

# 内质网靶向生物活性小分子探针研究进展\*

张晨曦 那娜<sup>†</sup>

(北京师范大学化学学院,放射性药物教育部重点实验室,100875,北京)

**摘要** 内质网是真核细胞中重要的细胞器,参与多种生理过程.各种外界诱因会引发内质网应激,使细胞产生各种生物活性分子,从而导致细胞生理活性变化,引起癌症等多种疾病.生物活性物种,如活性氧、活性氮、活性硫等,具有较高的氧化还原活性和生物活性,在众多生理病理过程中起着关键作用.荧光探针技术是检测这些生物活性物种的一种较理想的手段,具有光学性质优异、定位效果突出、可以进行多功能实时原位监测等特点.因而,借助荧光成像技术监测活性物种在内质网中的变化过程,对攻克某些代谢疾病和癌症具有极大的推动作用.本文综述了近几年来可以靶向于内质网、特异性检测活性物种的荧光探针,在对其结构进行介绍的基础上,展示了其功能性和生物应用前景,并进一步阐述了定位和检测机制,最后对该类探针的未来发展进行了展望.

**关键词** 内质网;荧光探针;活性氧;活性氮;活性硫

**中图分类号** O657.3

**DOI:** 10.12202/j.0476-0301.2022031

## 0 引言

内质网是真核细胞中重要的细胞器,其内腔中发生的蛋白质的折叠、修饰等行为参与了众多生理过程<sup>[1]</sup>.修饰折叠完的蛋白质会被释放到细胞内的其他细胞器中或排出细胞成为分泌蛋白<sup>[2-3]</sup>.在这一过程中,如果存在葡萄糖缺失、病毒感染等外界因素的干扰,会形成异常的活性物质,产生未折叠或者折叠错误的蛋白质.这些蛋白质不能被正常排出,从而集聚在内质网腔内,进一步影响内质网的生理过程,由此导致内质网应激<sup>[4-6]</sup>.内质网应激是一种亚细胞的病理状态,严重的应激会导致细胞凋亡,从而引起老年痴呆、糖尿病、呼吸道及心血管炎症乃至癌症等疾病<sup>[7-10]</sup>.因此,对内质网内活性组分的实时监测,有助于我们理解病理过程,帮助临床诊断及药物设计.

生物活性物质,包括活性氧物种(reactive oxygen species, ROS, 包括 HClO、ClO<sup>-</sup>、超氧阴离子、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、·OH 及 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 等)、活性氮物种(reactive nitrogen species, RNS, 包括 ONOO<sup>-</sup>、NO、NO<sub>2</sub>、HNO 等)、活性硫物种(reactive sulfur species, RSS, 包括谷胱甘肽(glutathione, GSH)、半胱氨酸(cysteine, Cys)、H<sub>2</sub>S、H<sub>2</sub>S<sub>n</sub>、SO<sub>2</sub> 衍生物等)、ATP、HCHO、CO 等,是细胞中非常重要的物质.这些物种在细胞中的动态波动决定了细胞的动

态平衡、信号传导,影响细胞的免疫力和新陈代谢,并参与多种生理过程.它们的异常表达会引起多种疾病,如癌症、帕金森综合征、糖尿病等<sup>[11]</sup>.因此,监测生物活性分子对于生物分析病理过程和相关药物的设计至关重要.

荧光成像技术近十几年飞速发展,广泛地应用于生物医学和生物分析领域<sup>[12-14]</sup>.大量证据表明,整个细胞周期的生理过程存在多种生物活性物种的参与<sup>[15]</sup>.在不同的细胞器内,活性物种表达的浓度、方式及时间不同,会引发不同的生理应激过程,导致不同的下游通路信号改变.如癌细胞中由于无氧呼吸的存在,乳酸被大量释放,导致胞内 pH 较低,易诱导产生多种活性氧物种,对人体内环境进一步破坏.因此,借助不同的荧光探针分子,对细胞器及细胞器内的活性物种进行定位并实时成像,通过不同的策略来调节荧光探针的物理化学性质,实现更精确的定位,将有助于我们理解不同的生理过程并提高对疾病的诊断、治疗和预后<sup>[16]</sup>.本文综述了近几年来的内质网靶向的用以监测生物活性小分子的荧光探针,分析了其结构、功能以及定位和检测机制.

## 1 ROS

ROS 广泛参与各种生理活动,如蛋白质折叠中的二硫键的合成等.然而,其具体的作用机制并不明确.

\* 国家重点研发计划项目(2019YFC1805600);国家自然科学基金资助项目(21874012, 21974010)

<sup>†</sup> 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. E-mail: nana@bnu.edu.cn

收稿日期: 2022-02-25

在内质网中,过度表达的 ROS 会破坏蛋白质的合成,使蛋白质交联,失去生理活性;或者引发内质网应激,破坏细胞内环境的稳态<sup>[17]</sup>.因此,对 ROS 的实时监测是非常必要的.

**1.1 HClO/CIO<sup>-</sup>** HClO 和 ClO<sup>-</sup> 是一对共轭酸碱对,拥有非常强的氧化性.通常,该类活性物种在细胞弱碱、弱酸环境下生成,并具有抵抗微生物、消炎等功

能.然而,由于高度的氧化性,该物种过量表达不仅会损害细胞内的 DNA,还会氧化细胞内正常表达的生物小分子和蛋白质等,甚至会诱导内质网产生氧化应激.有报道指出,动脉硬化、风湿性关节炎等疾病均与内质网中 HClO 物种浓度上升有关<sup>[18-19]</sup>.因此,对内质网中 HClO 物种进行实时监测是十分必要的.多个小组在此领域开展了多项工作(图 1).

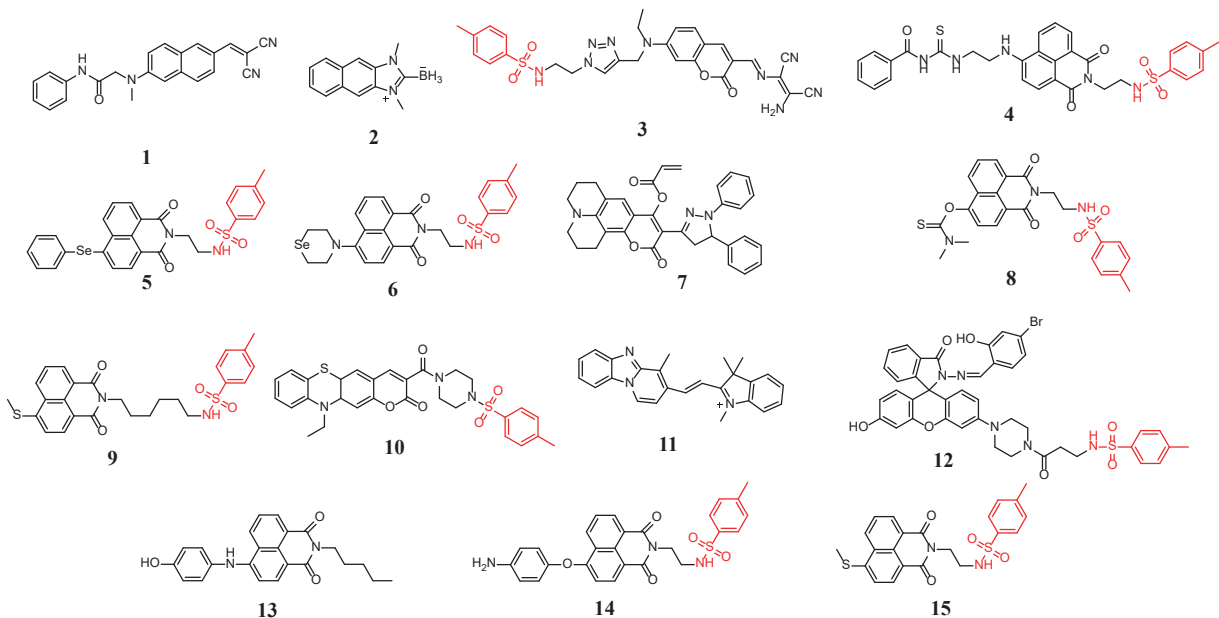


图 1 内质网靶向型检测 HClO 物种探针结构(定位基团以红色标出)

Li 等<sup>[20]</sup>设计的探针 **1** 对于不同比例的响应物质会产生不同的荧光信号,可以作为比率荧光探针.在此探针结构中,丙二腈部分可以特异性识别 ClO<sup>-</sup>,酰胺部分遇水会水解,从而产生荧光信号的变化.该探针可定位于粗面型内质网的弱碱性环境中,实现对粗面型内质网的荧光成像.ER-Tracker 共定位实验表明,其对内质网有良好靶向性,定位机制可能是基于整个分子较好的脂溶性,依据相似相容原理溶解于内质网中.作为一个荧光逻辑门分子,该探针对不同的响应物质,如 OH<sup>-</sup> 及 ClO<sup>-</sup>,有着不同的信号响应.值得注意的是,该探针没有使用传统的喹啉、硫醇或硫酮等检测基团,避免了粗面型内质网弱碱性环境对这些检测基团的影响,可以直接检测内质网中的 ClO<sup>-</sup>.

基于氮杂卡宾硼烷, Pak 等<sup>[21]</sup>设计了一种可以检测 HClO 物种的比率型荧光探针 **2**.如图 2 所示,当 ClO<sup>-</sup> 将硼氢基氧化后,探针分子形成了萘咪唑衍生物结构,产生荧光信号的变化,导致其本来于 361 nm 处的荧光信号下降,450 nm 处的荧光信号增强.荧光分子由蓝色变为青色,可以监测内质网应激过程中 HClO 物种浓度的变化.其发光机制可能是强吸电子

基团硼氢基离去,使整个荧光分子的电子云密度上升,发射波长红移.该探针具有良好的工作曲线,可以对 ClO<sup>-</sup> 的浓度进行定量分析.同时,该探针对于 HClO 物种的选择性强,干扰实验表明其仅对 HClO 物种会产生荧光信号的比率型变化,而对其他金属离子或者活性物种没有响应.该探针与 ER-Tracker、Mito-Tracker 及 Lyso-Tracker 的共定位实验表明其能良好地定位于内质网,定位机制可能和整个分子较强的脂溶性有关.

