

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2025.04.013

一种超氧阴离子荧光探针的合成与应用

王露露, 时杰, 王兰, 后华清

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘要:文章以咖啡酸基团作为超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)识别位点合成了一种吩噻嗪类荧光探针 PTZ-C, 通过荧光开启的方式来检测 $O_2^{\cdot-}$ 。在 $O_2^{\cdot-}$ 存在的情况下, PTZ-C 中咖啡酸残基的给电子邻苯二酚可以被氧化形成吸电子的邻苯二醌, 发生荧光共振能量转移, 在 470 nm 处出现新峰, 并且在紫外灯下观察到溶液由无色荧光变为蓝色荧光, 响应时间在 5 s 内。PTZ-C 探针能够特异性识别 $O_2^{\cdot-}$, 抗干扰能力较强, pH 值适用范围较广, 检测限为 12.8 nmol/L, 且对交替加入 $O_2^{\cdot-}$ 和抗坏血酸的氧化还原过程表现出良好的可逆性。此外, 该探针的细胞毒性小, 可应用于巨噬细胞 RAW264.7 的内源性 $O_2^{\cdot-}$ 荧光成像。

关键词:超氧阴离子; 吩噻嗪; 咖啡酸; 荧光探针

中图分类号: Q811.5

文献标志码: A

文章编号: 1003-5060(2025)04-0512-07

Synthesis and application of a superoxide anion fluorescent probe

WANG Lulu, SHI Jie, WANG Lan, HOU Huaqing

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract: In this paper, a phenothiazine fluorescent probe PTZ-C was synthesized using caffeic acid group as the recognition site of superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), and $O_2^{\cdot-}$ was detected by fluorescence activation. In the presence of $O_2^{\cdot-}$, the electron-donating pyrocatechol of caffeic acid residues in PTZ-C can be oxidized to form electron-withdrawing o-benzoquinone, and the fluorescence resonance energy transfer occurs. A new peak appears at 470 nm, and the solution is observed to change from colorless fluorescence to blue fluorescence under ultraviolet lamp, and the response speed is within 5 s. Probe PTZ-C can specifically recognize $O_2^{\cdot-}$, has strong anti-interference ability and a wide range of pH value, and the detection limit is 12.8 nmol/L. It shows good reversibility to the redox process of alternately adding $O_2^{\cdot-}$ and ascorbic acid. In addition, it shows little cytotoxicity, and can be applied in endogenous $O_2^{\cdot-}$ fluorescence imaging of macrophage RAW264.7.

Key words: superoxide anion; phenothiazine; caffeic acid; fluorescent probe

超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$) 是生物系统内一种重要的活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 可以通过酶或非酶途径转化为其他重要的 ROS^[1]。它主要在细胞呼吸过程中产生, 一般作为产生其他内源性 ROS 的前体, 如过氧化氢 (H_2O_2)、单线态氧 (1O_2)、羟基自由基^[2]。 $O_2^{\cdot-}$ 在多种生理活动中发挥重要作用, 如细胞间信号传导和非特异性免疫^[3]。已有研究表明, 炎症组织中会产生大量 $O_2^{\cdot-}$, 作为一种

活性氧自由基在机体中发挥重要作用^[4]。然而, 异常水平的 $O_2^{\cdot-}$ 可氧化损伤脂质、DNA 和蛋白质, 导致氧化应激, 这与各种疾病的发展密切相关, 如神经退行性疾病、关节炎、动脉硬化、肿瘤等^[5-6]。因此, 检测 $O_2^{\cdot-}$ 水平对于进一步研究 $O_2^{\cdot-}$ 在生命系统中的生理作用至关重要。

迄今为止, 检测 $O_2^{\cdot-}$ 的主要方法包括高效液相色谱、电子顺磁共振、电化学方法、质谱、化学

收稿日期: 2023-03-17; 修回日期: 2023-03-31

基金项目: 安徽省自然科学基金资助项目 (2202085J04)

作者简介: 王露露 (1997—), 女, 安徽安庆人, 合肥工业大学硕士生;

时杰 (1986—), 男, 安徽合肥人, 博士, 合肥工业大学研究员, 博士生导师, 通信作者, E-mail: shijie@hfut.edu.cn.

发光方法和荧光探针^[7-9]。这些分析方法中的大多数需要破坏组织、细胞或存在复杂的样品处理过程,并且不适合视觉和体内分析。而荧光成像由于其高灵敏度、实时检测和非破坏性等优点,对于监测各种活性物质是较为理想的。目前,文献[10-16]报道了比率探针、双光子探针、近红外探针、双响应探针、细胞器靶向探针、可逆探针和纳米探针等 $O_2^{\cdot-}$ ·荧光探针。这些探针虽然可以实现 $O_2^{\cdot-}$ ·成像,但也存在生物相容性较差^[17]、受其他 ROS 干扰^[18]等缺点。本文合成了一种对 $O_2^{\cdot-}$ ·响应的吩噻嗪类荧光探针 PTZ-C,该探针对于 $O_2^{\cdot-}$ ·表现出较好的选择性以及生物相容性。

