

# 检测活性氧的荧光探针新进展

章舒祺 魏永锋

(西北大学化学与材料科学学院 西安市太白北路 229 号 710069)

**摘 要** 活性氧对于人体是十分重要的。然而,过量的活性氧是相当有害的,它们会对人体产生氧化损伤,导致细胞死亡。活性氧现在已经引起了化学、生物、医药等多个领域学者的浓厚兴趣,它们被认为和多种病理条件有密切的联系。由于活性氧寿命短、反应活性高,并且大部分都存在于体内很难被捕获,因此它们的分析测定是一项国际性难题。荧光探针作为活性氧的高灵敏的检测分析物,已经得到越来越广泛和深入的研究。由于每一种活性氧都有它独特的生理学活性,因此设计高选择性的、能够检测具体一种活性氧的荧光探针分子就显得十分重要。本文主要对近三年来检测单线态氧、过氧化氢、超氧阴离子和羟自由基这四种活性氧的荧光探针的研究进展进行综述,关注这类荧光探针的检测机理以及具体应用。

**关键词** 荧光探针; 活性氧; 单线态氧; 过氧化氢; 超氧阴离子; 羟自由基; 综述

中图分类号: O 657. 32 文献标识码: A 文章编号: 1004-8138(2009)04-0794-09

## 1 前言

活性氧,顾名思义,就是比起普通的氧分子,它们有着更高的氧化还原活性<sup>[1]</sup>。活性氧不仅包括一些自由基,如羟自由基( $\cdot\text{OH}$ ),超氧阴离子( $\text{O}_2^- \cdot$ ),过氧羟自由基( $\cdot\text{HO}_2$ ),过氧自由基( $\text{ROO} \cdot$ )和烷氧基( $\text{RO} \cdot$ ),也包括了一些非自由基,即过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ ),单线态氧( $^1\text{O}_2$ )和次氯酸( $\text{HOCl}$ )<sup>[2]</sup>。根据定义,自由基是一些能够独立存在的,具有一个或多个未成对电子的原子或分子。当两个电子自旋方向相反,成对在同一个轨道上,那么它们就更加稳定。因此,自由基通常比非自由基更不稳定,有更强的反应活性。

现在所知,一些有害的因素,如杀虫剂,传染病,污染,紫外线,吸烟和辐射等,都可能导致活性氧的产生<sup>[3,4]</sup>。人体内自发产生的适量的活性氧是相当重要的,它们涵盖了不同的生命活动,诸如在信号转换,神经传递,肌肉舒展放松及蠕动,血小板凝集,血压调节,免疫系统控制,学习和记忆,能量产生,细胞常规生长,重要的生命化合物的合成和机体的新陈代谢中,都发挥了重要的作用<sup>[5-7]</sup>。然而,当活性氧产生过量,或是机体自身的抗氧化剂的量大量减少时,活性氧就变得相当有害了。它们通过氧化生物分子,使得细胞脂质膜,蛋白质组织,酶,碳水化合物和DNA等氧化损伤,造成细胞损坏或死亡<sup>[8-10]</sup>。总之,在一般细胞环境中,活性氧对于生命体是必不可少的,但过量的活性氧就会造成危害。

由于活性氧与这么多生命活动相联系,因此需要一种高灵敏的具体的工具来更深入的观察和了解它们的作用机制。然而,活性氧本身寿命相当短,反应活性高,且存在于体内难以被捕获,因此很难被检测。采用荧光方法,选择合适的荧光探针,是克服这些障碍的很好方法。由于荧光探针具有很高的灵敏性,数据采集和提供目标生物分子瞬时和空间信息的能力,使得它能够很好地接近并

联系人,手机: (0)13891897707; E-mail: z\_suqi@sohu.com

作者简介: 章舒祺(1984—),男,杭州市人,硕士,主要从事天然产物分离与分析的研究工作。

收稿日期: 2008-12-29; 接受日期: 2009-02-19

测量活性氧。我们可以利用荧光探针来实时检测活性细胞内目标生物分子的行为。

由于每种活性氧都有它各自独特的生理活性, 因此就需要更多新型的能够高选择性地检测单独某种活性氧的荧光探针。合成这一类荧光探针也就成为现在一个很活跃的研究领域<sup>[6]</sup>。

本文主要对近三年来相关文献作了综述, 介绍了检测单线态氧, 过氧化氢, 超氧阴离子和羟自由基的荧光探针的设计、作用机制、应用等方面的最新研究进展。根据对应的目标活性氧, 对荧光探针作了分类。

## 2 检测单线态氧的荧光探针

许多测定单线态氧的荧光探针都是和单线态氧反应生成内过氧化物。例如, Nagano 小组之前就报道过两种基于此反应原理的荧光探针 DPAX (图 1a)<sup>[11]</sup>和 DMAX (图 1b)<sup>[12]</sup>, 它们都和单线态氧反应生成荧光增强的内过氧化物 DPAX-EP 和 DMAX-EP。Tan 等合成了一种新型的测定单线态氧的荧光探针 PATA-Tb<sup>3+</sup> (图 1c)。它是 Tb<sup>3+</sup> 的螯合物, 本身没有荧光, 但和单线态氧作用后, 即生成了有强荧光的内过氧化物, 可以用它来进行时间分辨荧光测量<sup>[13]</sup>。Naito 等用弱荧光物质 TDI (图 1d) 作为荧光探针, 由于它和单线态氧通过内过氧化反应重排后生成一种强荧光物质, 故用它来实时监测 T D<sub>2</sub> 光催化产生的单线态氧<sup>[14]</sup>。