以对甲苯磺酰胺为靶向基团, Hou 等<sup>[22]</sup>报道了基于香豆素的比率型荧光探针 **3**.该探针由定位基团对甲苯磺酰胺、荧光基团香豆素以及 ClO<sup>-</sup> 识别基团二氨基马来腈组成,可以用来检测内质网中的 ClO<sup>-</sup>.对甲苯磺酰胺是一个传统的内质网定位基团,通过与膜上的磺酰脲受体结合,实现内质网定位. ClO<sup>-</sup> 与二氨基马来腈反应后,会诱导碳氮键断裂,使识别基团离去形成羧酸,从而导致荧光信号发生改变.由于反应后分子结构发生改变,分子内电子云密度也会重新分布,导致荧光信号变化.在 ClO<sup>-</sup> 的作用下,该探针吸收峰在 425/488 nm 处产生比率型变化,而其发射峰在 480/554 nm 处也会产生比率型变化,二者均具有良

好的线性关系. 干扰实验表明其对  $\text{ClO}^-$  具有良好的选择性, 共定位实验也证明了其对内质网良好的定位效能.

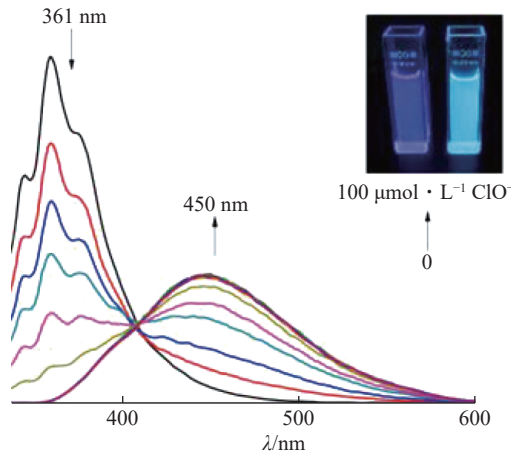


插图: 探针的荧光强度随  $\text{ClO}^-$  浓度发生变化.

图2 探针2的  $\text{ClO}^-$  光谱响应

另一个以萘酰亚胺衍生物为基础的荧光探针4由 Ma 等<sup>[23]</sup>所构建. 该探针为可以靶向内质网并检测 HClO 的比率型荧光探针. 萘酰亚胺是一个光学性能优异的双光子荧光基团, 基于其稳定的光学性能, 该荧光基团广泛地应用于荧光探针的构建. 定位基团使用的是对甲苯磺酰胺, 而识别基团则使用了可以被 HClO 氧化的硫脲. 在没有 HClO 存在的情况下, 整个分子于 533 nm 处发射绿色荧光. 当 HClO 将硫脲氧化后, 分子内的分子内电荷转移 (intramolecular charge transfer, ICT) 过程受阻, 荧光信号发生蓝移, 产生了位于 484 nm 处的新荧光峰. 该探针具有良好的抗干扰能力, 检测限低至  $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ . 该小组将其成功应用于活细胞内质网中的 HClO 成像.

细胞内的氧化还原状态也能体现细胞的生理活动是否出现异常. Zang 等<sup>[24]</sup>构建了一种可逆荧光探针5, 用来揭示内质网中的氧化还原状态. 该探针以硒为识别位点, 对甲苯磺酰胺及萘酰亚胺为定位基团及荧光基团. 硒可以被 HClO 物种氧化, 被 RSS 物种还原. 探针本身在 506 nm 处具有荧光, 当 HClO 加入后, 硒醚被氧化为硒氧基, 发生光致电子转移 (photoinduced electron transfer, PET) 效应, 导致荧光猝灭. 而后被 RSS 类物种还原, 使荧光复现, 实现了对细胞氧化还原状态的检测. 此探针对于 HClO 选择性强, 成功应用于表征衣霉素介导的内质网应激过程中 HClO 的变化, 并检测到了细胞整体的氧化还原状态.

Tang 等<sup>[25]</sup>以探针5为基础, 设计了另一种可以实时检测内质网氧化还原状态的探针6. 该探针以硒杂嘧啶为识别基团. 由于硒的 PET 效应, 整个探针几乎没有荧光, 荧光量子产率为 0.0062. 当 HClO 将硒氧

化为硒氧基, PET 效应被阻断, 分子荧光复现, 量子产率提高到了 0.11, 实现了对 HClO 的动态监测. 同样, 硒氧基可以被 RSS 类物种 (如 GSH) 还原, 使得荧光猝灭, 实现细胞内氧化还原状态的表征. 该探针荧光基团和定位基团选用的仍是萘酰亚胺和对甲苯磺酰胺.

外界诱因导致的未折叠蛋白质会引起还原性物质积累, 从而引发还原应激, 但具体的生理过程仍不明确. 大量的还原性物质如 GSH、Cys 等积累和 HClO 的产生, 会对细胞造成不可预测的损害. 为了进一步了解该生理过程, Niu 等<sup>[26]</sup>设计了一种内质网靶向荧光探针7, 可以实现对内质网还原应激的实时成像. 探针7采用了香豆素和吡啶啉衍生物为荧光基团, 丙烯酸酯为识别基团, 实现了对 GSH、Cys 及 HClO 的实时监测, 也可以对细胞内氧化还原状态进行判定. 共定位实验表明该探针定位于内质网, 并可以通过荧光信号区分正常细胞和癌细胞.

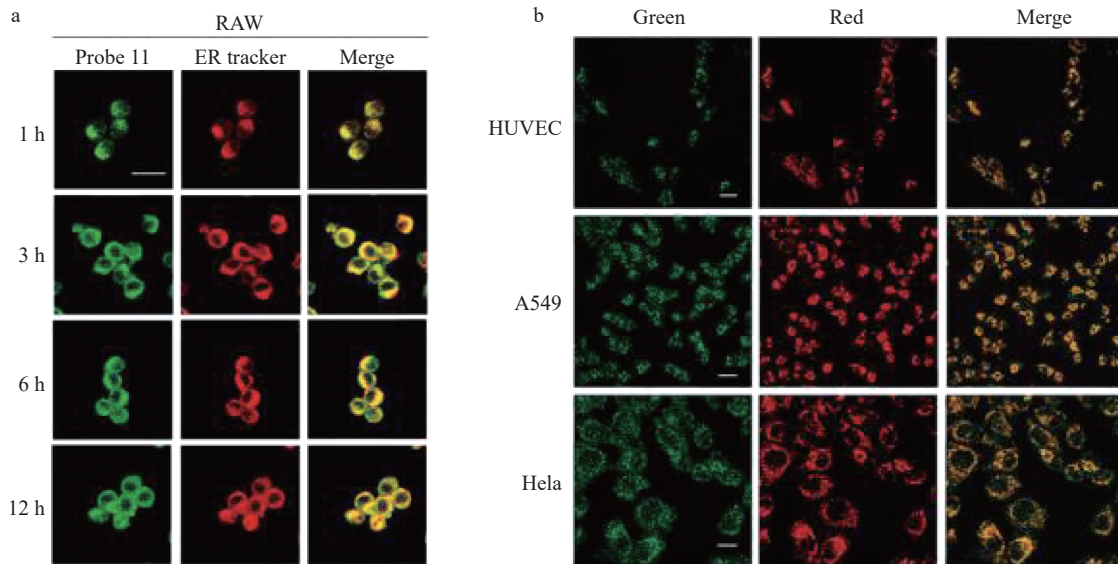
使用硫代氨基甲酸酯为识别基团, Lu 等<sup>[27]</sup>设计了荧光探针8. 该探针靶标物质为 HClO 解离出来的氯正离子, 实现了对内质网中 HClO 的检测. 检测机制为: 硫代氨基甲酸酯会与氯正离子发生亲电加成, 导致整个基团脱去. 而脱去位置则会生成羟基——一个强的给电子基团, 引起 ICT 效应, 使得萘酰亚胺荧光信号显著增强. 该探针在  $0 \sim 30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  具有良好的线性关系, 检测限低至  $0.13 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 并成功应用于斑马鱼的活体成像. 该小组另一个工作则在萘酰亚胺荧光基团上修饰了一个硫醚结构作为识别位点, 实现了对 HClO 的检测<sup>[28]</sup>. 探针9本身在 502 nm 处具有较强的荧光, 这是因为硫醚基团中硫原子的孤对电子与萘酰亚胺部分发生了 ICT 效应而产生的. 当硫醚被 HClO 氧化为亚砷结构后, ICT 效应消失, 导致该探针荧光猝灭, 实现 TURN-OFF 转变, 完成对 HClO 的检测. 该探针抗干扰能力强, 仅在 HClO 加入后荧光强度才有明显下降.

Wang 等<sup>[29]</sup>利用吩噻嗪香豆素衍生物构建了一种 HClO 荧光探针10, 通过修饰对甲苯磺酰胺实现了对内质网的定位. 检测机制为: HClO 特异性氧化吩噻嗪结构中的硫原子, 使之变为亚砷结构, 导致荧光从 609 nm 蓝移至 503 nm. 该探针细胞毒性低, 细胞膜通透性好. 此外, 该小组成功运用此探针, 对顺铂治疗癌细胞时产生的内质网应激过程中形成的大量 HClO 进行了监测.

HClO 探针也可以用来研究病理过程. 肿瘤细胞中 HClO 的含量远高于正常细胞, 可能是由于 HClO 对肿瘤细胞生长起着调控作用. 为了进一步了解此生理过程, Ning 等<sup>[30]</sup>以苯并咪唑-半花菁为模板构建

了一种 HClO 探针 **11**. 如图 3 所示, 共定位实验表明, 此探针靶向于内质网, 并且可以与 HClO 特异性结合, 导致细胞内 HClO 浓度下降, 从而抑制 HClO 引起

的 GRP78 的氧化修饰来促进癌细胞自噬及凋亡. 该工作为内源性 HClO 可以修饰蛋白, 调节癌细胞生长提供了新的证据.



a. 探针 11 的共定位实验细胞成像; b. HUVEC (人脐静脉内皮细胞)、A549 细胞及 HeLa 细胞内的荧光成像, 用以监测 HClO 的存在.