一般来说,大多数 $O_2^{\cdot-}$ ·小分子荧光探针是通过保护-去保护机制^[19-21]和氧化还原^[22-23]机制来实现的。其中基于氧化还原过程识别 $O_2^{\cdot-}$ ·的有几个典型识别反应位点,例如苯并噻唑啉、咖啡酸、联二硒等。本文选择咖啡酸基团作为 $O_2^{\cdot-}$ ·响应基团,设计并合成了一种吩噻嗪类荧光探针 PTZ-C,在与 $O_2^{\cdot-}$ ·反应后,探针中的邻苯二酚氧化为邻苯二醌,其中受体在 327 nm 处有吸收峰,

供体在 450 nm 处有发射峰,因此会产生荧光共振能量转移,从而发出荧光。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

所用仪器有:F-7100 荧光分光光度计,TU-1901 紫外可见分光光度计,Olympus IX73 荧光显微镜,SHZ-D(Ⅲ)循环水氏循环泵,ENF-260C/FC 紫外灯,RE-2000A 旋转蒸发仪,MS-H280 磁力搅拌器,FE28 pH 计。

吩噻嗪、溴乙烷、2-溴乙胺氢溴酸盐、咖啡酸、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二胺盐酸盐均购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;无水乙醇、N-羟基苯并三唑、超干 N,N-二甲基甲酰胺、超干四氢呋喃均购于北京伊诺凯科技有限公司;亚硝酸钠、无水氯化亚锡、甲苯、乙酸均购于国药集团化学试剂有限公司;60%氯化钠购于上海麦克林生化科技有限公司。

1.2 化合物合成及表征

PTZ-C 合成路线如图 1 所示。

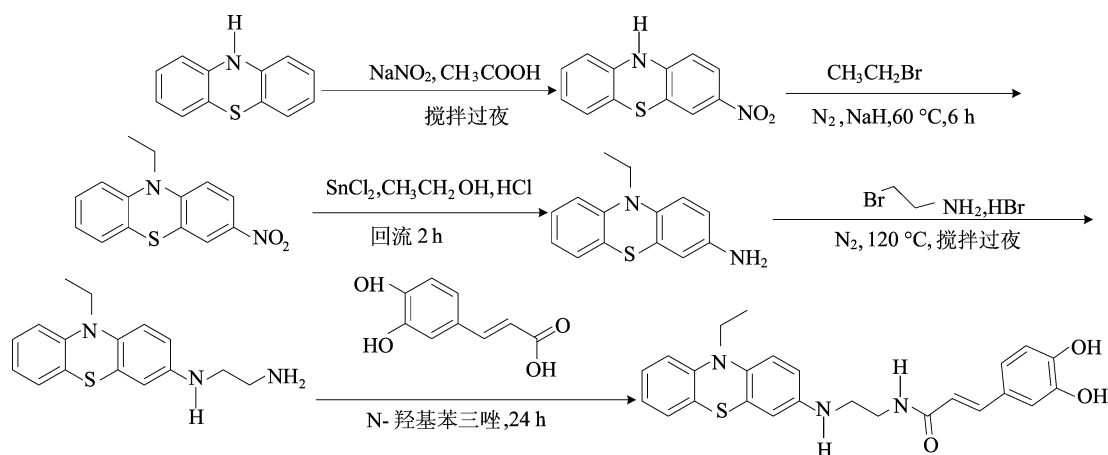


图 1 PTZ-C 的合成路线

1) 3-硝基吩噻嗪的合成。称取吩噻嗪(6 g)溶解于四氢呋喃(30 mL)和乙酸(9 mL)中,置于冰浴条件下搅拌,称取亚硝酸钠(6.48 g)溶解于水(12 mL)中并将其加入到上述吩噻嗪等溶液中,在室温下搅拌过夜,反应完成后,用乙酸乙酯和盐水进行萃取;分离有机层,用无水硫酸镁干燥并通过旋转蒸发仪浓缩,粗产物通过硅胶柱纯化,以乙酸乙酯与正己烷(体积比 1:3)进行洗脱,得到黑色粉末 3-硝基吩噻嗪。

2) 3-硝基-10-乙基吩噻嗪的合成。氮气保护下,称取上述产物 3-硝基吩噻嗪(4.48 g)和氢化

钠(矿物油中 60%分散体,1.204 g)于 200 mL 反应茄瓶中,加入超干 N,N-二甲基甲酰胺(100 mL)和溴乙烷(9.6 mL),60 °C 下搅拌反应 6 h;反应完成后,冷却至室温,用水稀释以沉淀粗产物,粗产物通过硅胶柱纯化,以乙酸乙酯与正己烷(体积比 1:4)进行洗脱,得到深红棕色固体 3-硝基-10-乙基吩噻嗪。

