

检测硫化氢分子的荧光探针*

高敏^{1,2†} 于法标^{1†} 陈令新^{1**}

(1. 中国科学院海岸带环境过程与生态修复重点实验室 山东省海岸带环境工程技术研究中心 中国科学院烟台海岸带研究所 烟台 264003; 2. 曲阜师范大学化学与化工学院 曲阜 273165)

摘要 硫化氢(H_2S)是继一氧化碳和一氧化氮之后,第三种可在生命体内发挥生理作用的内源性气体信号分子。该气体分子在心血管和神经系统中担负着重要的生理病理调节作用。因此,选择性识别和高灵敏检测生物体内的 H_2S 具有十分重要的生物学意义。在生物检测技术手段中,荧光探针法具有选择性好、灵敏度高、对生物样品损伤小以及可实现实时原位检测等独特的优势,故应用荧光探针法检测细胞内 H_2S 浓度的变化是近年来研究热点之一。本文依据荧光探针与 H_2S 之间的化学反应类型,将近三年来所研发的 H_2S 荧光探针按照其母体荧光团进行分类和总结,综述了 H_2S 荧光探针的研究进展,概述了相关荧光探针的设计理念、检测机理及生物应用,探讨了探针的结构和性能之间的关系,最后展望了 H_2S 荧光探针的发展趋势和应用前景。

关键词 硫化氢 荧光探针 活性硫物种 气体递质 可视化检测

中图分类号: O656; TP212.2 文献标识码: A 文章编号: 1005-281X(2014)06-1065-14

Fluorescent Probes for Hydrogen Sulfide Detection*

Gao Min^{1,2†} Yu Fabiao^{1†} Chen Lingxin^{1**}

(1. Key Laboratory of Coastal Environmental Processes and Ecological Remediation, The Research Center for Coastal Environmental Engineering and Technology of Shandong Province, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China; 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Qufu Normal University, Qufu 273165, China)

Abstract Following carbon monoxide and nitric oxide, hydrogen sulfide (H_2S) is found to be the third endogenous gasotransmitter, which provides the regulation significance of physiological and pathological processes in the cardiovascular and nervous systems. Therefore, the selective recognition and detection of H_2S are of importance. Fluorescent probe method, among biological detection technologies, is an indispensable technique for the biological species analysis, and that is highlighted by its good selectivity, high sensitivity, noninvasive detection, and real-time monitoring *in situ*. Recently, the development of fluorescent probes for intracellular H_2S detection has been becoming one of the hot topics. Herein, the progress during the last three years of fluorescent molecular probes based on the small molecules for H_2S detection are reviewed. These fluorescent probes are classified and concluded according to the different types of chemical reaction with H_2S , and then arranged specifically by the fluorophores in different type. The design concepts of molecular structures,

收稿: 2013年11月,收修改稿: 2014年1月,网络出版: 2014年5月25日

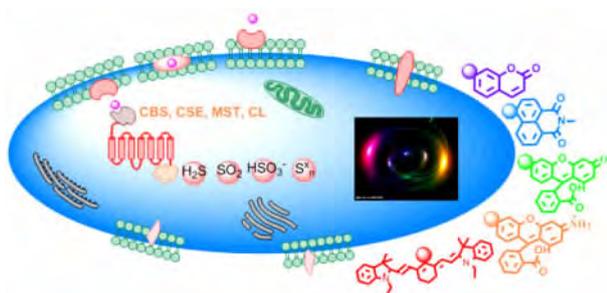
* 国家自然科学基金项目(No. 21275158)、中国科学院重要方向性项目(No. KZCX2-EW-206)和中国科学院“百人计划”择优支持项目资助
The work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21275158), the Innovation Projects of the Chinese Academy of Sciences (No. KZCX2-EW-206), and the 100 Talents Program of the Chinese Academy of Sciences

** Corresponding author e-mail: lxchen@yic.ac.cn

† These authors contributed equally to this work

detection mechanism and biological applications of these probes are introduced. In addition, the relationship between molecular structures and properties while testing are elucidated. Finally, the challenge and application prospects for the development of hydrogen sulfide fluorescent probes are also discussed.

Key words hydrogen sulfide; fluorescent molecular probe; reactive sulfur species; gasotransmitter; visual detection



The fluorescent probes for H₂S during the last three years

Contents

- 1 Introduction
- 2 Chemical strategies to design H₂S fluorescent probes
 - 2.1 Detection of H₂S via reduction reactions
 - 2.2 Detection of H₂S via nucleophilic addition reactions
 - 2.3 Detection of H₂S via copper-sulfide precipitation
 - 2.4 Detection of H₂S via thiolysis reactions
 - 2.5 Detection of H₂S via redox reactions
- 3 Fluorescent probes based on the reduction reaction
 - 3.1 H₂S probes employ coumarin dyes as fluorophore
 - 3.2 H₂S probes employ naphthalimide dyes as fluorophore
 - 3.3 H₂S probes employ rhodamine dyes as fluorophore
 - 3.4 H₂S probes employ near-infrared fluorescent (including two-photon) dyes as fluorophore
 - 3.5 H₂S probes employ other dyes as fluorophore
- 4 Fluorescent probes based on the nucleophilic addition
 - 4.1 H₂S probes employ BODIPY dyes as fluorophore
 - 4.2 H₂S probes employ fluorescein dyes as fluorophore
 - 4.3 H₂S probes employ benzothiazole dyes as fluorophore
 - 4.4 H₂S probes employ cyanine dyes as fluorophore
 - 4.5 H₂S probes employ other dyes as fluorophore
- 5 Fluorescent probes based on the Cu-S precipitation

- 5.1 H₂S probes employ fluorescein dyes as fluorophore
- 5.2 H₂S probes employ cyanine dyes as fluorophore
- 5.3 H₂S probes employ other dyes as fluorophore
- 6 Fluorescent probes based on the thiolysis reaction
- 7 Fluorescent probes based on mimics selenium enzyme
- 8 Fluorescent probes for other active sulfur species
 - 8.1 Fluorescent probes for bisulfite anion
 - 8.2 Fluorescent probes for sulfane sulfurs
- 9 Conclusion

1 引言

几个世纪以来,硫化氢(H₂S)对环境的毒性污染已得到了人们深入的研究。然而,最近关于生理内源性H₂S的研究工作都致力于其对若干生理功能的调控^[1]。H₂S这个具有特殊气味的气体,继一氧化氮和一氧化碳之后被证实为第三个内源性气体信号分子。内源性的H₂S主要来自于L-半胱氨酸的酶解作用,其生成机制至少与4种不同的酶有关:胱硫醚-β-合成酶(CBS)、胱硫醚-γ-裂解酶(CSE)、3-巯基丙酮酸硫转移酶(3-MST)和半胱氨酸酶(CL)^[2~5]。这些酶广泛的存在于人体各种组织和器官中。例如,CSE主要存在于心血管组织中,而CBS主要存在于神经系统中。在线粒体内则以巯基丙酮酸为底物,由3-MST作用产生H₂S^[6~11]。H₂S生成的次要途径是通过非酶产生,如在糖的氧化过程中由元素硫生成硫化氢。H₂S生理相关浓度的范围从纳摩尔级到毫摩尔级水平不等。在生理浓度水平下,H₂S参与一系列的生理调控过程,例如调节血管张力、心肌收缩、神经传导和胰岛素分泌等^[12,13]。细胞一旦不能维持其正常的H₂S浓度,便会引起动脉和肺动脉高压、阿尔茨海默氏症、胃粘膜损伤和肝硬化等疾病^[14]。此外,H₂S也可清除活性氧和活性氮物种。许多研究还表明三个气体递质硫化氢、一氧化氮和一氧化碳之间还通过各种交互作用调控着人体的健康与疾病^[15]。

目前,像比色法^[16~18],电化学分析^[19,20],色谱

分析^[21, 22]和金属硫化物沉淀^[23]等方法都可用来测量血浆和匀浆组织中的硫化氢浓度,但是这些方法往往需要试样预处理,例如组织匀浆和细胞破碎。荧光探针检测法因其具有高灵敏度以及在活细胞或组织中可直接检测等优点已经成为分析各种生理活性物种重要的检测手段。在生物体系中,荧光探针能够对被分析物进行高时空分辨的快速检测,并且对生物样品几乎不会产生破坏作用。因此,用于生物体系的荧光检测技术有着较好的发展潜力。应生物体系中 H_2S 浓度水平检测的要求,设计选择性好、灵敏度高、具有低细胞毒性的用于检测活细胞和组织内 H_2S 水平变化的荧光探针,已成为生物医学发展中具有挑战性的前沿课题之一。

近年来, H_2S 荧光探针在设计、作用机制和生物应用等方面取得了井喷式发展^[24, 25], 本文将从一个全新的角度,根据荧光探针与 H_2S 之间的化学反应类型,将近三年来所开发的 H_2S 荧光探针按照其母体荧光团进行分类和总结,综述了 H_2S 荧光探针的研究进展,着重概述各相关荧光探针的设计理念、检测机理及其生物应用,同时探讨了探针的结构和性能之间的关系。

2 设计硫化氢探针的主要化学反应

2.1 硫化氢的还原反应

H_2S 可将叠氮、羟胺和硝基等基团还原成氨基,这些取代基有着不同的供吸电子能力。调控荧光团上的各种取代基的供吸电子能力可以影响到探针分子的电子密度布局,从而达到设计荧光探针的目的(图1)。例如,控制荧光团上不同基团的供吸电子能力,将引起由分子内部电荷转移(internal charge transfer, ICT)机理诱导的荧光最大发射波长的蓝移或红移^[26, 27]。典型的 ICT 荧光分子探针是在荧光团上分别连接强推电子基和吸电子基,构成一个强推拉电子体系,其中荧光团与推电子基(EDG)和吸电子基(EWG)共轭相连。依托该机理可设计用于细胞内 H_2S 检测的比率型荧光探针。又如荧光团上非共轭连接的基团若为强的供吸电子基团,则可利用光诱导电子转移(photoinduced electron transfer, PET)机理来设计荧光分子探针。典型的 PET 荧光分子探针是由含电子供体的识别基团通过桥键和荧光团相连而构成。该类探针设计原理明确,所得的荧光现象为猝灭或者增强^[28]。