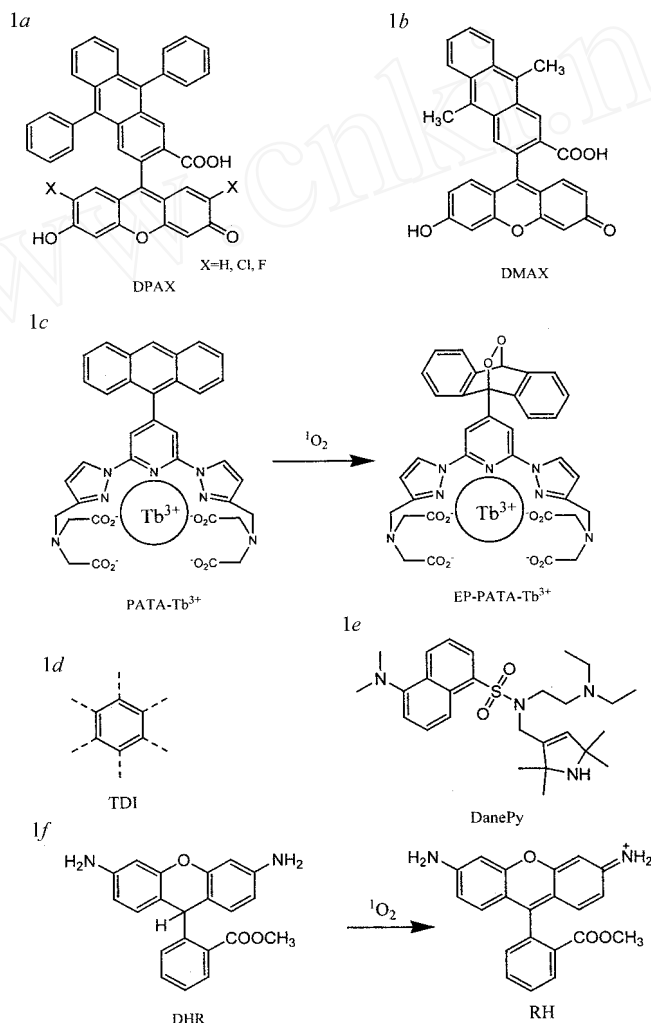


图 1 检测单线态氧的荧光探针

除此之外,周静等用海萤荧光素类似物(FCLA)作为一种高灵敏检测单线态氧的化学发光探针,用光谱法研究了FCLA与人血清白蛋白(HSA)的结合反应,发现FCLA对HSA的荧光有很强的猝灭作用,阐明了FCLA的运输过程及其在体内的作用机制<sup>[15]</sup>。A gati等用DanePy(图1e)作为检测单线态氧的荧光探针,来测定植物中线粒体内的黄酮类物质清除单线态氧的能力<sup>[16]</sup>。Costa等报道了以物质DHR(图1f)作为检测单线态氧的荧光探针,将其应用于设计的体系当中,比较了抗坏血酸、青霉胺、半胱氨酸、乙酰半胱氨酸、蛋氨酸和叠氮化钠等物质清除单线态氧能力。DHR本身没有荧光,它与单线态氧结合后,就生成具有强荧光性质的RH<sup>[17]</sup>。

### 3 检测过氧化氢的荧光探针

DCFH-DA (2, 7-Dichlorodihydrofluorescein diacetate) 是一种无荧光的物质,可转换成 DCF (2, 7-Dichlorofluorescein), 即二氯荧光素,后者具有强烈的荧光(图2a)。早在1938年, Schales等就用氯化荧光素溶液来测定过氧化氢。后来其应用不断扩大,陆续有人用于H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、NO等检测,并对其应用、特异性等作了广泛而深入的探讨<sup>[18]</sup>。杨泽福等以2, 7-Dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) 作为荧光探针对细胞内的活性氧产物进行检测,探讨了活性氧在致心肌细胞肥大时同时促进心肌细胞分泌内皮素的作用<sup>[19]</sup>。钟蓓华等用荧光探针DCF-DA测定细胞内过氧化氢的水平,反映心肌损伤及氧化活性物质的生成情况,来观察辛伐他汀对过氧化氢损伤的心肌细胞的保护作用,阐明此作用与其诱导心肌抗氧化酶活性、减少氧活性物质的生成的关系<sup>[20]</sup>。田芳等用荧光探针DCFH-DA作为荧光信号标记物捕获细胞内活性氧,设置了两种反应体系来探讨 $\alpha$ -硫辛酸对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导中国仓鼠肺细胞的活性氧水平以及DNA氧化损伤的影响<sup>[21]</sup>。L abieniec等用DCFH-DA作为荧光探针,测定了珠蚌消化腺细胞中的多酚类化合物对活性氧的清除能力,证明了这类多酚化合物既可以作为有效的活性氧清除剂,又能作为氧化强化剂<sup>[22]</sup>。孙蓉等以DCFH-DA作为细胞内荧光探针,通过测定细胞内活性氧浓度和线粒体跨膜电位深入研究芍药苷抗凋亡作用的机制<sup>[23]</sup>。W en等以DCFH<sub>2</sub>-DA作为荧光探针,阐明了高能量的蓝光能够诱导质膜和线粒体产生过氧化氢的机制<sup>[24]</sup>。Kolla等也以DCFH<sub>2</sub>-DA作为荧光探针,证明了过氧化氢是诱导芥菜气孔关闭的必要的第二信使<sup>[25]</sup>。另外,Orhan等其他一些研究小组也将这类荧光探针应用到化学、生物、医药等其它方面<sup>[26-36]</sup>。