3) 3-氨基-10-乙基吩噻嗪的合成。将上述产物 3-硝基-10-乙基吩噻嗪(2.72 g)、氯化亚锡(13.34 g)、乙醇(30 mL)和盐酸(3.34 g)的混合物加入到 200 mL 蒸馏烧瓶中,溶液在 78 °C 搅拌

反应 2 h; 反应完成后加水 200 mL, 用二氯甲烷萃取, 混合物通过硅胶柱纯化, 以乙酸乙酯与正己烷(体积比 1 : 1) 进行洗脱, 得到棕黄色黏体 3-氨基-10-乙基吩噻嗪。

4) PTZ-NH₂ 的合成。2-溴乙胺氢溴酸盐(0.68 g) 与上述产物 3-氨基-10-乙基吩噻嗪(1.8 g) 在甲苯(50 mL) 中溶解, 混合物在 120 °C 的氮气保护下搅拌过夜, 反应完成后冷却并过滤, 滤液用 20% 氢氧化钠水溶液(100 mL) 洗涤并用二氯甲烷萃取, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤后在旋转蒸发仪减压浓缩, 粗产物通过硅胶柱纯化, 以甲醇与乙酸乙酯(体积比 1 : 4) 进行洗脱, 得到黑色固体 PTZ-NH₂。

5) PTZ-C 的合成。在氩气保护下, 咖啡酸(360.32 mg)、N-羟基苯三唑(270.26 mg) 和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(383.40 mg) 溶解在 4 mL 的 N-N 二甲基甲酰胺和 16 mL 二氯甲烷中; 混合液在 0 °C 下搅拌 30 min, 然后将溶解在 4 mL 的 N-N 二甲基甲酰胺的化合物 PTZ-NH₂ 加入上述混合液中; 所有溶液在 25 °C 下反应 24 h。粗产物通过硅胶柱纯化, 以甲醇与乙酸乙酯(体积比 1 : 10) 进行洗脱, 得到黑绿色固体。核磁共振氢谱(proton nuclear magnetic resonance, ¹H NMR)(600 MHz, DMSO) 表征的 δ ($\times 10^{-6}$) 如下: 9.36 (s, 2H, —OH), 8.09 (s, 1H, —COONH), 7.33 (d, $J=15.4$ Hz, 1H, —CH=CH—), 7.19 (d, $J=7.7$ Hz, 1H, ArH), 7.16 (d, $J=9.3$ Hz, 2H, ArH), 7.05 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, ArH), 7.00 (t, $J=8.0$ Hz, 2H, ArH), 6.91 (s, 1H, ArH), 6.79 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, ArH), 6.71 (s, 1H, ArH), 6.66 (d, $J=7.9$ Hz, 1H, ArH), 6.22 (d, $J=15.7$ Hz, 1H, —COOCH), 6.03 (d, $J=15.3$ Hz, 1H, —NH), 3.89 (q, $J=6.9$ Hz, 2H, —CH₂—), 3.70 (t, $J=21.8$ Hz, 2H, —CH₂—), 3.30 (t, $J=5.6$ Hz, 2H, —CH₂—), 1.26 (t, $J=6.9$ Hz, 3H, —CH₃)。

高分辨质谱(liquid chromatography high-resolution mass spectrometry, HRMS) 表征结果如下: C₂₅H₂₅N₃O₃S [M⁺H]⁺ 的 m/z 计算值为 477.549 3, 其实际值为 477.199 3。

1.3 探针和其他待测物的配制

探针母液的配制。称取一定量的 PTZ-C, 用甲醇溶解得到最终探针浓度为 10 mmol/L 的储备液, 放置于冰箱储存; 后续一系列的测试实验使用 10 mmol/L 储备液稀释相应倍数即可。

活性氧和活性氮溶液的配制。H₂O₂ 和次氯

酸钠溶液(NaClO) 使用分光光度计对所需试剂进行浓度标定, 其中 H₂O₂ 在波长 240 nm 处的摩尔吸光系数为 43.6 L/(mol·cm), NaClO 在波长 292 nm 处的摩尔吸光系数为 350 L/(mol·cm); 通过过氧化叔丁醇(TBHP)、硝普纳和超氧化钾相应的物质的量配制所需浓度的 TBHP、一氧化氮自由基(NO·) 和 O₂⁻· 溶液; ¹O₂ 溶液需要称取适量钼酸钠溶解在去离子水中得到浓度为 50 mmol/L 的溶液, 然后与浓度为 500 mmol/L 的 H₂O₂ 溶液混合制得浓度为 50 mmol/L 的 ¹O₂ 溶液, 可根据后续测试的需要进行相应稀释。

金属离子溶液的配制。分别称取一定量的氯化钡、氯化钙、硫酸镁、硫酸锰、硫酸钴、氯化铜、氯化钾、氯化钠、亚硝酸钠、硝酸锌、硫酸亚铁、硫化钠和乙酸铅固体, 溶解于超纯水中制得浓度为 20 mmol/L 的溶液。可根据后续测试的需要进行相应稀释。