图 3 荧光探针 11 的细胞成像

过量的 ROS 会对细胞器产生氧化损伤, 可能会引发糖尿病. 为了进一步理解 HClO 和糖尿病的关系, Zhang 等<sup>[31]</sup>以 Rhodol 衍生物为荧光基团和检测基团, 以对甲基苯磺酰胺为识别基团, 设计了荧光探针 **12**. 该探针使用一个内酰胺结构完成了对 Rhodol 的荧光猝灭, 并引入了 4-溴-2-羟基苯甲醛使得探针更容易通过细胞膜. 当探针锚定于内质网后, 游离的 HClO 可以将内酰胺结构氧化开环, 使探针荧光复现, 达到检测的效果. 该探针对各种金属离子及各种活性物种具有良好的抗干扰能力, 并已成功应用于糖尿病细胞中异常 HClO 的检测.

$\text{ClO}^-$  可以破坏血管内皮功能, 氧化修饰脂蛋白, 增加斑块不稳定性, 促进动脉粥样硬化的形成. 为了进一步了解  $\text{ClO}^-$  在该过程中的作用, Zhang 等<sup>[32]</sup>基于 PET 效应, 以对氨基苯酚作为识别基团, 设计了一种内质网靶向的荧光探针 **13**. 由于对氨基苯酚的 PET 效应, 整个探针分子是荧光猝灭的, 而当  $\text{ClO}^-$  将对氨基苯酚氧化消去后, PET 效应被阻断, 荧光复现. 通过该过程, 可以检测外源性或者内源性的  $\text{ClO}^-$ . 其定位机制是利用了整个分子良好的脂溶性.

区别于  $\text{ClO}^-$ , Yang 等<sup>[33]</sup>使用了对氨基苯醚为识别基团, 构建了探针 **14**, 可以特异性识别 HClO. 与文献 [32] 所使用的识别基团不同, 该识别基团裸露在外的是氨基而不是酚羟基, 用以适当调节 pH 及 HClO

的存在形式. HClO 可以将识别基团氧化, 从而使探针荧光复现. 该探针定位基团及荧光基团使用的依旧是对甲苯磺酰胺和萘酰亚胺. 该探针细胞毒性低, 抗干扰能力强, 并成功地在斑马鱼体内实现了对内源性和外源性 HClO 的活体成像, 及对内质网应激过程中产生的 HClO 的实时监测.

睡眠不足会引起内质网应激, 其生理过程机制尚不明确, 可能与相关的活性物种浓度异常表达有关. Xia 等<sup>[34]</sup>最近针对睡眠缺失实验中内质网的 HClO 浓度变化, 设计出了一种双光子荧光探针 **15**. 该探针的荧光基团为光学性能优良的萘酰亚胺基团, 而检测基团为具有较强的还原性的硫醚. 硫醚可以被 HClO 氧化为亚砷结构, 从而改变对萘酰亚胺推拉电子的能力, 显著影响双光子荧光基团的光学性质. 探针分子于 509 nm 处存在强烈的荧光信号, 荧光量子产率为 42.7%, 但当加入 HClO 后, 509 nm 处的发射峰被猝灭, 信号强度显著下降. 该探针拥有较好的实时响应能力、较高的灵敏度和选择性. 该探针检测范围为  $1.0 \sim 160.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 检测限低至  $0.12 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 并成功用于对睡眠缺失的斑马鱼的内质网 HClO 的检测.

HClO 物种作为一类具有强氧化性的活性物种, 广泛参与了多种生理病理过程. 目前对 HClO 物种检测的荧光探针种类繁多, 检测机制大都利用了 HClO 物种的强氧化性.

**1.2 过氧化氢**  $\text{H}_2\text{O}_2$  广泛存在于各个细胞器中, 参与了众多生理过程. 当内质网中的蛋白质错误折叠并且累积时,  $\text{H}_2\text{O}_2$  会将其氧化, 并在内质网中集聚, 从而诱导产生内质网氧化应激.  $\text{H}_2\text{O}_2$  的异常表达

可能会引发神经退行性疾病、心血管疾病、代谢性疾病甚至癌症<sup>[35-36]</sup>. 有报道表明,  $\text{H}_2\text{O}_2$  可能通过激活 Caspase-12 通路引起细胞凋亡<sup>[37]</sup>, 因此, 对内质网中  $\text{H}_2\text{O}_2$  的检测是十分必要的(图4).

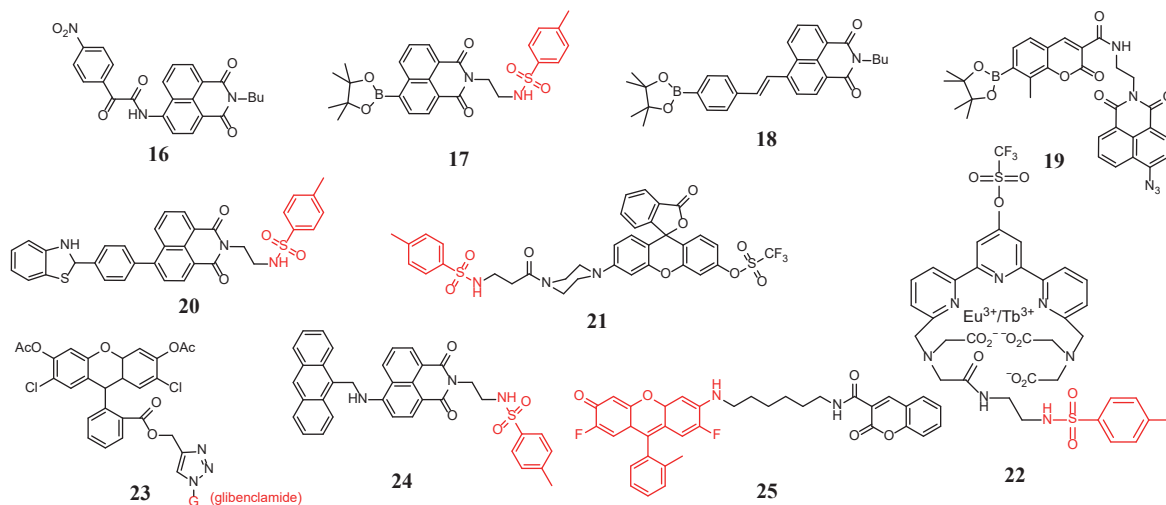
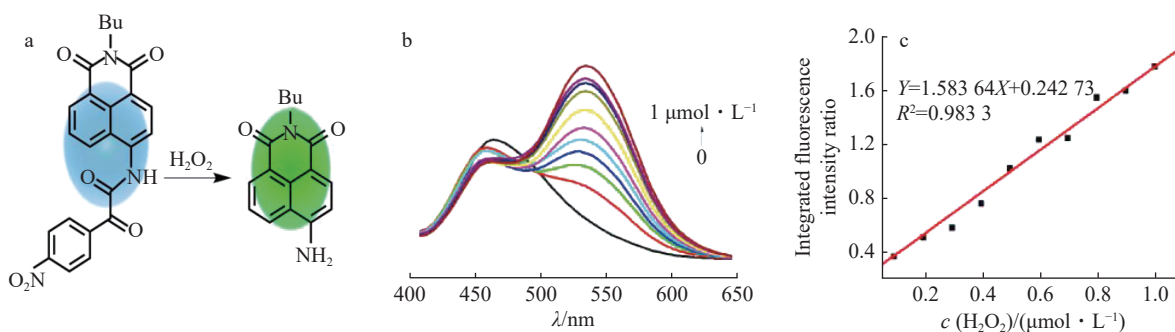


图4 内质网靶向型检测其他 ROS 探针结构(定位基团以红色标出)

Gao 等<sup>[38]</sup> 报道了  $\alpha$ -酮胺修饰的萘酰亚胺荧光探针 **16**, 可以特异性检测内质网中的  $\text{H}_2\text{O}_2$ .  $\alpha$ -酮胺作为识别基团, 可以被  $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化为氨基, 导致其电子供给能力发生改变, 从而引起荧光信号的变化. 该探针检测限低至  $38 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 定位效果良好, 可能的定位机制是利用了内质网较好的脂溶性. 该探针修饰了一

条长直链烷烃, 可以直接插入内质网中. 探针本身无明显荧光信号, 当加入  $\text{H}_2\text{O}_2$  后, 在  $540 \text{ nm}$  处产生荧光信号(图5). 该探针具有良好的工作曲线, 其他氧化性物种对荧光信号会有略微的影响, 但对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的选择性较高.



a. 探针 **16** 的检测机制; b. 随着  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度的上升, 探针于  $540 \text{ nm}$  处的发射峰逐渐增强; c. 探针 **16** 的工作曲线.

图5 荧光探针 **16** 的检测机制及光学性质

Xiao 等<sup>[39]</sup> 通过将硼酸酯基团修饰于萘酰亚胺上, 合成了可以定位于内质网并检测  $\text{H}_2\text{O}_2$  的双光子荧光探针 **17**. 定位基团仍是对甲苯磺酰胺. 该探针可以特异性地检测  $\text{H}_2\text{O}_2$ . 检测机制为:  $\text{H}_2\text{O}_2$  将硼酸酯氧化水解, 进而产生 ICT 效应, 导致荧光发射波长改变. 该探针的颜色会随  $\text{H}_2\text{O}_2$  的加入发生变化, 由无色转变为黄色. 相应的荧光发射波长由  $458 \text{ nm}$  红移至  $558 \text{ nm}$ , 量子产率由  $0.007$  增大至  $0.24$ . 当加入  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  后, 探针于  $558 \text{ nm}$  处的荧光强

度增强为原来的  $19$  倍. 该探针属于比率型荧光探针, 特异性好, 不与其他金属离子或氧化物反应.