2.2 硫化氢的亲核加成反应

在荧光分子探针的设计方法中,基于亲核加成

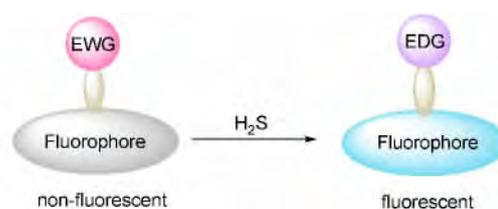


图1 利用硫化氢还原反应的荧光探针

Fig. 1 The fluorescent probes based on the reduction reaction of hydrogen sulfide

反应的荧光探针有着强大的吸引力。 H_2S 拥有独特的双重亲核加成反应特性,其可与探针发生两次加成后触发荧光生成。此加成反应一般是增强了探针分子 π 共轭体系的延伸程度或者抑制了探针分子的 PET 过程,通常会改变其荧光发射波长和荧光量子产率。而细胞中其他亲核硫醇,如谷胱甘肽和半胱氨酸,则不能发生二次亲核加成反应,因此,不会对检测造成干扰。目前所设计的探针分子多采用芳香环上的邻位分别由 α, β -不饱和丙烯酸酯和醛基($-CHO$)所取代。醛基可以与 H_2S 发生可逆的亲核反应,形成一个具有裸露巯基的硫代半缩醛中间体,该中间体可与 α, β -不饱和丙烯酸酯发生迈克尔加成反应,生成硫代缩醛。而其他硫醇则不能实现随后的迈克尔加成步骤,从而不会显著干扰 H_2S 的检测(图2)。

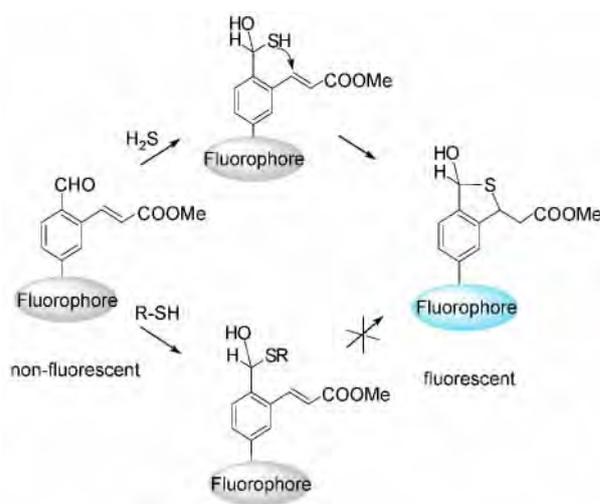


图2 利用硫化氢亲核加成反应的荧光探针

Fig. 2 The fluorescent probes based on the nucleophilic addition reaction of hydrogen sulfide

2.3 金属硫化物的沉淀反应

该类探针设计的原则基于软硬酸碱规则。当荧光团引入一个 $Cu(II)$ 络合基团后,顺磁性的 $Cu(II)$ 金属中心可以有效地猝灭荧光团的荧光。根

据软硬酸碱规则, 硫离子对 $\text{Cu}(\text{II})$ 有着强的亲和力。当加入硫化氢后, 硫离子结合 $\text{Cu}(\text{II})$ 形成不溶性的 CuS 沉淀, 相应的荧光分子又会重新发射出荧光(图3)。

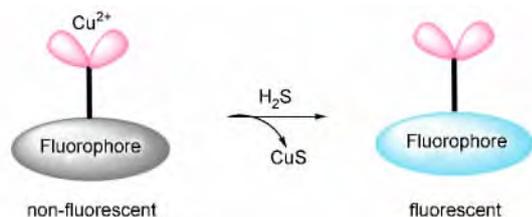


图3 利用 CuS 沉淀反应的荧光探针

Fig. 3 The fluorescent probes based on the CuS precipitation reaction

2.4 间二硝基苯醚硫解反应

间二硝基苯醚在肽链合成中常用于保护酪氨酸。在弱碱性条件下, 使用硫醇作为硫解剂可以去除该保护基团。 H_2S 是一个小的气体分子, 其 $\text{p}K_{\text{a}1}$ 约为 6.9, 而细胞内其他硫醇(如谷胱甘肽、半胱氨酸)具有较高的 $\text{p}K_{\text{a}}$ 值(约为 8.5)。该类探针的设计原则是基于硫醇分子大小和 $\text{p}K_{\text{a}}$ 值的显著区别, 因此在生理 pH 值范围内, 该硫解反应可以选择性检测硫化氢(图4)。

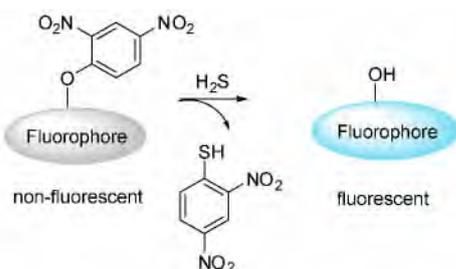


图4 利用间二硝基苯醚硫解反应的荧光探针

Fig. 4 The fluorescent probes based on the thiolysis reaction of dinitrophenyl ether

2.5 模拟硒酶氧化还原反应

硒(Se)作为谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)的活性位点, 在细胞抗氧化防御系统中起着重要的作用。GPx可以通过一个独特的酶乒乓机制(ping-pong mechanism)催化生物硫醇清除活性氧物种^[29]。该类探针依据处于氧化和还原态的含硒基团可调控荧光团荧光的改变以及硫醇分子的还原速率来选择性地检测硫化氢(图5)。

3 基于硫化氢还原反应的荧光探针

按照荧光团的不同种类, 基于叠氮、羟胺和硝基

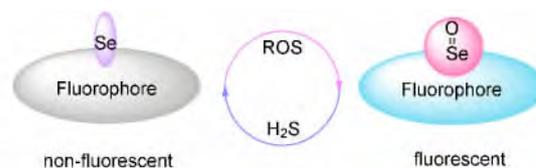


图5 模拟硒酶氧化还原反应的荧光探针

Fig. 5 The fluorescent probes based on the oxidation-reduction reaction of mimics selenium enzyme

等基团还原成胺所设计的 H_2S 荧光分子探针大致可分为: 香豆素染料类、萘酰亚胺染料类、罗丹明染料类和近红外区(含双光子)染料类等。

3.1 以香豆素为荧光团的硫化氢探针

香豆素类荧光团具有荧光量子产率高、斯托克斯位移大和光稳定性好等优点。Han等^[30]设计合成了探针 AzMB-coumarin, H_2S 还原叠氮基团原位生成氨基后, 探针分子内发生酰胺化反应同时游离出高量子产率的 7-羟基-4-甲基香豆素。该探针在活性氧、活性氮物种以及生物硫醇的共存下对 H_2S 的选择性良好。在乙腈溶液中, 该探针可以检测到 $10 \mu\text{M}$ 的硫化氢。另外, 该探针还可以检测 HeLa 细胞中外源的 H_2S 。

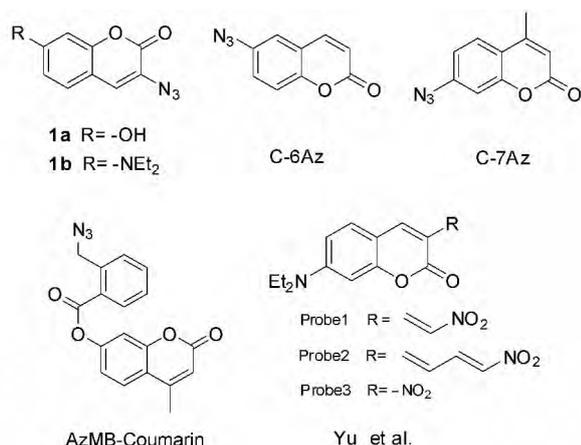
Tang等^[31]报道了性质相对稳定, 易于合成的 H_2S 荧光探针 C-6Az 和 C-7Az。其中探针 C-6Az 对 H_2S 的响应速度慢、灵敏度低, 而探针 C-7Az 的灵敏度高、选择性好。探针 C-7Az 的荧光性质对 PBS 缓冲液 pH 稳定。该探针对于 H_2S 的荧光响应远超过其他活性硫物种、活性氮、活性氧物种和阴离子。利用双光子激光扫描荧光显微镜, 该探针被成功地用于正常和动脉粥样硬化的大鼠心脏组织中 H_2S 的检测及 PBS 缓冲液和胎牛血清中 H_2S 浓度的检测。

Li等^[32]报道了两个以香豆素为荧光团的探针, 1a 和 1b。与探针 1a 相比, 探针 1b 对 H_2S 选择性和灵敏度高, 既可用于检测兔血浆中 H_2S 也可实现在 PC-3 细胞中 H_2S 的实时荧光成像。

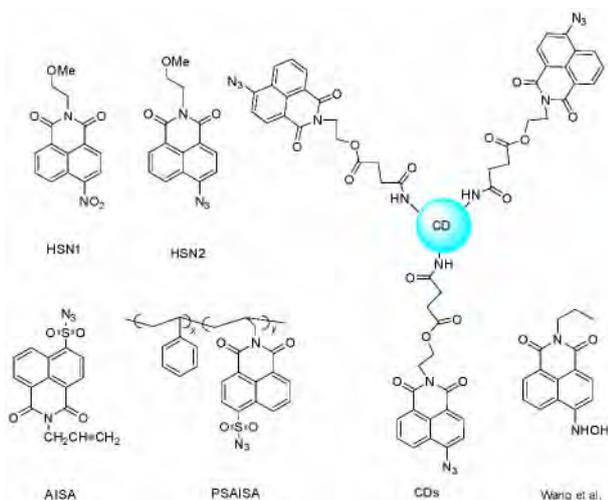
Li 和 Yu 等^[33]报道了一种基于 ICT 机理检测硫化氢的比色和比率荧光探针 Yu et al. Probe 1~3, 该探针对于 H_2S 具有优异的选择性, 超过其他的活性硫、活性氧和活性氮物种。该探针用于 H_2S 测定的检测限为 $2.5 \mu\text{M}$ 。