但是这一类化合物对过氧化氢的选择性比较差, DCFH及其衍生物的荧光响应是一种氧化机理,不仅仅对细胞内过氧化氢有响应,而且对其他的氧化物质亦有响应。故吴朝阳和M iller等人几乎同时合成并报道了一种新型的荧光探针。他们对DCFH-DA这类荧光探针作了修饰及改进,合成了3, 6-对戊酰硼荧光素(PF1)(图2b)。它是一种基于去保护机理的高灵敏H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>荧光增强化合物,能灵敏地检测出样品中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的含量<sup>[37, 38]</sup>。刘磊等人利用该种探针,结合超氧化物歧化酶(SOD)的选择性催化歧化反应条件,建立了一种超氧阴离子的酶催化荧光分析方法<sup>[39]</sup>。M iller等人还合成了另两种该类探针 Peroxyresorufin-1 (PR1)(图2c)和 Peroxyxanthone-1 (PX1)(图2d)<sup>[38]</sup>。A lbers等也设计合成了一种这类基于发射红光的萘荧光素类探针Naphtho-Peroxyfluor-1 (NPF1)(图2e),它也能高选择性地检测过氧化氢。A lbers等用它来评价肝脏细胞的过氧化水平<sup>[40]</sup>。在此基础上, Dickinson等又合成了另一种检测过氧化氢的荧光探针M itochondria peroxy yellow 1 (M itoPY1)(图2f),可以用它来对肝脏细胞中的线粒体产生的过氧化氢进行成像检测<sup>[41]</sup>。同时,该小组还合成了一种特定检测过氧化氢的荧光探针 Peroxy Lucifer 1 (PL1)(图2g)。Srikun等通过它来肉眼观察活体内对受到食菌细胞刺激而产生的局部过氧化氢浓度的变化<sup>[42]</sup>。

另外, Du等人以7-羟基香豆素作为荧光团,设计并合成了一种对过氧化氢有高选择性测量的新型水溶性荧光探针(图2h)。该探针本身只有很弱的荧光性质,但和过氧化氢结合反应后,即生成了强荧光的7-羟基香豆素<sup>[43]</sup>。A m atatongchai等以9, 10-Bis-(phenylethynyl) anthracene (BPEA)(图2i)作为荧光探针,采用化学发光微流体检测系统,对一些食物和药物清除过氧化氢的能力作了筛选<sup>[44]</sup>。He等用PFP-NM e<sub>3</sub><sup>+</sup>这种阳离子共轭聚合物作为荧光探针,用来检测葡萄糖被葡萄糖氧化酶所催化氧化产生的过氧化氢的量,从而间接的测定葡萄糖的含量<sup>[45]</sup>。