比率型荧光探针 **18**, 是另一个以萘酰亚胺硼酸酯为基础的、由 Lee 等<sup>[40]</sup> 设计的探针. 以苯乙烯萘酰亚胺硼酸酯为识别及荧光基团, 可以实现对内质网中  $\text{H}_2\text{O}_2$  的检测. 探针本身于  $535 \text{ nm}$  处发射绿色荧光, 但随着硼酸酯基被  $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化消去, 分子内产生强烈的 ICT 效应, 使得荧光红移至  $640 \text{ nm}$ . 共定位实验表明, 探针定位于内质网, 可能的机制是由于整个分子具有

良好的脂溶性。

此外, Velusamy 等<sup>[41]</sup> 基于荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 效应, 设计了双通道多功能荧光探针 **19**, 可同时检测外源性或内源性的  $\text{H}_2\text{O}_2$  及  $\text{H}_2\text{S}$ 。以对  $\text{H}_2\text{O}_2$  有响应的香豆素衍生物和对  $\text{H}_2\text{S}$  有响应的萘酰亚胺衍生物为荧光基团及检测基团, 实现了在活细胞内的双色荧光成像。由于香豆素的发射光谱与萘酰亚胺的吸收光谱有部分重叠, 可以对  $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $\text{H}_2\text{S}$  进行时间分辨检测。单独的  $\text{H}_2\text{S}$  会将萘酰亚胺基团的叠氮基还原为氨基, 使萘酰亚胺荧光复现。而单独的  $\text{H}_2\text{O}_2$  会将香豆素基团的硼酸酯基氧化消去, 使香豆素荧光复现, 从而实现了二者的单独检测。当二者同时存在时, 萘酰亚胺和香豆素荧光同时复现, 并发生 FRET 效应, 萘酰亚胺基团荧光增强, 实现了对二者的同时检测。由于整个分子较强的脂溶性, 该探针很可能定位于内质网中。

$\text{H}_2\text{O}_2$  广泛产生于各个细胞器, 目前已经报道了许多细胞水平的  $\text{H}_2\text{O}_2$  探针。然而, 亚细胞水平尤其是内质网内的  $\text{H}_2\text{O}_2$  荧光探针仍具有广阔的发展空间。并且,  $\text{H}_2\text{O}_2$  介导的内质网应激过程仍不明确, 如何发展可以实时快速成像的探针仍是需要解决的一个问题。

**1.3 超氧阴离子** 超氧阴离子是一种氧化性非常强的活性物种, 通常由人体新陈代谢过程的中间体产生。其活性高、浓度低、寿命短, 是细胞内众多 ROS 的前体。适量的超氧阴离子可以维持细胞内正常生理功能的进行, 然而其异常表达亦会引起蛋白质的错误折叠, 从而导致内质网应激, 严重破坏细胞内环境稳态<sup>[42]</sup>。因此, 对超氧阴离子进行亚细胞水平的实时监测已经成为一项重要任务。

Xiao 等<sup>[43]</sup> 开发出靶向内质网的荧光探针 **20**, 用以检测超氧阴离子。该探针由荧光基团萘酰亚胺、超氧阴离子识别基团苯并噻唑啉和定位基团对甲苯磺酰胺组成。检测机制为: 超氧阴离子将噻唑啉环氧化脱氢, 从而扩大共轭体系, 使氧化产物的荧光强度增加。此探针定位性能好, 检测限低至  $60 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 可以很好地研究内质网应激过程中超氧阴离子浓度的变化。在接触超氧阴离子后, 探针由无荧光转变为蓝色荧光, 在  $450 \text{ nm}$  处的荧光信号显著增强。在后续实验中, 成功地对小鼠体内的超氧阴离子进行了检测。

Lu 等<sup>[44]</sup> 设计的双光子荧光探针 **21**, 可以实时监测活细胞中内源性超氧阴离子的产生。该探针使用 Rhodol 作为双光子荧光基团, 三氟甲磺酸作为识别基团, 对甲苯磺酰胺作为内质网定位基团。超氧阴离子可以将三氟甲磺酸氧化消去, 使分子形成荧光素结构从而产生荧光。该探针在没有超氧阴离子存在的情

况下几乎没有荧光, 荧光量子产率为 0.0012。而当超氧阴离子加入后, 探针于  $558 \text{ nm}$  处出现了强烈的荧光信号, 产生绿色荧光。该探针在  $15\sim 90 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  内具有良好的线性关系, 且具有较低的检测限, 为  $0.12 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。随后, 该小组将其应用于斑马鱼体内。在  $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度探针培养后, 几乎观察不到荧光, 而斑马鱼被内源性超氧阴离子引发剂 PMA 处理后, 产生了明显的荧光。

为了测评药物性肾损伤, Tang 等<sup>[45]</sup> 设计了一种比率时间门控荧光探针, 用以监测内质网中的超氧阴离子。如图 6 所示, 探针 **22** 以镧系金属络合物为骨架, 对超氧阴离子具有很好的响应。该探针在  $540$  及  $610 \text{ nm}$  处均有长寿命的荧光信号, 抗干扰能力较强。随着超氧阴离子浓度上升,  $540 \text{ nm}$  处的荧光信号增强而  $610 \text{ nm}$  处的荧光信号减弱。通过结合比率荧光和时间门控发光成像技术, 揭示了不同刺激诱导下内质网中超氧阴离子水平的变化, 对顺铂和庆大霉素诱导的肾毒性进行了评估, 并对小鼠产生的左旋肉碱和 EGCG 对肾的保护作用进行了可视化 and 精确量化。

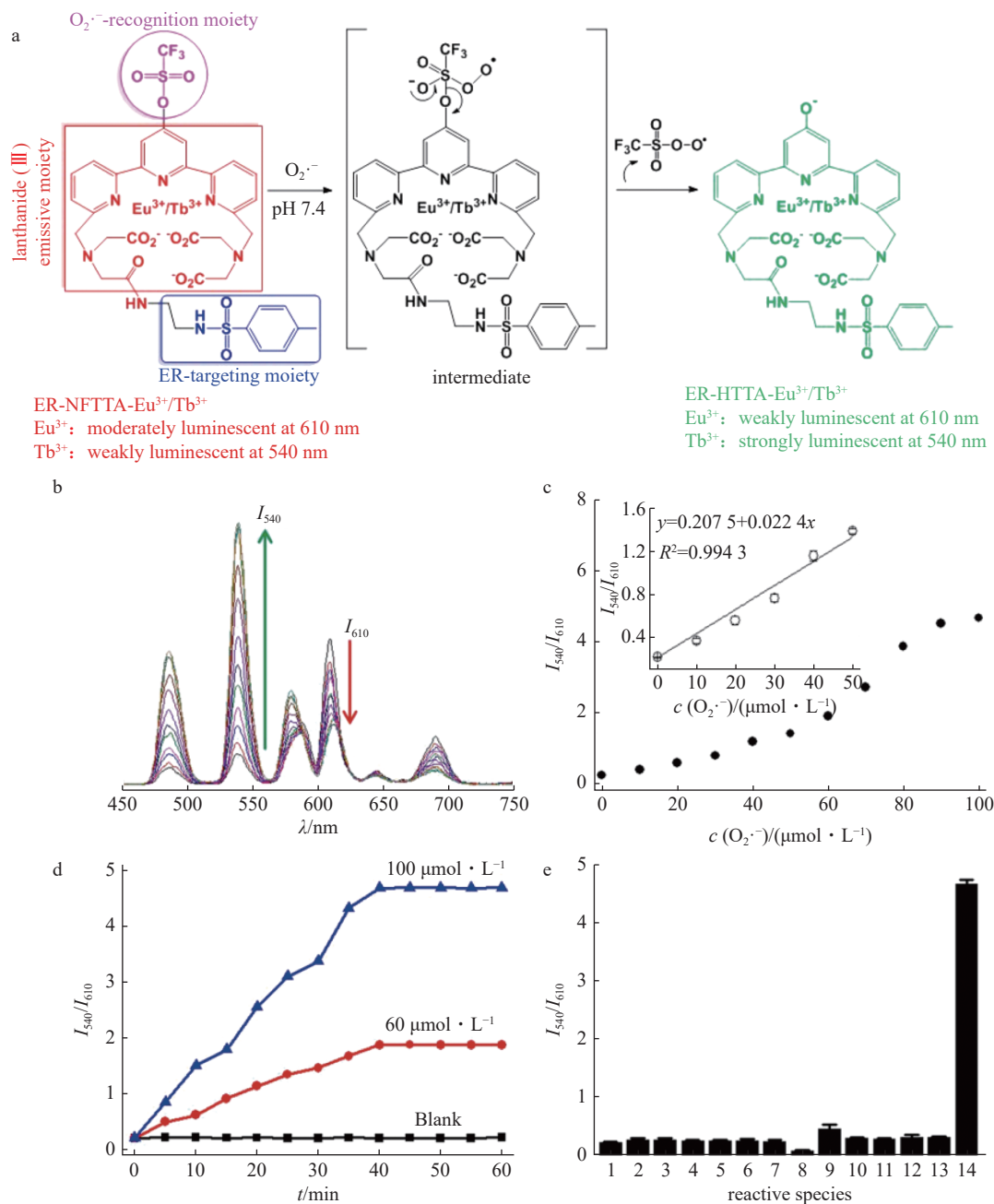
超氧阴离子具有高度的活性, 广泛参与各个生理过程。实现对短寿命超氧阴离子的捕获与生理活动检测具有重大意义。

**1.4 其他 ROS** 除了上文所述的 ROS, 羟基自由基、单线态氧等也会在细胞中产生并参与各种生理过程。这些物种活性高、寿命短、作用位点不明确且不容易被捕获, 因而对其进行检测的荧光探针较少。

Le 等<sup>[46]</sup> 以二氢荧光素为荧光基团、格列本脲为定位基团, 开发了靶向于内质网, 可以检测 ROS 的荧光探针 **23**。该探针进入内质网后, 先由内质网中的羧酸酯酶进行脱羧, 随后与 ROS 发生氧化反应, 将还原态的荧光基团前体氧化为二氢荧光素, 使荧光复现。该探针可以广谱地检测内质网应激过程中产生的各种 ROS。