3.2 以萘酰亚胺为荧光团的硫化氢探针

萘酰亚胺荧光团具有光化学性质稳定、激发及发射波长较长、斯托克斯位移大和其荧光性质对 pH 不敏感等优点, 已被广泛应用于设计各种荧光分子探针。Pluth等^[34]利用该荧光团设计合成了 H_2S 荧



光探针 HSN1 和 HSN2。探针 HSN1 含有能被 H₂S 还原的硝基基团,同时该基团也能被半胱氨酸和谷胱甘肽还原,并且该探针对于 H₂S 的响应时间较长。探针 HSN2 经 H₂S 选择性还原叠氮基团到氨基后可发出强烈的荧光。该探针在半胱氨酸、谷胱甘肽生物硫醇、活性氮和活性氧物种的存在下对 H₂S 有着良好的选择性。探针 HSN2 用于检测 HeLa 细胞中 H₂S 时有着良好的信噪比。



基于荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 机理, Wu 和 Zeng 等^[35] 设计合成了基于碳纳米量子点和萘酰亚胺衍生物的比率荧光探针 CDs。其中碳量子点作为能量供体和连接探针的作用点,叠氮萘酰亚胺基团作为能量受体和荧光响应 H₂S 的部分。通过调控碳量子点的发射波长接近萘酰亚胺荧光团的激发波长,使得 FRET 体系中供体和受体之间的能量更精确匹配以提高检测精度。该探针对于 H₂S 的检出限为 10 nM。由于碳纳米量子点优良的水溶性、生物兼容性、细胞膜的通透性以及尺寸小的性质,该探针可以很容易地透过细胞膜并实现 HeLa 和 L929 细胞中 H₂S 的荧光成像。

化学进展, 2014, 26(6): 1065 ~ 1078

Wang 等^[36] 报道了一种基于分子内部电荷转移 (ICT) 机理的 H₂S 荧光探针 (Wang et al), 该探针充分利用 H₂S 的还原性质, 将弱荧光的羟胺-萘酰亚胺还原成强荧光的氨基-萘酰亚胺。该探针对于 H₂S 具有高选择性和灵敏度。其检测限为 0.5 μM, 能够检测到亚微摩尔范围内的 H₂S, 已用于 astrocyte 细胞中 H₂S 成像。Wu 等^[37] 合成了一种能够选择性响应 H₂S 的功能性单体 AISA 及其共聚物 PSAISA, 与 H₂S 反应后, PSAISA 从无色变为亮黄色, 该探针在 HeLa 细胞中实现了成像。

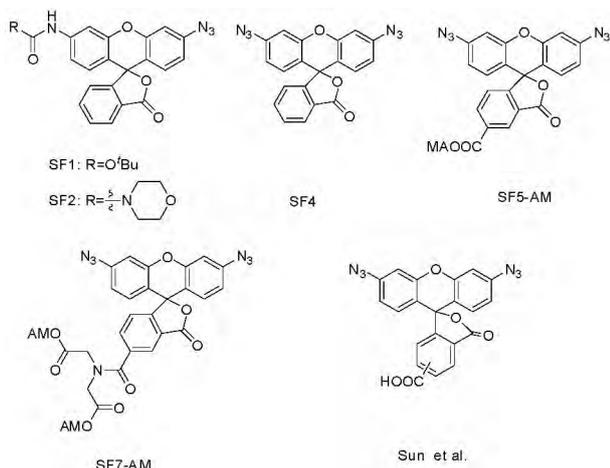
3.3 以罗丹明为荧光团的硫化氢探针

罗丹明类荧光染料有着摩尔消光系数高、光稳定性好、荧光量子产率高、较长的激发波长和发射波长等优异的光物理和光化学性能, 现已成为制备荧光探针的理想荧光团之一。Chang 等^[38] 率先报道了用于 H₂S 检测的荧光探针 SF1 和 SF2。由于叠氮基团的作用, 封闭内酯结构的探针分子是没有荧光的, 随着 H₂S 选择性的将叠氮基团还原成氨基, 探针内酯结构开环而发射出荧光。这两种探针可对 HEK293T 细胞中外源的 H₂S 产生荧光响应。然而, 它们也有一些不足。首先, 体内 H₂S 可被迅速代谢, 而探针对 H₂S 的荧光饱和响应需要一个小时左右, 所以该探针很难用于实时检测体内 H₂S; 其次, 响应时间较长导致了其他活性物种也参与到与叠氮基团的反应, 探针的选择性欠佳; 再者, 探针 SF1 和 SF2 检出限分别为 5 和 10 μM, 很难用于检出内源性 H₂S 的变化。时隔不久, 该团队^[39] 改进了该类荧光分子探针, 合成了探针 SF4、SF5-AM 和 SF7-AM。优化的探针有着较高的灵敏度和较好的选择性。特别值得注意的是探针 SF7-AM, 该探针能够用于直接、实时监测被血管内皮生长因子刺激的人脐静脉内皮细胞产生的内源性 H₂S 浓度的变化。实验结果表明, 内源性 H₂S 的产生依赖于血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR2) 和 CSE。该研究组还发现内源性 H₂S 的产生依赖于 NADPH 氧化酶所产生的过氧化氢浓度。Sun 等^[40] 也开发出一种在生理 pH 缓冲液中检测 H₂S 的荧光探针 (Sun et al.)。在其他生物相关物种存在下探针对 H₂S 具有高度选择性, 检出限为 1.12 × 10⁻⁷ M, 另外, 探针可在 HeLa 细胞内进行 H₂S 成像。

3.4 以近红外区荧光类 (含双光子) 染料为荧光团的硫化氢探针

近红外荧光分子探针的激发发射波长一般位于 650 ~ 900 nm, 此区域光子具有较小的辐射能, 可减

• 1069 •



小光对细胞和生物活体样本的损伤,并且近红外区域的光能穿透到较深的活体组织中,可以实现在活体动物体内的成像分析。此外在该波长范围内生物分子自身荧光较弱,可避免生物背景干扰,同时最大限度地减少血红蛋白和肌红蛋白中的血红素、水和脂类的吸收而获得较高的信噪比。因此,近红外荧光分子探针的这些优点都是位于紫外-可见光区的荧光分子探针所无法比拟的。因双光子荧光探针的激发往往位于近红外光区,故而本文将用于检测硫化氢的双光子荧光探针也归结到近红外荧光分子探针类。常用的近红外荧光团是菁染料,此类荧光团具有较大的摩尔消光系数、易于合成和纯化以及适当的荧光量子产率等优点,已经被广泛应用于许多领域。

荧光信号很容易为环境因素所扰动,在生理条件下单一的荧光发射增加或者减小对精确的分析检测有时会产生较大的影响。比率型荧光探针采用两种不同波长处荧光强度的比值,这在一定程度上能够修正探针受到环境影响时所产生的误差。Han等^[41]设计合成了一个基于分子内电荷转移(ICT)机理的比率型荧光探针Cy-N₃。当探针Cy-N₃与H₂S反应后,处于七甲川花菁中位的吸电性的叠氮基团被还原成供电性的氨基。该荧光探针借助比率荧光强度能选择性地检测了水溶液、牛血清中的H₂S。该探针可用来监测H₂S药物ADT-OH释放H₂S的过程。利用激光共聚焦扫描显微镜比率成像,探针Cy-N₃完成了RAW264.7细胞内氧化胁迫、正常培养和H₂S孵育条件下的不同水平的H₂S浓度的检测。该探针的检测限为0.08 μM。

Xu等^[42]和Peng等^[43]同时报道了一种基于叠氮还原反应的近红外荧光探针(Peng et al.),在阴离子和含硫化物样品存在下探针对H₂S具有较高的选择性。该探针实现了牛血清白蛋白、MCF-7细

