肿瘤缺氧荧光探针的研究进展

田昕伟¹, 李照^{1*}, 杨兴斌¹, 马会民^{2*}

1. 陕西省食品绿色加工与安全控制工程实验室, 陕西师范大学食品工程与营养科学学院, 西安 710062

2. 中国科学院活体分析化学重点实验室; 中国科学院化学研究所, 北京 100190

*通讯作者, E-mail: lizhao0309@snnu.edu.cn; mahm@iccas.ac.cn

收稿日期: 2018-01-26; 接受日期: 2018-04-04; 网络版发表日期: 2018-05-18

国家自然科学基金(编号: 31671823, 21605099)和陕西师范大学中央高校基本科研业务费专项资金(编号: GK201802019, 2018CSLZ007)资助项目

摘要 缺氧是临床多种疾病共有的病理过程, 研究缺氧的发生和发展规律, 对恶性肿瘤及相关疾病的诊断具有重要的科学意义和应用价值. 缺氧特异性荧光探针是指能对缺氧敏感物质进行选择性的荧光检测进而评价相关体系缺氧状况的一类分析试剂, 由于其检测的高灵敏性和高时空分辨能力, 已成为研究热点之一. 本文基于荧光探针检测肿瘤缺氧的不同反应机理, 着重讨论了缺氧荧光探针的设计方法、检测机理及其生物应用, 并对该类探针的发展趋势和应用前景进行了展望.

关键词 缺氧, 光学探针, 荧光成像分析, 细胞

1 引言

缺氧在细胞中可分为两种^[1-3], 慢性缺氧和急性缺氧. (1) 慢性缺氧: 氧的有效弥散距离为100~150 μm , 肿瘤细胞远离血管而处于缺氧状态, 此原因引起的缺氧称为慢性缺氧, 通常发生在实体肿瘤中; (2) 急性缺氧: 由肿瘤血管网结构和功能异常或肿瘤组织间液压升高引起的血流减少或阻滞导致的血管周围细胞缺氧, 这种由血管原因所致的血管周围细胞缺氧称为急性缺氧. 一般认定氧气分压中位数 $\leq 10 \text{ mm Hg}$ 为缺氧^[4-6].

缺氧被认为是实体肿瘤的重要特征之一, 主要与肿瘤无限制生长、氧耗增加、血供不足及肿瘤组织血管发育不良等因素有关^[7-9]. 缺氧使肿瘤细胞产生一系列生物学特性改变(图1), 如内壁细胞过度表达、还原

能力增强、pH变小、氧分压降低等, 进而导致肿瘤细胞突变率增加、放化疗敏感性降低、激活耐药基因、削弱免疫系统对肿瘤细胞的杀伤作用、侵袭能力增强等^[10-12]. 另外, 缺氧对缺氧诱导生长因子、血管内皮生长因子和细胞分裂周期蛋白的表达^[13,14]也产生影响. 缺氧使肿瘤对化疗的抗拒性增加是放疗、化疗失败的重要原因. 因此, 研究肿瘤细胞缺氧的发生和发展规律, 对临床治疗、增强机体代偿适应能力都有重要意义^[15-18].

氧电极测定法曾被认为是测定肿瘤缺氧状况的“金标准”. 但此方法仅适用于较浅表的肿瘤, 其检测结果较实际情况偏高, 创伤性也较大, 反映肿瘤整体的缺氧状况能力较差, 且会增加肿瘤转移机会. 组织形态分析法检测肿瘤缺氧状况相对可靠, 但在供应肿瘤血管内的血液携氧不足时, 并不能真实反映肿瘤的含氧情

引用格式: Tian X, Li Z, Yang X, Ma H. Progress in fluorescent probes for tumor hypoxia. *Sci Sin Chim*, 2018, 48: 712-730, doi: 10.1360/N032018-00011

图 1 肿瘤缺氧细胞的生物学特征(网络版彩图)

Figure 1 Biological characteristics of tumor hypoxia cells (color online).

况, 而且具有创伤性. 核磁共振波谱法具有无创性、定量化和可重复性等特点, 可动态地检测肿瘤的缺氧状况, 但该方法灵敏度较低且仪器昂贵. 核医学检测法主要是以缺氧细胞标志物为放射显像示踪剂, 对缺氧状况进行定性和定量检测的方法, 但该方法存在放射性污染问题^[19,20].

缺氧特异性荧光探针法是利用高特异性荧光探针, 对缺氧相关物质进行检测进而评价肿瘤缺氧状况的一类分析方法, 也简称为缺氧荧光探针(图2). 缺氧荧光探针因其具有简便性、高灵敏度、高时空分辨能力等特点^[21], 并且借助于激光共聚焦扫描显微技术, 可进行细胞、活体组织荧光成像研究, 现已在实时检测肿瘤细胞缺氧状况中得到了广泛应用. 近些年报道了许多缺氧荧光探针, 本文简要归纳和评述了缺氧荧光探针的研究进展, 主要包括基于硝基还原、偶氮还原、苯醌还原的生物还原型探针, 还有少量基于其他分析原理的光学探针. 此外, 还总结了目前缺氧荧光探针存在的问题, 并对其发展趋势和应用前景进行了展望.

2 基于硝基还原的缺氧荧光探针

此类缺氧探针一般是将硝基芳香化合物基团作识别单元, 引入荧光体中^[22,23], 并利用硝基还原酶(NTR)在缺氧条件下选择性地还原探针中的硝基而引起荧光增强的反应而设计. 当化合物的吸收波长小于 500 nm 时, 硝基是比较典型的可以使芳环化合物荧光猝灭的基团, 硝基一旦经生物还原, 即可使荧光基团重新释

图 2 荧光探针检测肿瘤缺氧的一般机理(网络版彩图)

Figure 2 General detection mechanism of fluorescence probe in tumor hypoxia (color online).

放荧光. 而硝基芳香类化合物通过主动扩散进入细胞内后, 在硝基还原酶的作用下发生单电子还原, 产生自由基阴离子; 在正常细胞中, 自由基阴离子又能被迅速再氧化成原化合物, 扩散到细胞外. 而当细胞内缺乏足够的氧时, 自由基阴离子就会被进一步还原, 其产物则与细胞内大分子结合, 停留在细胞内^[24-28]. 荧光显微镜或流式细胞仪可以直接测出缺氧细胞和正常细胞的荧光强度, 因此, 细胞内的荧光强度变化可以直接反映细胞缺氧情况.

基于硝基还原的缺氧荧光探针主要分为两类, 第一类为硝基直接还原为氨的反应, 第二类是荧光体上硝基还原为羟胺或氨, 继而引发多米诺分解反应^[29-34], 从而释放荧光团.

第一类探针的设计思路如图3所示. 这类探针通常是含硝基的荧光芳香化合物. 在正常状态下, 化合物无荧光或弱荧光; 在缺氧细胞内, 硝基被还原成氨基, 荧光基团重新发生荧光.

Hodgkiss课题组^[32,33]报道了3-硝基萘二酰亚胺类缺氧荧光探针1和2(图4), 并得到很好的离体细胞试验结果. 但在研究中发现化合物被两个硝基取代或硝基在4位取代时, 在还原前后, 荧光强度区别不大, 这可能与硝基的还原不完全有关, 或者与还原荧光化合物在缺氧细胞中停留时间过短有关. 因此, 如何将还原产物固定在缺氧区域内, 是探针设计需要考虑的因素^[34].

图3 缺氧荧光探针检测简图(网络版彩图)

Figure 3 Reaction mechanism of fluorescence probe (color online).

图4 探针1和2的结构

Figure 4 Structures of probe 1 and 2.

Raleigh课题组^[35]于1985年报道, 咪唑可以选择性地停留在缺氧细胞内. 依据此设计思路, 研究者陆续报道了以下典型的化合物3~6 (图5), X、Y、R代表一些小分子基团. 虽然此类化合物的荧光发射波长比较合适, 但其荧光量子产率太低限制了其在生物方面的应用^[35~37].

James课题组^[38]通过在香豆素3、4位修饰不同的基团, 开发了一系列基于硝基香豆素衍生物的荧光探针7 (图6), 均可对硝基还原酶产生响应, 以探针3-羧基-7-硝基-香豆素响应效果最好, 通过硝基被还原为氨基, 440 nm处的荧光信号增强, 探针在细菌培养液中培养4 h时荧光强度达到最大. 该探针可应用于测定微生物生长指标, 包括无菌检查或药敏试验.