Huang 等<sup>[47]</sup> 以葱为检测基团, 实现了对内质网中单线态氧的检测。探针 **24** 由 3 部分组成, 葱为单线态氧识别基团及电子给体, 萘酰亚胺作为双光子荧光基团, 对甲苯磺酰胺作为内质网定位基团。由于葱对于萘酰亚胺的 PET 效应, 整个探针是荧光猝灭的。当单线态氧将葱氧化, PET 效应消失, 使萘酰亚胺产生荧光, 从而实现检测。该探针检测范围为  $0\sim 2.75 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 检测限为  $0.11 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 对其他 ROS 及金属离子具有良好的抗干扰能力。

传统的荧光探针应由定位基团、荧光基团、检测基团 3 部分组成。Zhao 等<sup>[48]</sup> 创意性地使用了宾夕法尼亚绿 (PG), 一种脂溶性的荧光基团, 作为定位和检



a. 荧光探针 **22** 的结构及检测机制; b. 荧光探针 **22** 的荧光光谱. 随着超氧阴离子浓度的上升, 540/610 nm 处的荧光信号发生比率型变化; c.  $I_{540}/I_{610}$  的变化趋势. 插图为工作曲线; d. 不同超氧阴离子浓度下探针 **22** 的荧光信号随时间变化的趋势; e. 探针 **22** 的抗干扰实验(1: 空白; 2: 谷胱甘肽; 3: 半胱氨酸; 4: 同型半胱氨酸; 5: 抗坏血酸; 6: 葡萄糖; 7:  $H_2S$ ; 8:  $H_2O_2$ ; 9:  $HClO$ ; 10:  $\cdot OH$ ; 11:  $NO$ ; 12:  $ONOO^-$ ; 13:  $^1O_2$ ; 14: 超氧阴离子).

图 6 荧光探针 **22** 的结构, 检测机制及光学性质

测部分, 香豆素作为荧光部分, 构建了只有 2 个组件的荧光探针 **25**, 用以检测活细胞内质网中的羟基自由基. 当不存在羟基自由基时, 探针于 446 nm 处具有稳定的荧光信号. 而当香豆素羟基化后, 446 nm 处的荧光显著增强, 同时, PG 基团于 525 nm 处的荧光也同步增强, 可能与羟基化的香豆素对 PG 的能量转移有关. 该探针对众多 ROS 及金属离子具有良好的抗干扰能力, 并在  $0\sim 200 \mu mol \cdot L^{-1}$  内具有良好的线性

关系. 共定位实验也表明该探针靶向于内质网, 可以用来检测内质网应激过程中产生的羟基自由基.

## 2 RNS

除了活性氧外, RNS(包括  $HNO$ 、 $NO$ 、 $ONOO^-$ 等, 是一些含氮的、生物活性和氧化性很高的物种)也是生物体内重要的活性物种. 由于 RNS 寿命短、扩散距离大, 这些分子的作用位点通常由它们的位置所决

定,但实际参与了什么生理过程并不明确<sup>[49-51]</sup>. RNS 会对内质网的生理活动产生影响. 例如, 过氧亚硝酰会导致胞浆内钙离子的失衡, 从而引起细胞凋亡, 这与内质网是细胞内最大的钙离子储存场所有关. 由于 RNS 探针在早期预警和诊断方面具有较大潜力, 发展靶向内质网的 RNS 探针非常迫切. 在过去几十

年里, 活细胞内通过荧光探针追踪 RNS 引起了人们的极大兴趣. 尽管能够在亚细胞结构中对 RNS 浓度变化成像的探针, 特别是在内质网中进行成像作用的探针不多, 多个小组近年来在相关领域仍取得了进展(图 7).

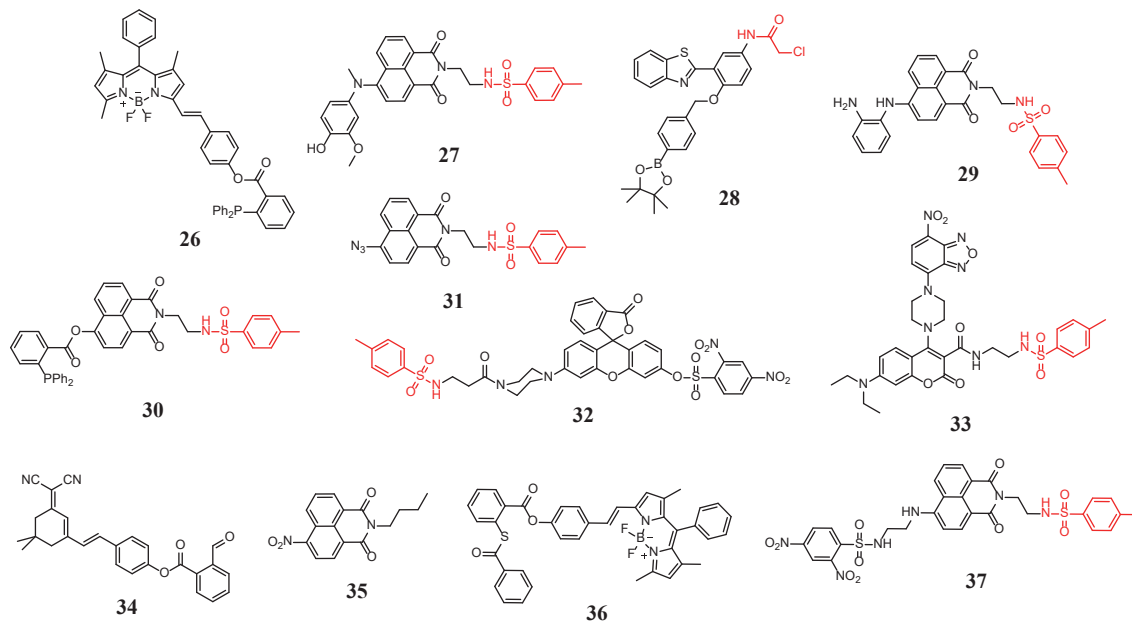


图 7 内质网靶向型检测活性氮及活性硫探针结构(定位基团以红色标出)

Ali 等<sup>[52]</sup> 基于 BODIPY 设计了可以特异性靶向内质网并检测 HNO 的荧光探针 **26**. 其检测机制为分子内猝灭基团将分子的荧光猝灭. 当 HNO 将酯键氧化断裂后, 猝灭基团离去, 整个体系的荧光复现. 共定位实验表明, 该探针在多种生物细胞里具有良好的内质网靶向性, 可以用来研究不同细胞的不同生理过程中 HNO 浓度的变化. 该探针抗干扰能力强, 对不同浓度的 HNO 有着良好的响应. 通过修饰苯基, 增强了探针分子的脂溶性, 从而可以定位于内质网.

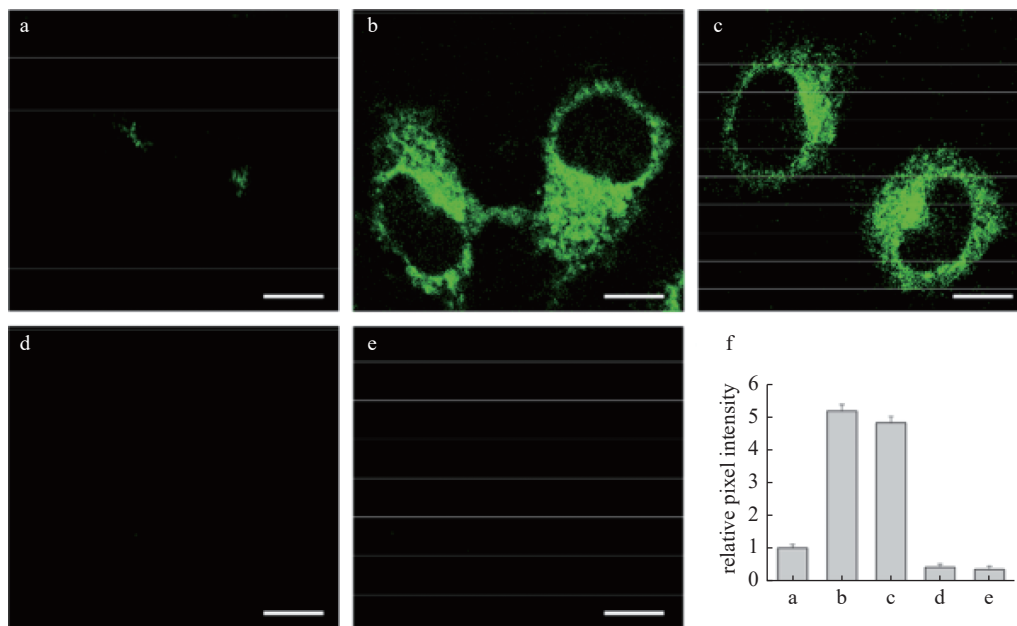
帕金森综合征可能与内质网应激有关. 为了研究这一问题, Yan 等<sup>[53]</sup> 设计了双光子荧光探针 **27**, 可以在帕金森综合征模型中检测内质网中的过氧亚硝酰. 该探针响应时间快, 能在 1 s 内实现对过氧亚硝酰的检测. 该探针使用对甲苯磺酰胺基团作为定位基团, 萘酰亚胺作为双光子荧光基团, 4-氨基-2-甲氧基苯酚作为检测基团. 检测机制为: 苯酚结构具有较强的 PET 性质, 使萘酰亚胺部分荧光猝灭, 当该基团被过氧亚硝酰氧化消去后, 荧光复现, 实现了检测.

基于激发态分子内质子转移(excited-state intramolecular proton transfer, ESIPT)原理, Wu 等<sup>[54]</sup> 设计出另一种可以特异性检测过氧亚硝酰的荧光探针 **28**. 检测机制仍利用了过氧亚硝酰的强氧化性, 可以氧化消

去硼酸酯基使得分子内的 ESIPT 重现. 定位机制利用了 Cl<sup>-</sup>对 K<sup>+</sup>通道的靶向性, 使分子可以锚定于内质网. 该探针为比率型探针, 随着过氧亚硝酰的不断加入, 410 nm 处的荧光强度不断减弱, 480 nm 处的荧光强度不断增强, 实现了比率型的检测. 该探针成功地对外源性/内源性的过氧亚硝酰实现了检测. 共定位实验表明其对内质网具有良好的靶向性.

