

# 基于亲核取代反应的活性硫组分检测的 荧光探针研究进展\*

尹伊颜<sup>1)</sup> 魏娟娟<sup>1,2)</sup> 那娜<sup>1)†</sup>

(1)北京师范大学化学学院, 100875, 北京; (2)宁夏师范学院化学化工学院, 756000, 宁夏固原)

**摘要** 活性硫组分(reactive sulfur species, RSS)是调节细胞过程和维持机体平衡的重要物质,与人类的各种疾病密切相关。在生物体系中快速、准确检测一系列 RSS 生物标志物,对于疾病的早期诊断和治疗具有非常重要的作用。在众多分子水平上检测 RSS 的方法中,荧光探针法是最方便、有效的方法之一。由于 RSS 本身具有强亲核性,基于亲核取代反应设计 RSS 荧光探针是目前常用的构建策略。本文综述了 H<sub>2</sub>S、谷胱甘肽(GSH)、半胱氨酸(Cys)等几种针对典型 RSS 生物标志物检测的荧光探针,主要是基于亲核取代反应对荧光探针的设计思路、构建方法、应用等的研究进展,并讨论了不同 RSS 生物标志物的不同响应机制。基于目前 RSS 荧光探针的研究进展和挑战,对该种类的荧光探针未来的研究方向和发展机遇进行了展望。

**关键词** 活性硫组分; 荧光探针; 亲核反应; 生物成像

**中图分类号** O656.21

**DOI:** 10.12202/j.0476-0301.2021094

## 0 引言

硫是生命中的基本元素之一,在调节细胞过程、维持生理平衡和控制细胞生长中均起着重要的作用<sup>[1]</sup>。并且,细胞内氧化态平衡在生理领域具有广泛的影响,而细胞氧化平衡的失衡与神经疾病、心脑血管疾病等很多人类的疾病密切相关<sup>[2]</sup>。为了调节细胞氧化平衡,细胞中存在着各种调节系统和多种活性分子,它们可以促进细胞内物质的各种氧化态的动态平衡,在细胞的氧化态平衡出现失衡时,提供缓冲作用<sup>[3]</sup>。其中,活性硫组分(reactive sulfur species, RSS)作为活性分子,在细胞的氧化还原过程中扮演了重要的角色,是人体抗氧化屏障的第一道防线,在细胞内通过各种生理过程产生的 RSS 都可以参与并调节各类细胞生物过程<sup>[4]</sup>。例如,谷胱甘肽(GSH)、半胱氨酸(Cys)、同型半胱氨酸(Hcy)这3种最常见的天然生物硫醇是维持细胞过程和保护细胞免受伤害的重要生物组分<sup>[5]</sup>。RSS 中的 S 元素具有-2~+4 价(+6 价较稳定,活性不高)的多种氧化态,因而具有多种不同的反应活性<sup>[6]</sup>,可以在许多氧化还原反应中发挥作用,并参与细胞内的多种生理过程<sup>[7]</sup>。图 1 中列出了生物体内常见的不同化合价的硫物种,并阐释了不同硫物种参与的细胞

过程和它们之间的相互关系<sup>[8]</sup>。

近年来,有研究表明,尽管在生活中 H<sub>2</sub>S、SO<sub>2</sub> 等含硫化合物通常被认为是毒气体,但是在细胞活动中,细胞剂量的 H<sub>2</sub>S、SO<sub>2</sub> 能够调节细胞过程,是维持细胞平衡的重要小分子物质<sup>[7]</sup>。因而,向细胞中添加少量的外源性 SO<sub>2</sub> 对于结核等疾病的治疗有一定的帮助<sup>[9]</sup>。Cys 作为一种氨基酸,本身就是生物体内各种蛋白质、多肽等生物物质的组成成分,Cys 的缺乏会导致生长缓慢、肌肉损伤、毛发脱色等严重的疾病<sup>[10]</sup>。GSH 和 H<sub>2</sub>S 在荧光成像中作为各类癌细胞的成像标志物<sup>[11]</sup>。然而,在细胞过程中发挥重要作用的各类 RSS 分子,在细胞内含量过多也将会对细胞造成损害,并且活性硫组分浓度的升高会导致细胞内活性组分(活性氧、活性氮)的浓度也随之升高,从而导致细胞过程紊乱,进而引发各类疾病的产生<sup>[7]</sup>。Hcy 在血液中浓度过高可能导致阿尔兹海默症、心脑血管疾病等<sup>[12]</sup>,因此,在复杂的生物系统中,各类 RSS 在细胞内和体内的定量分析和实时监测,可以促进未来相关疾病的个性化诊断和靶向治疗的发展。

在复杂的生物系统中,对 RSS 信号小分子进行定量分析的传统方法有液相色谱法<sup>[13]</sup>、毛细管电泳法<sup>[14]</sup>、质谱法<sup>[15]</sup>、电化学法<sup>[16]</sup>、荧光法<sup>[17]</sup>等分析测试方法。

\* 国家自然科学基金资助项目(21874012);科技部国家重点研发计划资助项目(2019YFC1805600);宁夏自然科学基金资助项目(2020AAC03260)

† 通信作者:那娜(1980—),女,满族,博士,教授,博士生导师。研究方向:质谱和光谱分析方面的研究。E-mail: nana@bnu.edu.cn  
收稿日期:2021-04-20

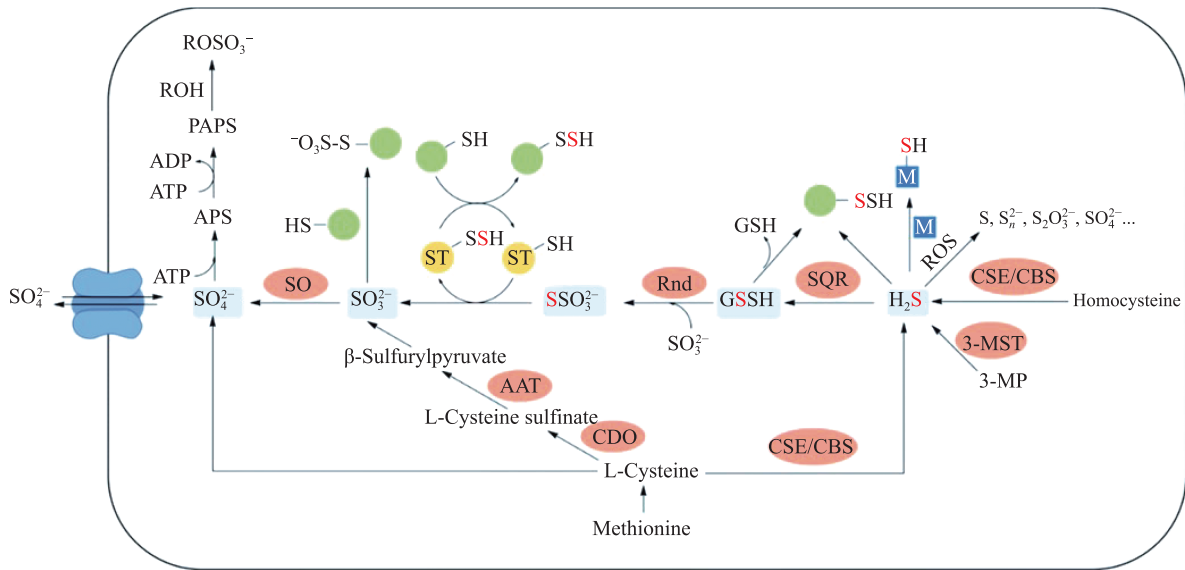


图 1 生物体内的硫物种和硫代谢过程

其中液相色谱法和毛细管电泳法有着良好的精度和准确度,但是色谱法设备成本高,样品处理复杂,检测过程缓慢且很难进行高通量检测,这使得该方法不能普遍应用于常规临床诊疗中.质谱法,例如气相色谱-质谱法和液相色谱-质谱法,能够特异性地对样品中的 RSS 进行检测.但是色谱-质谱仪器仍然非常复杂,而且质谱法在面对血液等复杂样品时,其定量检测的能力仍然不足以满足检测的需求.直接电化学分析法虽然能够快速、方便地对样品进行检测,但是电化学分析需要精细的实验条件,且由于生物体内大多数还原性物质的氧化电位与 RSS 分子氧化电位相似,容易对检测结果造成影响.相比之下,荧光法是一种简单、廉价、快速的检测方法,在医学和病理学研究领域得到了越来越广泛的应用.荧光法可以通过修改荧光探针的结构和功能的方式,对不同环境下的不同靶标化合物进行直接的实时原位检测,且检测不会破坏待分析物的环境和功能,不需要对待测样品进行结构上的破坏,这使得细胞成像和生物体内成像检测变得非常方便<sup>[18]</sup>.同时,各种各样的荧光探针因具有高灵敏度、高选择性、可设计性、快速反应等优点,已经成为生物化学和病理研究中的重要工具,为生物过程中分子的定向监测和定量检测提供了有力的帮助.