James课题组^[39]以4-硝基苯甲酸苄基作为硝基还原酶的响应基团, 又开发了一系列基于7-氨基香豆素的荧光探针8 (图7), 其中探针8-A在与黏质沙雷菌或绿脓杆菌培养时有明显的蓝色荧光产生. 但是, 此类探针溶解性差, 容易在细胞培养液中析出, 不利于荧光定量分析.

Qian课题组^[40,41]引入了长波长荧光团苝, 有效避免了生物体背景荧光的干扰. 将多种硝基咪唑类衍生物基团连接到荧光团苝上合成了一系列长波长2-硝基咪唑型缺氧荧光探针9 (图7).

Qian课题组^[42]又以萘酰亚胺为荧光母体, 结合该荧光团具有的优良性质和易于修饰的特点, 设计了荧光探针10和11 (图8). 探究了如下内容: (1) 引入两个

图5 探针3~6的结构

Figure 5 Structures of probe 3~6.

图6 探针7与硝基还原酶的反应机理

Figure 6 Reaction mechanism of probe with NTR.

图7 探针8和9的结构

Figure 7 Structures of probe 8 and 9.

杂环侧链的硝基咪唑基团, 荧光强度前后比值明显提高, 且探针对缺氧识别能力明显提升. (2) 硝基引入降低了水溶性, 因此探针A₃和A₄引入水溶性醚键增强了探针穿越细胞膜的能力. (3) 在萘酰亚胺4位引入取代基, 可以降低萘酰亚胺嵌入DNA的性能.

Qian课题组^[43]设计了几种新型的硝基杂环类荧光探针12 (图9), 它们由相同的母体合成, 但是彼此的荧光发射信号有很大的差别. 用其中3种探针A₁、A₄、

图 8 荧光探针10和11的结构

Figure 8 Structures of probe 10 and 11.

图 9 探针12~14的结构

Figure 9 Structures of probe 12~14.

A₅培育缺氧仓鼠肺细胞(V79细胞) 3.5 h, 缺氧细胞下产生的荧光分别是正常条件下的6、9和11倍。

Elmes课题组^[44]报道了结构为2-硝基咪唑-1,8-萘酰亚胺的两种荧光探针13和14 (图9)。实验证明, 识别基团4号位连接荧光基团的探针13是一种高灵敏、高选择性的硝基还原酶底物, 肉眼可见清晰的蓝绿荧光反应。此外, 共聚焦显微镜和流式细胞技术可以很容易地检测活细胞内硝基还原酶的还原能力。

本课题组^[45,46]以试卤灵为荧光母体、5-硝基咪唑为特异性识别基团, 设计合成了检测硝基还原酶及细胞缺氧的荧光探针15 (图10)。该探针对于硝基还原酶表现出快速、灵敏的显色和荧光响应。细胞成像实验表明, 该探针毒性低、生物兼容性好, 能够用于HeLa和A549细胞在正常和缺氧条件下的荧光成像分析, 并揭示出在表观上实体瘤细胞内的硝基还原酶的浓度随着

图 10 探针15~19的结构

Figure 10 Structures of probe 15~19.

缺氧程度的增加而增加。因而, 该探针可通过检测硝基还原酶的变化研究细胞的缺氧行为。本课题组^[46]又以5-硝基咪唑为识别基团合成了荧光探针16 (图10), 其检测限低至0.1 ng/mL。该探针可用于大肠杆菌生长过程中产生的硝基还原酶的测定。

随后, 本课题组^[47]通过一步合成法发展了以甲酚紫为荧光团的探针17 (图10)。探针与硝基还原酶作用导致甲酚紫骨架上的吸电子基团硝基还原为供电子氨基, 荧光在625 nm处增强, 该探针灵敏度高, 检测限达1 ng/mL, 可用于生物活体如斑马鱼中硝基还原酶的实时荧光成像分析。此外, Chen等^[48]报道了一个打开型缺氧荧光探针。

Wilson课题组^[49]设计了检测缺氧细胞内辅酶NADPH, 细胞色素P450氧化还原酶(POR)的荧光探针18 (图10)。在人结肠癌细胞中加入探针, 培育3 h后观察到缺氧细胞明显比正常细胞荧光强度高; 由于探针具有亲水的酯侧链, 所以探针被还原后的荧光代谢物可以在细胞中很好滞留, 用流式细胞仪同样可以检测POR的表达活性。该探针模型也可以用作构建治疗肿瘤的前体药物。

Huang课题组^[50]将4-硝基苯基与香豆素母体连接, 发展了长波长打开型荧光探针19 (图10)。该探针的硝基可以被硝基还原酶还原为氨基, 发生1,6-重排消除反应, 形成环尿素, 随后释放香豆素, 波长595 nm处荧光增强; 但当有其他硝基芳香化合物存在时, 还原反应被抑制, 因此, 其选择性有待提高。

肿瘤细胞糖酵解能力增强, 代谢产物堆积致胞内形成酸性微环境^[51]。因此, Nakata课题组^[52]开发了以可逆方式监测肿瘤的pH的探针20 (图11)。同样, 该探针

图 11 探针20的检测机理

Figure 11 Detection mechanism of probe 20.

通过硝基还原产生荧光, 但是该荧光光谱峰形和出峰位置受pH规律性影响, 所以可根据检测缺氧环境的pH的变化从而推得缺氧情况. 探针已经用于肝微粒体和缺氧仓鼠肺细胞荧光成像.

双光子探针具有较大的生物组织穿透深度, 可延长观察时间, 提供更好的三维定位等优点^[53]. Tan课题组^[54]报道了双光子探针21在细胞和活体动物两个层面上对肿瘤缺氧环境的光学成像研究(图12). 以蒽衍生物为荧光母体, 对硝基苄基为识别基团, 基于光致电子转移机理(PET), 孤对电子发生转移导致荧光猝灭. 与待测物反应时, PET效应减弱, 荧光恢复, 借助这个“关-开”过程实现了硝基还原酶定量检测. 该探针与硝基还原酶响应时荧光强度可增加70倍, 在小鼠肝癌肿瘤组织切片70~160 μm 处选择性地检测了硝基还原酶.

本课题组^[55]通过一步反应合成了靶向溶酶体检测硝基还原酶的荧光探针22 (图13). 该探针由吗啉连接到4-硝基-1,8-萘酰亚胺而构成; 与硝基还原酶反应导致543 nm处荧光增强, 且在0.05~2.0 mg/mL范围内具有线性关系, 检测限为2.2 ng/mL. 该探针可用于研究缺氧环境下溶酶体硝基还原酶的变化及其对细胞凋亡、吞噬、胞吐、细胞能量和营养物质的影响.

Qian课题组^[56]以尼罗蓝染料分子为荧光团, 合成了长波长(658 nm)发射的打开型荧光探针23 (图13). 该探针能够在含有辅酶NADH的PBS缓冲液(pH 7.4, 10 mM, 1% DMSO)中特异性地检测硝基还原酶, 在2.5~12.5 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内有良好的线性关系, 检测限能达到180 ng/mL; 探针相对于一些其他生物还原剂, 如二硫苏糖醇、谷胱甘肽和半胱氨酸等具有良好的选择性. 该探针不仅可用于体外硝基还原酶检测, 在肿瘤

细胞成像方面也有较高应用价值.

3-羟基黄酮具有良好的光学特性和较低的毒性, 被广泛应用于生物探针合成^[57]. Lin课题组^[58]以硝基苯基或硝基咪唑基为识别基团、3-羟基黄酮为荧光团合成了一系列3-羟基黄酮类缺氧荧光探针24和25 (图14), 结构上引入带吗啉环的侧链增加了探针的水溶性, 探究了不同条件如溶剂性质和含量、pH、缓冲液等的变化对于探针检测性能的影响.

BODIPY类染料具有很高的荧光量子产率、较窄的荧光光谱发射、易于修饰的特点^[59]. Shao课题组^[60]

图 12 探针21检测硝基还原酶的机理(网络版彩图)

Figure 12 Detection mechanism of probe 21 with NTR (color online).

图 13 探针22检测硝基还原酶的机理及23的结构(网络版彩图)

Figure 13 Detection mechanism of probe 22 with NTR and structure of 23 (color online).

图 14 探针24和25的结构

Figure 14 Structures of probe 24 and 25.