以对甲苯磺酰胺和邻苯二胺功能化的萘酰亚胺为模板, Li 等<sup>[55]</sup> 设计了探针 **29**. 首先, 萘酰亚胺的荧光被邻苯二胺部分猝灭. 在 NO 和 O<sub>2</sub> 存在的情况下, 邻苯二胺被氧化成三唑结构, 导致 PET 过程被阻断, 荧光强度显著增加. 通过共聚焦显微镜对 HeLa 细胞、小鼠肝脏组织和腿部组织进行共聚焦成像, 表明该探针可以实现内质网中 NO 浓度变化的检测(图 8). 定位基团仍使用了对甲苯磺酰胺.

Peng 等<sup>[56]</sup> 设计的另一种苯基磷修饰的萘酰亚胺双光子荧光探针 **30**, 可以靶向内质网并检测 HNO. 该探针通过修饰对甲苯磺酰胺实现了对内质网的定位. 检测机制为: HNO 作为一个亲电试剂, 可以与探针的猝灭基团发生反应生成氮杂叶立德并脱去, 使萘酰亚胺部分荧光复现. 该探针可以实现 HNO 控制下的荧光 TURN-ON/OFF 转换, 且由于其发射波长在 560 nm



a. 单独使用探针 **29** ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 孵育 20 min; b. DEA·NONOate(NO 释放剂,  $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 与探针 **29** 共同孵育 20 min; c. LPS(脂多糖, 内源性 NO 引发剂,  $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 孵育 12 h 后, 以探针 **29** 孵育 20 min; d. L-MANE(LPS 合成抑制剂,  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 孵育 12 h 后, 以探针 **29** 孵育 20 min; e. AG(氨基胍, NO 合成抑制剂,  $0.5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 孵育 12 h 后, 以探针 **29** 孵育 20 min; f. 图 a~e 的相对强度比. 比例尺:  $10 \mu\text{m}$ .

图 8 荧光探针 **29** 在 HeLa 细胞内一氧化氮检测共聚焦成像

处, 较其他探针穿透性较强.

由于 RNS 寿命短、作用位点不明确, 目前报道的荧光探针并不多. 然而, 其重要的分子生物学地位使得对 RNS 的实时检测十分必要. 如何设计灵敏、快速的 RNS 探针也是值得思考的问题.

### 3 RSS

RSS(包括  $\text{H}_2\text{S}$ 、 $\text{H}_2\text{S}_2$ 、 $\text{H}_2\text{S}_n$  及硫醇等)是一类重要的分子, 在多个生理和病理过程中起着重要的作用. 内质网是细胞内蛋白质最大的合成单位, 而 RSS 的存在容易使蛋白质获得额外的二硫键, 产生错误折叠, 引起内质网应激等过程. RSS 也可以通过自身还原性阻止内质网氧化应激. 因此, 监测内质网中的 RSS, 对研究内质网的生理过程有着重要的意义<sup>[57]</sup>. Yin 等<sup>[58]</sup> 已经对 RSS 的荧光分子检测进行了详细的综述. 在这里只对定位于内质网并检测小分子活性硫物种的荧光探针进行简单的介绍.

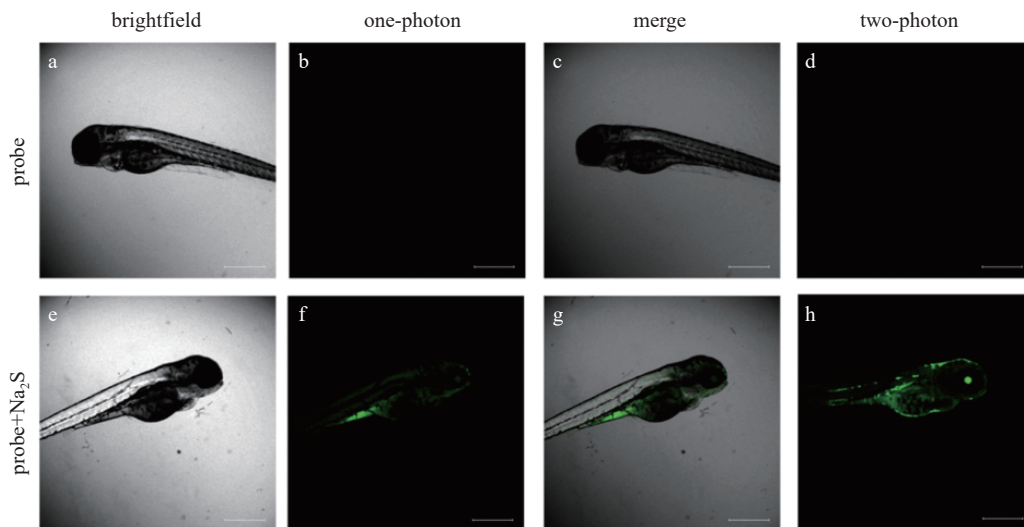
Tang 等<sup>[59]</sup> 合成了可以定位于内质网的  $\text{H}_2\text{S}$  检测探针 **31**, 检测机制利用了 ICT 过程.  $\text{H}_2\text{S}$  是一种强还原剂, 可以将叠氮基还原成氨基——一个好的给电子基团, 进而使整个体系发生 ICT 过程, 荧光增强, 实现检测. 定位基团使用的仍是对甲苯磺酰胺. 在荧光探针分子被还原后,  $540 \text{nm}$  处的荧光信号明显上升. 如图 9 所示, 该探针成功用于检测斑马鱼体外/内源性  $\text{H}_2\text{S}$  的存在.

Zhou 等<sup>[60]</sup> 设计了一种可用于活细胞成像的检测外/内源性  $\text{H}_2\text{S}$  的探针 **32**. 该探针采用对甲苯磺酰胺为定位基团, Rhodol 为荧光基团, 2, 4-二硝基苯磺酸为  $\text{H}_2\text{S}$  检测基团.  $\text{H}_2\text{S}$  可以将检测基团还原消去, 进一步将荧光素内酯环打开, 使得荧光复现, 在  $556 \text{nm}$  处出现荧光. 该探针抗干扰能力强, 在  $0 \sim 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  内具有良好的线性关系, 检测限为  $0.081 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Zhang 等<sup>[61]</sup> 以吡嗪香豆素为荧光基团、NBD 为  $\text{H}_2\text{S}$  识别基团、对甲苯磺酰胺为定位基团, 设计的另一种  $\text{H}_2\text{S}$  探针 **33**, NBD 作为一个强的 PET 基团会使发色团荧光猝灭, 而当  $\text{H}_2\text{S}$  将 NBD 还原消去后荧光复现. 该探针在  $\text{pH}=7$  时荧光效率最好, 在  $0 \sim 80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  下具有良好的线性关系, 检测限为  $4.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Shu<sup>[62]</sup> 设计的近红外比率型荧光探针 **34**, 可对内质网中的  $\text{H}_2\text{S}$  进行检测. 该探针以二氰基异佛尔酮衍生物为荧光基团, 邻羧基苯甲醛为  $\text{H}_2\text{S}$  的特异性识别受体. 由于 ICT 作用, 该探针本身在  $560 \text{nm}$  处具有较弱的荧光, 而当  $\text{H}_2\text{S}$  通过亲核加成将苯甲醛部分还原消去后, 荧光分子产生了较大的斯托克斯位移, 在  $650 \text{nm}$  处产生了强烈的荧光. 该探针检测限为  $39.1 \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 对于其他的生物活性分子具有良好的抗干扰能力. 共定位实验表明该探针靶向内质网.

其他种类的小分子活性硫的检测探针也被相继报道. Zhou 等<sup>[63]</sup> 设计了一种可以靶向内质网并检测  $\text{H}_2\text{S}_2$  的荧光探针 **35**. 萘酰亚胺为双光子荧光基团, 分子内



a. 孵育后的斑马鱼明场图; b. 单光子荧光; c. 图 a、b、d 的合并荧光; d. 双光子荧光; e. 孵育并喂食硫化钠的斑马鱼明场图; f. 喂食硫化钠的斑马鱼单光子荧光; g. 图 e、f、h 的合并荧光; h. 喂食硫化钠斑马鱼的双光子荧光。将斑马鱼与  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的探针 31 共同孵育。

图 9 荧光探针 31 在斑马鱼体内的共聚焦成像

的长直链烷烃可以直接插入并固定在内质网的脂溶性结构中。由于  $\text{H}_2\text{S}_2$  具有非常强的还原性, 可以将荧光基团上的吸电子基团硝基还原为供电子基团氨基, 从而导致分子荧光信号的改变。Anila 等<sup>[64]</sup> 针对多硫化物  $\text{H}_2\text{S}_n$  设计了荧光探针 36。该探针以 BODIPY 为母体, 通过修饰脂溶性苯环实现了对内质网的定位。荧光分子一开始是猝灭的, 当多硫化物接触到探针分子后, 酯键被还原打开, 使得荧光恢复。该探针检测限低至  $26.01 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。此外, Li 等<sup>[65]</sup> 基于 PET 原理, 设计了一种靶向内质网的荧光探针 37, 用以检测硫醇的存在。硫醇可以将识别基团还原, 阻断 PET 效应, 使探针分子荧光复现。定位基团使用的是对甲苯磺酰胺, 当硫醇存在时,  $540 \text{ nm}$  处的荧光大幅增强。该小组用双光子显微镜成功观测到了抑郁型小鼠大脑内质网中硫醇浓度的降低。