在生物化学领域中,信号小分子在细胞中的定位、监测、定量检测等研究中具有非常重要的地位.目前在生理学和细胞过程的探索中,主要研究的 RSS 信号小分子有生物硫醇(GSH, Cys, Hcy 等)<sup>[19]</sup>、 $H_2S$  类分子<sup>[20]</sup>、 $H_2S_n$  类分子<sup>[21]</sup> 和  $SO_2$  类分子<sup>[22]</sup>. 这些小分子相互之间结构性质都很相似,但是它们在细胞生物过程中的作用各不相同,因而,需要设计多种荧光探针,对这些 RSS 信号小分子进行特异性检测,以便于

区分这些活性小分子.因此,目前对于 RSS 荧光探针的研究重点主要着眼于设计对多种 RSS 小分子具有高选择性、高灵敏度的荧光探针<sup>[23]</sup>.同时,随着检测技术的发展和多维检测需求的不断提升,开发能够一次性同时区分检测不同 RSS 小分子的荧光探针也引起了研究人员的广泛兴趣.

在目前的 RSS 的荧光探针设计方法中,通常利用 RSS 分子的强亲核性<sup>[24]</sup>及其与金属离子的强配位性<sup>[25]</sup>进行探针设计.对于一些常见的 RSS 小分子(例如  $SO_2$ 、 $HCO_3^-$ ),它们能与荧光基团中的双键发生亲核加成反应,破坏荧光基团的共轭结构,从而改变探针的荧光性质,然而,并不是所有的 RSS 分子都能轻易地进攻双键,对于另外的 RSS 分子,需要设计一些其他的检测策略,例如,消除亲电芳香基团是一种常见的探针设计方法<sup>[26]</sup>,亲电芳香基团和大部分荧光基团相连会有很强的荧光猝灭效应.作为强亲核性的分子, RSS 能够进攻荧光探针,使亲电芳香基团离去,因此,在 RSS 作用下,亲电芳香基团对荧光基团的猝灭效果消失,从而使得荧光探针的荧光恢复<sup>[17]</sup>.该设计方法可以和绝大部分荧光探针结合使用,并且借助不同的猝灭基团,可以开发不同的用于检测 RSS 的荧光探针.该方法设计简单,选择性好,因而在近几年的 RSS 荧光探针研究中受到了广泛的关注.此外,近年来,基于 RSS 分子的强亲核性设计多通道的荧光探针的工作也逐渐成为 RSS 检测研究的热点.利用 RSS 分子能够亲核进攻荧光探针,使其断裂成为多个荧光探针的特性,开发出了多种同时检测多种 RSS 分子的荧光探针<sup>[27]</sup>.本文首先简要综述了基于 RSS 分子强亲核性的荧光探针构建和应用的最新研究进展;然后基于 RSS 荧光探针现有的研究进展和挑战,展望了该类荧光探针未来的发展方向和研究机遇.

## 1 硫烷荧光探针

硫烷( $\text{H}_2\text{S}_n$ )和硫化氢( $\text{H}_2\text{S}$ )都是细胞内非常重要的一类 RSS 信号小分子,  $\text{H}_2\text{S}_n$  是生物活动过程中所产生的一种重要的小分子中间产物,  $\text{H}_2\text{S}$  在细胞中多数是各种生物过程的最终产物. 一般来说, 对  $\text{H}_2\text{S}$  的检测通常是在细胞质里或者在细胞外,  $\text{H}_2\text{S}_n$  则更多是在细胞生命过程中所产生的信号分子, 通常存在于各种细胞器中, 参与细胞的各个过程<sup>[28]</sup>. 研究表明, 在生命过程的调节中,  $\text{H}_2\text{S}_n$  比  $\text{H}_2\text{S}$  更为重要, 很多生命过程中真正发挥信号分子作用的是  $\text{H}_2\text{S}_n$ <sup>[29]</sup>. 因此, 对  $\text{H}_2\text{S}_n$  的追踪与检测, 能更加直观地观察细胞过程, 追踪生物体内和细胞内的氧化还原过程, 且对细胞生理过程和生物病理的研究至关重要.  $\text{H}_2\text{S}_n$  分子在体内很不稳定, 捕捉硫烷的信号也有一定的困难, 因此, 开发高选择性、高灵敏度的  $\text{H}_2\text{S}_n$  荧光探针对于细胞代谢研究有着非常重大的意义.

**1.1 猝灭基团离去策略的荧光探针** 在生理 pH 条件下,  $\text{H}_2\text{S}_n$  的亲核性比  $\text{H}_2\text{S}$  或是其他生物硫醇(GSH、Cys、Hcy 等)都要强, 因此, 利用亲电性荧光探针与  $\text{H}_2\text{S}_n$  特异性识别, 是设计  $\text{H}_2\text{S}_n$  荧光探针的常用策略<sup>[30]</sup>. 在猝灭基团离去策略的荧光探针设计中,  $\text{H}_2\text{S}_n$  对亲电猝灭基团发生亲核进攻使得猝灭基团脱去. 苯甲酸酯结构由于其连在苯环上的羰基上电子云密度很小, 是一种非常好的亲电试剂, 而且该结构通常会使得相连的荧光基团荧光猝灭, 因此, 人们也经常利用该结构进行  $\text{H}_2\text{S}_n$  荧光探针的设计<sup>[31]</sup>. Ma 等<sup>[26]</sup> 利用  $\text{H}_2\text{S}_n$

的强亲核性, 提出了一种基于苯甲酸酯断裂策略的类罗丹明荧光探针 SNARF- $\text{H}_2\text{S}_n$ . 该荧光探针利用苯甲酸酯结构猝灭了荧光基团,  $\text{H}_2\text{S}_n$  作为亲核试剂进攻酯键, 酯键断裂, 苯甲酸酯脱去. 继而苯甲酸酯对荧光基团的猝灭效果不复存在, 荧光探针的荧光恢复. 该工作同时还研究了 SNARF- $\text{H}_2\text{S}_n$  和  $\text{H}_2\text{S}_n$  作用的机制, 并利用 SNARF- $\text{H}_2\text{S}_n$  实现了对细胞内和生物体内内源和外源的  $\text{H}_2\text{S}_n$  的检测和荧光成像(图 2).

**1.2 能量转移策略的荧光探针** 在利用亲核进攻消除策略来构建检测  $\text{H}_2\text{S}_n$  的荧光探针时, 不一定要单纯地利用消除猝灭基团使探针荧光得到恢复. 单纯的开启式的  $\text{H}_2\text{S}_n$  荧光探针的实际应用也存在着一定的缺陷, 其荧光检测信号容易受到测试条件和环境等因素影响. 因此, 为了解决上述这些因素对检测的影响, 可以采用改变分子内 FRET<sup>[32]</sup>、ICT<sup>[33]</sup> 等发光方式的方法构建比率荧光探针, 通过 2 个发射峰的比率变化对上述影响因素进行校准, 进行精确的分析检测. 例如, Sun 等<sup>[17]</sup> 设计了一种连有苯甲酸酯猝灭基团的 FRET 荧光探针, 当其连有猝灭基团时, 分子内的荧光基团被猝灭, 分子内的 FRET 效应消失, 发射光波长为 460 nm, 与  $\text{H}_2\text{S}_n$  作用后, 猝灭基团脱去, 荧光基团恢复, 分子内的 FRET 效应也随之恢复, 初始的 460 nm 的发射波长通过 FRET 效应转换成 537 nm 的发射光. 该工作利用原始荧光的减弱和新荧光的增强构建了一种比率型荧光探针, 并在细胞中实现了红蓝双通道的  $\text{H}_2\text{S}_n$  检测(图 3).