氨基酸溶液的配制。称取一定量的脯氨酸、甘氨酸、谷氨酸、天门冬氨酸、半胱氨酸、胱氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸和丝氨酸固体, 溶解于超纯水中制得浓度为 20 mmol/L 的溶液。可根据后续测试的需要进行相应稀释。

1.4 PTZ-C 光谱性能测试方法

如无特别说明, 以下测试将探针母液用甲醇与 pH 值 7.4 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS) 以体积比 9 : 1 混合后稀释至相应浓度。按照相应操作后使用荧光分光光度计进行测量, 除特别说明外, 所有荧光测试条件如下: 探针的激发波长为 370 nm, 激发和发射狭缝均为 10 nm。光谱性能分析中: F_0 为单独的 PTZ-C 空白组的荧光强度; F 为在相应分析物存在下 PTZ-C 的荧光强度。

1.4.1 浓度滴定实验

向终浓度为 5 μ mol/L 的探针溶液中加入不同浓度的 O₂⁻· 溶液, 使用荧光分光光度计检测荧光强度。最低检测限根据公式 $L=3\sigma/k$ 计算, 其中: σ 为未加 O₂⁻· 测得空白样的标准偏差; k 为荧光强度与 O₂⁻· 浓度线性曲线的斜率。

1.4.2 荧光探针与 O₂⁻· 的反应动力学测试

向终浓度为 10 μ mol/L 的探针溶液中加入一定当量的 O₂⁻· 溶液, 立刻使用荧光分光光度计进行荧光光谱检测, 记录其在 470 nm 处荧光强度, 后续每隔 15 s 检测 4 次并记录后, 再间隔 1 min 检测 10 次并记录荧光强度。

1.4.3 选择性和抗干扰性测试

在检测液中分别加入一定当量的以下 27 种干扰物质:氯化钡、氯化钙、硫酸镁、硫酸锰、氯化钴、氯化铜、氯化钾、氯化钠、亚硝酸钠、硝酸锌、硫酸亚铁、硫化钠、乙酸铅、脯氨酸、甘氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、胱氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、丝氨酸、NaClO、H₂O₂、TBHP、NO·、¹O₂,使用荧光分光光度计分别记录混合溶液荧光光谱。抗干扰性测试实验是在检测液中加入一定当量的各种干扰物质后,再向混合的测试液中加入 O₂^{-·},使用荧光分光光度计记录荧光强度的变化。

1.4.4 pH 值滴定实验

使用 1 mol/L 氢氧化钠水溶液或 1 mol/L 的盐酸来调节 pH 值为 7.4 的 PBS 来配制不同 pH 值(3~12)的缓冲液。荧光检测分为 2 组:一组在测试时取 10 μL 储备液,与 1 mL 不同 pH 值的缓冲液用水定容至 2 mL;另一组测试是在前者的基础上,再加入一定体积的 O₂^{-·} 溶液后用水定容至 2 mL。

1.5 细胞毒性实验

细胞毒性实验采用 MTT (3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐)法。细胞存活率计算公式为 $C = (A/B) \times 100\%$,其中:A 为样品处理后的吸光度值;B 为空白对照组的吸光度值。探针 PTZ-C 对 O₂^{-·} 的细胞成像分为 3 组:① 对照组,将探针孵育到细胞上,0.5 h 后用 PBS 洗涤 3 次,再加入 PBS 继续孵育 0.5 h 后进行成像;② 细胞用 1 μg/mL 脂多糖(LPS)和 5 μg/mL 佛波醇 12-十四酸酯 13-乙酸酯(PMA)孵育 0.5 h 后,用 PBS 洗涤 3 次,再孵育探针 0.5 h 进行成像;③ 细胞用 1 μg/mL LPS 和 5 μg/mL PMA 孵育 0.5 h 后,用 PBS 洗涤 3 次,加入 200 μmol/L 的钛试剂(超氧化物清除剂)孵育 1 h 后再用 PBS 洗涤 3 次,加入探针 PTZ-C 孵育细胞 0.5 h,用 PBS 洗涤 3 次后用荧光显微镜成像。

2 结果与讨论

2.1 PTZ-C 与 O₂^{-·} 反应前、后的光谱分析

PTZ-C 与 O₂^{-·} 反应前、后的光谱图如图 2 所示。由图 2a 可知,PTZ-C 在大约 327 nm 处有一个最强吸收峰,归属于探针分子中的咖啡酸单元^[23],与 O₂^{-·} 反应后,咖啡酸瞬间氧化为邻苯二醌,因此该波长的最大吸收度值略有增加。从图 2b 可以看出,与单独的 PTZ-C 相比,加入 O₂^{-·} 后 470 nm 处的荧光强度显著增强,即加入 O₂^{-·} 前、