## 4 总结与展望

本文介绍了多种靶向内质网并可以检测活性物种的荧光探针, 介绍了其定位机制、检测机制及实际应用。

目前所报道的内质网检测探针定位及检测机制均较为相似, 说明内质网定位检测的荧光探针仍有进一步发展的空间。对内质网实现定位的手段主要有 3 种: 利用对甲苯磺酰胺基团或格列本脲, 对内质网表面的磺酰脲受体的靶向进行定位; 利用内质网的脂溶性环境, 以相似相溶原理构建脂溶性探针进行定位; 利用  $\text{Cl}^-$  对内质网表面的  $\text{K}^+$  通道的靶向进行定位。其中, 由于修饰对甲苯磺酰胺基团相对简便, 已经成

为广泛使用的定位方式。

作为一项重要的检测手段, 荧光探针在医学、药学领域有着广泛的应用。然而, 目前的探针面临着如下几个问题:

1) 水溶性较差。荧光的产生往往需要较大的共轭体系, 导致该类分子水溶性较差, 存在不容易进入细胞、进入细胞后不扩散等问题。通常, 在高浓度孵育下, 探针才能通过扩散作用或者胞吞胞吐进入细胞。而较多的有机溶剂会损伤细胞。有研究人员通过载体实现细胞的进出, 如硅纳米颗粒或者金纳米颗粒等。但这些载体的合成往往非常烦琐, 合成后对探针的装载也很复杂。且由于纳米颗粒表面的电性, 有机小分子可能很难进入空腔内部。因此, 如何解决分子的水溶性差这一问题, 需要进一步研究。由于内质网靶向型的荧光探针分子的定位机制是利用了探针的脂溶性, 因而如何合理地增强水溶性, 又不影响探针的定位效率, 是目前需要解决的一大问题。

2) 细胞毒性较大。由于存在较大的共轭体系, 探针分子在靶向细胞器或者蛋白后, 会对蛋白或细胞的生理过程产生严重的干扰。而较小的共轭体系荧光信号蓝移, 穿透性差, 且由于体积限制无法负载更多功能的识别基团, 导致功能单一化, 失去实用的意义。因此, 发展低毒、高效、高负载的荧光探针是十分必要的。

3) 体内生命环境的差异。目前, 检测生物活性物种大都基于生物活性物种的强氧化还原性。通过对不同修饰基团的氧化还原作用导致荧光 TURN-ON/OFF 或者比率型的变化, 从而实现物种检测。然

而,即使这些荧光探针的循环稳定性很好,细胞中存在的氧化还原性物种仍不能将其完全还原为初始状态.如何在体内实现可逆、动态的监测,或利用其他机制(如电荷密度、配位作用等)实现可逆监测,也是一项值得思考的问题.

**数据共享** 本文在期刊网站上提供全部37种探针数据荧光团、定位/检测基团及功能汇总,数据地址:<http://www.bnjournal.com/article/doi/10.12202/j.0476-0301.2022031>.

## 5 参考文献

- [1] KING A P, WILSON J J. Endoplasmic reticulum stress: an arising target for metal-based anticancer agents[J]. *Chemical Society Reviews*, 2020, 49(22): 8113
- [2] WANG M, KAUFMAN R J. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease[J]. *Nature*, 2016, 529(7586): 326
- [3] LEE J E, CATHEY P I, WU H X, et al. Endoplasmic reticulum contact sites regulate the dynamics of membraneless organelles[J]. *Science*, 2020, 367(6477): eaay7108
- [4] DESHAIES R J. Proteotoxic crisis, the ubiquitin-proteasome system, and cancer therapy[J]. *BMC Biology*, 2014, 12: 94
- [5] SHORE G C, PAPA F R, OAKES S A. Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2011, 23(2): 143
- [6] GONG S H, ZHANG X, LI N, et al. Recent progress of fluorescent nanoprobe for organelle pH detection[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2020, 41(9): 1933
- [7] LIN J H, WALTER P, YEN T S B. Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis[J]. *Annual Review of Pathology-Mechanisms of Disease*, 2008, 3: 399
- [8] KIM I, XU W J, REED J C. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2008, 7(12): 1013
- [9] HOOZEMANS J J M, SCHEPER W. Endoplasmic reticulum: the unfolded protein response is tangled in neurodegeneration[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2012, 44(8): 1295
- [10] KE M T, YUAN J P, ZHANG H, et al. Coordination porous polymers for targeting subcellular organelles: bio-imaging, diagnosis and therapy[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2021, 42(11): 3295
- [11] JIAO X Y, LI Y, NIU J Y, et al. Small-molecule fluorescent probes for imaging and detection of reactive oxygen, nitrogen, and sulfur species in biological systems[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(1): 533
- [12] ZHOU H, LI S S, ZENG X D, et al. Tumor-homing peptide-based NIR-II probes for targeted spontaneous breast tumor imaging[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2020, 31(6): 1382
- [13] ZHANG B X, ZHANG H J, ZHONG M, et al. A novel off-on fluorescent probe for specific detection and imaging of cysteine in live cells and *in vivo*[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2020, 31(1): 133
- [14] TAO X Q, LIAO Z Y, ZHANG Y Q, et al. Aptamer-quantum dots and teicoplanin-gold nanoparticles constructed FRET sensor for sensitive detection of *Staphylococcus aureus*[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2021, 32(2): 791
- [15] XU W, ZENG Z B, JIANG J H, et al. Discerning the chemistry in individual organelles with small-molecule fluorescent probes[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2016, 55(44): 13658
- [16] LI W T, SUN X M, ZHAO X, et al. Rapid pattern recognition of different types of sulphur-containing species as well as serum and bacteria discrimination using Au NCs-Cu<sup>2+</sup> complexes[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2020, 31(9): 2473
- [17] JIANG H, ZHANG X W, LIAO Q L, et al. Electrochemical monitoring of paclitaxel-induced ROS release from mitochondria inside single cells[J]. *Small*, 2019, 15(48): 1901787
- [18] FENG H, ZHANG Z Q, MENG Q T, et al. Rapid response fluorescence probe enabled *in vivo* diagnosis and assessing treatment response of hypochlorous acid-mediated rheumatoid arthritis[J]. *Advanced Science*, 2018, 5(8): 1800397
- [19] ZHANG Y, SHEN C, XING Z R, et al. Benzimidazole-derived fluorescence enhancement probe for visual detection of HClO[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2019, 40(12): 2480
- [20] LI J P, XIA S, ZHANG H, et al. Three-input “AND-Type” fluorescent logic gate as ratio probe for specific imaging of hypochlorite in rough endoplasmic reticulum[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 255: 622
- [21] PAK Y L, PARK S J, SONG G, et al. Endoplasmic reticulum-targeted ratiometric N-heterocyclic carbene borane probe for two-photon microscopic imaging of hypochlorous acid[J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(21): 12937
- [22] HOU J T, KIM H S, DUAN C, et al. A ratiometric fluorescent probe for detecting hypochlorite in the endoplasmic reticulum[J]. *Chemical Communications*,

- 2019, 55(17): 2533
- [23] MA Q J, WANG C Y, MAO G J, et al. An endoplasmic reticulum-targeting and ratiometric fluorescent probe for hypochlorous acid in living cells based on a 1, 8-naphthalimide derivative[J]. *New Journal of Chemistry*, 2020, 44(42): 18389
- [24] ZANG S P, KONG X X, CUI J, et al. Revealing the redox status in endoplasmic reticulum by a selenium fluorescence probe[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2020, 8(13): 2660
- [25] TANG Y J, HE S, GUO X F, et al. A redox reversible endoplasmic reticulum-targeted fluorescent probe for revealing the redox status of living cells[J]. *The Analyst*, 2021, 146(24): 7740
- [26] NIU H W, ZHANG Y R, ZHAO F F, et al. Reductive stress imaging in the endoplasmic reticulum by using living cells and zebrafish[J]. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 2019, 55(65): 9629
- [27] LU Y R, DONG B L, SONG W H, et al. An endoplasmic reticulum-targeting fluorescent probe for the imaging of hypochlorous acid in living cells and zebrafishes[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2019, 384: 111980
- [28] SONG W H, DONG B L, LU Y R, et al. Development of an endoplasmic reticulum-targeting fluorescent probe for the two-photon imaging of hypochlorous acid (HClO) in living cells[J]. *Analytical Methods*, 2019, 11(35): 4450
- [29] WANG S, ZHU B T, WANG B Y, et al. Revealing HOCl burst from endoplasmic reticulum in cisplatin-treated cells via a ratiometric fluorescent probe[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2021, 32(5): 1795
- [30] NING J Y, LIN Z M, ZHAO X, et al. Inhibiting lysine 353 oxidation of GRP78 by a hypochlorous probe targeting endoplasmic reticulum promotes autophagy in cancer cells[J]. *Cell Death & Disease*, 2019, 10: 858
- [31] ZHANG W Y, SONG W H, LIN W Y. A novel ER-targeted two-photon fluorescent probe for monitoring abnormal concentrations of HClO in diabetic mice[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2021, 9(36): 7381
- [32] ZHANG M M, MA Y H, LI P, et al. Detection of atherosclerosis-related hypochlorous acid produced in foam cells with a localized endoplasmic reticulum probe[J]. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 2020, 56(17): 2610
- [33] YANG T T, SUN J Y, YAO W, et al. A two-photon fluorescent probe for turn-on monitoring HOCl level in endoplasmic reticulum[J]. *Dyes and Pigments*, 2020, 180: 108435
- [34] XIA Q N, WANG X Y, LIU Y N, et al. An endoplasmic reticulum-targeted two-photon fluorescent probe for bioimaging of HClO generated during sleep deprivation[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, 229: 117992
- [35] FANG C, ZHU H Y, LIU Y, et al. Synthesis and characterization of nanoparticles with hydrogen peroxide sensitivity, targeting and fluorescence for atherosclerosis[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2018, 39(9): 2071
- [36] WEN Y, HUO F J, YIN C X. Organelle targetable fluorescent probes for hydrogen peroxide[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2019, 30(10): 1834
- [37] NAKAGAWA T, ZHU H, MORISHIMA N, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta[J]. *Nature*, 2000, 403(6765): 98
- [38] GAO C C, TIAN Y, ZHANG R B, et al. Endoplasmic reticulum-directed ratiometric fluorescent probe for quantitative detection of basal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(23): 12945
- [39] XIAO H B, LI P, HU X F, et al. Simultaneous fluorescence imaging of hydrogen peroxide in mitochondria and endoplasmic reticulum during apoptosis[J]. *Chemical Science*, 2016, 7(9): 6153
- [40] LEE J J, YOON S A, CHUN J, et al. A red-emitting styrylnaphthalimide-based fluorescent probe providing a ratiometric signal change for the precise and quantitative detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2019, 1080: 153
- [41] VELUSAMY N, THIRUMALAIIVASAN N, BOBBA K N, et al. FRET-based dual channel fluorescent probe for detecting endogenous/exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>S formation through multicolor images[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2019, 191: 99
- [42] TURRENS J F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species[J]. *The Journal of Physiology*, 2003, 552(2): 335
- [43] XIAO H B, LIU X, WU C C, et al. A new endoplasmic reticulum-targeted two-photon fluorescent probe for imaging of superoxide anion in diabetic mice[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 91: 449
- [44] LU Y R, WANG R F, SUN Y R, et al. Endoplasmic reticulum-specific fluorescent probe for the two-photon imaging of endogenous superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) in live cells and zebrafishes[J]. *Talanta*, 2021, 225: 122020
- [45] TANG Z X, SONG B, ZHANG W Z, et al. Precise monitoring of drug-induced kidney injury using an endoplasmic reticulum-targetable ratiometric time-gated luminescence probe for superoxide anions[J]. *Analytical*