在生物过程中,  $\text{H}_2\text{S}_n$  通常是生成  $\text{H}_2\text{S}$  过程的中间

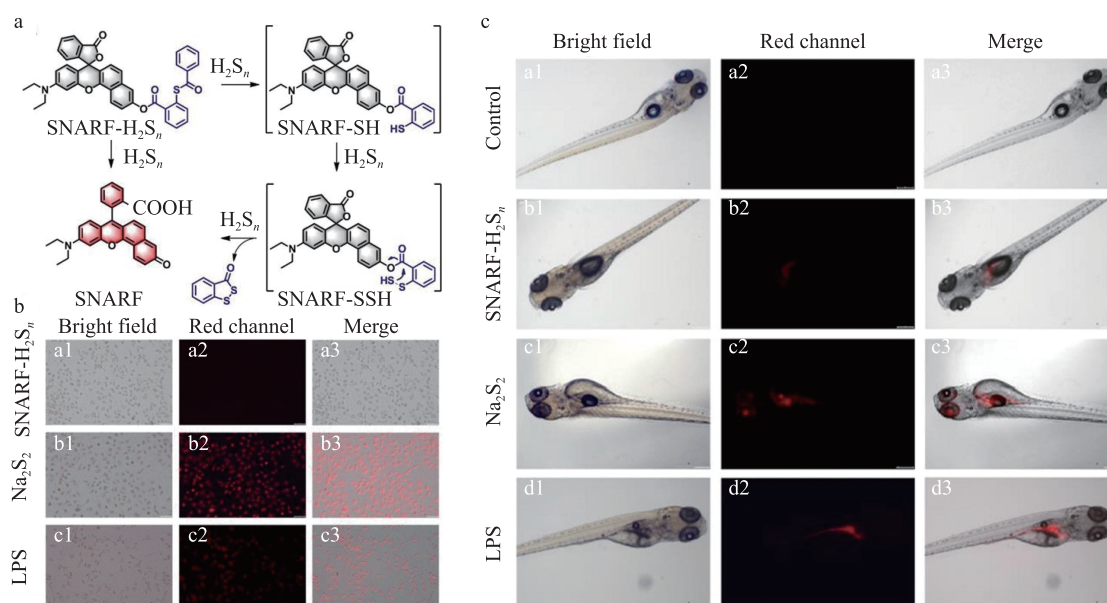


图 2 a 苯甲酸酯基团猝灭的类罗丹明荧光探针 (SNARF- $\text{H}_2\text{S}_n$ ) 识别  $\text{H}_2\text{S}_n$  的机制; b SNARF- $\text{H}_2\text{S}_n$  对内源 (LPS: 脂质多糖, 促进细胞产生更多的  $\text{H}_2\text{S}_n$ ) 和外源 ( $\text{Na}_2\text{S}_2$ ) 的  $\text{H}_2\text{S}_n$  在细胞内的成像结果; c SNARF- $\text{H}_2\text{S}_n$  对内源 (LPS: 脂质多糖, 促进细胞产生更多的  $\text{H}_2\text{S}_n$ ) 和外源 ( $\text{Na}_2\text{S}_2$ ) 的  $\text{H}_2\text{S}_n$  在斑马鱼内的成像结果

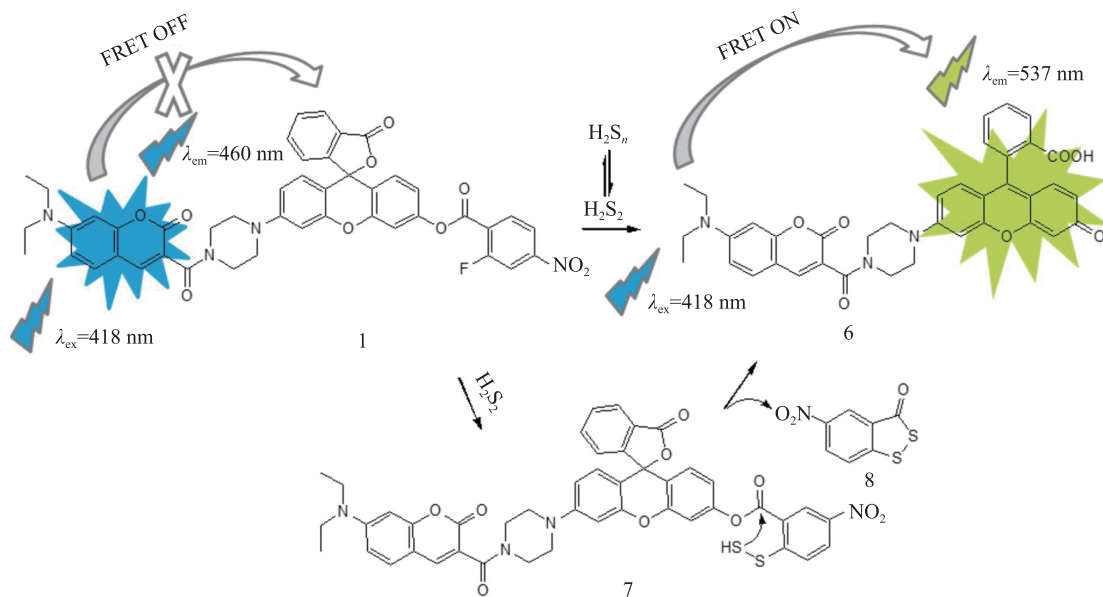


图 3 利用苯甲酸酯猝灭和 FRET 策略的荧光探针和  $\text{H}_2\text{S}_n$  的作用机制

产物,为了研究  $\text{H}_2\text{S}$  和  $\text{H}_2\text{S}_n$  在细胞过程中的不同作用和相互关系,能够同时监测  $\text{H}_2\text{S}$  和  $\text{H}_2\text{S}_n$  的双通道荧光探针,逐渐成为目前研究的热点。Choi 等<sup>[21]</sup>和 Chung 等<sup>[34]</sup>利用双光子荧光显微镜实现了  $\text{H}_2\text{S}$  和  $\text{H}_2\text{S}_n$  在细胞内的双通道荧光成像。Chen 等<sup>[28]</sup>则是利用 FRET,依据  $\text{H}_2\text{S}$  与  $\text{H}_2\text{S}_n$  性质的不同,设计了一种基于 FRET 双通道的同时检测  $\text{H}_2\text{S}$  和  $\text{H}_2\text{S}_n$  的荧光探针。

## 2 生物硫醇荧光探针

生物硫醇是生物体内存在的带有活性硫基团(硫

基)的分子。常见的生物硫醇有 Cys、Hcy 和 GSH 等(图 4)。它们是生物体内酶代谢和各类细胞过程中非常重要的中间信号分子和氨基酸产物,能够调节细胞生长和凋亡,参与细胞膜、细胞器、细胞质内各项细胞活动,在调节氧化应激和信号传导中具有重要的作用<sup>[35]</sup>。生物硫醇在细胞内或是人体内的含量是一项非常重要的指标,含量过多或者过少可能会导致高血压等疾病<sup>[36]</sup>。生物硫醇在生命过程、疾病研究、预防和治疗等过程中都有着极其重要的作用<sup>[6]</sup>。所以,发展针对生物硫醇选择性检测的荧光探针非常重要。

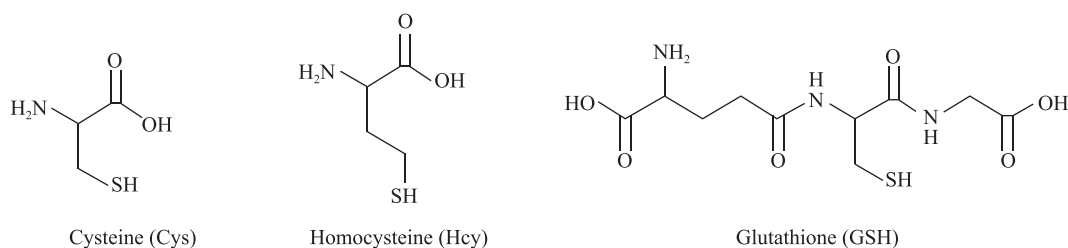


图 4 3 种生物硫醇(Cys、Hcy、GSH)的分子结构

由于生物硫醇(Cys、Hcy、GSH 等)都是带有巯基的生物小分子,它们之间在性质上非常相似,即具有相似的亲核进攻能力和相似的还原性。在荧光探针的设计过程中,需要考虑提高这些相似的分子检测的选择性。因此,如何设计并利用荧光探针,以有效区分几种生物硫醇,已经成为目前研究的热点和难点。

**2.1 基于反应动力学差异设计荧光探针** 3 种生物硫醇虽然都拥有活性基团巯基,但是它们分子的链长不同,分子内其他官能团的个数与位置也不同。这就导致了在某些亲核进攻反应过程中,3 种生物硫醇的

反应动力学存在差异。因而,利用这一点可以设计出特异性识别某一种生物硫醇的荧光探针。

Jiang 等<sup>[37]</sup>基于四苯乙烯的 AIE 荧光探针,在四苯乙烯分子上连接苯磺酸作为猝灭剂,设计了一个能特异性识别 Cys 的 AIE 荧光探针 TPENH<sub>2</sub>。在 Cys 存在时,四苯乙烯和苯磺酸被巯基进攻断开,生成了 AIE 分子四苯乙烯,进而在体内产生荧光。Lu 等<sup>[38]</sup>利用丙烯酸作为荧光猝灭剂,并连接在 NIR 荧光探针 DRP 上,实现了对 Cys 的高灵敏、高选择性的近红外荧光检测。但是,前文中的实验对于荧光探针的选择