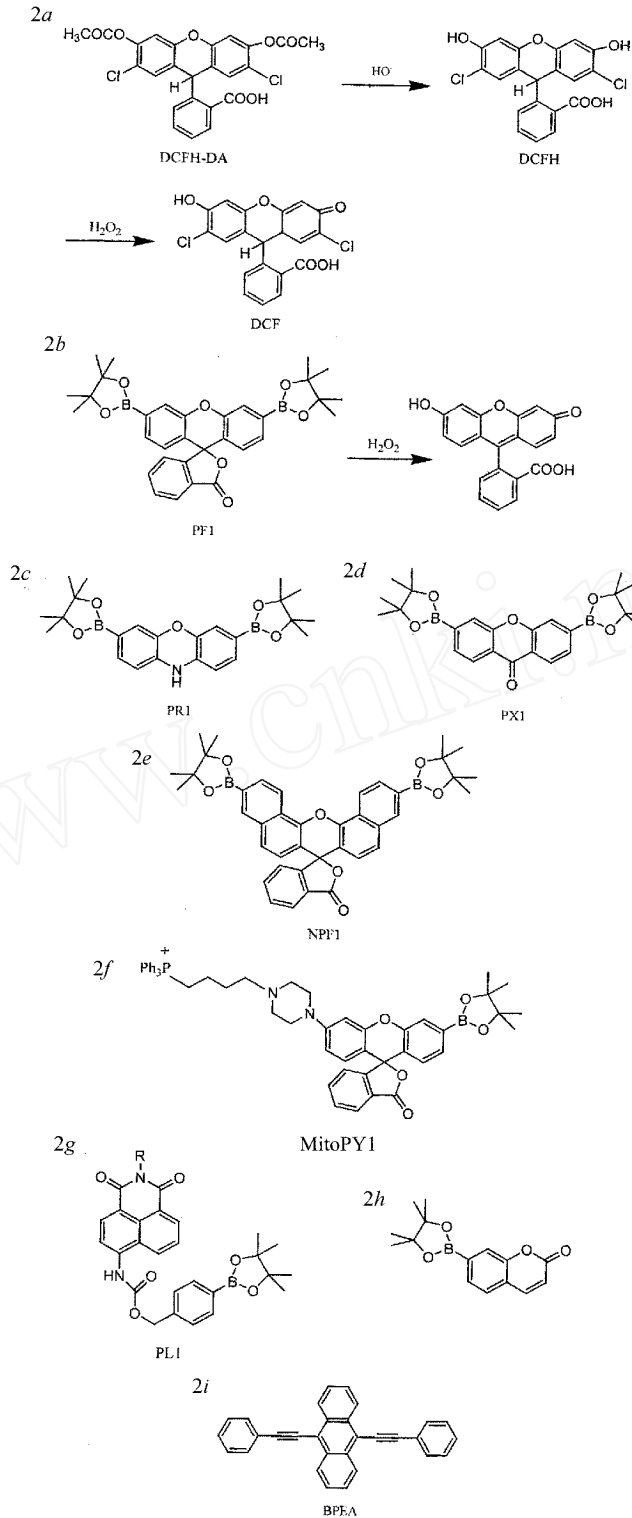


图 2 检测过氧化氢的荧光探针

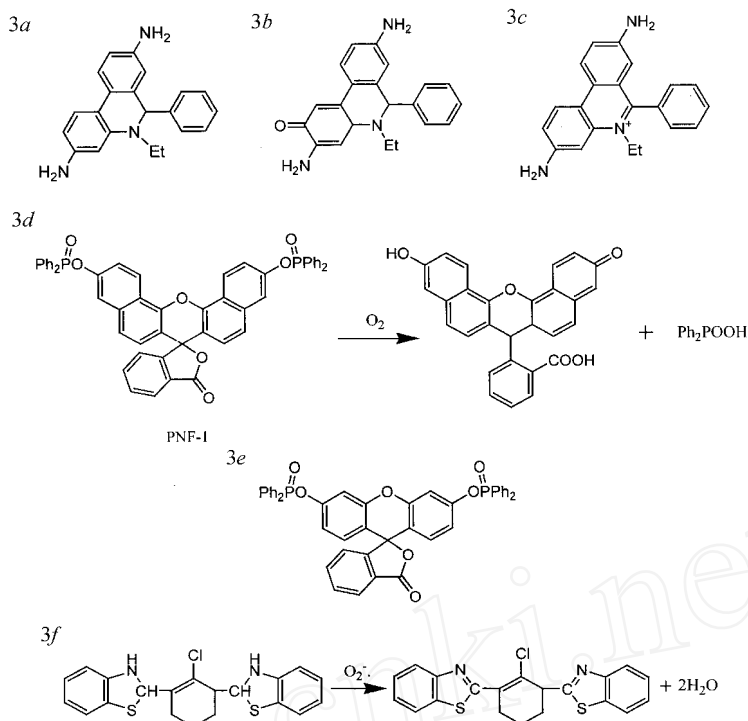


图 3 检测超氧阴离子的荧光探针

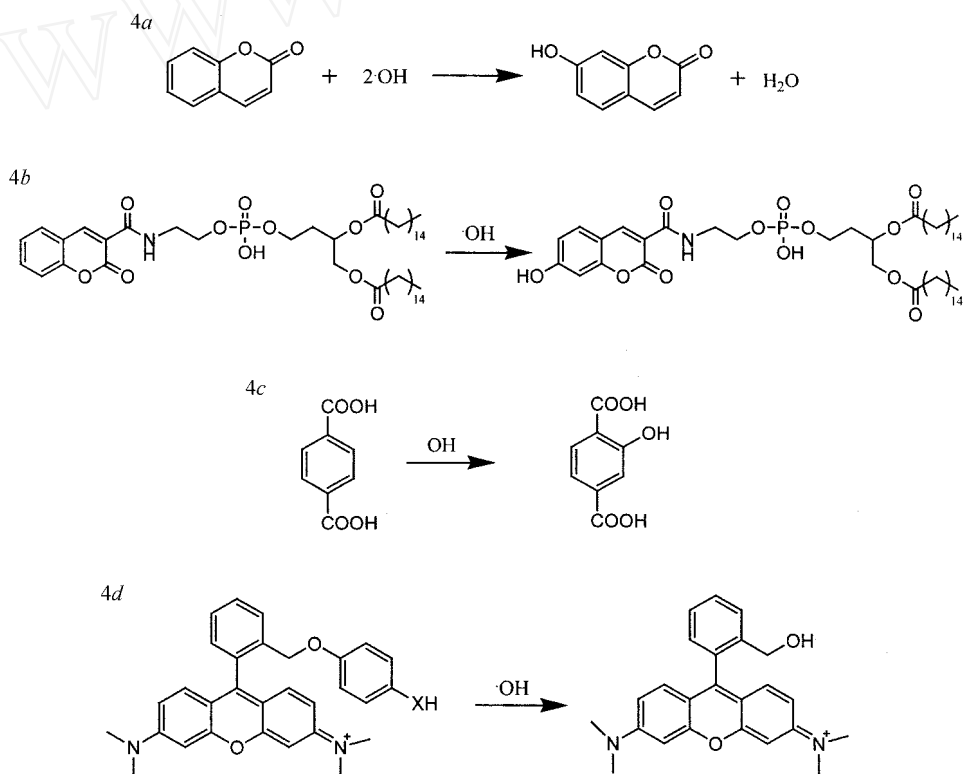


图 4 检测羟自由基的荧光探针

## 4 检测超氧阴离子的荧光探针

Hydroethidine (HE) (图 3a) 被认为是一种选择性和灵敏性都很好的超氧阴离子的荧光探针。张霞等人应用超氧阴离子荧光探针 HE 标记脾脏淋巴细胞, 探讨了蕨麻多糖对体外培养的小鼠脾脏淋巴细胞 NADPH 氧化酶活性的影响<sup>[46]</sup>。Yamaura 等也利用 PE 作为荧光探针来检测着色细胞内的过氧化物产生的超氧阴离子<sup>[47]</sup>。Novitskiy 等用该探针通过化学发光法来测定甲醇和甲醛对于白鼠星型肝脏细胞产生的超氧阴离子的作用效果<sup>[48]</sup>。在此基础上, Robinson 等人合成了 Mito-HE (图 3b), 它也是一类基于溴乙非啶的检测超氧阴离子的荧光探针。比起 HE, 它具有更长的激发波长, 故将其运用于细胞内检测时, 对细胞的损伤更小<sup>[49]</sup>。最近, Zhu 等利用另一种该类物质二氢乙锭 (DHE) (图 3c), 作为超氧阴离子的荧光探针, 通过微流体芯片凝胶电泳法, 来检测个体 HepG2 细胞中超氧阴离子的量<sup>[50]</sup>。

PNF-1 是一种能高选择性测定超氧阴离子的红色荧光探针, 它可以穿过细胞膜, 用于生物体内的检测。它本身没有荧光, 但和超氧阴离子作用后就会生成强荧光的物质 (图 3d)。Xu 等设计合成了该探针, 并用它来检测 RAW 264 7 巨噬细胞产生的超氧阴离子<sup>[51]</sup>。该课题组还合成了另外一种基于亚磷酸盐的超氧阴离子荧光探针 PF-1 (图 3e), 并用它来检测白鼠腹膜巨噬细胞生成的超氧阴离子<sup>[52]</sup>。此外, Xu 等人又合成了一种新型的检测超氧阴离子的荧光探针 DBZTC (图 3f)。它本身没有荧光, 随着超氧阴离子的浓度不断增加, 其荧光强度也不断增大。它的激发波长较长, 在 485nm, 故可以应用于活体细胞内检测。Xu 等同样将其用来检测巨噬细胞产生的超氧阴离子<sup>[53]</sup>。

