H₂S 激活, 成功用于 NIR-II 成像引导下的 HCT-116 细胞荧光成像与结肠直肠癌特异性可视化和精确定位。

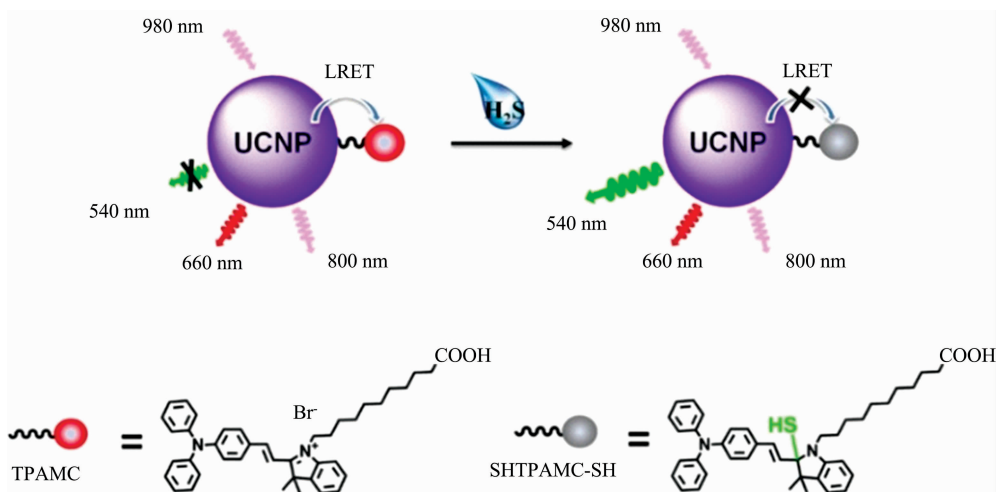


图 9 H₂S 纳米探针 (TPAMC-UCNPs@PEG) 示意图^[28]

Fig. 9 Schematic illustration of nanoprobes (TPAMC-UCNPs@PEG) for H₂S^[28]

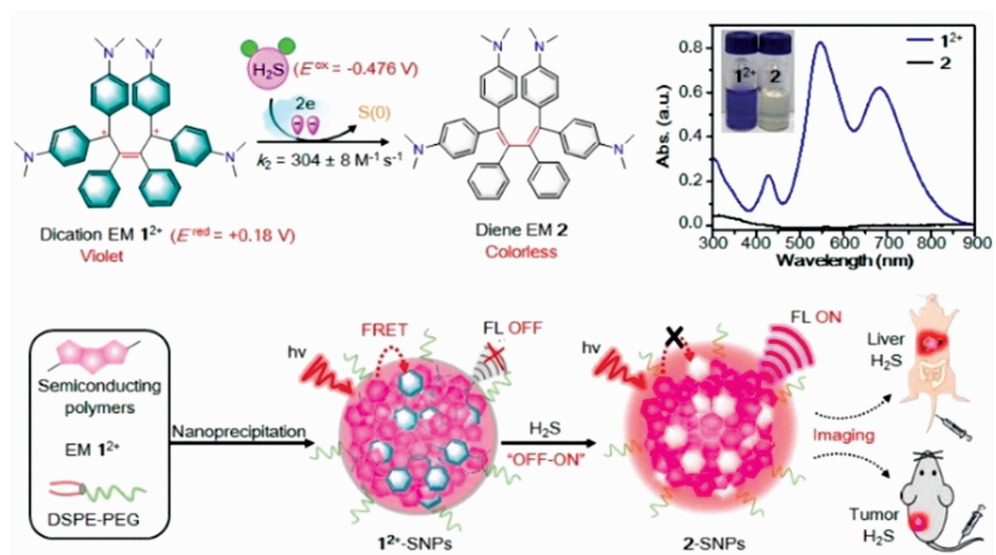


图 10 H₂S 纳米探针 (1²⁺-SNPs) 示意图^[29]

Fig. 10 Schematic illustration of nanoprobes (1²⁺-SNPs) for H₂S^[29]