胞、HUVEC、生物组织如新鲜的大鼠肝癌切片和ICR活体小鼠内H₂S的荧光成像。

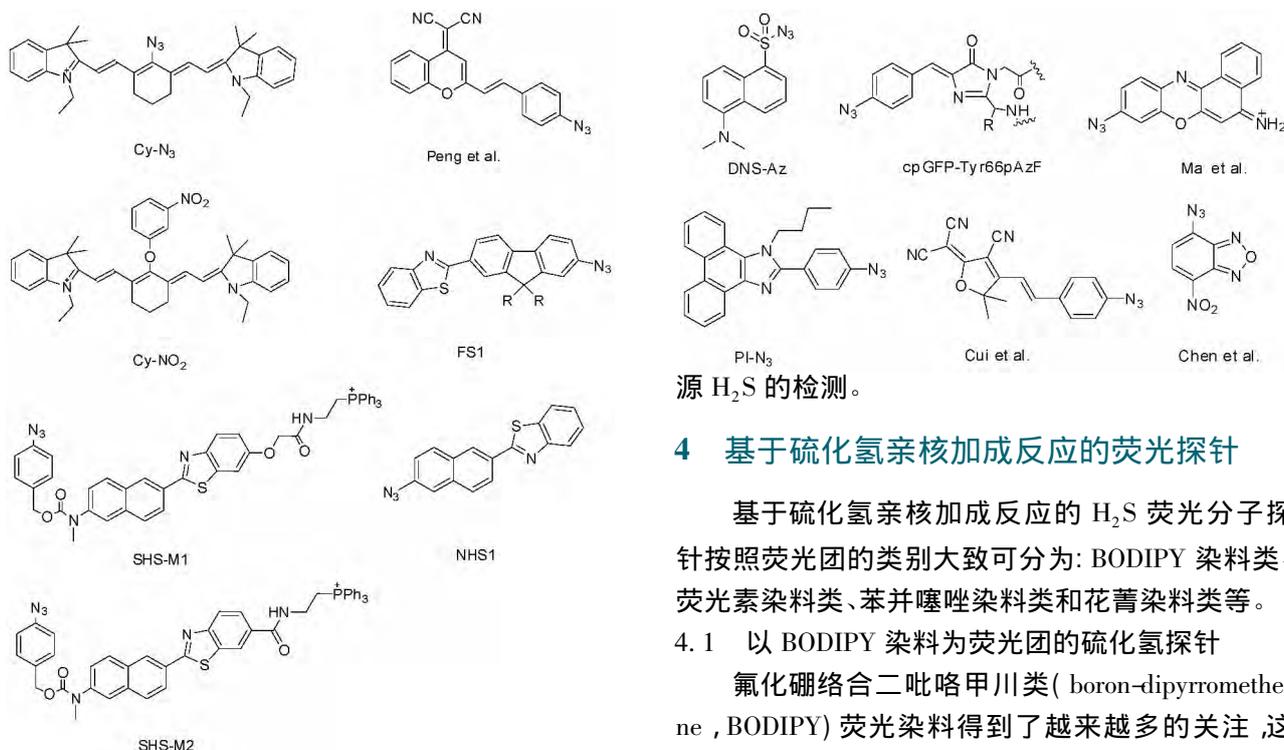
Chen等^[44]基于光诱导电子转移(PET)机理设计合成了一种用于检测细胞内H₂S的近红外荧光探针Cy-NO₂。该探针以七甲川花菁为荧光团,在荧光团中位引入间硝基苯酚作为H₂S响应基元。该探针在水溶液和活细胞中对H₂S表现出较高的选择性和灵敏度。在实验过程中发现Cy-NO₂和H₂S之间的反应速率可受到反应温度的影响,这一现象可给其他常温反应速率较慢的探针以启发。该探针可对缓冲溶液和胎牛血清样品中H₂S浓度线性响应。利用共聚焦显微镜该探针可以检测RAW264.7细胞中外源H₂S浓度水平的变化。

双光子显微镜采用两个近红外光的光子作为激发光源,具有较大的生物组织穿透深度(>500 μm)和较长的实验观察时间等优点。Cho等^[45]报道了以苯并噻唑为荧光团的双光子探针FS1,该探针对H₂S响应时其双光子激发所发射的荧光强度可增加21倍。该探针可以用于深层组织成像,在大鼠海马切片90~190 μm处选择性地检测了H₂S。此外,该团队^[46]又开发了另外两种双光子比率探针SHS-M1和SHS-M2用于检测线粒体中的H₂S。在生理pH值范围内,探针SHS-M2具有高耐光性和低细胞毒性等良好的性能。使用双光子显微镜探针SHS-M2可比率检测星形胶质细胞和活体小鼠脑切片中的H₂S。实验结果表明H₂S含量的减少可能会增加患帕金森病的风险。

Tan和Zhang等^[47]报道了一种新的检测H₂S的双光子生物成像探针NHS1,H₂S的检出限为20 nM。在活性氧、活性氮和其他与生物相关的离子存在下探针对H₂S选择性较高。探针显示出非常低的背景荧光,已成功应用于HeLa细胞中H₂S成像。

3.5 以其他染料为荧光团的硫化氢探针

丹磺酰胺是一种常用的荧光团,其量子产率高,荧光发射波长长。Wang等^[48]设计合成了一种基于丹磺酰胺为荧光团的H₂S探针DNS-Az。该探针可检测水溶液、血清和小鼠全血中的H₂S。在缓冲液中该探针的检出限为1 μM。生物体系中H₂S浓度是快速变化的,探针DNS-Az可快速响应瞬态变化的H₂S,而无需样品预处理。在含有30 μM H₂S的牛血清中,该探针可于几秒钟内就产生荧光响应。将该探针应用于C57BL6/J小鼠血液中H₂S浓度的检测结果为(31.9 ± 9.4) μM。



源 H₂S 的检测。

4 基于硫化氢亲核加成反应的荧光探针

基于硫化氢亲核加成反应的 H₂S 荧光分子探针按照荧光团的类别大致可分为: BODIPY 染料类、荧光素染料类、苯并噻唑染料类和花菁染料类等。

4.1 以 BODIPY 染料为荧光团的硫化氢探针

氟化硼络合二吡咯甲川类 (boron-dipyrromethene, BODIPY) 荧光染料得到了越来越多的关注, 这得益于其自身优异的理化性能: 较高的荧光量子产率和摩尔吸光系数; 良好的光稳定性; 不易受到溶剂极性和 pH 值的影响; 较窄的染料荧光光谱峰宽; 较高的光热及化学稳定性; 较小的分子质量与较低的细胞毒性; 易于调节最大吸收与发射波长以及易于进行化学修饰等。Qian 等^[54,55] 主要以 BODIPY 染料为荧光母体设计合成了选择性检测 H₂S 的荧光探针 SFP-1、SFP-2 和 SFP-3。探针可与 H₂S 发生迈克尔加成反应触发与 H₂S 的选择性反应。SFP-2 与 H₂S 反应后其荧光强度可增加 13 倍, 该探针的荧光性质适合其应用于活细胞成像研究。探针 SFP-3 可检测牛血浆中的 H₂S, 荧光响应迅速、线性关系良好, 已成功应用于测量 C57BL6/J 小鼠血浆和脑组织中 H₂S 的浓度。采用类似的方法, Li 和 Hu 等^[56] 报道了一种基于 ICT 机理检测 H₂S 的荧光开启型探针 ZS1。探针的设计也是利用 H₂S 双重亲核性质, 可检测 RAW264.7 细胞中内源性产生的 H₂S。在其他的硫醇和氨基酸存在下探针对 H₂S 的选择性较高。

4.2 以荧光素染料为荧光团的硫化氢探针

荧光素由于具有高的消光系数, 在水中具有较高的荧光量子产率, 激发和发射波长都在可见光区以及无毒等优点, 合成至今一百多年来, 一直被广泛应用于化学及生物分析等领域。Xian 等^[57,58] 设计合成的探针 (Xian et al. Probe 1) 含有一个封闭的内酯结构, 苯环邻位上连接酯基和二硫化物, H₂S 作为

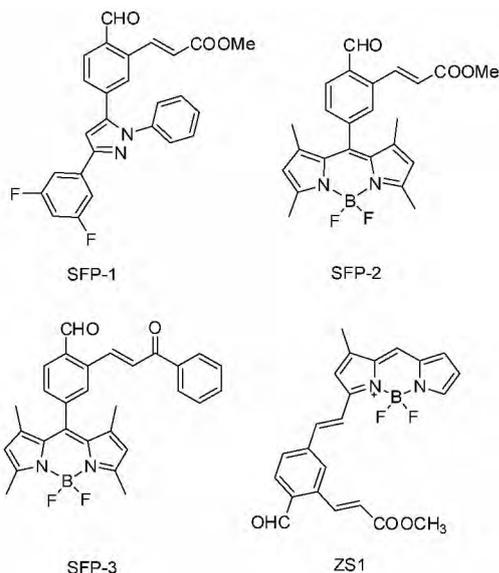
甲酚紫是一种优良的荧光团, 其具有光稳定性好、荧光量子产率高和电子体系易于调节等优点。Ma 等^[49] 报道了一种基于甲酚紫为荧光团的 H₂S 比率荧光探针 (Ma et al.)。在生理条件下, 该探针对 H₂S 有着很好的比率响应, 可以应用于 MCF-7 cells 和斑马鱼体内 H₂S 的荧光成像。

荧光蛋白是细胞自行合成的多肽序列生色团。Ai 等^[50] 报道了一个基因编码的 H₂S 探针 cpGFP-Tyr66pAzF, 通过扩展大肠杆菌和哺乳动物细胞中的基因编码, 将荧光蛋白发色团用叠氮基团改性, H₂S 还原叠氮基团成氨基后, 荧光蛋白的荧光可增强。但是, 该探针对二硫苏糖醇的响应也较大。

Chen 等^[51] 报道了一种以 NBD (7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole) 为荧光团的荧光探针 (Chen et al.)。探针检测 H₂S 时的信噪比为 3, 检测限为 680 nM。在 pH 值为 6.5~9.0 探针可以检测 H₂S, 实现了在 MCF-7 细胞内 H₂S 的荧光成像。

Lin 等^[52] 设计并合成了荧光探针 PI-N₃, 该探针在 4 min 内可达到饱和荧光信号, pH 值在 5.0~8.5 探针是稳定的。在活性氧、还原性物质及小分子硫醇的存在下探针能特异地选择 H₂S。探针可用于检测 HeLa 细胞中外源 H₂S 含量的变化。

Cui 等^[53] 报道了一种以 DCDHF (dicyanomethylene-dihydrofuran) 为荧光团, 发射红光的荧光探针 (Cui et al.)。在含硫分析物和其他阴离子的存在下对 H₂S 的选择性高, 利用该探针实现了 HUVEC 中外



亲核试剂取代巯基吡啶基团后经分子内环化释放出游离的荧光团,对 H_2S 显示出较高的选择性,已应用于对 COS7 细胞中的 H_2S 进行可视化分析。然而,该探针在血浆中对 H_2S 的荧光响应强度低于其在纯缓冲溶液中所获得的信号。引起此现象的主要问题是生物硫醇(如半胱氨酸的衍生物)会与探针发生类似的亲核反应,生成一个非荧光产物。为了解决这个问题,该团队研究优化了这类探针, Xian et al. Probe 5 和 6 可在高浓度生物硫醇存在的条件下选择性地响应 H_2S 。究其本质是生物硫醇与迈克尔受体以可逆的方式反应,并没有导致共价产物的生成,因此,其他硫醇无法使探针发生荧光响应。

4.3 以苯并噻唑类染料为荧光团的硫化氢探针

苯并噻唑(HMBT)类染料的斯托克斯位移比较大,该荧光团易于实现比率检测。Xu 等^[59]利用该荧光团基于激发态分子内质子转移机理(excited-state intramolecular proton transfer,ESIPT)设计合成了一种用于检测 H_2S 的比率荧光探针 E1。该探针可在两分钟内对 H_2S 做出响应,荧光强度增强了近 30 倍,其他生物硫醇对于检测没有明显的干扰。该探针可以定量检测 H_2S ,在水溶液中 H_2S 的检测限为 $0.12 \mu\text{M}$ 。