## 5 检测羟自由基的荧光探针

羟自由基能和一些芳香化合物反应生成芳香羟基化合物, 而许多这类物质都是具有荧光性质的。譬如安息香酸盐, 香豆素, 吩恶嗪等。Newton 等分别测定了安息香酸盐, 香豆素, 吩恶嗪这三类物质与羟自由基的反应速率, 研究了它们作为检测羟自由基的荧光探针的可行性。这三类物质和羟自由基作用后, 都生成荧光很强的物质。故可以用它们来作为检测羟自由基的选择性荧光探针<sup>[54]</sup>。Czili 等用香豆素作为羟自由基的荧光探针, 来检测和测量有氧和无氧条件下紫外辐射 T<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 悬浮液产生的羟自由基, 生成的 7-羟基香豆素具有荧光特性 (图 4a)<sup>[55]</sup>。Singh 等合成了一系列的聚胺香豆素类化合物, 作为检测由  $\gamma$  射线产生的羟自由基的分子荧光探针<sup>[56]</sup>。Soh 等以香豆素为母核, 合成了一种磷脂联香豆素 DPPEC (图 4b), 用它来作为检测脂质细胞膜中羟自由基含量的荧光探针。它能够很迅速的和羟自由基反应, 且荧光强度大大增强<sup>[57]</sup>。

Liu 等用对苯二酸和过氧化氢/氧化钨纳米修饰电极生成的羟自由基反应, 得到了强荧光的 2-羟基对苯二酸 (图 4c)。故用对苯二酸作为一种检测羟自由基的荧光探针<sup>[58]</sup>。Li 等就用对苯二酸作为荧光探针, 证明了铁螯合剂不会抑制 Fenton 反应, 而会参与反应来增强抗自由基体的猝灭<sup>[59]</sup>。Wu 等也用对苯二酸作为荧光探针, 测定了水溶液中由 T<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 光催化产生的羟自由基的量子生成产率<sup>[60]</sup>。另外, Koide 等设计合成了两种测量活性氧特别是羟自由基的荧光探针 MitoAR 和 MitoHR (图 4d)。这两种物质本身几乎都没有荧光, 但和活性氧反应后就生成强荧光的物质 HM TMR。他们将其用于活的线粒体中活性氧的测量<sup>[61]</sup>。Moore 等用荧光素作为荧光探针, 建立了一种评价羟自由基清除能力的新的荧光分析方法<sup>[62]</sup>。Cohn 等用酵母 RNA 作为检测由土料产生的羟自由基的荧光探针<sup>[63]</sup>。

## 6 结论

本文总结了近三年来关于检测单线态氧、过氧化氢、超氧阴离子和羟自由基的荧光探针的文献, 主要介绍了它们的检测机制和应用。所有的探针都根据它们所检测的目标活性氧的不同而分类。这些高灵敏度、高选择性的新型荧光探针的出现, 拓宽了人们对于活性氧的检测方法, 为人们更清晰深入地了解和研究活性氧提供了很好的平台。