- Chemistry, 2019, 91(21): 14019
- [46] LE H T, JO H R, OH S Y, et al. Endoplasmic reticulum targeting reactive oxygen species sensor based on dihydrofluorescein: application of endoplasmic reticulum stress[J]. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2021, 42(2): 279
- [47] HUANG H, CHEN B Y, LI L F, et al. A two-photon fluorescence probe with endoplasmic reticulum targeting ability for turn-on sensing photosensitized singlet oxygen in living cells and brain tissues[J]. *Talanta*, 2022, 237: 122963
- [48] ZHAO Y Y, LI H Y, CHAI Z Y, et al. An endoplasmic reticulum-targeting fluorescent probe for imaging  $\cdot\text{OH}$  in living cells[J]. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 2020, 56(47): 6344
- [49] GOTOH T, MORI M. Nitric oxide and endoplasmic reticulum stress[J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2006, 26(7): 1439
- [50] TSE J K Y. Gut microbiota, nitric oxide, and microglia as prerequisites for neurodegenerative disorders[J]. *ACS Chemical Neuroscience*, 2017, 8(7): 1438
- [51] ASCENZI P, DI MASI A, SCIORATI C, et al. Peroxynitrite—an ugly biofactor?[J]. *BioFactors*, 2010, 36(4): 264
- [52] ALI F, SREEDHARAN S, ASHOKA A H, et al. A super-resolution probe to monitor HNO levels in the endoplasmic reticulum of cells[J]. *Analytical Chemistry*, 2017, 89(22): 12087
- [53] YAN M, FANG H X, WANG X Q, et al. A two-photon fluorescent probe for visualizing endoplasmic reticulum peroxynitrite in Parkinson's disease models[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2021, 328: 129003
- [54] WU L L, WANG Y, WEBER M, et al. ESIPT-based ratiometric fluorescence probe for the intracellular imaging of peroxynitrite[J]. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 2018, 54(71): 9953
- [55] LI S J, ZHOU D Y, LI Y F, et al. Efficient two-photon fluorescent probe for imaging of nitric oxide during endoplasmic reticulum stress[J]. *ACS Sensors*, 2018, 3(11): 2311
- [56] PENG S X, LI Z P, ZHANG Y R, et al. A two-photon fluorescent probe for HNO rapid visualization in endoplasmic reticulum[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2020, 317: 128211
- [57] YING R, WANG X Q, YANG Y, et al. Hydrogen sulfide suppresses endoplasmic reticulum stress-induced endothelial-to-mesenchymal transition through Src pathway[J]. *Life Sciences*, 2016, 144: 208
- [58] 尹伊颜, 魏娟娟, 那娜. 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[J]. *北京师范大学学报(自然科学版)*, 2021, 57(5): 659
- [59] TANG Y H, XU A, MA Y Y, et al. A turn-on endoplasmic reticulum-targeted two-photon fluorescent probe for hydrogen sulfide and bio-imaging applications in living cells, tissues, and zebrafish[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 12944
- [60] ZHOU L, CHENG Z Q, LI N, et al. A highly sensitive endoplasmic reticulum-targeting fluorescent probe for the imaging of endogenous  $\text{H}_2\text{S}$  in live cells[J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, 240: 118578
- [61] ZHANG H, CHEN J L, XIONG H Q, et al. An endoplasmic reticulum-targetable fluorescent probe for highly selective detection of hydrogen sulfide[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2019, 17(6): 1436
- [62] SHU W, ZANG S P, WANG C, et al. An endoplasmic reticulum-targeted ratiometric fluorescent probe for the sensing of hydrogen sulfide in living cells and zebrafish[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(14): 9982
- [63] ZHOU H, TANG J B, SUN L, et al.  $\text{H}_2\text{S}_2$ -triggered off-on fluorescent indicator with endoplasmic reticulum targeting for imaging in cells and zebrafishes[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2019, 278: 64
- [64] ANILA H A, SREEDHARAN S, ALI F, et al. Polysulfide-triggered fluorescent indicator suitable for super-resolution microscopy and application in imaging[J]. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 2018, 54(30): 3735
- [65] LI P, SHI X H, XIAO H B, et al. Two-photon imaging of the endoplasmic reticulum thiol flux in the brains of mice with depression phenotypes[J]. *The Analyst*, 2018, 144(1): 191

## Endoplasmic reticulum-targeted probes for biomolecules

ZHANG Shengxi NA Na

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

**Abstract** The endoplasmic reticulum (ER) is an important organelle in eukaryotic cells involved in a variety of physiological processes. Endoplasmic reticulum stress often leads to the generation of biologically active molecules, to regulate physiological activities in different cell types, with implications for cancer and non-malignant lesions. Bioactive species such as reactive oxygen, nitrogen and sulfur species tend to have high redox and biological activities, and are involved in pathological processes. Fluorescent probes for these biologically active species often offer excellent optical properties, outstanding positioning, and are good for multi-functional real-time *in situ* monitoring. Monitoring of active species in the ER by fluorescence imaging has great potential in metabolic diseases and cancer. Fluorescent probes targeted to ER developed in recent years are summarized in this review.

**Keywords** endoplasmic reticulum (ER); fluorescent probe; reactive oxygen species (ROS); reactive nitrogen species (RNS); reactive sulfur species (RSS)

【责任编辑:武 佳】

表1 内质网探针汇总

探针	荧光基团	定位基团/机制	探针功能	文献
1	氨基萘衍生物	内质网的脂溶性	检测ClO <sup>-</sup>	[20]
2	萘咪唑衍生物	内质网的脂溶性	检测HClO	[21]
3	香豆素	对甲苯磺酰胺	检测ClO <sup>-</sup>	[22]
4	萘酰亚胺	对甲苯磺酰胺	检测HClO	[23]
5	萘酰亚胺	对甲苯磺酰胺	检测细胞的氧化还原状态	[24]
6	萘酰亚胺	对甲苯磺酰胺	检测细胞的氧化还原状态	[25]
7	香豆素/吡啶衍生物	内质网的脂溶性	检测还原性物种与HClO	[26]
8	萘酰亚胺	对甲苯磺酰胺	检测HClO	[27]
9	萘酰亚胺	对甲苯磺酰胺	检测HClO	[28]
10	吩噻嗪香豆素衍生物	对甲苯磺酰胺	检测HClO	[29]
11	苯并咪唑-半花菁	内质网的脂溶性	检测HClO并诱导癌细胞凋亡	[30]
12	Rhodol	对甲苯磺酰胺	检测糖尿病细胞中的HClO	[31]
13	萘酰亚胺	内质网的脂溶性	检测ClO <sup>-</sup>	[32]
14	萘酰亚胺	对甲苯磺酰胺	检测HClO	[33]
15	萘酰亚胺	对甲苯磺酰胺	检测睡眠缺失斑马鱼的HClO	[34]
16	萘酰亚胺	内质网脂溶性	检测H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[38]
17	萘酰亚胺	对甲苯磺酰胺	检测H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[39]
18	萘酰亚胺	内质网的脂溶性	检测H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[40]
19	香豆素/萘酰亚胺	内质网的脂溶性	双通道检测H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> S	[41]
20	萘酰亚胺	对甲苯磺酰胺	检测超氧阴离子	[43]
21	Rhodol	对甲苯磺酰胺	检测超氧阴离子	[44]
22	钕系金属配合物	对甲苯磺酰胺	检测超氧阴离子	[45]
23	二氢荧光素	格列本脲	检测活性氧	[46]
24	萘酰亚胺	对甲苯磺酰胺	检测单线态氧	[47]
25	宾夕法尼亚绿/香豆素	宾夕法尼亚绿	检测羟基自由基	[48]
26	BODIPY	内质网的脂溶性	检测HNO	[52]
27	萘酰亚胺	对甲苯磺酰胺	检测过氧亚硝酰	[53]
28	苯并噻唑	氯靶向钾离子通道	检测过氧亚硝酰	[54]
29	萘酰亚胺	对甲苯磺酰胺	检测一氧化氮	[55]
30	萘酰亚胺	对甲苯磺酰胺	检测HNO	[56]
31	萘酰亚胺	对甲苯磺酰胺	检测H <sub>2</sub> S	[59]
32	Rhodol	对甲苯磺酰胺	检测H <sub>2</sub> S	[60]
33	香豆素	对甲苯磺酰胺	检测H <sub>2</sub> S	[61]
34	二氧异佛尔酮衍生物	内质网的脂溶性	检测H <sub>2</sub> S	[62]
35	萘酰亚胺	内质网的脂溶性	检测多硫化物	[63]
36	BODIPY	内质网的脂溶性	检测多硫化物	[64]
37	萘酰亚胺	对甲苯磺酰胺	检测硫醇	[65]