4.4 以近红外花菁染料为荧光团的硫化氢探针

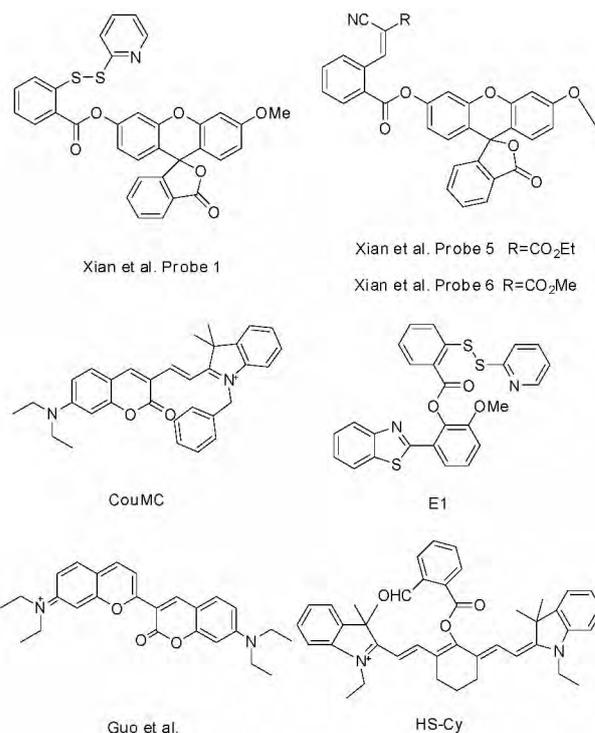
Guo 和 He 等^[60]设计合成了一种杂合花菁和香豆素荧光团的硫化氢比率荧光探针 CouMC。花菁部分不仅可以作为荧光团,而且还能作为 H_2S 亲核反应的活性位点。探针 CouMC 对 H_2S 响应迅速从而有利于对细胞内 H_2S 的实时成像。该探针实现了对 MCF-7 细胞线粒体中 H_2S 荧光成像检测。

Tang 等^[61]设计合成了一个近红外比率荧光探

针 HS-Cy。该探针可与 H_2S 发生分子内环化加成反应来改变花菁荧光团的共轭结构,从而实现比率成像检测。该探针的检测限为 $5 \sim 10 \text{ nM}$,成功检测了人 A549 细胞产生的内源性 H_2S 。

4.5 以其他染料为荧光团的硫化氢探针

Guo 等^[62]报道了一个在生理条件下对 H_2S 响应快、选择性高的比率荧光探针(Guo et al.)。该探针基于 H_2S 对正电的苯并吡喃基的选择性亲核攻击,探针可有效地从生物硫醇和其他生理相关的物种中检测出 H_2S 。该探针在生理 pH 范围内对 H_2S 响应较好,在 HeLa 细胞中实现了 H_2S 的荧光成像。



5 基于金属硫化物沉淀的荧光探针

基于金属硫化物的沉淀反应所设计合成的 H_2S 荧光探针按照荧光团的类别主要有荧光素染料类和近红外花菁染料类等。

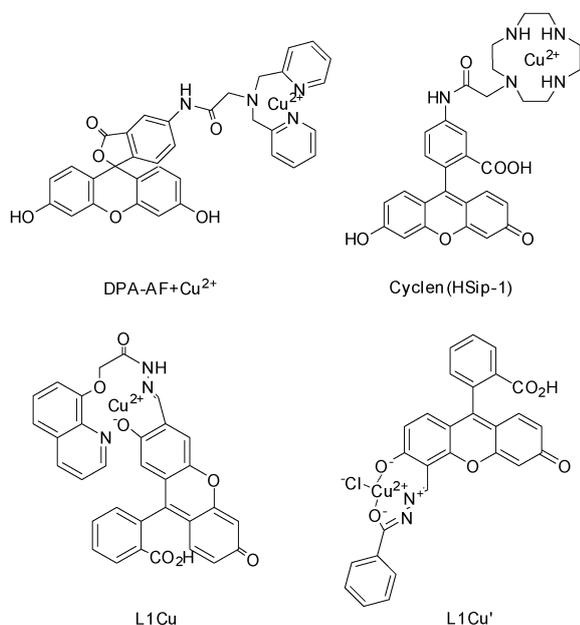
5.1 以荧光素染料为荧光团的硫化氢探针

Chang 等^[63]报道了一种对硫离子具有选择性响应的荧光探针 $\text{DPA-AF} + \text{Cu}^{2+}$ 。该探针结构以荧光素为荧光团通过酰胺键与 $\text{Cu}(\text{II})$ 络合物(DPA)相连接。该探针在水溶液中对硫化物的检出限为 420 nM ,但其选择性欠佳,其中 10 mM GSH 可对测定体系产生较大的干扰。

Nagano 等^[64]采用类似的机理选择 TACN、Cyclen、Cyclam 和 TMCyclen 等有机配体来代替 $\text{Cu}(\text{II})$ 络合物 DPA,设计合成了一系列荧光探针。

其中光谱性能最好的探针是 HSip-1。该探针对于 H_2S 具有高选择性和高灵敏度,在活性氧、活性氮及其他硫醇共存下对 H_2S 有着良好的选择性并能快速检测 H_2S 。该探针被应用于 HeLa 细胞中的 H_2S 荧光成像。

同样, Bai 等^[65] 利用荧光素荧光团和铜离子配体 8-羟基喹啉设计合成了硫离子探针 L1Cu。该探针应用于 HeLa 细胞内进行 H_2S 荧光成像,可检测细胞内微摩尔浓度范围内的硫离子而没有显示出大的细胞毒性。该课题组^[66] 又设计合成了探针 L1Cu'。该探针对于 pH 不敏感 (pH = 4 ~ 12)。当与 H_2S 反应后探针的荧光信号增强 25 ~ 30 倍,其检测限为 1.7 μM 。该探针在交替检测 Cu(II) 和 H_2S 时可构成一个“开-关-开”型荧光检测体系,在 HepG2 细胞中可同时检测铜 Cu(II) 和 H_2S 。



5.2 以近红外花菁染料为荧光团的硫化氢探针

Lin 等^[67] 设计合成了一种在过渡金属取代方法基础上检测 H_2S 的近红外荧光探针 4-Cu²⁺ Complex。探针的设计是将 Cu(II) 的配位基团 8-氨基喹啉引入到七甲川花菁中位,该探针的激发和发射波长都位于近红外区域,对 pH 范围要求也很宽泛。该探针选择性好、灵敏度高,其检出限为 280 nM。

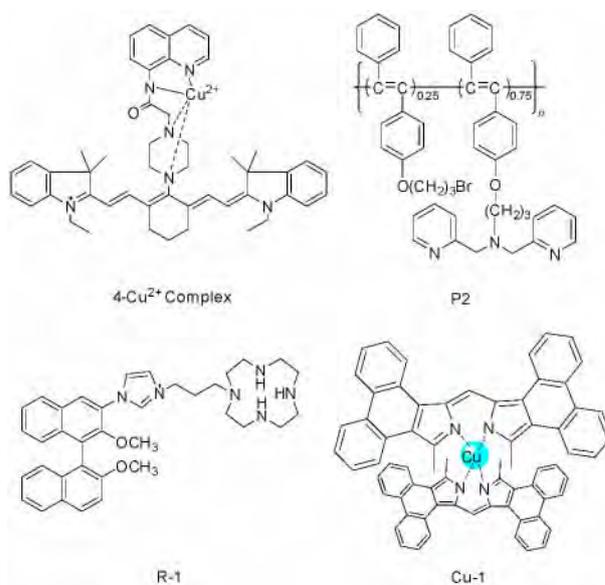
5.3 以其他染料为荧光团的硫化氢探针

Yu 等^[68] 报道了一个多功能的水溶性荧光探针 R-1 可以选择性识别 Cu²⁺ 和 S²⁻ 两种离子,探针的设计是将氮杂冠醚连接的一个具有光学活性的联萘酚衍生物上,交替添加 Cu²⁺ 和 S²⁻ 探针显示荧光变化构成“开-关-开”型荧光识别系统。另外,生物硫

醇和阴离子包括谷胱甘肽(GSH)、L-半胱氨酸、二巯苏糖醇(DTT)和硫酸盐不干扰探针对于硫离子的检测,R-1-Cu(II)对硫化物的检出限为 1.6×10^{-5} M。

Li 等^[69] 报道了一个吡啶甲基胺官能团化的二取代聚乙炔探针 P2。在 Cu²⁺ 的存在下,吡啶甲基胺部分的能量能有效地从共轭主链转移到铜离子,导致聚合物的荧光猝灭。加入 S²⁻ 后,Cu²⁺ 被取代,猝灭的荧光又会恢复。

Guo 和 Shen 等^[70] 合成了一种通过取代法来选择性检测 HS⁻ 的荧光探针 Cu-1。在各种无机阴离子、硫的含氧酸根和硫醇的存在下探针可以选择性地和 H_2S 反应,探针能够响应 HeLa 细胞中外源 HS⁻ 浓度的变化。