## 参考文献

- [1] Murrant C L, Reid M B. Detection of Reactive Oxygen and Reactive Nitrogen Species in Skeletal Muscle[J]. *Microsc Res Tech*, 2001, **55**(4): 236—48
- [2] Fink M P. Role of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Acute Respiratory Distress Syndrome[J]. *Curr Opin Crit Care*, 2002, **8**(1): 6—11
- [3] Caporaso N. The Molecular Epidemiology of Oxidative Damage to DNA and Cancer[J]. *J. Natl Cancer Inst*, 2003, **95**(17): 1263—1265
- [4] Cooke M S, Evans M D, Dizdaroğlu M *et al* Oxidative DNA Damage: Mechanisms, Mutation, and Disease[J]. *FASEB J*, 2003, **17**(10): 1195—1214
- [5] Suzuki Y J, Fomani H J, Sevanian A. Oxidants as Stimulators of Signal Transduction[J]. *Free Radic Biol Med*, 1997, **22**(1—2): 269—285
- [6] Babür B M. Phagocytes and Oxidative Stress[J]. *Am. J. Med.*, 2000, **109**(1): 33—44
- [7] Azzia A, Davies, K J, Kelly F. Free Radical Biology—Terminology and Critical Thinking[J]. *FEBS Lett*, 2004, **558**(1—3): 3—6
- [8] Feng Q, Kumagai T, Torii, Y *et al* Anticarcinogenic Antioxidants as Inhibitors Against Intracellular Oxidative Stress[J]. *Free Radic Res*, 2001, **35**(6): 779—788
- [9] Van Dam P S. Oxidative Stress and Diabetic Neuropathy: Pathophysiological Mechanisms and Treatment Perspectives[J]. *Diabetes/Metab Res Rev*, 2002, **18**(3): 176—184
- [10] Embola C W, Sohn O S, Fiala E S *et al* Induction of UDP-Glucuronosyltransferase 1 (UDP-GT1) Gene Complex by Green Tea in Male F344 Rats[J]. *Food. Chem. Toxicol*, 2002, **40**(6): 841—844
- [11] Umezawa N, Tanaka K, Umano Y *et al* Novel Fluorescent Probes for Singlet Oxygen[J]. *Angew. Chem. Int Ed.*, 1999, **38**(19): 2899—2901
- [12] Tanaka K, Miura T, Umezawa N *et al* Rational Design of Fluorescein-Based Fluorescence Probes Mechanism-Based Design of a Maximum Fluorescence Probe for Singlet Oxygen[J]. *J. Am. Chem. Soc*, 2001, **123**(11): 2530—2536
- [13] Tan M Q, Song B, Wang G L *et al* A New Terbium (III) Chelate as an Efficient Singlet Oxygen Fluorescence Probe[J]. *Free Radic Biol Med*, 2006, **40**(9): 1644—1653
- [14] Naito K, Tachikawa T, Fujitsuka M *et al* Real-Time Single-Molecule Imaging of the Spatial and Temporal Distribution of Reactive Oxygen Species with Fluorescent Probes: Applications to TiO<sub>2</sub> Photocatalysts[J]. *J. Phys. Chem. C*, 2008, **112**(4): 1048—1059
- [15] 周静, 魏宜春. 光谱法研究 FCLA 与人血清白蛋白的相互作用[J]. *光谱学与光谱分析*, 2007, **27**(11): 2287—2290
- [16] Agati G, Manteini P, Goti A *et al* Chloroplast-located Flavonoids can Scavenge Singlet Oxygen[J]. *New Phytol*, 2007, **174**(1): 77—89
- [17] Costa D, Fernandes E, Santos Joao L M *et al* New Noncellular Fluorescence Microplate Screening Assay for Scavenging Activity against Singlet Oxygen[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2007, **387**(6): 2071—2081
- [18] 陈修平, 杜官华. 二氯荧光素双醋酸盐 40 年的应用与争论[J]. *医药导报*, 2007, **26**(4): 343—349
- [19] 杨泽福, 冯义柏. 反应性氧族介导缩血管活性物质的作用[J]. *高血压杂志*, 2005, **13**(10): 624—627
- [20] 钟蓓华, 罗健东, 张贵平. 辛伐他汀对过氧化氢损伤的心肌细胞的保护作用[J]. *医药导报*, 2006, **25**(1): 16—18
- [21] 田芳, 仲伟鉴, 应贤平.  $\alpha$ -硫辛酸对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的细胞活性氧水平及 DNA 氧化损伤的影响[J]. *环境与职业医学*, 2007, **24**(2): 180—182
- [22] Labieniec M, Gabryelak T. Antioxidative and Oxidative Changes in the Digestive Gland Cells of Freshwater Mussels *Unionio tumidus* Caused by Selected Phenolic Compounds in the Presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or Cu<sup>2+</sup> Ions[J]. *Toxicol In Vitro*, 2007, **21**(1): 146—156
- [23] 孙蓉, 武栋栋, 张作平等. 过氧化氢诱导 PC12 细胞凋亡及芍药苷的保护作用[J]. *中国药理学杂志*, 2006, **41**(22): 1710—1713
- [24] Wen F, Xing D, Zhang L R. Hydrogen Peroxide is Involved in High Blue Light-Induced Chloroplast Avoidance Movements in Arabidopsis[J]. *J. Exp. Bot*, 2008, **59**(10): 2891—2901
- [25] Kolla V A, Vavaasseur A, Raghavendra A S. Hydrogen Peroxide Production is an Early Event during Bicarbonate Induced Stomatal Closure in Arabidopsis[J]. *Planta*, 2007, **225**(6): 1421—1429
- [26] Schauss A G, Wu X L, Prior R L *et al* Phytochemical and Nutrient Composition of the Freeze-Dried Amazonian Palm Berry, *Euterpe oleracea Mart* (Acai)[J]. *J. Agric Food Chem*, 2006, **54**(22): 8604—8610
- [27] Orhan H, Gurer-Orhan H, Vriese E *et al* Application of Lipid Peroxidation and Protein Oxidation Biomarkers for Oxidative