后 PTZ-C 的光谱变化较明显,说明 PTZ-C 探针是一种比较灵敏的 O₂^{-·} 响应型探针。

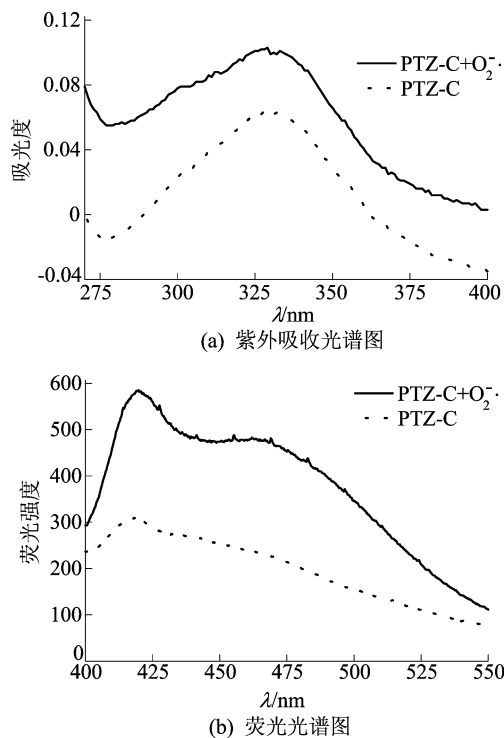
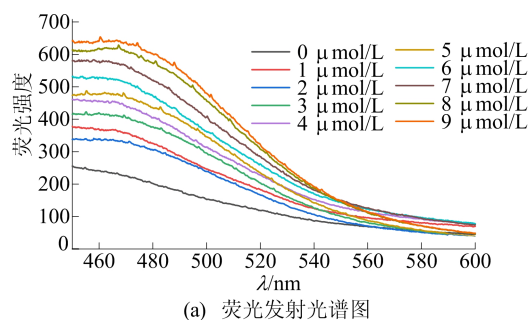


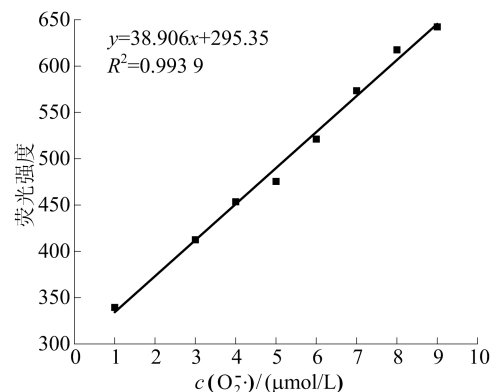
图 2 PTZ-C 与 O₂^{-·} 反应前、后的光谱图

2.2 PTZ-C 与超氧阴离子的荧光响应关系

PTZ-C 对不同浓度 O₂^{-·} 荧光响应能力的影响如图 3 所示。



(a) 荧光发射光谱图



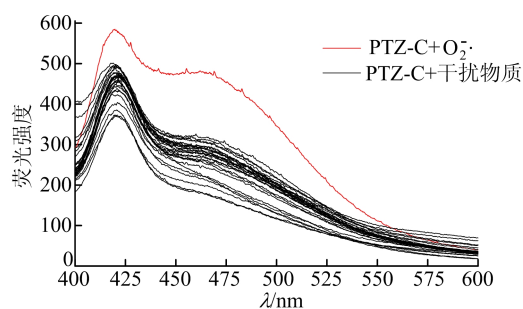
(b) 470 nm 处荧光强度与 O₂^{-·} 浓度线性关系

图 3 PTZ-C 与 O₂^{-·} 的荧光响应关系曲线

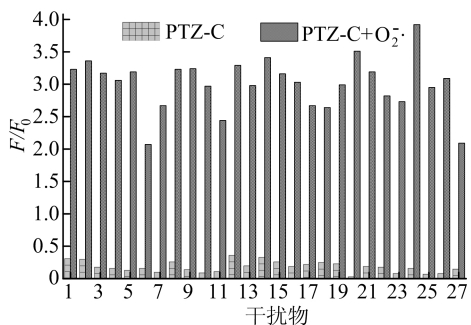
从图 3 可以看出,随着 $O_2^{\cdot-}$ 浓度的增加,PTZ-C 在 470 nm 处的荧光强度逐渐增强,PTZ-C 在 470 nm 处的荧光强度符合线性关系方程 $y=38.906x+295.35$,其中 $O_2^{\cdot-}$ 浓度范围为 $0\sim 9\ \mu\text{mol/L}$,线性相关系数为 0.993 9,计算出检测限为 12.8 nmol/L。

2.3 PTZ-C 的选择性分析

PTZ-C 对 $O_2^{\cdot-}$ 和其他干扰物质的选择性如图 4 所示。



(a) PTZ-C 在不同物质存在下的荧光响应谱图



(b) PTZ-C 在 470 nm 处的荧光强度

图 4 PTZ-C 的选择性分析

图 4 横坐标 1~27 分别表示氯化钡、氯化钙、硫酸镁、硫酸锰、氯化钴、氯化铜、氯化钾、氯化钠、亚硝酸钠、硝酸锌、硫酸亚铁、硫化钠、乙酸铅、脯氨酸、甘氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、胱氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、丝氨酸、NaClO、 H_2O_2 、TBHP、 $NO\cdot$ 、 1O_2 。本文检测了 PTZ-C 对生物环境中可能产生干扰的物质的荧光反应,包括 ROS、活性氮、金属离子和氨基酸类物质。由图 4a 可知,加入干扰物后,PTZ-C 的荧光强度几乎没有变化,而添加 $O_2^{\cdot-}$ 后,PTZ-C 的荧光强度显著增强。进一步研究体系在其他干扰物质与 $O_2^{\cdot-}$ 共存情况下的荧光响应,如图 4b 所示,可以看出,存在其他物质时,加入 $O_2^{\cdot-}$ 后在 470 nm 处荧光强度依旧增强,没有明显的影响。结果表明,存在其他物质时,PTZ-C 对 $O_2^{\cdot-}$ 依旧表现出较好的荧光响应。