报道了一种可在PBS缓冲液中定量检测硝基还原酶的荧光探针**26** (图15)。PET过程使得探针荧光猝灭, 硝基还原酶催化还原5-硝基咪唑基, 荧光团脱离, 实现了荧光的打开。外源环境下检测荧光饱和响应只需要5 min, 在0.1~1.0 mg/mL范围内获得了良好的线性关系, 检测限达9.6 ng/mL。该探针已用于实时监测缺氧肿瘤细胞和大肠杆菌体内的硝基还原酶。

Zhu课题组^[61]以硝基咪唑作为电子受体、香豆素为荧光团, 开发了一种基于PET机制以及通过光控释放抗癌药物到肿瘤缺氧区域的荧光探针**27** (图16)。只有缺氧条件下单光子或双光子激活释放被探针锁定的化学药物, 将抗癌药物释放到缺氧的癌细胞的同时, 荧光信号打开作为判断药物释放的信号依据。该方法与普通的光控药物释放体系相比展现出极强的辨识能力, 对药物靶向传递的发展有很大的促进作用。

化合物**28**是基于菁染料的近红外荧光探针(图17)^[62], 它与硝基还原酶可产生高选择性的荧光打开响应, 可用于研究实体瘤变化时上皮间质的转化过程及细胞内的缺氧状态。然而, 菁染料的不稳定性和高背景, 限制了对硝基还原酶进行高灵敏检测。

Qian课题组^[63]将结构稳定的荧光团半菁骨架与识别基团对硝基苯基连接获得结构稳定的探针**29** (图17), 探针分子内部强烈的“推电子-拉电子”结构使得探针荧光猝灭。在与待测物相互作用后, 识别基团上的硝基还原为氨基, “拉-推”效应的变化将极大地改变荧光体分子内的电子云分布或电子环境, 伴随着556 nm处的荧光强度增强。硝基还原酶在2.5~17.5 mg/mL浓度范围内呈良好线性关系, 检测限可达40 ng/mL。探针在缺氧的A549细胞荧光成像中展现了其成像应用潜力。

Zhu课题组^[64]将4-对硝基苯基修饰到菁染料上发展了性能优良的近红外比率型荧光探针**30** (图18), 比率型探针具有自校功能, 检测结果更准确可靠。辅酶NADPH存在下硝基被硝基还原酶还原释放出荧光体, 荧光强度在805 nm处下降、747 nm处上升, 生理环境(PBS, pH 7.4, 10 mM, 37°C)下反应20 min时荧光强度比值($F_{747\text{ nm}}/F_{805\text{ nm}}$)达到稳定。

Zhang课题组^[65]报道了由硝基苯基保护的苯酚基与苯并咪唑衍生物呈1:2的比例关系组成新型的近红外荧光探针**31** (图18), 在PBS缓冲液(pH 7.4, 50 mM)中被硝基还原酶还原, 导致720 nm处的荧光发射产生, 在

0.02~0.20 μM 浓度范围内呈线性关系, 且该荧光响应具有高选择性, 100当量的其他生物还原剂不产生干扰。该探针可通过荧光成像差异来检测正常与缺氧HeLa细胞的缺氧情况。

图15 探针**26**检测硝基还原酶机理(网络版彩图)

Figure 15 Detection mechanism of probe **26** with NTR (color online).

图16 探针**27**光控释放药物的机理(网络版彩图)

Figure 16 Mechanism of photocontrolled drug released from probe **27** (color online).

图17 探针**28**的结构及探针**29**检测硝基还原酶的机理(网络版彩图)

Figure 17 Structure of probe **28** and detection mechanism of probe **29** with NTR (color online).

图 18 探针30~32的结构

Figure 18 Structures of probe 30~32.

Zhang课题组^[66]将对硝基苄基通过三步反应连接到花菁染料骨架上, 开发了具有生物水溶性的荧光探针32 (图18). 该探针最大激发波长为590 nm, 发射波长为708 nm, 探针对比其他生物还原剂显示出高选择性. 该探针已经成功应用体外检测硝基还原酶, 并且可用于肿瘤前体药物在临床医学中的治疗评估.

研究表明, 菁染料的衍生物半菁骨架却表现出优良的稳定性, 并仍具有近红外光学性能^[67]. 基于此, Ma课题组^[68]通过引入识别基团4-硝基苯单元, 开发了半菁骨架作为荧光母体的探针33 (图19). 探针与硝基还原酶反应后, 705 nm处的荧光显著增加. 该探针已经应用于斑马鱼体内硝基还原酶分布的检测.

Zhu课题组等^[69-71]为了将探针应用于肿瘤缺氧组织成像, 基于前人研究基础上开发了三代荧光探针(图19). 第一代染料34使用乙醇胺键将硝基咪唑和染料吡啶羧酸衍生物连接, 荧光发射峰值位于780 nm, 在缺氧细胞内探针被还原, 导致荧光强度值相差2.5~3倍; 第二代染料35改善了肿瘤缺氧的靶向性, 并且具有较高的荧光产率, 探针35成功应用于肿瘤组织切片荧光成像和免疫组化技术证实肿瘤缺氧; 探针36为第三代, 它由菁染料与2-硝基咪唑相连而成, 其荧光量子产率达到0.467. 小鼠实验表明, 注射2 h后, 探针36相比第二代缺氧探针荧光强度增加了两倍多, 对肿瘤缺氧的体内检测有了显著的改善.

Hecht课题组^[72]首先用近红外探针37 (图20)表征了人肺腺癌细胞线粒体内硝基还原酶的活性, 又通过相同的识别基团连接到线粒体毒素抗霉素上, 该前体

图 19 探针33~36的结构

Figure 19 Structures of probe 33~36.

图 20 探针37的结构及靶向线粒体药物的作用机制(网络版彩图)

Figure 20 Structure of probe 37 and mechanism of drug targeting mitochondria (color online).

药物将更加有效地作用到线粒体上, 从而对杀死癌细胞效果更强, 该结论在4种癌细胞株上都得到了验证.

通过氨基甲酸酯键将对硝基苄基连接到亚甲基蓝的氮原子上, Bae课题组^[73]得到了长波长荧光探针38 (图21). 荧光团亚甲基蓝最大吸收波长和荧光发射波长分别为665和685 nm, 探针由于3个环上的共轭体系被打断, 导致在665 nm处既无明显吸光度, 也无荧光激发. 检测过程中硝基被还原, 发生消除反应释放出荧光团触发显著的荧光增强, 能够用来检测体内体外的硝基还原酶. 此外, 还讨论了该化合物在光动力疗法中的潜在治疗应用.

Li课题组^[74]通过在菁染料上修饰不同的硝基芳香族基团得到了5种近红外荧光探针39~43 (图22), 结果发现, 只有与对硝基苯甲酸连接的菁染料39可以作为一种快速检测和生物成像的探针. 在Tris缓冲液(pH 7.4, 0.05 M, 15% DMSO)中, 39被硝基还原酶还原, 荧

图 21 探针38检测硝基还原酶的机理(网络版彩图)
Figure 21 Detection mechanism of probe 38 with NTR (color online).

图 22 探针39~43的结构及探针39的检测机理(网络版彩图)
Figure 22 Structures of probe 39~43 and the detection mechanism of probe 39 (color online).

光在788 nm处可以增加110倍。缺氧A549细胞荧光成像实验表明, 探针39在细胞水平上对硝基还原酶具有检测能力。由于肿瘤体积的增加会导致缺氧程度的升高, 他们在小鼠体内接种不同大小的肿瘤来描述不同程度的缺氧。结果表明, 探针在7和12 mm大小的小鼠肿瘤内荧光信号强度分别提高了3和8倍, 反映了肿瘤的不同恶性程度, 该方法有望应用于肿瘤缺氧诊断。

Zhou课题组^[75]通过将生物素酰化的哌嗪-对甲氨基酚衍生物与对硝基苄基连接两步合成了荧光探针44 (图23)。该探针在广泛生理pH 6~8范围下有稳定的信号输出, 对细胞毒性小, 在DMSO-PBS缓冲液(pH 7.4, v/v=1/9, 0.01 M)检测体系中, 对硝基还原酶检测限为51.5 ng/mL。该探针对还原微环境如肝微粒体很敏感,

图 23 探针44、45的结构及探针46的检测机理(网络版彩图)
Figure 23 Structures of probe 44, 45 and the detection mechanism of probe 46 (color online).