性依然只停留在猜想的阶段。基于此, Lee 等<sup>[39]</sup> 设计了 2 种以苯硫醚作为猝灭剂的荧光探针, 该荧光探针在硫醇存在的时候会被进攻断裂, 但是反应速率和荧光强度却都不相同。于是, 他们从分子动力学角度,

说明了 3 种生物硫醇在发生亲核进攻时的荧光效应区别, 从成环重排效应和反应速率方面均展现出了 3 种荧光的不同, 从而在 3 种生物硫醇中对 GSH 实现了特异性检测识别(图 5)。

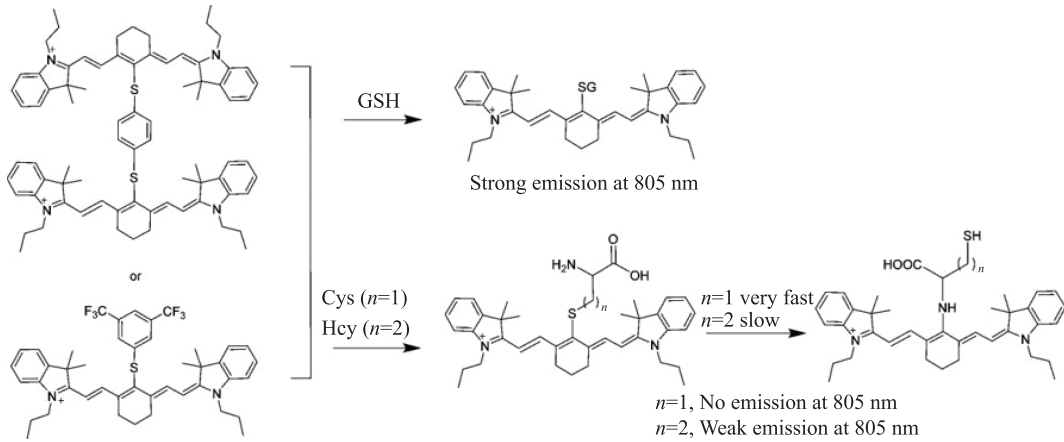


图 5 硫醇醚类荧光探针对于 3 种生物硫醇反应的动力学

### 2.2 基于亲核取代后产物的荧光差异设计荧光探针

基于反应动力学的差异设计的荧光探针, 在实际应用中通常只能对 1 种生物硫醇进行特异性检测, 剩下的生物硫醇分子在与探针作用后现象差异都不明显。随着检测技术的发展和实际样品检测要求的提升, 开发能够同时检测多种生物硫醇分子的荧光检测方法的需求越来越强烈。在前文中提到的猝灭基团消除策略中, 被取代掉的猝灭基团在荧光检测中没有被真正地利用到。因此, 在这种荧光探针的亲核取代设计

中, 将 2 个荧光基团相连, 这样 RSS 分子发生亲核取代后的产物有 2 个, 其中一个是被亲核取代下来的荧光基团, 这个荧光信号通常用来作为检测生物硫醇是否存在总信号。另一个则是接有生物硫醇分子的产物, 该产物随着发生反应的 RSS 分子的不同, 可能会产生不一样的荧光, 通常人们利用这种荧光的差异, 来区分 H<sub>2</sub>S 和各种生物硫醇<sup>[40]</sup>。这种策略成功实现了一种多通道对多种生物硫醇分子同时进行检测的方法(图 6)。

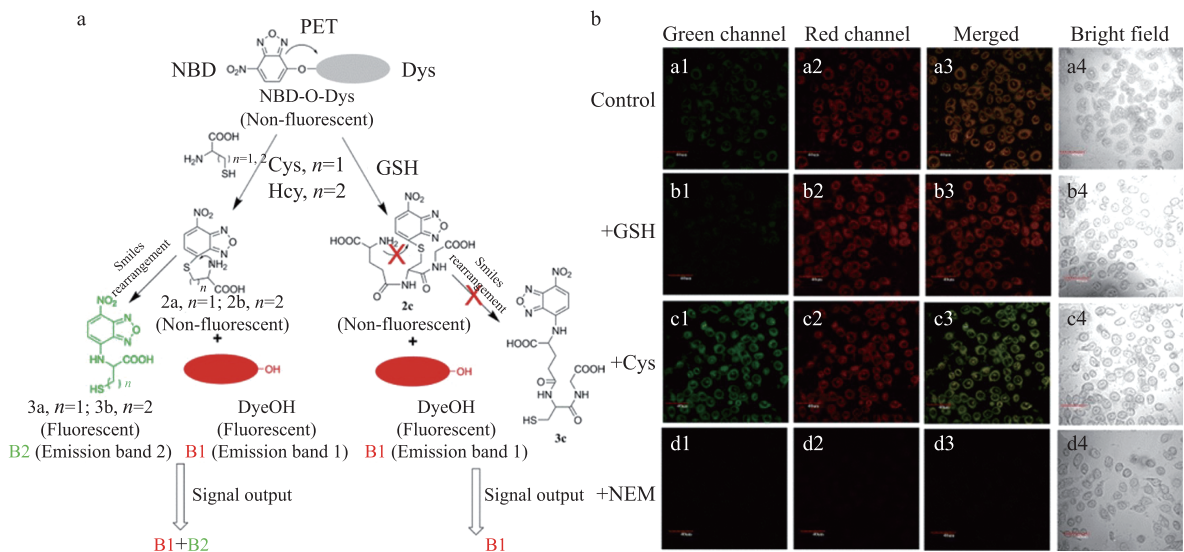


图 6 亲核进攻识别多种生物硫醇的机制 (a) 和多通道细胞成像 (b)

Zhang 等<sup>[12]</sup> 将 2 个荧光基团用苯醚键连接起来, 构建了一个荧光探针 RC。由于 2 个基团都是亲电芳

香基团, 它们连在一起时是没有荧光的。当有生物硫醇或 H<sub>2</sub>S 存在时, 3 种生物硫醇和 H<sub>2</sub>S 会和该探针作

用,产生不同的荧光颜色,进而在细胞内区分 4 种 RSS(图 7). Liu 等<sup>[27]</sup>利用 BODIPY 荧光探针和不同生物硫醇结合重排后荧光波长的变化,设计了一种苯醚猝灭的荧光探针 BC,利用 Cys 的成环重排效应对其

实现了特异性检测(图 8). Chen 等<sup>[40]</sup>、Gao 等<sup>[23]</sup>和 He 等<sup>[41]</sup>则是利用 7-硝基苯并-2-氧杂-1,3 二唑(NBD)基团与 3 种生物硫醇作用,基于作用后所产生的荧光颜色变化,设计了一种特异性检测 GSH 的荧光探针.