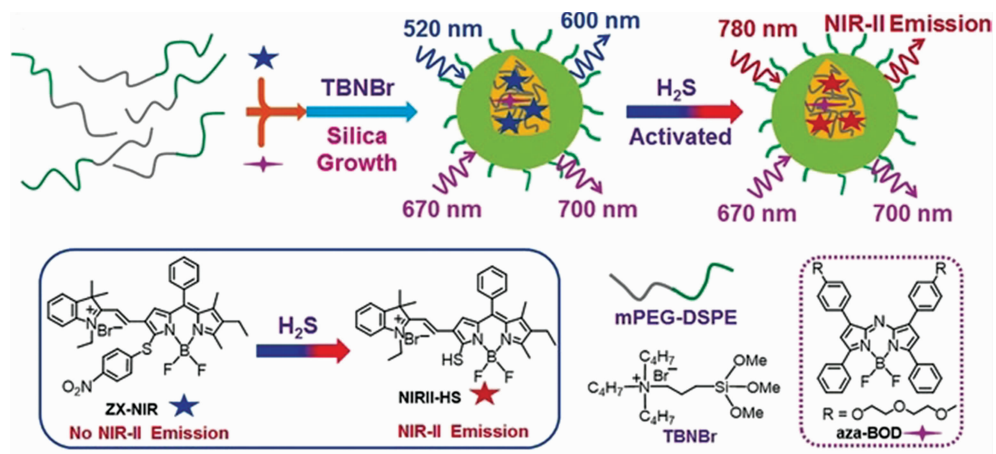


图 11 多波长 H₂S 纳米探针结构示意图^[30]

Fig. 11 Schematic illustration of multi-wavelength nanoprobes for H₂S^[30]

2 结论与展望

H_2S 是一种具有重要生理功能的内源性气体, 为了更好地探索 H_2S 在生理和病理中的动态作用, 近红外荧光探针技术发展迅速。本文综述了近三年近红外 H_2S 荧光探针的研究进展, 文中例子证明其已取得了很大进步。很多探针已能用于细胞和生物体内 H_2S 荧光成像, 但由于细胞与生物体内环境复杂, 检测时干扰因素多, 开发高性能生物用近红外 H_2S 荧光探针仍具有很大挑战。多数报道的近红外 H_2S 有机小分子荧光探针检测 H_2S 时都需要加入有机助剂, 而且多数探针响应 H_2S 时间较长。为了实现近红外探针在细胞与生物体内对 H_2S 的无毒、实时检测应用, 科学家开始研制纳米近红外探针。一般情况下 H_2S 纳米探针的水溶性好、检测速度快、LOD 低, 具有更好光物理性质和更高靶向性, 更有利于在生物方面的应用, 因此开发对 H_2S 具有优异识别性能的 NIR 纳米荧光探针也是目前研究的热点课题之一。此外, 生物体内有很多其他物种, 比如, 生物硫醇、其他气体信号分子一氧化氮和一氧化碳等, 很多生理与病理过程受到

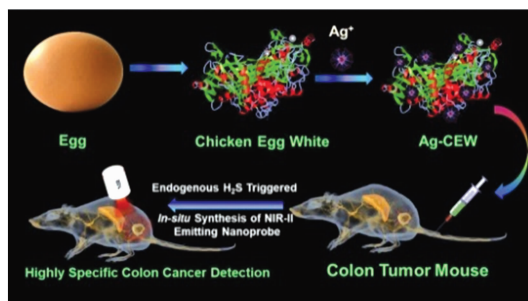


图 12 Ag-CEW 纳米探针合成过程示意图和内源性 H_2S 触发的结肠癌高特异性可视化^[31]

Fig. 12 Schematic illustration of the synthesis procedure of Ag-CEW nanoprobe and endogenous H_2S -triggered highly specific visualization of colon cancer^[31]

H_2S 与它们相互作用“crosstalk”的影响, 所以, 设计开发 NIR 荧光探针对它们相互作用进行原位、实时、动态的可视化检测具有重要意义。期望此综述将有助于设计高性能近红外荧光探针来检测活细胞与活体中的 H_2S 。