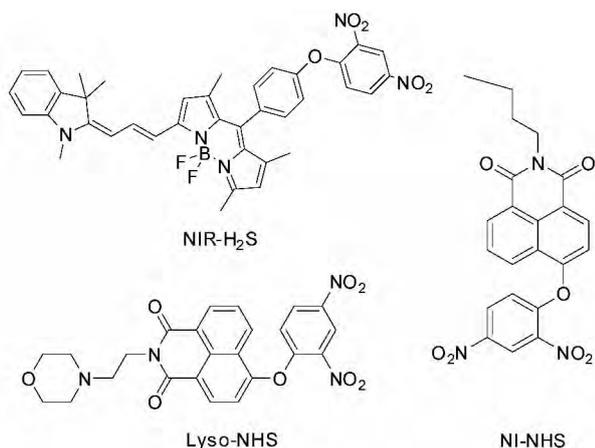
6 基于间二硝基苯醚磺解反应的荧光探针

建立在间二硝基苯醚磺解反应基础上的检测 H_2S 的荧光探针目前有两类,一类是以萘酰亚胺为荧光团,另一类是以花菁染料杂合 BODIPY 为荧光团。

Xu 和 Cui 等^[71,72] 报道了基于间二硝基苯醚的磺解反应检测 H_2S 的两种探针 NI-NHS 和 Lyso-NHS。Lyso-NHS 探针除了在萘酰亚胺荧光团上引入二硝基苯基作为 H_2S 反应位点外,又引入一种能定位于溶酶体的基团 4-(2-乙基)吗啉。该探针被成功用于 MCF-7 细胞溶酶体内 H_2S 的检测,其检出限为 0.48 μM 。

Lin 等^[73] 将红外花菁染料杂合 BODIPY 染料为荧光团,设计合成了一种近红外荧光探针 NIR-H₂S。该探针选择性较好,对 H_2S 能迅速作出反应,检出限为 5×10^{-8} M。探针可对 MCF-7 细胞中的 H_2S

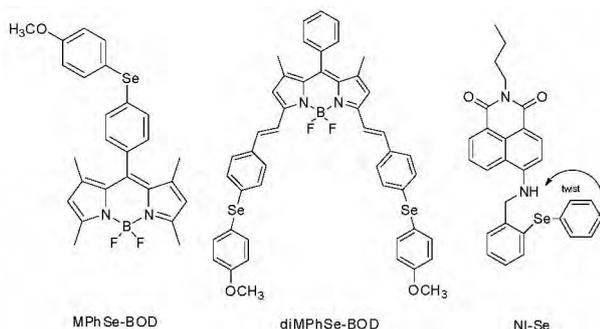
进行荧光成像。



7 模拟硒酶氧化还原反应的硫化氢荧光探针

H₂S 可以保护生物体免受次氯酸(HOCl)和次溴酸(HOBr)所造成的氧化应激,而且可以修复由活性氧和活性氮引起的各种组织损伤^[74,75]。Han等^[76]合成了可以检测活细胞内HOCl氧化应激/H₂S修复的可逆荧光探针MPhSe-BOD。该探针在BODIPY荧光团中位引入一个含二苯基硒的分子结构MPhSe作为识别基团。探针的工作机理基于识别基团MPhSe和荧光团BODIPY之间所存在的PET过程。MPhSe被HOCl快速氧化成“硒氧”的形式后抑制了PET过程,探针荧光增强;当“硒氧”被H₂S还原成“硒”以后,荧光降低。该探针可以灵敏地、特异性地检测RAW264.7细胞内的HOCl和H₂S诱导的氧化还原过程。该团队还报道了一个可对HOBr/H₂S诱导的氧化还原循环过程的近红外比率荧光探针diMPhSe-BOD^[77]。利用小鼠巨噬细胞的即时细胞成像表明该探针有着良好的细胞膜通透性,可以连续、可逆检测细胞内HOBr/H₂S诱导的氧化还原过程。

Han等^[78]还利用激发态扭转的机理设计了一个可逆的H₂S荧光探针NI-SE。经过密度泛函理论计算发现分子NI-SE中不存在PET过程,而存在着



一个激发态结构扭转的荧光猝灭过程。该探针实现了RAW264.7细胞和活体小鼠中次氯酸氧化和H₂S还原性修复的原位可视化检测。

8 用于检测其他活性硫物种的荧光探针

活性硫物种(RSS)是生物体内一类含硫的活性分子。这些分子包括硫醇、S-改性的半胱氨酸加合物(S-亚硝基硫醇)、次磺酸、硫化氢、过硫化物、多硫化物以及无机硫衍生物。这些分子在生物医学研究中表现出多种生理功能,因此RSS引起了越来越多的关注。目前,用于检测生物硫醇的荧光探针有很多,而检测其他活性硫物种的荧光探针相对较少。鉴于活性硫物种在生物系统中的重要作用,发展用于检测其他活性硫物种的荧光探针是相当有必要的。

8.1 检测亚硫酸氢根的荧光探针

二氧化硫(SO₂)是一种常见的气体环境污染物。二氧化硫被人体吸入后可迅速与水化合生成亚硫酸盐和亚硫酸氢盐,并可能导致呼吸道疾病,甚至肺癌。此外,从含硫的氨基酸也可以生成亚硫酸盐和亚硫酸氢盐,如L-半胱氨酸,或哺乳动物的硫代硫酸盐。高浓度的亚硫酸根和亚硫酸氢根可呈现较重的毒理作用,但在生理及低浓度情况下,它们发挥着调节心血管功能的生理作用。亚硫酸氢盐(HSO₃⁻)在许多食品和饮料产品是常见的防腐剂。在酸或酸化的食品或饮料中它们也是非常有效的微生物抑制剂。目前对亚硫酸氢根阴离子的检测主要依据的化学反应是亚硫酸氢根选择性与醛基反应形成稳定的亚硫酸氢根加成物。但是该类荧光探针大部分尚未应用于生物体系,这也正是该类荧光探针下一步发展的方向。

Yang等^[79]报道了一种用于在水-乙醇介质中选择性检测亚硫酸氢根的荧光探针(Yang et al.)。该探针与亚硫酸氢根反应后,导致罗丹明衍生物的螺内酰胺开环,从而发出荧光。该探针对亚硫酸氢根的选择性好,其它阴离子未对检测造成干扰。

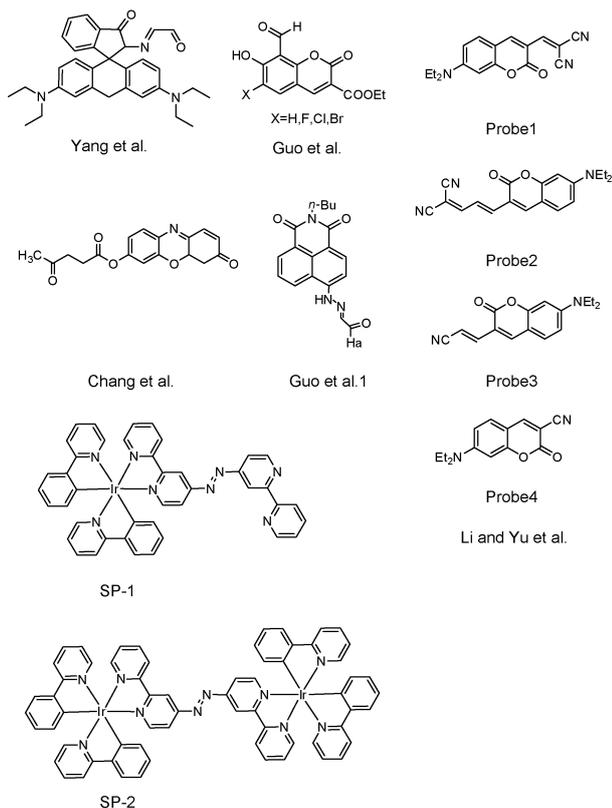
Guo等^[80]设计合成了4种以香豆素为荧光团的亚硫酸氢根荧光探针(Guo et al.)。该类探针可在水溶液中选择性地与亚硫酸氢根反应,在其他阴离子的存在下也对亚硫酸氢根表现出较高的选择性。探针可应用于测定砂糖中的亚硫酸盐。氢键可以抑制C=N异构化,Guo等^[81]利用此方法设计合成了基于C=N异构化的荧光探针(Guo et al. 1),在pH值为5时,该加成反应可以在5分钟之内完

成 HSO_3^- 检出限为 $0.1 \mu\text{M}$ 。探针可用于砂糖中亚硫酸氢根的检测。

Li 和 Yu 等^[82]报道了一种基于 ICT 机理的比色和比率香豆素类荧光探针(Li and Yu et al.) 用于选择性检测亚硫酸根, 在其他阴离子和活性硫物种存在下, 探针对亚硫酸根的选择性较高。

Chang 等^[83]报道了一种基于试卤灵荧光团选择性检测亚硫酸根的荧光分子探针(Chang et al.)。在水溶液中, 该探针与亚硫酸根离子反应后, 乙酰丙基选择性脱保护并开启了荧光开关。该探针对亚硫酸根的检测限为 $4.9 \times 10^{-5} \text{ M}$ 。

磷光是受激分子由激发三线态跃迁到基态而产生的光辐射现象, 磷光分析法是测定痕量有机化合物和生物物质的高灵敏度和高选择性的一种新的测试手段。Li 等^[84]报道了通过偶氮基团连接非发射的单核和双核铱(III) 配合物来检测亚硫酸根和亚硫酸氢根的磷光探针, SP-1 和 SP-2。相比较于 SP-1, SP-2 对亚硫酸根和亚硫酸氢根的选择性和灵敏度较高。探针对亚硫酸根和亚硫酸氢根的检出限分别为 0.24 和 $0.14 \mu\text{M}$ 。另外, 此探针不仅可以检测外源添加的亚硫酸根和亚硫酸氢根, 也可以量化在 HepG2 细胞内由酶生成的亚硫酸根和亚硫酸氢根。

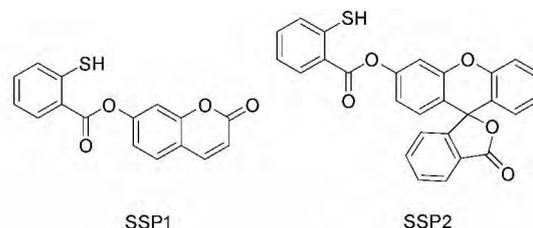


8.2 检测硫烷硫的荧光探针

硫烷硫化合物是 RSS 的一种重要类型。具有

生物活性的硫烷硫化合物包括过硫化物(R-S-SH)、过硫化氢(H_2S_2)、聚硫化物($\text{R-S-S}_n\text{-S-R}$) 和与蛋白质结合的元素硫(S_8)。最近的研究表明, 硫烷硫物种来自硫化氢, 可能是实际的信号分子。之前检测硫烷硫的唯一方法是基于其与氰离子反应生成硫氰酸根, 然后与铁(III) 反应生成硫氰化铁从而被检出。然而该方法需要组织预处理或细胞破碎, 很难被应用在实时检测生物样品中。