在细胞内和线虫活体内可以有良好的荧光成像。

Lin课题组^[76]在双光子发射荧光基团上连接识别基团对硝基苄基醚, 合成了打开型近红外双光子荧光探针45。该探针表现出优良的性能, 如灵敏度高、选择性好、光稳定性高和细胞毒性低。可使用小剂量的探针(5 μM)实现定量检测, 与1.5 μg/mL硝基还原酶反应时荧光增强了130倍, 展现了双光子探针的优良分析性能。该探针应用到了缺氧细胞和肿瘤组织的硝基还原酶检测, 检测深度达70 μm。该课题组还验证了双香豆素对硝基还原酶的抑制作用。

Jiang课题组^[77]基于苯并噻二唑可以选择性标记细胞的线粒体, 设计了苯并噻二唑衍生物为荧光团的缺氧探针46 (图23)。硝基还原酶将硝基还原为氨基使得荧光信号打开, 流式细胞仪的结果表明, 65%的缺氧骨肉瘤细胞有红色荧光, 而只有2.4%的常氧细胞能观测到荧光。实时荧光定量RT-PCR证明, 探针可以刺激硝基还原酶基因的高表达, 反过来又刺激-NO₂到-NH₂的转变, 表明探针46可作为一种性能优良且用于检测肿瘤缺氧的荧光探针。

Hammond课题组^[78]基于抗细胞周期检测点激酶1抗体 (Chk1)构建荧光探针47 (图24)。由于Chk1对低氧有高的应激响应, 被认为是一种有前景的肿瘤治疗药物; 然而其可能引起DNA正常的复制和损伤, 诱发基因组不稳定, 并促进肿瘤的发生。为了克服这一缺点, 该课题组通过在Chk1上引入硝基, 从而构建了只有在缺氧环境下才能发挥Chk1活性作用的前体药物即探针47。这种新的方法对肿瘤部位可针对性地治疗, 同时保护正常组织免受治疗引起的基因组不稳定性的影响。

图 24 探针47检测硝基还原酶的机理及探针48和49的结构
Figure 24 Detection mechanism of probe 47 with NTR and structures of probe 48 and 49.

Jayagopal课题组^[79]将2-硝基咪唑和哌莫硝唑分别连接到异硫氰酸荧光素(FITC)上设计合成了探针48和49(图24)。采用建立的细胞培养模型和小鼠缺氧视网膜疾病模型,检测两种探针对于缺氧细胞的特异性,两种探针分别在视网膜细胞R28和Muller细胞有良好的成像效果。探针可用于研究缺氧与不可逆视力丧失的视网膜疾病的相关性,同时也阐述了视网膜低氧成像技术对于早期发现疾病、监控疾病进展和评估的重要意义。

Zhang等^[80]基于四苯乙烯聚集诱导发光原理开发了硝基还原酶检测和缺氧细胞成像的荧光探针50(图25)。硝基还原酶将硝基还原为氨基,发生2,5-电子重排并释放出荧光团TPE-PY,由于TPE-PY在水溶液中的溶解度低,此时会在聚集态诱导效应下得到有序排列产生荧光。该探针具有高选择性、高灵敏度,检测限为5 ng/mL,可用于缺氧HeLa细胞的荧光成像。

3 基于偶氮还原的缺氧荧光探针

偶氮苯化合物是典型的光致变色分子,通过其分子构型的改变通常呈现为两种异构体:一种是顺式异构体,分子状态不稳定;另一种为反式异构体,分子状态稳定。在一定光激发条件下可以实现顺式与反式的转变。从热力学角度讲,反式结构比顺式结构更稳定,所以顺式到反式的转变可以通过热量传递或者光诱导来实现^[80-83]。偶氮染料,如偶氮苯衍生物,由于光激发后-N=N-键附近超快的构象变化使得本身荧光猝灭^[84,85]。然而,偶氮基团在缺氧环境以及相关酶作用下会发生还原形成氨基衍生物,从而猝灭效应消失,荧光

重新打开;氧气对偶氮还原酶有抑制作用,所以在缺氧环境下才能顺利还原。

Nagano课题组^[86]合成了一种基于偶氮苯还原作用的检测缺氧的荧光共振能量转移(FRET)型探针51(图26)。BHQ-3是通常用作猝灭近红外或远红外染料荧光发射的一种猝灭剂^[85]。该探针将BHQ-3与具有近红外特性的菁染料相连,菁染料与BHQ-3发生FRET而荧光猝灭,而在缺氧条件下,猝灭染料BHQ-3还原断裂成氨基,失去对菁染料发射带的吸收,阻断了FRET过程,使荧光得到恢复。在该反应中,偶氮苯类衍生物经过三步还原为苯胺类衍生物。然而,菁染料的不稳定性限制了其实际应用。

Nagano课题组^[87]又将具有-N=N-键的荧光猝灭基团对二甲氨基偶氮苯连接到罗丹明衍生物2-MeRG和2-MeSiR600上分别得到荧光探针52和53(图26)。这两种非FRET的探针由于偶氮基团的猝灭作用使得探针没有荧光;但在缺氧条件下,偶氮键被还原裂解,荧

图 25 探针50检测硝基还原酶的机理(网络版彩图)
Figure 25 Detection mechanism of probe 50 with NTR (color online).

图 26 探针51的检测机制及探针52和53的结构
Figure 26 Detection mechanism of probe 51 and structures of probe 52 and 53.

光信号打开. 探针**52**与**53**分别靶向线粒体与溶酶体, 两种探针可检测视网膜动脉阻塞大鼠视网膜缺氧. 另外, 两探针显示出了不同的缺氧检测阈值, 分别在低于5%和0.1%氧气浓度下可以观察到荧光信号. 通过玻璃片覆盖模拟肿瘤内氧气的渗透梯度, 两种探针可以有效地感应细胞氧气浓度梯度. 这种研究思路适用于开发不同阈值水平的缺氧敏感探针.

Nagano课题组^[88]利用偶氮苯进一步发展了一系列基于**52**衍生出来的探针(图27), 偶氮还原酶将偶氮苯基团上的偶氮键还原, 非酶反应释放出荧光团2-MERG, 还原产物在细胞内可很好的滞留, 其中衍生出的化合物**L9**有较好的分析能力, 可检测缺氧条件下的细胞内源偶氮还原酶.

Qian课题组^[89]报道了一种基于FRET原理检测缺氧的荧光探针**54**(图28). 1,8-萘酰亚胺通过偶氮键与偶氮苯衍生物连接得到了能量供体, 然后经脱水缩合反应与能量受体罗丹明B连接, 设计了荧光探针**54**, 此时发射的是1,8-萘酰亚胺的荧光, 581 nm处荧光强度很低. 当探针被细胞色素P450酶快速还原后, FRET恢复, 使得581 nm处的荧光强度急剧增加, 不同缺氧环境下培养的活细胞与探针孵育得到的荧光强度差异明显, 证明该探针在实体瘤缺氧成像有潜在的研究价值.

Cui课题组^[90]通过-N=N-键与对光稳定的二氰基亚甲基类荧光团连接设计合成了近红外荧光探针**55**(图28), 探针用来检测肿瘤细胞过表达的色素P450还原酶. 在PBS缓冲液(30% DMSO, 0.1%吐温80)中与酶作用使-N=N-键断裂, 荧光在650 nm处增强, 缺氧环境下与还原酶作用前后荧光强度相差可达150倍, 探针可以对不同程度缺氧的肿瘤细胞进行成像.

Chevalier课题组^[91]通过偶氮偶联反应将荧光团磺酰罗丹明衍生物连接到二甲基苯胺上得到探针**56**(图29), 通过还原反应荧光可以打开检测缺氧环境. 为了获得细胞渗透性强的探针, 该课题组引入强极性基团分别获得了探针**57**和**58**, 3种探针在模拟生理反应条件下625 nm处荧光强度可分别提高94、45和58倍. 探针**56**已成功应用于对A549肿瘤细胞缺氧状态时的荧光成像, 然而探针**57**和**58**对细胞缺氧成像不理想, 可能是因为它们的体积过大和或过于亲水性, 从而限制了它们的细胞穿透性.

Jayagopal课题组^[92]基于荧光共振能量转移原理合成了可以检测视网膜血管疾病缺氧的荧光探针**59**(图

图 27 偶氮苯类缺氧荧光探针

Figure 27 Azobenzene hypoxia fluorescent probes.

图 28 探针**54**和**55**的结构(网络版彩图)

Figure 28 Structures of probe **54** and **55** (color online).

图 29 探针**56**~**58**的结构

Figure 29 Structures of probe **56**~**58**.

30), BHQ-3作为吸电子基团在FRET中猝灭荧光. 在缺氧的视网膜神经细胞及小鼠模型中观察到荧光增强, 反之, 在正常细胞中荧光几乎没有增强. 体外研究表

明, 探针**59**具有最佳信噪比的剂量在10 μM . 该研究有助于阐明缺氧在视网膜疾病中的作用.

Freeman课题组^[93]利用荧光光谱法表征探针性能并研究了偶氮还原反应对探针构象的影响(图31). 探针**60**和**61**由于偶氮基团的作用使分子处于轴向椅式构象, π - π 键的堆积导致荧光发射微弱; 当偶氮键被偶氮还原酶还原裂解, 分子发生构象转变, 轴向椅式构象经过环翻转为赤道椅式构象, 导致荧光在451 nm处上升, 552 nm处下降. 研究还表明, 偶氮还原酶在体外缓冲液与体内芽孢杆菌、大肠杆菌中都能将偶氮键还原.