References

- [1] Wang J, Huo F, Yue Y, et al. *Luminescence*, 2020, 35(8): 1156.
- [2] Jose D A, Sakla R, Sharma N, et al. *ACS Sensors*, 2020, 5(11): 3365.
- [3] Qian M, Zhang L W, Pu Z J, et al. *J. Mater. Chem. B*, 2018, 6(47): 7916.
- [4] Lin X F, Lu X H, Zhou J L, et al. *Spectrochim. Acta A*, 2019, 213: 416.
- [5] Zhao X J, Li Y T, Jiang Y R, et al. *Talanta*, 2019, 197: 326.
- [6] Zhong K L, He Y Q, Deng L L, et al. *Anal. Chim. Acta*, 2020, 1127: 49.
- [7] Gong S Y, Zhou E B, Hong J X, et al. *Anal. Chem.*, 2019, 91(20): 13136.
- [8] Huang X T, Liu H Y, Zhang J W, et al. *New J. Chem.*, 2019, 43(18): 6848.
- [9] Zhang Y M, Chen Y C, Bai Y, et al. *Analyst*, 2020, 145(12): 4233.
- [10] Wei H G, Liu Y J, Zhao X D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2020, 30(13): 127221.
- [11] Li Q Y, Wang Z C, Zhao M, et al. *Sens. Actuators B Chem.*, 2019, 298: 126898.
- [12] Hong J X, Feng W Y, Feng G Q. *Sens. Actuators B Chem.*, 2018, 262: 837.
- [13] Feng S M, Xia Q F, Feng G Q. *Dyes Pigments*, 2019, 163: 447.
- [14] Dou K, Feng W Q, Fan C, et al. *Anal. Chem.*, 2021, 93(8): 4006.
- [15] Chen Z Y, Mu X L, Han Z, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2019, 141(45): 17973.
- [16] Wang R C, Dong K K, Xu G, et al. *Chem. Sci.*, 2019, 10(9): 2785.
- [17] Wang R C, Gu X F, Li Q Z, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2020, 142(35): 15084.
- [18] Wen Y, Huo F J, Wang J P, et al. *J. Mater. Chem. B*, 2019, 7(43): 6855.
- [19] Zhou T T, Yang Y T, Zhou K Y, et al. *Sens. Actuators B Chem.*, 2019, 301: 127116.
- [20] Yao X F, Liu W W, Zhu W C, et al. *Chem. Commun.*, 2020, 56(58): 8111.
- [21] Wu Q, Yin C X, Wen Y, et al. *Sens. Actuators B Chem.*, 2019, 288: 507.
- [22] Kumar K, Kaur S, Kaur S, et al. *J. Photoch. Photobio. A*, 2020, 388.
- [23] Men J X, Yang X J, Zhang H B, et al. *Dyes Pigments*, 2018, 153: 206.
- [24] Wang J P, Wen Y, Huo F J, et al. *Sens. Actuators B Chem.*, 2019, 297: 126773.
- [25] Ma J L, Li F F, Li Q, et al. *New J. Chem.*, 2018, 42(23): 19272.
- [26] Du Y, Wang H, Zhang T, et al. *Spectrochim. Acta A*, 2022, 265: 120390.
- [27] Shi B, Ren N, Gu L Y, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2019, 58(47): 16826.
- [28] Li X, Zhao H, Ji Y, et al. *Acs Appl. Mater. Inter.*, 2018, 10(46): 39544.
- [29] Wu L Y, Sun Y D, Sugimoto K, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2018, 140(47): 16340.
- [30] Xu G, Yan Q, Lv X, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2018, 57(14): 3626.

[31] Deng Z, Jiang M, Li Y, et al. *iScience*, 2019, 17: 217.

Research Progress of Near-Infrared Fluorescent Probes for Hydrogen Sulfide

SONG Jiang-tao, YUAN Yue-hua, ZHU Yong-jun, WANG Yu-zhen, TIAN Mao-zhong*, FENG Feng*

College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi Provincial Key Laboratory of Chemical Biosensing, Shanxi Datong University, Datong 037009, China

Abstract Hydrogen sulfide (H₂S) is a colorless gas with the unpleasant smell of rotten eggs. It not only exists in the environment but was also considered the third important endogenous gaseous transmitter following nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO) in biological systems. H₂S has recently attracted more attention for contributing to human health and disease. H₂S has important biological functions and has been recognized as a cytoprotectant and gasotransmitter in many tissue types, including mediating vascular tone in blood vessels and neuromodulation in the brain. Hydrogen sulfide concentration has been demonstrated to be closely correlated with particular diseases in modern medical research, such as diabetes, Alzheimer's disease and Parkinson's disease. The molecular mechanisms by which H₂S affects cell signaling and other physiological events remain unclear. Therefore, it is necessary to develop highly sensitive and selective methods for detecting the concentration of H₂S in living cells and organisms. The near-infrared fluorescent probe for detecting H₂S has been the research hotspot. Near-infrared (NIR) fluorescent probes have several significant advantages for imaging applications *in vivo*: negligible photodamage, deep tissue penetration, and low interference from background auto fluorescence. Many new methods for visualizing H₂S in living systems have been reported. At the molecular level, H₂S exhibits unique chemical characteristics, acting as a good reducing agent and a good nucleophile. Thus the main strategies used in NIR fluorescent probe development for H₂S detection include azide and nitro group reduction, nucleophilic attack, addition reaction, etc. Herein, the design and synthesis, recognition mechanism, properties of NIR fluorescent probes for H₂S and their fluorescence imaging in cells and organisms and the latest research progress reported in recent three years have been reviewed. Finally, in our opinion, the future research direction and development trend of this kind of probes are prospect.

Keywords Near-infrared; Hydrogen sulfide; Fluorescent probe; Recognition mechanism and performance; Bioimaging; Research progress

(Received Sep. 3, 2021; accepted Mar. 1, 2022)

* Corresponding authors