Xian 等^[85]报道了两种用于检测硫烷硫的荧光探针 SSP1 和 SSP2。探针利用—SH 基团充当亲核试剂捕获硫烷硫中活性硫原子, 形成—S—SH 加合物, 然后经过快速的分子内环反应化释放游离的荧光团分子。该反应可以在 5 分钟内达到荧光信号饱和, 两种探针在中性至弱碱性的 pH 值下能有效地工作。SSP2 具有较高的灵敏度和较低的背景荧光, 即使存在其他硫化物或醛类, 该探针对硫烷硫的响应仍然有明显的荧光信号增强, 且已用于 H9c2 和 HeLa 细胞中硫烷硫的荧光成像。



9 结论

综上所述, 近年来 H_2S 荧光分子探针的研究已经取得了很大的进展, 很多探针分子已能够用于细胞和生物体内 H_2S 浓度的检测, 但适用于活细胞和活体内 H_2S 定量检测的新型荧光分子探针还有待发展。另外, 由于 H_2S 荧光分子探针很容易受到其他内源性生物硫醇物种的干扰, 因此开发对 H_2S 具有高度选择性的荧光分子探针也是目前研究学者重点关注的课题之一。气体信号分子硫化氢、一氧化氮和一氧化碳之间有着各种交互作用指示着人体的健康与疾病, 因此设计合成能用于响应三种气体信号分子交互作用的荧光探针研究具有更好的理论与实际意义。我们认为新型的下一代 H_2S 荧光分子探针将是一种能够利用活细胞体系三维示踪和高时空分辨单分子成像新技术在细胞水平上进行原位、实时、动态的可视化监测的小分子荧光探针。这种探针将同时实现对不同细胞器的功能性活性物种区域定位检测和连续动态监测的功能。

表1 H₂S 荧光探针的总结Table 1 Summary of H₂S fluorescent probe

probe	fluorophore	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	detection limit	selectivity	cells lines	Φ
Reduction Reaction							
AzMB-coumarin	coumarin	365	450	10 μ M	high	HeLa	—
C-7Az	coumarin	340	445	—	high	HeLa	(0.88 \pm 0.02)
1a	coumarin	390	483	—	low	—	(0.66 \pm 0.015) %
1b	coumarin	380	515	—	high	PC-3	(10.93 \pm 0.15) %
Yu et al.	coumarin	397	482/602	2.5 μ M	high	—	0.236
HSN1	naphthalimide	432	542	5 ~ 10 μ M	low	HeLa	—
HSN2	naphthalimide	432	542	1 ~ 5 μ M	high	HeLa	(0.096 \pm 0.001)
CDs	naphthalimide	340	526/425	10 nM	high	HeLa/L929	—
AISA	naphthalimide	431	530	2.5 μ M	high	HeLa	—
Wang et al.	naphthalimide	440	544	0.5 μ M	high	astrocyte	0.12
SF1	rhodamine	490	525	5 ~ 10 μ M	low	HEK293T	0.51
SF2	rhodamine	492	525	5 ~ 10 μ M	high	HEK293T	0.6
SF4	rhodamine	496	517	125 nM	high	HUVECS	0.92
SF5-AM	rhodamine	498	521	250 nM	high	HUVECS	0.18
SF7-AM	rhodamine	498	526	500 nM	high	HUVECS	0.17
Sun et al.	rhodamine	480	525	112 nM	high	Hela	—
Guo et al.	rhodamine	450	485/690	0.14 μ M	high	HeLa	0.085
Cy-N ₃	heptamethine cyanine	625	710/750	0.08 μ M	high	RAW264.7	0.12
Cy-NO ₂	heptamethine cyanine	755	809	—	high	RAW264.7	0.11
Xu et al.	dicyanomethylene-4H-chromene	491	635	—	high	HUVEC	—
FS1	BMF	363	548	5 ~ 10 μ M	high	HeLa	0.46
SHS-M1	benzothiazole derivative	340	500/420	0.2 μ M	high	HeLa	0.5
SHS-M2	benzothiazole derivative	373	545/420	0.4 μ M	high	HeLa	0.12
NHS1	naphthalene derivative	360	480	20 nM	high	HeLa	—
Peng et al.	benzopyran	520	670	3.05 μ M	high	HeLa	—
DNS-AZ	dansyl	340	535	1 μ M	high	—	—
Ma et al.	cresyl violet	535	620/566	0.1 μ M	high	MCF-7	0.54
cpGFP-Tyr66pAzF	FPs	480	510	10 μ M	high	HeLa	—
Chen et al.	7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole	474	550	680 nM	high	MCF-7	—
PI-N3	phenanthroimidazole	350	423	879 nM	high	HeLa	0.62
Cui et al.	dicyanomethylenedihydro-furan	574	619	—	high	HUVEC	0.018
Nucleophilic addition reactions							
SFP1	1,3,5-triaryl-2-pyrazoline	300	391	—	high	—	0.058
SFP2	BODIPY	465	510	5 μ M	high	HeLa	0.208
SFP3	BODIPY	500	515	—	high	—	0.1
ZS1	BODIPY	520	561	2.5 μ M	high	RAW 264.7	0.13
Xian et al. Probe 1	fluorescein	465	515	1 ~ 10 μ M	low	COS7	0.392
Xian et al. Probe 5	fluorescein	476	513	1 μ M	high	COS7	—
Xian et al. Probe 6	fluorescein	476	513	1 μ M	high	COS7	—
E1	benzothiazole	295	487/356	0.12 μ M	high	Hela	—
CouMC	merocyanine	475	510/652	1 μ M	high	MCF-7	—
HS-Cy	cyanine	700	625/780	5.0 ~ 10 nM	high	HepG2/A549	—
Guo et al.	7-diethylaminocoumarin	450	485/690	0.14 μ M	high	HeLa	0.34
Chang et al.	resorufin	487	588	49 μ M	high	—	—
Copper sulfide precipitation							
DPA-AF + Cu ²⁺	fluorescein	470	517	420 nM	low	—	—
HSip-I	fluorescein	491	516	10 μ M	high	HeLa	0.019
LI Cu	fluorescein	495	534	~ 5 μ M	high	HeLa	0.123
LI Cu'	fluorescein	494	523	1.7 μ M	high	Hep G2	—
4-Cu ²⁺	tricarboyanine	694	794	280 nM	high	—	0.11

续表 1

probe	fluorophore	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	detection limit	selectivity	cells lines	Φ
R-1-Cu(II)	1,1'-bi-2-naphthol	291	449	16 μ M	high	—	—
P2	di(2-picoly)l amine	324	507	500 nM	high	—	—
Cu-1	phenanthrene-fused dipyromethene	540	600	—	high	HeLa	0.008
Thiolysis reaction							
Lyso-NHS	naphthalimide	450	555	0.48 μ M	high	MCF-7	—
NI-NHS	naphthalimide	450	550	0.18 μ M	high	MCF-7	—
NIR-H ₂ S	cyanine	650	708	50 nM	high	MCF-7	—
Other reactive sulfur species							
Yang et al.	rhodamine	510	580	890 nM	high	—	—
Guo et al. (3b)	coumarin	380	458	0.37 μ M	high	—	0.62
Guo et al. 1	naphthalimide	439	535	0.1 μ M	high	—	0.374
SSP1	coumarin	380	458	73 nM	high	—	0.06
SSP2	fluorescein	482	518	32 nM	high	H9c2/HeLa	0.05
Li and Yu et al. Probe1	coumarin	492	480/578	58 μ M	high	—	0.028
Li and Yu et al. Probe2	coumarin	468	501/625	—	high	—	—