2.4 pH 值对 PTZ-C 与超氧阴离子反应的影响

PTZ-C 在不同 pH 值下 470 nm 处的荧光强度变化情况如图 5 所示,发现单独的 PTZ-C 荧光强度在一定 pH 值范围内基本上是稳定的,在加入 $O_2^{\cdot-}$ 后,在酸性条件下于 470 nm 处的荧光强度低于在中性和碱性条件下的,并且 pH 值为 8 时,荧光强度达到最大。结果表明,PTZ-C 可以在广泛的生理条件(pH 值为 6~8)下对 $O_2^{\cdot-}$ 响应。

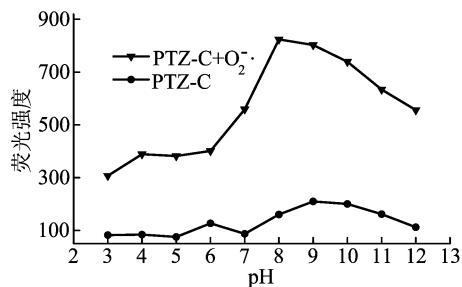


图 5 PTZ-C 与 $O_2^{\cdot-}$ 反应前、后不同 pH 值下的荧光强度

2.5 PTZ-C 与 $O_2^{\cdot-}$ 反应的稳定性分析

PTZ-C 与 $O_2^{\cdot-}$ 反应前、后的稳定性如图 6 所示,可看出单独的 PTZ-C 和 PTZ-C + $O_2^{\cdot-}$ 的反应产物都是稳定的。加入 $10\ \mu\text{mol/L}$ 的 $O_2^{\cdot-}$ 后,在 470 nm 处显示出对 $O_2^{\cdot-}$ 的强发射荧光,约 5 s 内达到平台期,同时在 470 nm 处的荧光强度在 10 min 内几乎保持不变,结果表明 PTZ-C 的稳定性较好。

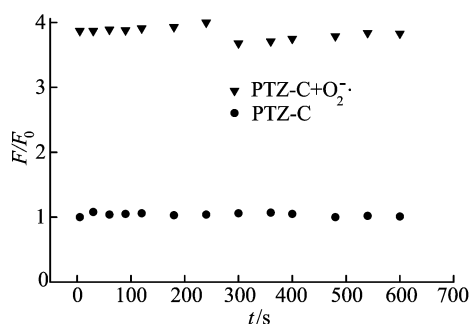


图 6 PTZ-C 与 $O_2^{\cdot-}$ 反应前、后的荧光强度稳定性

2.6 PTZ-C 的可逆性分析

以咖啡酸基团作为 $O_2^{\cdot-}$ 的响应位点时,强荧光的邻苯二酚(电子供体)会转化为弱荧光的邻苯二醌(电子受体),而抗坏血酸(还原性物质)可将探针从邻苯二醌转化为邻苯二酚,并恢复荧光,并且该氧化还原反应具有良好的可逆性。因此,本文研究了 PTZ-C 的可逆性,如图 7 所示。在

370 nm激发下,加入 $O_2^{\cdot-}$ 可在 470 nm 处观察到荧光强度的显著增强,加入抗坏血酸后荧光强度明显减弱。在相同条件下,可实现至少 3 次可逆循环,荧光效率损失很小。结果表明,PTZ-C 对交替加入 $O_2^{\cdot-}$ 和抗坏血酸表现出可逆的开关型和瞬时型荧光响应。