- Damage in Mammalian Cells A Comparison with Two Fluorescent Probes[J]. *Toxicol In Vitro*, 2006, **20**(6): 1005—1013
- [28] Labieniec M, Gabryelak T. Study of Interactions between Phenolic Compounds and  $H_2O_2$  or  $Cu(II)$  Ions in B14 Chinese Hamster Cells[J]. *Cell Biol Int*, 2006, **30**(10): 761—768
- [29] Mehendale S R, Wang C Z, Shao Z H *et al* Chronic Pretreatment with American Ginseng Berry and Its Polyphenolic Constituents Attenuate Oxidant Stress in Cardiomycocytes[J]. *Eur. J. Pharmacol*, 2006, **553**(1—3): 209—214
- [30] Zurgil N, Shafran Y, Afrimzon E *et al* Concomitant Real-Time Monitoring of Intracellular Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Membrane Potential in Individual Living Promonocytic Cells[J]. *J. Immunol Methods*, 2006, **316**(1—2): 27—41
- [31] Kim Y M, Lin J M, Kim B C *et al* Cu, Zn-Superoxide Dismutase is an Intracellular Catalyst for the  $H_2O_2$ -Dependent Oxidation of Dichlorodihydrofluorescein[J]. *Mol Cells*, 2006, **21**(1): 161—165
- [32] Venkatachari P, Hopke P K, Brune W H *et al* Characterization of Wintertime Reactive Oxygen Species Concentrations in Flushing, New York[J]. *Aerosol Sci Technol*, 2007, **41**(2): 97—111
- [33] Ashamker C, Kiss V, Sagi M *et al* Diverse Subcellular Locations of Cryptogein-Induced Reactive Oxygen Species Production in Tobacco Bright Yellow-2 Cells[J]. *Plant Physiol*, 2007, **143**(4): 1817—1826
- [34] 戴维德, 李晓松, 曾晶等. 光敏剂亚细胞分布位点光漂白作用的实验研究[J]. 中国激光医学杂志, 2007, **16**(3): 137—141
- [35] Qin Y, Lu M, Gong X G. Dihydrorhodamine 123 is Superior to 7-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate and Dihydrorhodamine 6G in Detecting Intracellular Hydrogen Peroxide in Tumor Cells[J]. *Cell Biol Int*, 2008, **32**(2): 224—228
- [36] Folmer V, Pedroso N, Matias A C *et al*  $H_2O_2$  Induces Rapid Biophysical and Permeability Changes in the Plasma Membrane of *Saccharomyces Cerevisiae*[J]. *Biochim. Biophys Acta*, 2008, **1778**(4): 1141—1147
- [37] 吴朝阳, 范占煌, 唐友云等. 基于去保护机理的新型 $H_2O_2$ 荧光探针的制备及应用[J]. 化学学报, 2006, **64**(8): 738—742
- [38] Miller E W, Albers A E, Pralle A *et al* Boronate-Based Fluorescent Probes for Imaging Cellular Hydrogen Peroxide[J]. *J. Am. Chem. Soc*, 2005, **127**(47): 16652—16659
- [39] 刘磊, 吴朝阳, 范占煌等. 基于对戊酰硼荧光素探针的超氧阴离子酶催化荧光分析[J]. 化学传感器, 2007, **27**(2): 42—46
- [40] Albers A E, Dickinson B C, Miller E W *et al* A Red-Emitting Naphthofluorescein-Based Fluorescent Probe for Selective Detection of Hydrogen Peroxide in Living Cells[J]. *Bioorg. Med. Chem. Lett*, 2008, **18**(22): 5948—5950
- [41] Dickinson B C, Chang C J. A Targetable Fluorescent Probe for Imaging Hydrogen Peroxide in the Mitochondria of Living Cells[J]. *J. Am. Chem. Soc*, 2008, **130**(30): 9638—9639
- [42] Srikun D, Miller E W, Dornaille D W *et al* An ICT-Based Approach to Ratiometric Fluorescence Imaging of Hydrogen Peroxide Produced in Living Cells[J]. *J. Am. Chem. Soc*, 2008, **130**(14): 4596—4597
- [43] Du L P, Li M Y, Zheng S L *et al* Rational Design of a Fluorescent Hydrogen Peroxide Probe Based on the Umbelliferone Fluorophore[J]. *Tetrahedron Lett*, 2008, **49**(19): 3045—3048
- [44] Amatongchai M, Hofmann O, Nacapricha D *et al* A Microfluidic System for Evaluation of Antioxidant Capacity Based on a Peroxyoxalate Chemiluminescence Assay[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2007, **387**(1): 277—285
- [45] He F, Tang Y L, Yu M H *et al* Fluorescence-Amplifying Detection of Hydrogen Peroxide with Cationic Conjugated Polymers, and Its Application to Glucose Sensing[J]. *Adv. Funct Mater*, 2006, **16**(1): 91—94
- [46] 张霞, 胡庭俊, 郑荣梁等. 蕨麻多糖对小鼠脾脏淋巴细胞NADPH氧化酶活性的影响[J]. 畜牧与兽医, 2006, **38**(12): 42—44
- [47] Yamaura K, Gebremedhin D, Zhang C *et al* Contribution of Epoxyeicosatrienoic Acids to the Hypoxia-Induced Activation of  $Ca^{2+}$ -Activated  $K^+$  Channel Current in Cultured Rat Hippocampal Astrocytes[J]. *J. Neurosci*, 2006, **143**(3): 703—716
- [48] Novitskiy G, Traore K, Wang L *et al* Effects of Ethanol and Acetaldehyde on Reactive Oxygen Species Production in Rat Hepatic Stellate Cells[J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2006, **30**(8): 1429—1435
- [49] Robinson K M, Janes M S, Pehar M *et al* Selective Fluorescent Imaging of Superoxide in Vivo Using Ethidium-Based Probes[J]. *PNAS*, 2006, **103**(41): 15038—15043
- [50] Zhu L L, Lu M, Yin X F. Ultrasensitive Determination of Intracellular Superoxide in Individual HepG2 Cells by Microfluidic Chip Electrophoresis[J]. *Talanta*, 2008, **75**(5): 1227—1233
- [51] Xu K H, Liu X, Tang B *et al* A Phosphinate-Based Red Fluorescent Probe for Imaging the Superoxide Radical Anion Generated by RAW 264.7 Macrophages[J]. *ChemBioChem*, 2007, **8**(4): 453—458
- [52] Xu K H, Liu X, Tang B *et al* Design of a Phosphinate-Based Fluorescent Probe for Superoxide Detection in Mouse Peritoneal Macrophages[J]. *Chem. Eur. J.*, 2007, **13**(5): 1411—1416