Chevalier课题组^[94]发展了基于罗丹明110染料, 用于检测偶氮还原酶的打开型荧光探针**62** (图32). 探针分子存在两个偶氮键, 模拟生理条件(PBS+1% DMSO)下, 采用在体外模拟偶氮还原酶还原作用的连二亚硫酸钠, 将100倍探针当量的连二亚硫酸钠加入前后进行对比, 520 nm处荧光强度可以提高250倍, 可用肉眼观察到颜色变化. 与大肠杆菌提纯的偶氮还原酶作用也证明了探针的检测能力.

Tung课题组^[95]发展了一种用于观察肿瘤细胞中溶酶体的荧光探针**63** (图32), 采用哌嗪键将BODIPY荧光团连接到偶氮苯基团上, 探针仅有微弱的荧光信号. 偶氮键被酶促裂解后产生的氨基苄氨基甲酸酯经过化学变化又释放出了哌嗪改性的BODIPY, 同时该基团又具有酸性pH质子化的特征, 从而在酸性环境下可以靶向识别溶酶体单元. 该探针主要定位于还原性裂解后的溶酶体, 并在HepG2细胞中获得了较强的荧光信号, 但是达到荧光饱和和所需时间较长.

Kim课题组^[96]报道了一种靶向线粒体、缺氧激活的DNA烷基化前药**64** (图33). 结合肿瘤和线粒体靶向递送机制与组织选择性激活达到最大治疗效果. 在缺氧条件下, 探针的偶氮键被还原, 导致载有药物的基团释放, 伴随荧光信号打开作为药物释放的佐证. 这种具有高灵敏、合成简单、良好的治疗反应的靶向缺氧释放抗癌药物的方法是未来肿瘤治疗最有效的途径之一.

Li课题组^[97]通过将可被细胞色素p450还原酶还原的偶氮基团引入氨基荧光素中, 设计了荧光探针**65** (图34). 通过用不同浓度的钴离子去诱导活细胞缺氧, 提高细胞内还原物质和还原酶水平. 该课题组也探讨了肿瘤细胞中存在的还原物种包括硝基还原酶、辅酶NADPH、维生素C、还原型谷胱甘肽和硫化氢根离

图30 探针**59**的检测机制(网络版彩图)

Figure 30 Detection mechanism of probe **59** (color online).

图31 探针**60**和**61**的构象转变机制

Figure 31 Conformation transition mechanisms of probe **60** and **61**.

图32 探针**62**和**63**的结构

Figure 32 Structures of probe **62** and **63**.

子对探针检测选择性的影响. 探针具有良好的灵敏度和选择性, 结合生物发光技术的优点, 在细胞和体内

图 33 探针前药64的作用模型(网络版彩图)

Figure 33 Detection model of prodrug based on probe 64 (color online).

图 34 探针65靶向溶酶体的机制(网络版彩图)

Figure 34 Mechanism of probe 65 targeting lysosome (color online).

低氧成像有潜在的应用价值。

4 基于苯醌还原的缺氧荧光探针

醌基是对缺氧敏感基团, 主要机理是苯醌在体内还原酶(hNQO1)的作用下以电子传递链为电子载体经过电子还原并发生质子化, 生成对苯二酚或半醌, 苯环上的酚羟基进攻羰基碳, 最后发生自发反应生成3,4-二氢香豆素(图35)。还原后的产物可以自发反应将荧光基团或药物基团释放出来, 荧光信号随之改变^[98-101]。作为有效的缺氧识别单元, 近几年来被引入缺氧探针的构建当中。

McCarley课题组^[102]基于苯醌还原的机理合成了一种罗丹明类的缺氧探针66 (图36)。苯醌在体内氢醌还原酶的作用下, 被还原成对苯二酚, 生成的酚羟基进攻羰基碳, 最后发生自发反应生成3,4-二氢香豆素。该探针已应用在实体瘤细胞缺氧状态的检测中。

Tanabe课题组^[103]报道的缺氧荧光探针67 (图37)也是基于苯醌还原设计的, 但是该探针水溶性较差, 分析波长较短, 而且香豆素通过酯键和引发基团链接, 细胞膜附近的酯酶可以轻易地将酯键水解而把荧光团释放出来^[104], 这些缺点都进一步阻碍了探针的实际应用。

Nishimoto课题组^[105]报道了通过还原吡啶酮的方式合成了对缺氧细胞荧光成像的探针68 (图37)。在缺氧环境下由于香豆素-3-羧酸的释放, 探针会产生强烈的荧光发射。为了增加其水溶性, 探针使用了水溶性的荧光团对甲氨基酚, 但是探针激发和发射波长相对较短限制了它们在细胞成像中的进一步应用。

Nakamura课题组^[106]发展了一种动态检测腹膜卵巢癌转移(POCM)的近红外荧光探针69 (图38), 醌氧化还原酶同工酶(hNQO1)在患癌区域有更高的表达活性, 将探针还原, 荧光信号在755 nm处打开, 其对小肠组织信号背景有更高的辨识能力, 能够收集腹腔内转移的卵巢癌细胞荧光发射的动态图谱。探针小剂量2 μM就可以对酶定量分析, 另外结合其组织渗透能力强、荧光量子产率高的特点, 使得该探针可应用在临床肿瘤模型成像中。

McCarley课题组^[107]发展了基于萘二甲酰亚氨基

图 35 基于苯醌还原的缺氧荧光探针的设计原理

Figure 35 Detection mechanism of hypoxia fluorescence probe with hNQO1.

图 36 探针66检测氢醌还原酶的机制

Figure 36 Detection mechanism of probe 66 with hNQO1.

图 37 探针67和68的结构

Figure 37 Structures of probe 67 and 68.

图 38 探针69的检测机理(网络版彩图)

Figure 38 Detection mechanism of probe 69 (color online).

的打开型荧光探针70 (图39), 与酶hNQO1还原后荧光信号打开, 前后荧光强度增强了200倍, 荧光量子产率可达0.81; 细胞实验证明, 探针在酶hNQO1阳性和阴性细胞中荧光强度差异明显, 荧光显微图像可以有效引导外科手术切除病变组织。

随后, McCarley课题组^[108]又开发了在胞内检测hNQO1的探针71 (图39)。用10 μM的探针分别培育可以产生酶hNQO1的结肠癌细胞株与不产生该酶的肺癌细胞株, 通过荧光共聚焦显微镜对比观察, 结肠癌细胞株的细胞质中呈现明亮的红色荧光, 结果验证了探针71在胞内被hNQO1还原的能力; 且细胞内探针扩散能力快, 对生物硫醇、抗坏血酸盐等各种还原物质辨识能力高。

Jiang课题组^[109]发展了具有大Stokes位移值和高信背比的双光子荧光探针72 (图40), 已应用在活细胞和组织检测荧光成像。探针与酶hNQO1反应前后荧光强度相差达25倍, 斯托克斯位移红移超过100 nm, 具有很高的辨识能力; 检测限达5.6 ng/mL, 肿瘤细胞和组织切片证明, 内源性的hNQO1可以将探针特异性还原, 检测深度可达120 μm。该探针在肿瘤的诊断和成像引导治疗方面有很大的潜力。

McCarley课题组^[110,111]先后发展了通过氧化还原

图 39 探针70和71的结构

Figure 39 Structures of probe 70 and 71.

图 40 探针72的检测机理(网络版彩图)

Figure 40 Detection mechanism of probe 72 (color online).

作用可视化检测人类癌细胞NQO1过表达的探针73和74 (图41)。探针基于PET机理使得强吸电子基团苯醌荧光猝灭, 酶hNQO1将醌基还原, 释放荧光团羰二甲酰亚氨基衍生物。该方法已经成功用于区别hNQO1表达与不表达的癌细胞株。

5 基于其他分析原理的缺氧荧光探针

Nagano课题组^[112]发现荧光染料QSY-21在常氧-缺氧环境下有特殊的吸收光谱变化。缺氧环境下, 其荧光强度在波长470 nm处上升、660 nm处下降; 常氧环境反之。基于此, 该课题组将QSY-21与花菁染料Cy5连接, 开发了一种基于FRET原理可逆检测缺氧的荧光探针75 (图42)。缺氧条件下QSY-21发生单电子还原使FRET能量转移受阻, 呈现Cy5的发射峰; 而常氧条件下QSY-21重新氧化, FRET能量转移重新建立。探针可以实现体内、体外缺氧环境的检测, 是第一个检测常氧-缺氧的可逆性荧光探针。

Landry课题组^[113]通过荧光素类似物与3个不同的芳香硝基基团连接开发了探针76。在这3个探针中, 探针76-A在检测缺氧时表现出良好的选择性, 其在HepG-2、A549和SKOV-3细胞成像中荧光明显增强。通过酶联免疫法同时监测肿瘤细胞内和细胞外硝基还

图 41 探针73和74的检测机理(网络版彩图)

Figure 41 Detection mechanisms of probe 73 and 74 (color online).