参 考 文 献

- [1] Kimura H, Nagai Y, Umemura K, Kimura Y. *Antioxid. Redox. Sign.*, 2005, 7: 795.
- [2] Li L, Rose P, Moore P K. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2011, 51: 169.
- [3] Kimura H. *Amino Acids*, 2011, 41: 113.
- [4] Stipanuk M H, Ueki I. *J. Inherit. MeTab. Dis.*, 2011, 34: 17.
- [5] Dominy J E, Stipanuk M H. *Nutr. Rev.*, 2004, 62: 348.
- [6] Calvert J W, Coetzee W A, Lefer D J. *Antioxid. Redox. Sign.*, 2010, 12: 1203.
- [7] Lee M, Schwab C, Yu S, McGeer E, McGeer P L. *Neurobiol. Aging*, 2009, 30: 1523.
- [8] Tripatara P, Patel N S, Brancaleone V, Renshaw D, Rocha J, Sepodes B, Mota-Filipe H, Perretti M, Thiernemann C. *Eur. J. Pharmacol.*, 2009, 606: 205.
- [9] Stipanuk M H, Beck P W. *Biochem. J.*, 1982, 206: 267.
- [10] Madden J A, Ahlf S B, Dantuma M W, Olson K R, Roerig D L. *Appl. Physiol.*, 2012, 112: 411.
- [11] Bhatia M, Wong F L, Fu D, Lau H Y, Mochhala S M, Moore P K. *FASEB J.*, 2005, 19: 623.
- [12] Yan H, Du J B, Tang C S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, 313: 22.
- [13] Geng B, Yang J H, Qi Y F, Zhao J, Pang Y Z, Du J B, Tang C S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, 313: 362.
- [14] Zhang C Y, Du J B, Bu D F, Yan H, Tang X Y, Tang C S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, 302: 810.
- [15] Wang R. *FASEB J.*, 2002, 16: 1792.
- [16] Pandey S K, Kim K H. *Environ. Sci. Technol.*, 2009, 43: 3020.
- [17] Siegel L M. *Anal. Biochem.*, 1965, 11: 126.
- [18] Fischer E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 1883, 16: 2234.
- [19] Searcy D G, Peterson M A. *Anal. Biochem.*, 2004, 324: 269.
- [20] Lawrence N S, Davis J, Jiang L, Jones T G, Davies S N, Compton R G. *Electroanalysis*, 2000, 12: 1453.
- [21] Hannestad U, Margheri S, Sörbo B. *Anal. Biochem.*, 1989, 178: 394.
- [22] Furne J, Saeed A, Levitt M D. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2008, 295: 1479.
- [23] Ishigami M, Hiraki K, Umemura K, Ogasawara Y, Ishii K, Kimura H. *Antioxid. Redox. Sign.*, 2009, 11: 205.
- [24] Chan J, Dodani S C, Chang C J. *Nat. Chem.*, 2012, 4(12): 973.
- [25] Kumar N, Bhalla V, Kumar M. *Coord. Chem. Rev.*, 2013, 257: 2335.
- [26] De Silva A P, Gunaratne H Q, Gunlaugsson T, Huxley A J, McCoy C P, Rademacher J T, Rice T E. *Chem. Rev.*, 1997, 97: 1515.
- [27] Grabowski Z R, Rotkiewicz K, Rettig W. *Chem. Rev.*, 2003, 103: 3899.
- [28] Miyasaka N, Hirata Y. *Life Sci.*, 1997, 61: 2073.
- [29] Yu F B, Li P, Wang B S, Han K L. *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135: 7674.
- [30] Wu Z S, Li Z, Yang L, Han J H, Han S F. *Chem. Commun.*, 2012, 48: 10120.
- [31] Chen B F, Li W, Lv C, Zhao M M, Jin H W, Jin H F, Du J B, Zhang L R, Tang X J. *Analyst*, 2013, 138: 946.
- [32] Li W H, Sun W, Yu X Q, Du L, Li M Y. *J. Fluoresc.*, 2013, 23: 181.
- [33] Wu M Y, Li K, Hou J T, Huang Z, Yu X Q. *Org. Biomol. Chem.*, 2012, 10: 8342.
- [34] Montoya L A, Pluth M D. *Chem. Commun.*, 2012, 48: 4767.
- [35] Yu C M, Li X Z, Zeng F, Zheng F Y, Wu S Z. *Chem. Commun.*, 2013, 49: 403.
- [36] Xuan W M, Pan R, Cao Y T, Liu K J, Wang W. *Chem.*

- Commun. ,2012 ,48: 10669.
- [37] Sun K , Liu X L , Wang Y Y , Wu Z Q. RSC Adv. ,2013 ,3: 14543.
- [38] Lippert A R , New E J , Chang C J. J. Am. Chem. Soc. ,2011 ,133: 10078.
- [39] Lin V S , Lippert A R , Chang C J. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. ,2013 ,110: 7131.
- [40] Zhang H T , Wang P , Chen G C , Cheung H Y , Yi L , Sun H Y. Tetrahedron. Lett. ,2013 ,138: 946.
- [41] Yu F B , Li P , Song P , Wang B S , Zhao J Z , Han K L. Chem. Commun. ,2012 ,48: 2852.
- [42] Zheng Y , Zhao M , Qiao Q L , Liu H Y , Lang H J , Xu Z C. Dyes. Pigm. ,2013 ,98: 367.
- [43] Sun W , Fan J L , Hu C , Cao J F , Zhang H , Wang J Y , Cui S , Peng X J. Chem. Commun. ,2013 ,49: 3890.
- [44] Wang R , Yu F B , Chen L X , Chen H , Wang L J , Zhang W W. Chem. Commun. ,2012 ,48: 11757.
- [45] Das S K , Lim C S , Yang S Y , Han J H , Cho B R. Chem. Commun. ,2012 ,48: 8395.
- [46] Bae S K , Heo C H , Choi D J , Sen D , Joe E H , Cho B R , Kim H M. J. Am. Chem. Soc. ,2013 ,135: 9915.
- [47] Mao G J , Wei T T , Wang X X , Huan S Y , Lu D Q , Zhang J , Zhang X B , Tan W H , Shen G L , Yu R Q. Anal. Chem. ,2013 ,85: 7875.
- [48] Peng H J , Cheng Y F , Dai C F , King A L , Predmore B L , Lefer D J , Wang B H. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. ,2011 ,50: 9672.
- [49] Wan Q Q , Song Y C , Li Z , Gao X H , Ma H M. Chem. Commun. ,2013 ,49: 502.
- [50] Chen S , Chen Z J , Ren W , Ai H W. J. Am. Chem. Soc. ,2012 ,134: 9589.
- [51] Zhou G D , Wang H L , Ma Y , Chen X Q. Tetrahedron ,2012 ,69: 867.
- [52] Zheng K B , Lin W Y , Tan L. Org. Biomol. Chem. ,2012 ,10: 9683.
- [53] Chen T , Zheng Y , Xu Z C , Zhao M , Xu Y N , Cui J N. Tetrahedron. Lett. ,2013 ,49: 7510.
- [54] Qian Y , Zhang L , Ding S T , Deng X , He C , Zheng X E , Zhu H L , Zhao J. Chem. Sci. ,2012 ,3: 2920.
- [55] Qian Y , Karpus J , Kabil O , Zhang S Y , Zhu H L , Banerjee R , Zhao J , He C. Nat. Commun. ,2011 ,2: 495
- [56] Li X , Zhang S , Cao J , Xie N , Liu T , Yang B , He Q J , Hu Y Z. Chem. Commun. ,2013 ,49: 8656.
- [57] Liu C R , Pan J , Li S , Zhao Y , Wu L Y , Berkman C E , Whorton A R , Xian M. Angew. Chem. ,2011 ,123: 10511.
- [58] Liu C R , Peng B , Li S , Park C M , Whorton A R , Xian M. Org. Lett. ,2012 ,14: 2184.
- [59] Xu Z , Xu L , Zhou J , Xu Y F , Zhu W P , Qian X H. Chem. Commun. ,2012 ,48: 10871.
- [60] Chen Y C , Zhu C C , Yang Z H , Chen J J , He Y F , Jiao Y , He W , Qiu L , Cen J J , Guo Z J. Angew. Chem. ,2013 ,125: 1732.
- [61] Wang X , Sun J , Zhang W H , Ma X X , Lv J Z , Tang B. Chem. Sci. ,2013 ,4: 2551.
- [62] Liu J , Sun Y Q , Zhang J Y , Yang T , Cao J B , Zhang L S , Guo W. Chem. A Eur. J. ,2013 ,19: 4717.
- [63] Choi M G , Cha S , Lee H , Jeon H L , Chang S K. Chem. Commun. ,2009 ,7390.
- [64] Sasakura K , Hanaoka K , Shibuya N , Mikami Y , Kimura Y , Komatsu T , Ueno T , Terai T , Kimura H , Nagano T. J. Am. Chem. Soc. ,2011 ,133: 18003.
- [65] Hou F P , Huang L , Xi P X , Cheng J , Zhao X F , Xie G Q , Shi Y J , Cheng F J , Yao X J , Bai D C. Inorg. Chem. ,2012 ,51: 2454.
- [66] Hou F P , Cheng J , Xi P , Chen F J , Huang L , Xie G Q , Shi Y J , Liu H Y , Bai D C , Zeng Z Z. Dalton. Trans. ,2012 ,41: 5799.
- [67] Cao X W , Lin W Y , He L W. Org. Lett. ,2011 ,13: 4716.
- [68] Wang M Q , Li K , Hou J T , Wu M Y , Huang Z , Yu X Q. J. Org. Chem. ,2012 ,77: 8350.
- [69] Zhang L , Lou X D , Yu Y , Qin J G , Li Z. Macromolecules ,2011 ,44: 5186.
- [70] Qu X Y , Li C J , Chen H C , Mack J , Guo Z J , Shen Z. Chem. Commun. ,2013 ,49: 7510.
- [71] Liu T Y , Zhang X F , Qiao Q L , Zou C Y , Feng L , Cui J N , Xu Z C. Dyes. Pigm. ,2013 ,99: 537.
- [72] Liu T Y , Xu Z C , Spring D R , Cui J N. Org. Lett. ,2013 ,15: 2310.
- [73] Cao X W , Lin W Y , Zheng K B , He L W. Chem. Commun. ,2012 ,48: 10529.
- [74] Nagy P , Winterbourn C C. Chem. Res. Toxicol. ,2010 ,23: 1541.
- [75] Kimura Y , Goto Y I , Kimura H. Antioxid. Redox. Sign. ,2010 ,12: 1.
- [76] Wang B S , Li P , Yu F B , Song P , Sun X F , Yang S Q , Lou Z R , Han K L. Chem. Commun. ,2013 ,49: 1014.
- [77] Wang B S , Li P , Yu F B , Chen J S , Qu Z J , Han K L. Chem. Commun. ,2013 ,49: 5790.
- [78] Lou Z R , Li P , Pan Q , Han K L. Chem. Commun. ,2013 ,49: 2445.
- [79] Yang X F , Zhao M L , Wang G. Sensors and Actuators B: Chemical ,2011 ,152: 8.
- [80] Chen K Y , Guo Y , Lu Z H , Yang B Q , Shi Z. Chin. J. Chem. ,2010 ,28: 55.
- [81] Sun Y Q , Wang P , Liu J , Zhang J Y , Guo W. Analyst ,2012 ,137: 3430.
- [82] Wu M Y , He T , Li K , Wu M B , Huang Z , Yu X Q. Analyst ,2013 ,138: 3018.
- [83] Choi M G , Hwang J , Eor S , Chang S K. Org. Lett. ,2010 ,12: 5624.
- [84] Li G Y , Chen Y , Wang J Q , Lin Q , Zhao J , Ji L N , Chao H. Chem. Sci. ,2013 ,4: 4426.
- [85] Chen W , Liu C R , Peng B , Zhao Y , Pacheco A , Xian M. Chem. Sci. ,2013 ,4: 2892.