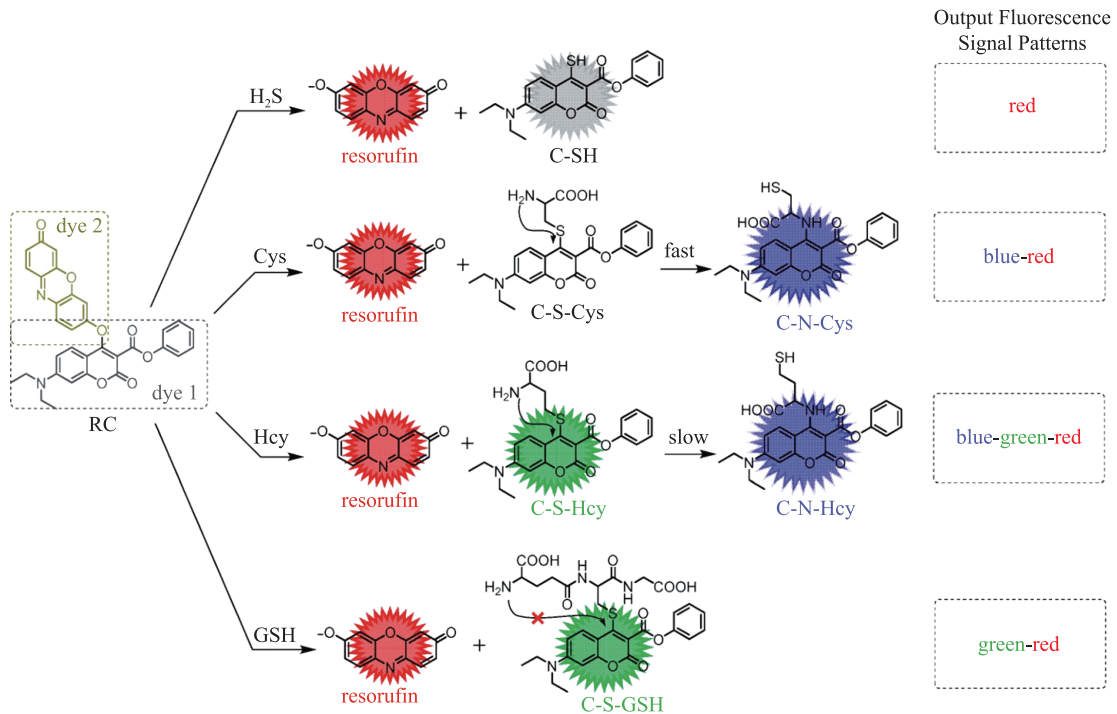


图 7 RC 荧光探针和 H<sub>2</sub>S、Cys、Hcy、GSH 的作用机制和荧光信号显示

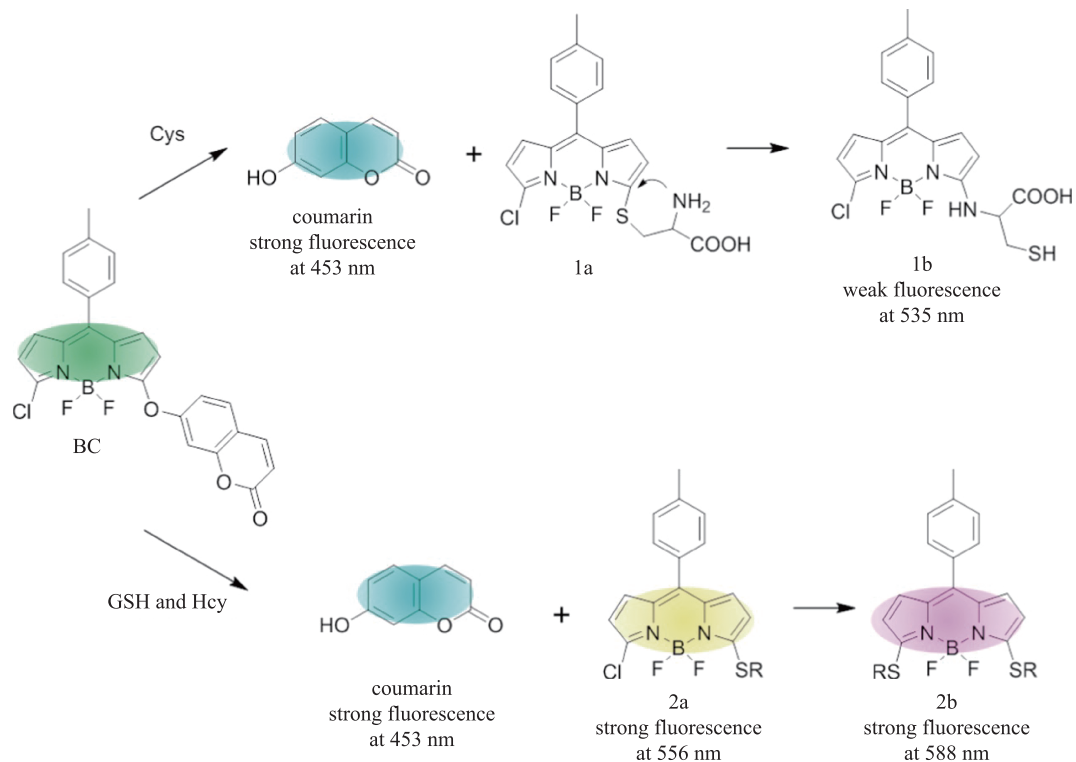


图 8 BC 荧光探针对于 Cys 特异性检测的原理

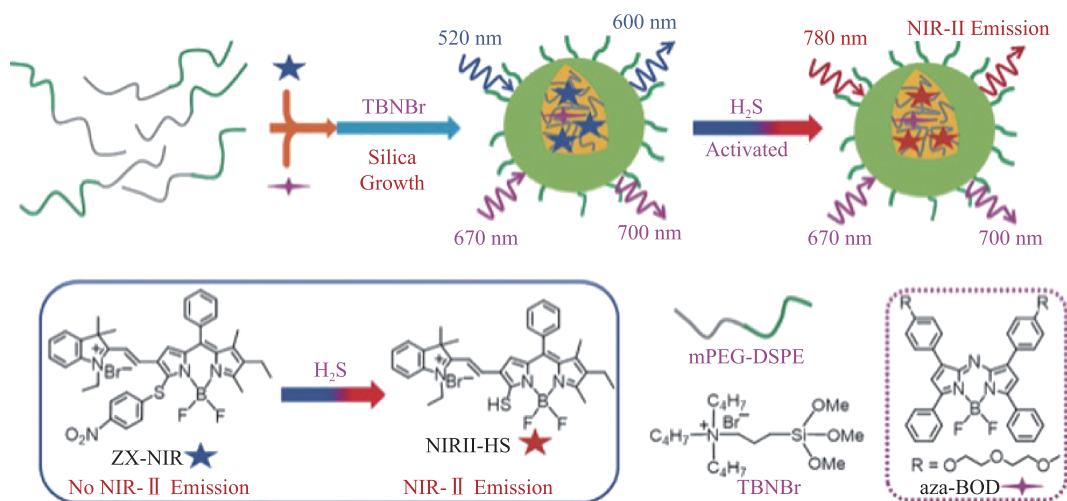
### 3 硫化氢荧光探针

$\text{H}_2\text{S}$  是生命系统中非常重要的一类内源性气体递质, 被认为是多种生命过程和疾病过程的媒介. 虽然  $\text{H}_2\text{S}$  在空气中被视为有毒气体, 但研究表明, 人体大脑内的  $\text{H}_2\text{S}$  含量较高, 与其他活性物质一起联合作用, 可以起到神经调节剂的作用<sup>[42]</sup>. 作为生物体内的细胞内源性气体小分子,  $\text{H}_2\text{S}$  可以涉及细胞的生长和死亡、调节血压和控制氧化等众多生命过程<sup>[43]</sup>, 同时又和阿尔兹海默病、糖尿病、唐氏综合征等疾病息息相关<sup>[44]</sup>.

目前, 有很多  $\text{H}_2\text{S}$  释放器或是抑制器被开发, 并作为药物治疗各种疾病<sup>[45]</sup>. 然而,  $\text{H}_2\text{S}$  分子在不同的生理过程和病理过程中的行为仍然有很大一部分是模糊不清的, 因此, 对  $\text{H}_2\text{S}$  信号分子进行选择性的检测

识别, 已经成为目前的研究热点.

**3.1 基于猝灭基团离去的荧光探针** 与前文所介绍的基于猝灭基团离去的  $\text{H}_2\text{S}_n$  荧光探针设计策略相似, 该策略也能被用于  $\text{H}_2\text{S}$  荧光探针的设计中. 利用  $\text{H}_2\text{S}$  的亲核进攻, 使得猝灭基团离去, 从而恢复荧光, 达到检测  $\text{H}_2\text{S}$  的效果. Xu 等<sup>[46]</sup> 设计了一种基于 BODIPY 的 NIR-II 荧光探针 ZX-NIR, 以水溶性、生物相容性好的硅球作为荧光探针的保护壳. 由于 NIR-II 的荧光特性, 该荧光探针在保护壳里也有非常强的穿透能力, 因而在设计时同时在硅球中再加入一个同样是 BODIPY 结构的、荧光吸收和发射都没有重叠的分子作为参比荧光探针 (aza-BOD), 构建了一种比率型荧光探针. 这样, 参比荧光探针的存在使得这个硅球包裹的荧光探针不会受到细胞环境的影响, 能够在不同的细胞中也可以准确地识别  $\text{H}_2\text{S}$  (图 9).



参比荧光探针 aza-BOD 的  $\lambda_{\text{ex}}=670 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}}=700 \text{ nm}$ .

图 9 BODIPY 的比率型荧光探针

NBD 基团是一种强吸电子的芳香荧光基团, 能够作为一种荧光猝灭基团, 在与荧光基团相连时, 发生荧光猝灭, 并且由于其 C 上电子云密度太小, 非常容易被各类 RSS 亲核进攻, 因而, 人们经常利用该结构设计 RSS 荧光探针<sup>[47]</sup>. 然而, NBD 亲电性过强导致了这类化合物存在对 RSS 的选择性不是很好的隐患<sup>[48]</sup>. He 等<sup>[49]</sup> 用 NBD 和荧光基团相连, 在有 RSS 存在的时候发生亲核取代反应, 使得二者断开. 继而, 利用硫化氢对荧光基团的还原作用, 以及 GSH 与 Cys/Hcy 对 NBD 猝灭效果的不同, 开发了一种能够特异性识别 3 类 RSS 的荧光探针 HMN. Ding 等<sup>[20]</sup> 利用取代基引入的方法改变了 HBT-NBD 荧光探针和 RSS 反应的反应活性, 同时醛基作为新的反应位点能够特异性地与  $\text{H}_2\text{S}$  进行亲核反应, 而且醛基与  $\text{H}_2\text{S}$  的反应活性

会比没有醛基时  $\text{H}_2\text{S}$  直接进攻醚键的反应速率更高, 使得新的荧光探针可以高选择性、高灵敏度地检测  $\text{H}_2\text{S}$  (图 10).