图 42 探针75的检测反应机理(网络版彩图)

Figure 42 Detection mechanism of probe 75 (color online).

原酶的变化,未发现其浓度与缺氧程度之间的关系;另外,小鼠实验表明,通过测量肿瘤体内缺氧程度可以区分肿瘤的不同生长阶段,无论小鼠生长7或35 d,肿瘤组织硝基还原酶浓度几乎保持不变,表明探针的荧光响应是由 O_2 浓度的降低而不是硝基还原酶浓度的增加引起的。

Rajapakse课题组^[114]报道了一种小分子荧光探针77(图43),其在细胞色素P450酶催化下,生成氧化偶氮基螺烯化合物,且化合物内有联芳基键的形成,荧光强度在445 nm处有67倍的增强。该荧光小分子的生物还原过程可以作为将药物和荧光标记物质向缺氧细胞传递的一个途径。

碳酸酐酶的表达受到乏氧诱导因子的调控,在肿瘤缺氧细胞中特异性地高表达。Low课题组^[115]设计了

图 43 探针76的结构及探针77的检测反应机理(网络版彩图)

Figure 43 Structure of probe 76 and detection mechanism of probe 77 (color online).

一种以碳酸酐酶为检测物的荧光探针78(图44),由于实体肿瘤的缺氧区域都含有大量的碳酸酐酶,在大肠癌细胞HT-29中,探针通过对碳酸酐酶的检测间接说明其缺氧状态,另外,碳酸酐酶mRNA在HT-29的表达水平与其在人体癌细胞如子宫颈、食道、胰腺、膀胱、乳腺、肾脏、胃、子宫内膜、卵巢、结肠直肠、肺、肝和睾丸中的表达水平相当,期待该探针可以协助多种实体肿瘤的手术切除。

酸化同样也是肿瘤缺氧区域不同于正常组织的生物学特征^[5],Zheng课题组^[116]通过对酸敏感的亚胺键将铱配体部分和聚乙二醇连接设计了荧光探针79(图45)。在酸性环境下,探针分子转化为信号分子,荧光发射波长由610 nm红移到705 nm。在缺氧条件下,信号分子在705 nm处的荧光强度进一步增强,通过两步转换,可较好地实现与肿瘤代谢相关的肿瘤微环境信号的两级转换和放大,该探针实现了肿瘤发展早期阶段对少量活癌细胞的检测。

Li课题组^[117]合成了一种通过检测pH变化来说明缺氧状态的近红外荧光探针80(图46)。该探针在中性环境下,由于分子内二聚体的作用,其荧光被猝灭;在酸性环境中,聚集体被破坏,使得荧光信号增强。肿瘤pH失调,特别是细胞外pH酸化,破坏了细胞与基质的相互作用,增加了癌细胞的迁移能力,该荧光探针有望通过描述肿瘤内酸中毒的空间分布来判断肿瘤的转移。

Kim课题组^[118]报告了基于叠氮化合物用于检测缺氧环境的荧光探针81(图46),细胞色素P450酶能够

图 44 探针78的结构(网络版彩图)

Figure 44 Structure of probe 78 (color online).

图 45 探针79两级响应检测的机理(网络版彩图)

Figure 45 Two-stage response detection mechanism of probe 79 (color online).

以氧依赖的方式还原探针, 而硫化氢在还原过程中没有发挥作用. 该探针已用于缺氧环境下癌细胞荧光成像. 研究表明, 叠氮化合物具有新的生物还原功能, 可设计前药和荧光染料用于缺氧的研究.

6 总结与展望

综上所述, 缺氧特异性荧光探针设计合成的策略主要有以下4点. (1) 以硝基还原酶为指示物. 硝基还原酶以辅酶作为电子供体催化外源硝基芳香族化合物发生单电子转移, 生成硝基阴离子自由基, 随后进一步被还原成羟胺或氨基, 从而引起荧光探针光学性质的变化. (2) 以偶氮还原酶为指示物. 偶氮基团在相关酶作用下还原成氨基衍生物, 从而荧光信号重新打开. (3) 以氢醌还原酶为指示物. 苯醌在氢醌还原酶的作用下, 被还原成对苯二酚, 生成的酚羟基进攻羰基碳, 最后发生自发反应释放出荧光团. (4) 以三磷酸腺苷为指示物. 本课题组新发现三磷酸腺苷对缺氧敏感, 因

图 46 探针80的结构及探针81的检测机制(网络版彩图)

Figure 46 Structure of probe 80 and detection mechanism of probe 81 (color online).

此, 可作为一个新的缺氧指示物, 用于研究细胞的缺氧行为. 在目前的这些缺氧荧光探针中, 有的探针其分析性能仍显不足, 从而限制了在生物体内的应用. 具体来说, (1) 具有近红外发射的荧光探针的母体多为菁染料, 其量子产率较低, 在水溶液中稳定性差, 并且在荧光共聚焦成像中光漂白严重; (2) 比率型光学探针较少, 阻碍了对缺氧条件下相关还原酶的定量测定; (3) 许多荧光探针集中在可见光波段激发, 而可见光激发的染料易于受生物机体组织内背景荧光的影响, 实际生物应用限于细胞成像, 而应用在活体组织上的较少. 针对上述一些缺氧荧光探针存在稳定性差、发射波长短和定量分析准确性差等问题, 可设计合成同时具有高稳定性、近红外发射和比率响应的新型缺氧荧光探针. 另外, 荧光纳米材料在增强渗透、滞留肿瘤组织的成像研究方面取得了新进展, 核壳型介孔硅纳米材料能够提升所包覆探针的荧光量子效率及荧光寿命, 并且外层的硅壳能够保护其中的染料分子, 小粒径和良好的生物相容性使得该纳米颗粒能够在细胞成像中得到很好的应用, 利用这些特性可设计合成纳米材料缺氧荧光探针. 总之, 随着性能优良的缺氧荧光探针的不断发展, 更多的肿瘤缺氧的生物功能将被人们所揭示. 这些研究为肿瘤缺氧研究提供了优良的分析方法, 对恶性肿瘤及相关疾病的诊断具有重要的科学意义和应用价值.