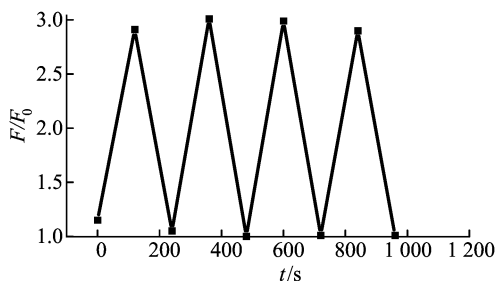


图7 PTZ-C的可逆性

2.7 PTZ-C 的细胞毒性分析

本文研究了 PTZ-C 在 RAW264.7 细胞中的荧光成像,细胞内源性成像前采用 MTT 法来评估 PTZ-C 在细胞中的毒性,结果如图 8 所示。

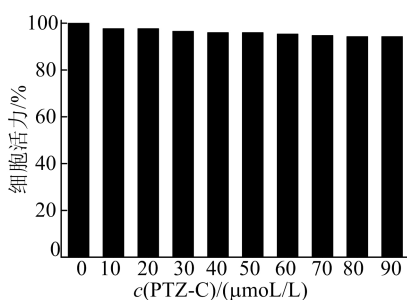


图8 PTZ-C 浓度对 RAW264.7 细胞毒性的影响

从图 8 可以看出,PTZ-C 的浓度达到 $90 \mu\text{mol/L}$ 时仍有 96% 细胞存活,说明 PTZ-C 对细胞具有低毒性,可以用作荧光传感器成像活细胞中的 $O_2^{\cdot-}$ 水平。

PTZ-C 的内源性成像测试结果如图 9 所示。

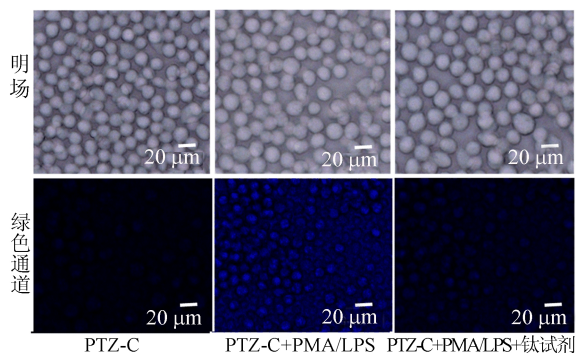


图9 PTZ-C 对 RAW264.7 细胞的荧光成像结果

从图 9 可以看出,仅用 PTZ-C 处理的

RAW264.7 细胞在荧光显微镜下无明显荧光,而用 LPS 和 PMA 处理后的细胞发出强烈的荧光,这是由于 LPS 和 PMA 会诱导细胞产生炎症反应,从而增强了细胞中 $O_2^{\cdot-}$ 的释放。相比之下,用钛试剂处理后导致 PMA 诱导的强蓝色荧光强度显著降低,结果表明 TPZ-C 成功实现了对 RAW264.7 细胞的内源性成像。

3 结 论

本文设计并合成的荧光探针 PTZ-C 以咖啡酸为反应位点,用于选择性检测。该探针首先能够特异性识别 $O_2^{\cdot-}$,明显区别于其他多种干扰物质,并且在其他干扰物质存在下依然对 $O_2^{\cdot-}$ 保持强烈响应;其次能够对 $O_2^{\cdot-}$ 做出即时响应,并且 pH 值波动不影响 PTZ-C 在 470 nm 处的荧光强度,能够实现对 $O_2^{\cdot-}$ 和抗坏血酸可逆动态荧光成像;PTZ-C 在细胞中的细胞毒性很小,可成功应用于 RAW 264.7 巨噬细胞的内源性成像。结果表明,PTZ-C 在生物领域中具有较为广泛应用的可能性,并为未来设计对 $O_2^{\cdot-}$ 响应的探针提供了一些思路。

[参 考 文 献]

- [1] ZHOU J, JANGILI P, SON S, et al. Fluorescent diagnostic probes in neurodegenerative diseases[J]. *Advanced Materials*, 2020, 32(51): e2001945.
- [2] WEI H, WANG Y, CHEN Q X, et al. Development of an endoplasmic reticulum-targeting fluorescent probe for the imaging of superoxide anion in living cells[J]. *Journal of Fluorescence*, 2023, 33(2): 509-515.
- [3] MA S H, MA Y Y, LIU Q L, et al. A two-photon fluorescent probe with lysosome targetability for imaging endogenous superoxide anion in living cells, zebrafish and pneumonia tissue[J]. *Sensors and Actuators B(Chemical)*, 2021, 332: 129523.
- [4] CURIESES ANDRÉS M C, PEREZ DE LA LASTRA J M, JUAN C A, et al. Superoxide anion chemistry: its role at the core of the innate immunity[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(3): 1841.
- [5] WANG T, SHAH I, YANG Z M, et al. Incorporating thiourea into fluorescent probes: a reliable strategy for mitochondrion-targeted imaging and superoxide anion tracking in living cells[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(3): 2824-2829.
- [6] XIAO H B, ZHANG W, LI P, et al. Versatile fluorescent probes for imaging the superoxide anion in living cells and *in vivo* [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(11): 4216-4230.