**3.2 基于荧光基团破坏的荧光探针** 亲核进攻策略不仅适用于脱去猝灭剂, 也可以被用于破坏荧光基团. 对猝灭剂的进攻通常会使得荧光探针脱去一些芳香小分子 (例如 NBD 分子), 这使得该类探针可能存在一定的生物相容性不好的问题. 利用  $\text{H}_2\text{S}$  进攻破坏荧光基团, 在一定程度上可以避免脱去基团对动物体有害的隐患. Gong 等<sup>[50]</sup> 在 BODIPY 上连接硒苯醚取代基, 作为荧光加强基团, 设计了一种荧光探针 BOD-PhSe. 当有  $\text{S}^{2-}$  存在时, 探针中的醚键被进攻脱去, 硒苯醚取代基被取代成为巯基, 导致 BOD-PhSe 变成 BOD-2SH, 荧光探针的荧光被猝灭 (图 11). Chen

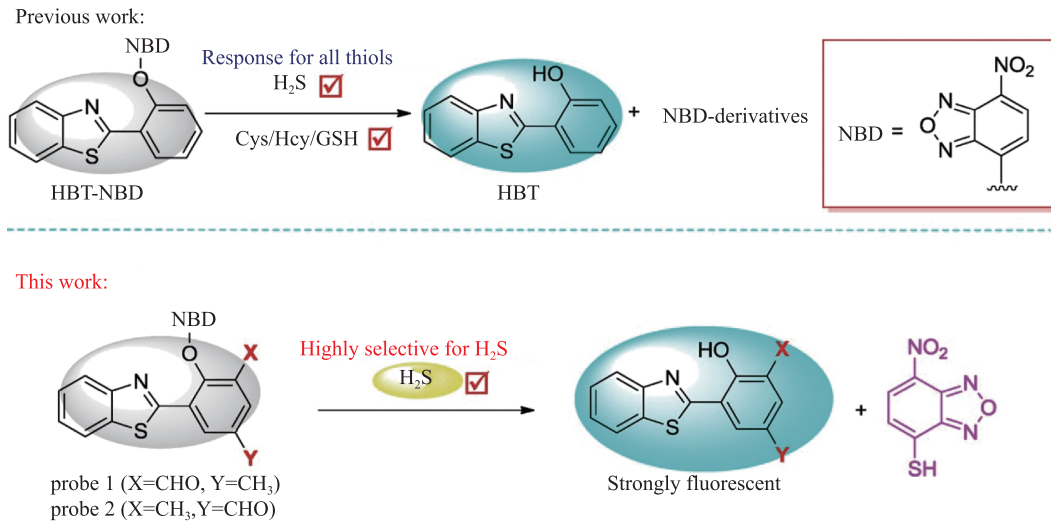
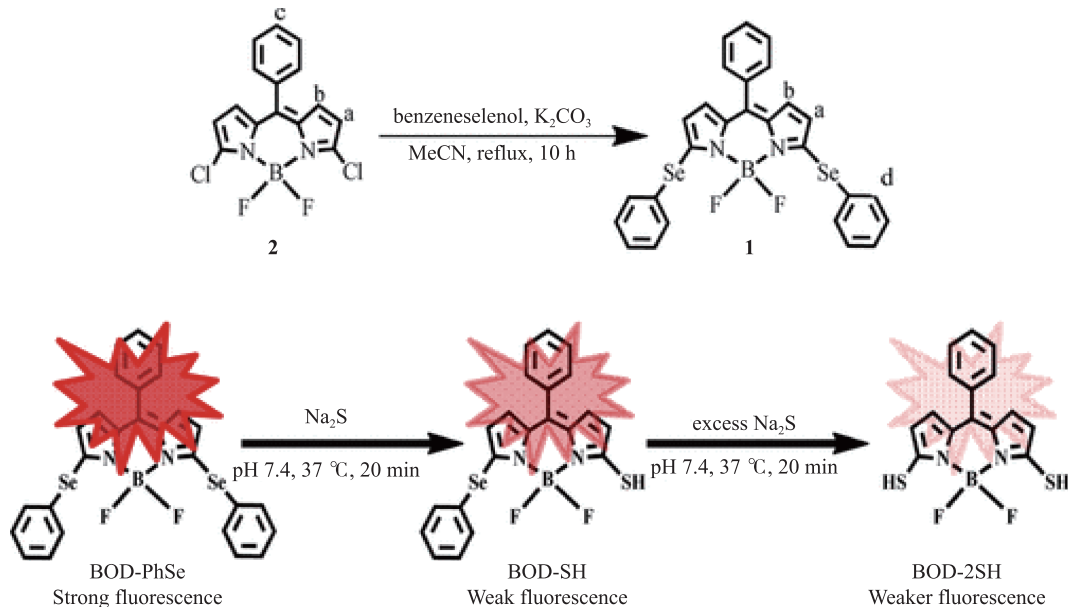


图 10 取代基对荧光探针 HBT-NBD 选择性的影响

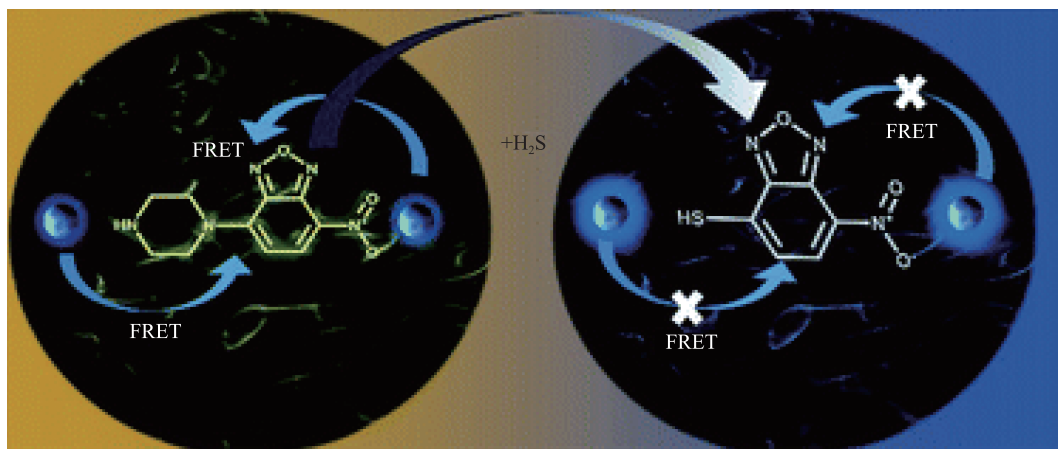
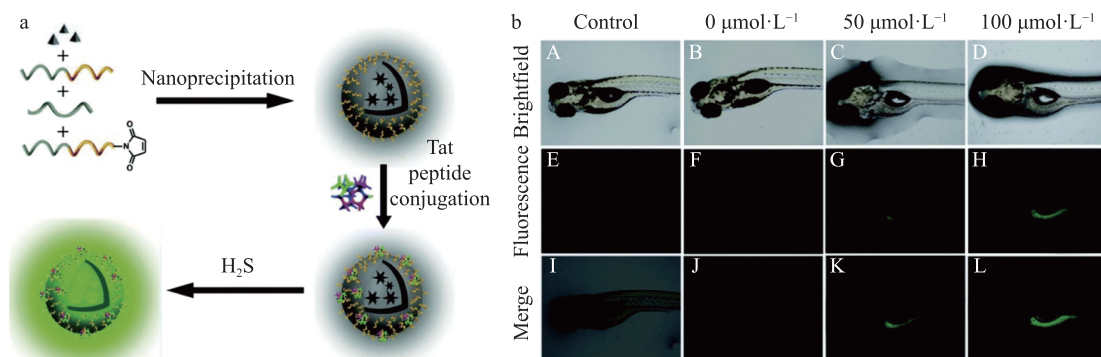
图 11 亲核进攻破坏荧光基团策略检测  $\text{H}_2\text{S}$  的荧光探针

等<sup>[51]</sup>、Paul 等<sup>[52]</sup>、Feng 等<sup>[53]</sup>则是利用  $\text{S}^{2-}$  和  $\text{HS}^-$  对吡啶结构的亲核进攻反应, 进攻荧光基团以改变探针的荧光性质, 构建了在生物硫醇中特异性检测  $\text{H}_2\text{S}$  的荧光探针.