参考文献

- 1 DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. *Cell Metabolism*, 2008, 7: 11–20
- 2 Brown JM, Wilson WR. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4: 437–447
- 3 Gilkes DM, Semenza GL, Wirtz D. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14: 430–439
- 4 Sun L, Ji L, Chao H. *SSC*, 2017, 47: 133–143
- 5 Van De Wiele C, Versijpt J, Dierckx RA, Moerman M, Lemmerling M, D’asseler Y, Vermeersch H. *Nucl Med Commun*, 2001, 22: 269–275
- 6 Harada H, Inoue M, Itasaka S, Hirota K, Morinibu A, Shinomiya K, Zeng L, Ou G, Zhu Y, Yoshimura M, McKenna WG, Muschel RJ, Hiraoka M. *Nat Commun*, 2012, 3: 783–786
- 7 Hanahan D, Weinberg RA. *Cell*, 2011, 144: 646–674
- 8 Shannon AM, Bouchier-Hayes DJ, Condron CM, Toomey D. *Cancer Treat Rev*, 2003, 29: 297–307
- 9 Semenza GL. *Oncogene*, 2010, 29: 625–634
- 10 Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, Nicholls LG, Harris AL, Stratford IJ, Hankinson O, Pugh CW, Ratcliffe PJ. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 8104–8109
- 11 Wilson WR, Hay MP. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11: 393–410
- 12 Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. *Am J Pathol*, 2000, 157: 411–421
- 13 Huang Y, Lin D, Taniguchi CM. *Sci China Life Sci*, 2017, 60: 1114–1124
- 14 Semenza GL. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3: 721–732
- 15 Okunieff P, Dols S, Lee J, Singer S, Vaupel P, Neuringer LJ, Beshah K. *Cancer Res*, 1991, 51: 3289–3295
- 16 Yamaguchi H, Kobayashi Y, Kobayashi R, Takashima Y, Hashidzume A, Harada A. *Nat Commun*, 2012, 3: 603–608
- 17 Hung MC, Mills GB, Yu D. *Nat Med*, 2009, 15: 246–247
- 18 Moeller BJ, Cao Y, Li CY, Dewhirst MW. *Cancer Cell*, 2004, 5: 429–441
- 19 Eschmann SM, Paulsen F, Reimold M, Dittmann H. *J Nucl Med*, 2005, 46: 253–260
- 20 Hicks RJ, Rischin D, Fisher R, Binns D, Scott AM, Peters LJ. *Eur J Nucl Med Mol Imag*, 2005, 32: 1384–1391
- 21 Li D, Li Z, Yang X, Zhang C. *Sci Sin Chim*, 2018, 48: 45–57
- 22 Okuda K, Okabe Y, Kadosono T, Ueno T, Youssif BGM, Kizaka-Kondoh S, Nagasawa H. *Bioconjugate Chem*, 2012, 23: 324–329
- 23 Sun M, Shangguan D, Ma H, Nie L, Li X, Xiong S, Liu G, Thiemann W. *Biopolymers*, 2003, 72: 413–420
- 24 Reinehr R, Görg B, Becker S, Qvartskhava N, Bidmon HJ, Selbach O, Haas HL, Schliess F, Häussinger D. *Glia*, 2007, 55: 758–771
- 25 Cellier M, Fabrega OJ, Fazackerley E, James AL, Orenge S, Perry JD, Salwatura VL, Stanforth SP. *Bioorg Med Chem*, 2011, 19: 2903–2910
- 26 Stratford MRL, Clarke ED, Hodgkiss RJ, Middleton RW, Wardman P. *Int J Radiat Oncol*, 1984, 10: 1353–1356
- 27 Watanabe M, Yanagi Y, Masuhiro Y, Yano T, Yoshikawa H, Yanagisawa J, Kato S. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 245: 900–905
- 28 Hodgkiss RJ, Begg AC, Middleton RW, Parrick J, Stratford MRL, Wardman P, Wilson GD. *Biochem Pharmacol*, 1991, 41: 533–541
- 29 Cui L, Zhong Y, Zhu W, Xu Y, Qian X. *Chem Commun*, 2010, 46: 7121–7123
- 30 Jin C, Zhang Q, Lu W. *RSC Adv*, 2017, 7: 18217–18223
- 31 Olive PL. *Int J Radiat Oncol*, 1984, 10: 1357–1360
- 32 Hodgkiss RJ. *Anti-Cancer Drug Design*, 1998, 13: 687–702
- 33 Hodgkiss R, Jones G, Long A, Parrick J, Smith K, Stratford M, Wilson G. *Br J Cancer*, 1991, 63: 119–125
- 34 Hodgkiss RJ, Jones GW, Long A, Middleton RW, Parrick J, Stratford MRL, Wardman P, Wilson GD. *J Med Chem*, 1991, 34: 2268–2274
- 35 Raleigh JA, Franko AJ, Koch CJ, Born JL. *Br J Cancer*, 1985, 51: 229–235
- 36 Wardman P, Clarke ED, Hodgkiss RJ, Middleton RW, Parrick J, Stratford MRL. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1984, 10: 1347–1351
- 37 Raleigh J, Miller G, Franko A, Koch C, Fuciarelli A, Kelly D. *Br J Cancer*, 1987, 56: 395–400
- 38 James AL, Perry JD, Jay C, Monget D, Rasburn JW, Gould FK. *Lett Appl Microbiol*, 2001, 33: 403–408
- 39 James AL, Perry JD, Stanforth SP. *J Heterocycl Chem*, 2006, 43: 515–517
- 40 Dai M, Zhu W, Xu Y, Qian X, Liu Y, Xiao Y, You Y. *J Fluoresc*, 2008, 18: 591–597
- 41 Liu Y, Xu Y, Qian X, Xiao Y, Liu J, Shen L, Li J, Zhang Y. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16: 1562–1566
- 42 Liu Y, Xu Y, Qian X, Liu J, Shen L, Li J, Zhang Y. *Bioorg Med Chem*, 2006, 14: 2935–2941

- 43 Zhu W, Dai M, Xu Y, Qian X. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16: 3255–3260
- 44 Ao X, Bright SA, Taylor NC, Elmes RBP. *Org Biomol Chem*, 2017, 15: 6104–6108
- 45 Li Z, Li X, Gao X, Zhang Y, Shi W, Ma H. *Anal Chem*, 2013, 85: 3926–3932
- 46 Li Z, Gao X, Shi W, Li X, Ma H. *Chem Commun*, 2013, 49: 5859–5861
- 47 Wan QQ, Gao XH, He XY, Chen SM, Song YC, Gong QY, Li XH, Ma HM. *Chem Asian J*, 2014, 9: 2058–2062
- 48 Wei C, Shen Y, Xu Z, Peng S, Yuan Z, He Y, Yin J, Chen H. *J Photochem Photobiol A-Chem*, 2018, 353: 292–298
- 49 Su J, Guise CP, Wilson WR. *Biochem J*, 2013, 452: 79–86
- 50 Huang HC, Wang KL, Huang ST, Lin HY, Lin CM. *Biosens Bioelectron*, 2011, 26: 3511–3516
- 51 Stubbs M, McSheehy PMJ, Griffiths JR, Bashford CL. *Mol Med Today*, 2000, 6: 15–19
- 52 Nakata E, Yukimachi Y, Kariyazono H, Im S, Abe C, Uto Y, Maezawa H, Hashimoto T, Okamoto Y, Hori H. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17: 6952–6958
- 53 Ren M, Deng B, Wang JY, Liu ZR, Lin W. *J Mater Chem B*, 2015, 3: 6746–6752
- 54 Zhang J, Liu HW, Hu XX, Li J, Liang LH, Zhang XB, Tan W. *Anal Chem*, 2015, 87: 11832–11839
- 55 Zhou J, Shi W, Li LH, Gong QY, Wu XF, Li XH, Ma HM. *Chem Asian J*, 2016, 11: 2719–2724
- 56 Guo T, Cui L, Shen J, Zhu W, Xu Y, Qian X. *Chem Commun*, 2013, 49: 10820–10822
- 57 Ameer-Beg S, Ormson SM, Brown RG, Matousek P, Towrie M, Nibbering ETJ, Foggi P, Neuwahl FVR. *J Phys Chem A*, 2001, 105: 3709–3718
- 58 Lin CC, Chen CL, Chung MW, Chen YJ, Chou PT. *J Phys Chem A*, 2010, 114: 10412–10420
- 59 Loudet A, Burgess K. *Chem Rev*, 2007, 107: 4891–4932
- 60 Xu J, Sun S, Li Q, Yue Y, Li Y, Shao S. *Analyst*, 2015, 140: 574–581
- 61 Lin Q, Bao C, Yang Y, Liang Q, Zhang D, Cheng S, Zhu L. *Adv Mater*, 2013, 25: 1981–1986
- 62 Xu K, Wang F, Pan X, Liu R, Ma J, Kong F, Tang B. *Chem Commun*, 2013, 49: 2554–2556
- 63 Yuan J, Xu YQ, Zhou NN, Wang R, Qian XH, Xu YF. *RSC Adv*, 2014, 4: 56207–56210
- 64 Zhu D, Xue L, Li G, Jiang H. *Sens Actuat B-Chem*, 2016, 222: 419–424
- 65 Xue C, Lei Y, Zhang S, Sha Y. *Anal Methods*, 2015, 7: 10125–10128
- 66 Shi Y, Zhang S, Zhang X. *Analyst*, 2013, 138: 1952–1955
- 67 He X Y, Zhang H, Li X H, Shi W, Ma H M. *Sci Sin Chim*, 2017, 47: 994–999
- 68 Li Z, He X, Wang Z, Yang R, Shi W, Ma H. *Biosens Bioelectron*, 2015, 63: 112–116
- 69 Zhou F, Zanganeh S, Mohammad I, Dietz C, Abuteen A, Smith MB, Zhu Q. *Org Biomol Chem*, 2015, 13: 11220–11227
- 70 Xu Y, Zanganeh S, Mohammad I, Aguirre A, Wang T, Yang Y, Kuhn L, Smith MB, Zhu Q. *J Biomed Opt*, 2013, 18: 066009
- 71 Pavlik C, Biswal NC, Gaenzler FC, Morton MD, Kuhn LT, Claffey KP, Zhu Q, Smith MB. *Dyes Pigm*, 2011, 89: 9–15
- 72 Chevalier A, Zhang Y, Khdour OM, Kaye JB, Hecht SM. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 12009–12012
- 73 Bae J, McNamara LE, Nael MA, Mahdi F, Doerksen RJ, Bidwell GL, Hammer NI, Jo S. *Chem Commun*, 2015, 51: 12787–12790
- 74 Li Y, Sun Y, Li J, Su Q, Yuan W, Dai Y, Han C, Wang Q, Feng W, Li F. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 6407–6416
- 75 Zhou Y, Bobba KN, Lv XW, Yang D, Velusamy N, Zhang JF, Bhuniya S. *Analyst*, 2017, 142: 345–350
- 76 Liu ZR, Tang Y, Xu A, Lin W. *Biosens Bioelectron*, 2017, 89: 853–858
- 77 Jiang Q, Zhang Z, Lu J, Huang Y, Lu Z, Tan Y, Jiang Q. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21: 7735–7741
- 78 Cazares-Körner C, Pires IM, Swallow ID, Grayer SC, O'Connor LJ, Olcina MM, Christlieb M, Conway SJ, Hammond EM. *ACS Chem Biol*, 2013, 8: 1451–1459
- 79 Evans SM, Kim K, Moore CE, Uddin MI, Capozzi ME, Craft JR, Sulikowski GA, Jayagopal A. *Bioconjugate Chem*, 2014, 25: 2030–2037
- 80 You X, Li L, Li X, Ma H, Zhang G, Zhang D. *Chem Asian J*, 2016, 11: 2918–2923
- 81 Qin CG, Lu CX, Ouyang GW, Qin K, Zhang F, Shi HT, Wang XH. *Chin J Anal Chem*, 2015, 43: 433–443
- 82 Takakusa H, Kikuchi K, Urano Y, Sakamoto S, Yamaguchi K, Nagano T. *J Am Chem Soc*, 2002, 124: 1653–1657
- 83 Zbaida S, Levine WG. *Chem Res Toxicol*, 1991, 4: 82–88
- 84 Kizaka-Kondoh S, Konse-Nagasawa H. *Cancer Sci*, 2009, 100: 1366–1373
- 85 Ueno T, Urano Y, Setsukinai KI, Takakusa H, Kojima H, Kikuchi K, Ohkubo K, Fukuzumi S, Nagano T. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 14079–14085