(下转第 523 页)

- mono-aza-Michael addition reactions of piperazine[J]. *Monatshfte für Chemie-Chemical Monthly*, 2015, 146(4): 653-661.
- [17] 陈国松,张莉莉. 分析化学[M]. 2 版. 南京:南京大学出版社, 2014.
- [18] 郑争志,荆丹琳,赵旭东,等. HPP-H₂O-Na₂SO₄ 双水相液相平衡的测定及 NRTL 方程关联[J]. *高校化学工程学报*, 2017, 31(6): 1259-1266.
- [19] ASADBEGI S, FARZIN M, NOSRATZEDEGAN K, et al. Propylene oxide ring opening with aniline: a combined experimental and DFT theoretical calculation study[J]. *Organic Chemistry An Indian Journal*, 2015, 11(5): 192-198.
- [20] 张治国,尹红. 环氧乙烷环氧丙烷开环聚合反应动力学研究[J]. *化学进展*, 2007, 19(4): 575-582.
- [21] 刘玉梅,安然,陈圣新,等. 环氧化合物亲核开环反应过程强化研究进展[J]. *化工进展*, 2020, 39(12): 4877-4895.
- [22] CHEN S, ZENG G, LI Y, et al. Epoxide ring-opening reaction promoted by ionic liquid reactivity: interplay of experimental and theoretical studies [J]. *Catalysis Science & Technology*, 2019, 9(20): 5567-5571.
- [23] AZIZI N, SAIDI M R. Highly chemoselective addition of amines to epoxides in water [J]. *Organic Letters*, 2005, 7(17): 3649-3651.

(责任编辑 闫杏丽)

(上接第 517 页)

- [7] NETHERTON J K, HETHERINGTON L, OGLE R A, et al. Mass spectrometry reveals new insights into the production of superoxide anions and 4-hydroxynonenal adducted proteins in human sperm[J]. *Proteomics*, 2020, 20(2): e1900205.
- [8] OLOWE R, SANDOUKA S, SAADI A, et al. Approaches for reactive oxygen species and oxidative stress quantification in epilepsy[J]. *Antioxidants*, 2020, 9(10): 990.
- [9] OBENG E, DING F, HE X J, et al. Bioimaging of superoxide anions in living cells and *in vivo*: perfect visualization with fluorescence probes and their applications[J]. *Dyes and Pigments*, 2022, 199: 109964.
- [10] XU C, ZHANG W, WANG R X, et al. Versatile gold-coupled Te-carbon dots for quantitative monitoring and efficient scavenging of superoxide anions [J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(26): 9111-9118.
- [11] WANG Y, WANG D, SUN L H, et al. BC @ DNA-Mn₃(PO₄)₂ nanozyme for real-time detection of superoxide from living cells [J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(24): 15927-15935.
- [12] CHEN L Y, LU X, XIAO F P, et al. A sensitive and selective fluorescence probe for the detection of superoxide radical anion *in vivo* based on a protection-deprotection process[J]. *Dyes and Pigments*, 2021, 194: 109614.
- [13] NGUYEN V N, HA J, CHO M, et al. Recent developments of bodipy-based colorimetric and fluorescent probes for the detection of reactive oxygen/nitrogen species and cancer diagnosis [J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2021, 439: 213936.
- [14] WANG Y C, HAN J Y, XU Y Z, et al. Taking advantage of the aromatisation of 7-diethylamino-4-methyl-3, 4-dihydrocoumarin in the fluorescence sensing of superoxide anion [J]. *Chemical Communications*, 2020, 56 (68): 9827-9829.
- [15] WANG Y, WANG X Y, ZHANG L, et al. A ratiometric fluorescent probe for detecting the endogenous biological signaling molecule superoxide anion and bioimaging during tumor treatment [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2020, 8(5): 1017-1025.
- [16] JIAO S, ZHAI J J, YANG S, et al. A highly responsive, sensitive NIR fluorescent probe for imaging of superoxide anion in mitochondria of oral cancer cells [J]. *Talanta*, 2021, 222: 121566.
- [17] YING W W, DONG F X, SHI Y F, et al. Superoxide anion monitoring in epileptic brains with a near-infrared fluorescent probe[J]. *Dyes and Pigments*, 2023, 213: 111155.
- [18] ZARIC B L, MACVANIN M T, ISENOVIC E R. Free radicals: relationship to human diseases and potential therapeutic applications [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2023, 154: 106346.
- [19] 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 (O₂^{-•}) in live cells and zebrafishes [J]. *Talanta*, 2021, 225: 122020.
- [20] GONG Y Y, YANG M Y, LV J J, et al. A 1, 2-dioxetane-based chemiluminescent probe for highly selective and sensitive detection of superoxide anions *in vitro* and *in vivo* [J]. *ChemPlusChem*, 2022, 87(4): e202200054.
- [21] WANG S Y, LIU J R, JU Z H, et al. Simultaneous two-photon intravital imaging of viscosity and superoxide radical anion by a styrylpyridinium-based fluorescent probe [J]. *Sensors and Actuators B(Chemical)*, 2023, 381: 133470.
- [22] YE Y X, PAN J C, CHEN X Y, et al. A new mitochondria-targeted fluorescent probe for exogenous and endogenous superoxide anion imaging in living cells and pneumonia tissue [J]. *Analyst*, 2022, 147(15): 3534-3541.
- [23] DING Q, TIAN Y, WANG X, et al. Oxidative damage of tryptophan hydroxylase-2 mediated by peroxisomal superoxide anion radical in Bbrains of mouse with depression [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(49): 20735-20743.

(责任编辑 闫杏丽)