**3.3 基于改变功能性结构的荧光探针** 基于亲核进攻的  $\text{H}_2\text{S}$  荧光探针, 还可以用于生物功能性结构中的检测, 例如脂质体<sup>[54]</sup>、纳米球<sup>[55]</sup>、量子点<sup>[56]</sup>、AIED 大分子<sup>[57]</sup>、MOF<sup>[58]</sup> 等. 这些生物功能性结构有着非常好的生物相容性, 相比于小分子荧光探针, 它们对于检测应用到细胞层面, 甚至是应用到动物体内成像有着非常显著的优势. 在这些功能性结构上修饰对应亲电基团, 进而在  $\text{H}_2\text{S}$  存在时发生亲核取代反应, 使得这些功能性分子的化学结构或空间构型发生变化, 继

而引发这些功能性结构的荧光发生改变, 从而达到检测的目的. 例如, Liu 等<sup>[56]</sup> 利用连有取代基的 NBD 探针和碳量子点 (CDs) 构建了一种荧光探针, 当  $\text{H}_2\text{S}$  存在时, NBD 探针荧光猝灭, 碳量子点 (CDs) 和 NBD 分子的 FRET 过程被破坏, 从而导致荧光波长和强度改变 (图 12).

功能性纳米结构是目前生物化学检测领域比较常用的一种结构, 它有着生物相容性好、可修饰多种功能等优点, 在生物成像方面的应用越来越广泛. Wang 等<sup>[55]</sup> 将基于 AIE 的  $\text{H}_2\text{S}$  探针与磷脂共沉淀合成了一种纳米球, 又在纳米球的表面修饰了肽段促进了纳米球的细胞渗透能力, 从而构建了一种能在体内和体外对  $\text{H}_2\text{S}$  进行检测分析的生物功能性结构 (图 13).

图 12 CDs-NBD FRET 荧光探针识别  $\text{H}_2\text{S}$  的机制图 13 检测  $\text{H}_2\text{S}$  的纳米探针 (a) 和在斑马鱼体内的成像 (b)

## 4 结论与展望

活性硫组分(RSS)是生物体内维持生理平衡的一类重要物质,是生物氧化还原屏障的第一道防线,这些分子参与了生物体内的各种细胞过程,是生物过程中非常重要的一类还原性分子<sup>[8]</sup>。目前开发各类检测 RSS 的荧光探针已经成为化学工作者的研究热点<sup>[17, 26]</sup>。本文介绍了一系列基于 RSS 检测的亲核性荧光探针的设计和应用研究进展。在设计基于亲核反应的荧光探针时,影响探针 RSS 选择性检测的主要因素是检测基团的位置和亲电性的强弱。通常来说,引入一些特定的取代基,能够使探针对 RSS 产生响应。此外,不同 RSS 的亲核性不同,分子结构也不尽相同。因此,目前主要是选择对  $\text{H}_2\text{S}$  和  $\text{H}_2\text{S}_n$  具有更强亲核性的基团进行探针构建,或利用 GSH、Cys 等独特的分子内氨基重排效应,来区分这些 RSS 分子。近年来,也有越来越多的工作是基于 RSS 的多种性质,构建多通道响应型荧光探针,一次性区分多种 RSS 分子。这些荧光探针,可以基于  $\text{H}_2\text{S}$  的强亲核性和生物硫醇独特的分子结构特性,利用荧光信号的变化,方便、快捷地一次性实现多种 RSS 分子的检测。

目前所报道的识别体内 RSS 的荧光探针,都有着

选择性强、生物相容性好、光学性质良好等优点,对生物体内成像和检测都有着非常重要的应用前景。在目前发展阶段,研究者在开发基于亲核取代的 RSS 荧光探针方面开展了大量的工作。尽管在这一领域已经取得了重大进展,但是对于目前该类 RSS 荧光探针的开发,仍然存在一些挑战,需要在探针设计和应用方面开展进一步研究,仍然需要更稳定、透射能力更强的荧光基团对 RSS 进行检测。另外,强亲核性只是 RSS 分子的诸多特性之一,RSS 分子还有强配位性或其他一些尚未利用的特性,因而基于 RSS 其他特性的荧光探针的设计和开发也十分迫切。为了更好地研究生命过程和病理过程,我们需要开发更加精确、快速对 RSS 进行成像和检测的方法,从而更加完整、精确地了解各个生命过程。基于对这些过程新的了解,可以对一些疾病产生过程进行更加完整全面的认识,为疾病的精确诊断提供足够的理论知识和实施策略。

## 5 参考文献

- [1] JACOB C, GILES G I, GILES N M, et al. Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function[J]. *Angewandte Chemie International Edition*,

- 2003, 42(39): 4742
- [2] CIRCU M L, AW T Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2010, 48(6): 749
- [3] WINYARD P G, RYAN B, EGGLETON P, et al. Measurement and meaning of markers of reactive species of oxygen, nitrogen and sulfur in healthy human subjects and patients with inflammatory joint disease[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2011, 39(5): 1226
- [4] LIN V S, CHEN W, XIAN M, et al. Chemical probes for molecular imaging and detection of hydrogen sulfide and reactive sulfur species in biological systems[J]. *Chemical Society Reviews*, 2015, 44(14): 4596
- [5] SHAHROKHIAN S. Lead phthalocyanine as a selective carrier for preparation of a cysteine-selective electrode[J]. *Analytical Chemistry*, 2001, 73(24): 5972
- [6] TURELL L, RADI R, ALVAREZ B. The thiol pool in human plasma: the central contribution of albumin to redox processes[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2013, 65: 244
- [7] GILES G I, TASKER K M, JACOB C. Hypothesis: the role of reactive sulfur species in oxidative stress[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2001, 31(10): 1279
- [8] BORA P, CHAUHAN P, PARDESHI K A, et al. Small molecule generators of biologically reactive sulfur species[J]. *RSC Advances*, 2018, 8(48): 27359
- [9] GRUHLKE M C H, SLUSARENKO A J. The biology of reactive sulfur species (RSS) [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2012, 59: 98
- [10] VAN OPDENBOSCH N, LAMKANFI M. Caspases in cell death, inflammation, and disease[J]. *Immunity*, 2019, 50(6): 1352
- [11] ZHANG H, XU L Z, CHEN W Q, et al. Simultaneous discrimination of cysteine, homocysteine, glutathione, and H<sub>2</sub>S in living cells through a multisignal combination strategy[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(3): 1904
- [12] WINDER A F. Homocysteine and cardiovascular disease[J]. *Journal of Clinical Pathology*, 1998, 51(10): 713
- [13] TCHERKAS Y V, DENISENKO A D. Simultaneous determination of several amino acids, including homocysteine, cysteine and glutamic acid, in human plasma by isocratic reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection[J]. *Journal of Chromatography A*, 2001, 913(1/2): 309
- [14] IVANOV A R, NAZIMOV I V, BARATOVA L A. Determination of biologically active low-molecular-mass thiols in human blood. II: high-performance capillary electrophoresis with photometric detection[J]. *Journal of Chromatography A*, 2000, 895(1/2): 167
- [15] SHINOHARA Y, HASEGAWA H, TAGOKU K, et al. Simultaneous determination of methionine and total homocysteine in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2001, 758(2): 283
- [16] LAWRENCE N S, DEO R P, WANG J. Detection of homocysteine at carbon nanotube paste electrodes[J]. *Talanta*, 2004, 63(2): 443
- [17] SUN J G, BAI Y, MA Q J, et al. A FRET-based ratiometric fluorescent probe for highly selective detection of hydrogen polysulfides based on a coumarin-rhodol derivative[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, 241: 118650
- [18] CHOI M G, CHO M J, RYU H, et al. Fluorescence signaling of thiophenol by hydrolysis of dinitrobenzenesulfonamide of 2-(2-aminophenyl) benzothiazole[J]. *Dyes and Pigments*, 2017, 143: 123
- [19] NIU L Y, CHEN Y Z, ZHENG H R, et al. Design strategies of fluorescent probes for selective detection among biothiols[J]. *Chemical Society Reviews*, 2015, 44(17): 6143
- [20] DING S S, FENG W Y, FENG G Q. Rapid and highly selective detection of H<sub>2</sub>S by nitrobenzofurazan (NBD) ether-based fluorescent probes with an aldehyde group[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017, 238: 619
- [21] CHOI H J, LIM C S, CHO M K, et al. A two-photon ratiometric probe for hydrogen polysulfide (H<sub>2</sub>S<sub>n</sub>): increase in mitochondrial H<sub>2</sub>S<sub>n</sub> production in a Parkinson's disease model[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2019, 283: 810
- [22] LI Z Y, CUI X L, YAN Y H, et al. A novel endoplasmic reticulum-targeted ratiometric fluorescent probe based on FRET for the detection of SO<sub>2</sub> derivatives[J]. *Dyes and Pigments*, 2021, 188: 109180
- [23] GAO X H, LI X H, LI L H, et al. A simple fluorescent off-on probe for the discrimination of cysteine from glutathione[J]. *Chemical Communications*, 2015, 51(45): 9388
- [24] ZHANG B X, LIU Y X, LI X M, et al. Small molecules to target the selenoprotein thioredoxin reductase[J]. *Chemistry-an Asian Journal*, 2018, 13(23): 3593
- [25] HAN B Y, YUAN J P, WANG E K. Sensitive and selective sensor for biothiols in the cell based on the recovered fluorescence of the CdTe quantum Dots-Hg(II) system[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(13): 5569
- [26] MA Y Y, XU Z C, SUN Q, et al. A semi-naphthorhodafluor-based red-emitting fluorescent probe for tracking of hydrogen polysulfide in living cells and