- [53] Gao J J, Xu K H, Tang B *et al* Selective Detection of Superoxide Anion Radicals Generated from Macrophages by Using a Novel Fluorescent Probe[J]. *FEBS J.*, 2007, **274**(7): 1725—1733
- [54] Newton G L, Milligan J R. Fluorescence Detection of Hydroxyl Radicals[J]. *Radiat Phys Chem.*, 2006, **75**(4): 473—478
- [55] Czili H, Horvath A. Applicability of Coumarin for Detecting and Measuring Hydroxyl Radicals Generated by Photoexcitation of TiO<sub>2</sub> Nanoparticles[J]. *Appl Catal B-Environ.*, 2008, **81**(3—4): 295—302
- [56] Singh A, Chen K, Adelstein S J *et al* Synthesis of Coumarin-Polyamine-Based Molecular Probe for the Detection of Hydroxyl Radicals Generated by Gamma Radiation[J]. *Radiat Res.*, 2007, **168**(2): 233—242
- [57] Sohn N, Makihara K, Ariyoshi T *et al* Phospholipid-Linked Coumarin: a Fluorescent Probe for Sensing Hydroxyl Radicals in Lipid Membranes[J]. *Anal Sci.*, 2008, **24**(2): 293—296
- [58] Liu J F, Laguer G, Tacchini P *et al* Generation of OH Radicals at Palladium Oxide Nanoparticle Modified Electrodes, and Scavenging by Fluorescent Probes and Antioxidants[J]. *J. Electroanal Chem.*, 2008, **619—620**: 131—136
- [59] Li L X, Abe Y, Kanagawa K *et al* Iron-Chelating Agents Never Suppress Fenton Reaction but Participate in Quenching Spin-Trapped Radicals[J]. *Anal Chim Acta*, 2007, **599**(2): 315—319
- [60] Wu Q P, Li D Z, Hou Y D *et al* Study of Relationship between Surface Transient Photoconductivity and Liquid-Phase Photocatalytic Activity of Titanium Dioxide[J]. *Mater Chem Phys.*, 2007, **102**(1): 53—59
- [61] Koide Y, Umano Y, Kenmoku S *et al* Design and Synthesis of Fluorescent Probes for Selective Detection of Highly Reactive Oxygen Species in Mitochondria of Living Cells[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**(34): 10324—10325
- [62] Moore J, Yin J J, Yu L L. Novel Fluorometric Assay for Hydroxyl Radical Scavenging Capacity (HOSC) Estimation[J]. *J. Agric Food Chem.*, 2006, **54**(3): 617—626
- [63] Cohn C A, Laffers R, Schoonen M A A. Using Yeast RNA as a Probe for Generation of Hydroxyl Radicals by Earth Materials[J]. *Environ Sci Technol.*, 2006, **40**(8): 2838—2843

## Recent Advances in Fluorescent Probes for the Detection of Reactive Oxygen Species

ZHANG Shu-Qi WEI Yong-Feng

(College Chemistry & Materials Science, North West University, Xi'an 710069, P. R. China)

**Abstract** Reactive oxygen species (ROS) are essential to life. However, when these reactive species were overproduced, it become highly harmful, causing oxidative stress and leading cell death. ROS have captured the interest of many researchers in the chemical, biological, and medical fields since they are thought to be associated with various pathological conditions. ROS present some characteristics that make them difficult to detect, namely their very short lifetime, high reactive activity and incapable capturing due to existing in vivo. Fluorescent probes are excellent sensors of ROS due to their high sensitivity, have become the research focuses. It is important to design high selective and specific detecting fluorescent probe because each ROS has its own unique physiological activity. This review focused on the detection mechanism and applications of fluorescent probes for the detection of singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), superoxide anion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), or hydroxyl radicals (•OH), a field in which remarkable progress had been achieved in the last three years.

**Key words** Fluorescent Probes; Reactive Oxygen Species (ROS); Singlet Oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>); Hydrogen Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); Superoxide Anion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>); Hydroxyl Radicals (•OH); Review