- zebrafish[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2021, 247: 119105
- [27] LIU X L, NIU L Y, CHEN Y Z, et al. A multi-emissive fluorescent probe for the discrimination of glutathione and cysteine[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 90: 403
- [28] CHEN W, PACHECO A, TAKANO Y, et al. A single fluorescent probe to visualize hydrogen sulfide and hydrogen polysulfides with different fluorescence signals[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2016, 55(34): 9993
- [29] IDA T, SAWA T, IHARA H, et al. Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(21): 7606
- [30] CHEN W, ROSSER E W, ZHANG D, et al. A specific nucleophilic ring-opening reaction of aziridines as a unique platform for the construction of hydrogen polysulfides sensors[J]. *Organic Letters*, 2015, 17(11): 2776
- [31] YU F B, GAO M, LI M, et al. A dual response near-infrared fluorescent probe for hydrogen polysulfides and superoxide anion detection in cells and *in vivo*[J]. *Biomaterials*, 2015, 63: 93
- [32] ZHANG J, ZHU X Y, HU X X, et al. Ratiometric two-photon fluorescent probe for *in vivo* hydrogen polysulfides detection and imaging during lipopolysaccharide-induced acute organs injury[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(23): 11892
- [33] ZHANG C L, SUN Q, ZHAO L M, et al. A BODIPY-based ratiometric probe for sensing and imaging hydrogen polysulfides in living cells[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2019, 223: 117295
- [34] CHUNG J, LI H D, LIM C S, et al. Two-photon imaging of hydrogen polysulfides in living cells and hippocampal tissues[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2020, 322: 128564
- [35] LI L, ROSE P, MOORE P K. Hydrogen sulfide and cell signaling[M]//*Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. California: Annual Reviews, 2011: 169-187.
- [36] SOWMYA S, SWATHI Y, YEO A L, et al. Hydrogen sulfide: regulatory role on blood pressure in hyperhomocysteinemia[J]. *Vascular Pharmacology*, 2010, 53(3/4): 138
- [37] JIANG G Y, LIU X, CHEN Q Q, et al. A new tetraphenylethylene based AIE probe for light-up and discriminatory detection of Cys over Hcy and GSH[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017, 252: 712
- [38] LU Z L, LU Y N, FAN C H, et al. Ultrafast deep-red emission fluorescent probe for highly selective imaging of endogenous cysteine in living cells and mice[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2019, 290: 581
- [39] LEE D, JEONG K, LUO X, et al. Near-infrared fluorescent probes for the detection of glutathione and their application in the fluorescence imaging of living cells and tumor-bearing mice[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2018, 6(17): 2541
- [40] CHEN W Q, LUO H C, LIU X J, et al. Broadly applicable strategy for the fluorescence based detection and differentiation of glutathione and cysteine/homocysteine: demonstration *in vitro* and *in vivo*[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(7): 3638
- [41] HE L W, YANG X L, XU K X, et al. A multifunctional logic gate by means of a triple-chromophore fluorescent biothiol probe with diverse fluorescence signal patterns[J]. *Chemical Communications*, 2017, 53(98): 13168
- [42] ABE K, KIMURA H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator[J]. *The Journal of Neuroscience*, 1996, 16(3): 1066
- [43] WANG X, SUN J, ZHANG W H, et al. A near-infrared ratiometric fluorescent probe for rapid and highly sensitive imaging of endogenous hydrogen sulfide in living cells[J]. *Chemical Science*, 2013, 4(6): 2551
- [44] WEI H J, LI X, TANG X Q. Therapeutic benefits of H<sub>2</sub>S in Alzheimer's disease[J]. *Journal of Clinical Neuroscience*, 2014, 21(10): 1665
- [45] CHAN M V, WALLACE J L. Hydrogen sulfide-based therapeutics and gastrointestinal diseases: translating physiology to treatments[J]. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2013, 305(7): 467
- [46] XU G, YAN Q L, LÜ X, et al. Imaging of colorectal cancers using activatable nanoprobe with second near-infrared window emission[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2018, 57(14): 3626
- [47] ZHANG K, ZHANG J, XI Z, et al. A new H<sub>2</sub>S-specific near-infrared fluorescence-enhanced probe that can visualize the H<sub>2</sub>S level in colorectal cancer cells in mice[J]. *Chemical Science*, 2017, 8(4): 2776
- [48] MONTOYA L A, PLUTH M D. Hydrogen sulfide deactivates common nitrobenzofurazan-based fluorescent thiol labeling reagents[J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(12): 6032
- [49] HE L W, YANG X L, XU K X, et al. A multi-signal fluorescent probe for simultaneously distinguishing and sequentially sensing cysteine/homocysteine, glutathione, and hydrogen sulfide in living cells[J]. *Chemical Science*, 2017, 8(9): 6257

- [50] GONG D Y, ZHU X T, TIAN Y J, et al. A phenylselenium-substituted BODIPY fluorescent turn-off probe for fluorescence imaging of hydrogen sulfide in living cells[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(3): 1801
- [51] CHEN Y C, ZHU C C, YANG Z H, et al. A ratiometric fluorescent probe for rapid detection of hydrogen sulfide in mitochondria[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2013, 52(6): 1688
- [52] PAUL S, GOSWAMI S, DAS MUKHOPADHYAY C. A remarkable ratiometric fluorescent chemodosimeter for very rapid detection of hydrogen sulfide in the vapour phase and living cells[J]. *New Journal of Chemistry*, 2015, 39(11): 8940
- [53] FENG X, ZHANG T, LIU J T, et al. A new ratiometric fluorescent probe for rapid, sensitive and selective detection of endogenous hydrogen sulfide in mitochondria[J]. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 2016, 52(15): 3131
- [54] ZHANG P S, NIE X Z, GAO M, et al. A highly selective fluorescent nanoprobe based on AIE and ESIPT for imaging hydrogen sulfide in live cells and zebrafish[J]. *Materials Chemistry Frontiers*, 2017, 1(5): 838
- [55] WANG F Y, XU G, GU X F, et al. Realizing highly chemoselective detection of H<sub>2</sub>S *in vitro* and *in vivo* with fluorescent probes inside core-shell silica nanoparticles[J]. *Biomaterials*, 2018, 159: 82
- [56] LIU G Q, GE H W, YIN R H, et al. Carbon dots tailored with a fluorophore for sensitive and selective detection of hydrogen sulfide based on a ratiometric fluorescence signal[J]. *Analytical Methods*, 2020, 12(12): 1617
- [57] ZHANG P S, HONG Y X, WANG H, et al. Selective visualization of endogenous hydrogen sulfide in lysosomes using aggregation induced emission dots[J]. *Polymer Chemistry*, 2017, 8(46): 7271
- [58] MA Y, LI X Y, LI A J, et al. H<sub>2</sub>S-activable MOF nanoparticle photosensitizer for effective photodynamic therapy against cancer with controllable singlet-oxygen release[J]. *Angewandte Chemie (International Ed in English)*, 2017, 56(44): 13752

## Fluorescent probes for reactive sulfur species based on nucleophilic substitution

YIN Yiyan<sup>1)</sup> WEI Juanjuan<sup>1,2)</sup> NA Na<sup>1)†</sup>

(1) College of Chemistry, Beijing Normal University, 100875, Beijing, China;

2) College of Chemistry and Chemical Engineering, Ningxia Normal University, 756000, Guyuan, Ningxia, China)

**Abstract** Reactive sulfur species (RSS) are important in cellular physiology and pathophysiology. For early diagnosis and therapy it is important to detect RSS rapidly and accurately in biological systems. Fluorescence-based detections are convenient and effective at the molecular level. RSS are generally nucleophilic, therefore nucleophilic substitutions are the common mechanism for RSS fluorescence detection. Typical fluorescent RSS probes for H<sub>2</sub>S, glutathione (GSH), cysteine (Cys) are reviewed, with a discussion on different response mechanism. Future directions and opportunities for new fluorescent RSS probes are put into perspectives.

**Keywords** reactive sulfur species (RSS); fluorescent probes; nucleophilic reaction; biological imaging

【责任编辑: 武佳】