- 86 Kiyose K, Hanaoka K, Oushiki D, Nakamura T, Kajimura M, Suematsu M, Nishimatsu H, Yamane T, Terai T, Hirata Y, Nagano T. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 15846–15848
- 87 Piao W, Tsuda S, Tanaka Y, Maeda S, Liu F, Takahashi S, Kushida Y, Komatsu T, Ueno T, Terai T, Nakazawa T, Uchiyama M, Morokuma K, Nagano T, Hanaoka K. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 13028–13032
- 88 Shin N, Hanaoka K, Piao W, Miyakawa T, Fujisawa T, Takeuchi S, Takahashi S, Komatsu T, Ueno T, Terai T, Tahara T, Tanokura M, Nagano T, Urano Y. *ACS Chem Biol*, 2017, 12: 558–563
- 89 Cai Q, Yu T, Zhu W, Xu Y, Qian X. *Chem Commun*, 2015, 51: 14739–14741
- 90 Cui L, Shi Y, Zhang S, Yan L, Zhang H, Tian Z, Gu Y, Guo T, Huang J. *Dyes Pigm*, 2017, 139: 587–592
- 91 Chevalier A, Piao W, Hanaoka K, Nagano T, Renard PY, Romieu A. *Methods Appl Fluoresc*, 2015, 3: 044004
- 92 Uddin MI, Evans SM, Craft JR, Marnett LJ, Uddin MJ, Jayagopal A. *ACS Med Chem Lett*, 2015, 6: 445–449
- 93 Rattray NJW, Zalloum WA, Mansell D, Latimer J, Jaffar M, Bichenkova EV, Freeman S. *Tetrahedron*, 2013, 69: 2758–2766
- 94 Chevalier A, Mercier C, Saurel L, Orenga S, Renard PY, Romieu A. *Chem Commun*, 2013, 49: 8815–8817
- 95 Luo S, Liu Y, Wang F, Fei Q, Shi B, An J, Zhao C, Tung CH. *Analyst*, 2016, 141: 2879–2882
- 96 Verwilt P, Han J, Lee J, Mun S, Kang HG, Kim JS. *Biomaterials*, 2016, 115: 104–114
- 97 Gao Y, Lin Y, Liu T, Chen H, Yang X, Tian C, Du L, Li M. *Anal Chem*, 2017, 89: 12488–12493
- 98 Rajendran JG, Wilson DC, Conrad EU, Peterson LM, Bruckner JD, Rasey JS, Chin LK, Hofstrand PD, Grierson JR, Eary JF, Krohn KA. *Eur J Nucl Med Mol Imag*, 2003, 30: 695–704
- 99 Toma-Dașu I, Dașu A, Brahme A. *Acta Oncologica*, 2009, 48: 1181–1192
- 100 Yang Y, Zhang Y, Wu Q, Cui X, Lin Z, Liu S, Chen L. *J Exp Clin Cancer Res*, 2014, 33: 14
- 101 Roithová J, Schröder D, Schwarz H. *Angew Chem Int Ed*, 2005, 44: 3092–3096
- 102 Silvers WC, Payne AS, McCarley RL. *Chem Commun*, 2011, 47: 11264–11266
- 103 Tanabe K, Hirata N, Harada H, Hiraoka M, Nishimoto SI. *ChemBioChem*, 2008, 9: 426–432
- 104 Wolfe KL, Liu RH. *J Agric Food Chem*, 2007, 55: 8896–8907
- 105 Komatsu H, Harada H, Tanabe K, Hiraoka M, Nishimoto S. *MedChemComm*, 2010, 1: 50–53
- 106 Nakamura Y, Shen Z, Harada T, Nagaya T, Sato K, Okuyama S, Ogata F, Choyke PL, McCarley RL, Kobayashi H. *Oncotarget*, 2017, 8: 61181–61192
- 107 Best QA, Prasai B, Rouillere A, Johnson AE, McCarley RL. *Chem Commun*, 2017, 53: 783–786
- 108 Best QA, Johnson AE, Prasai B, Rouillere A, McCarley RL. *ACS Chem Biol*, 2016, 11: 231–240
- 109 Pan D, Luo F, Liu X, Liu W, Chen W, Liu F, Kuang YQ, Jiang JH. *Analyst*, 2017, 142: 2624–2630
- 110 Prasai B, Silvers WC, McCarley RL. *Anal Chem*, 2015, 87: 6411–6418
- 111 Silvers WC, Prasai B, Burk DH, Brown ML, McCarley RL. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 309–314
- 112 Takahashi S, Piao W, Matsumura Y, Komatsu T, Ueno T, Terai T, Kamachi T, Kohno M, Nagano T, Hanaoka K. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 19588–19591
- 113 Luo S, Zou R, Wu J, Landry MP. *ACS Sens*, 2017, 2: 1139–1145
- 114 Rajapakse A, Gates KS. *J Org Chem*, 2012, 77: 3531–3537
- 115 Lv PC, Roy J, Putt KS, Low PS. *Mol Pharm*, 2016, 13: 1618–1625
- 116 Zheng X, Tang H, Xie C, Zhang J, Wu W, Jiang X. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 8094–8099
- 117 Wang L, Fan Z, Zhang J, Changyi Y, Huang C, Gu Y, Xu Z, Tang Z, Lu W, Wei X, Li C. *Int J Cancer*, 2015, 136: E107–E116
- 118 Lee J, Oh ET, Yoon H, Woo Kim C, Han Y, Song J, Jang H, Joo Park H, Kim C. *Nanoscale*, 2017, 9: 6901–6909

Progress in fluorescent probes for tumor hypoxia

Xinwei Tian¹, Zhao Li^{1*}, Xingbin Yang¹, Huimin Ma^{2*}

¹ Shaanxi Engineering Laboratory for Food Green Processing and Safety Control, College of Food Engineering and Nutritional Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

² Key Laboratory of Analytical Chemistry for Living Biosystems, Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

*Corresponding authors (email: lizhao0309@snnu.edu.cn; mahm@iccas.ac.cn)

Abstract: Hypoxia is an important feature of many diseases. Hypoxia detection is of great importance for tumor and related diseases diagnosis which could provide useful methods for exploring the mechanism of hypoxic tumor. Hypoxia-sensitive fluorescent probes can be used to monitor the hypoxic status of tumor cells via the detection of endogenous reductase, which have attracted much attention due to high sensitivity and high spatial and temporal resolution. In this review, the different mechanisms of tumor hypoxia detection based on fluorescent probe are reviewed systematically. The design concept, detection mechanism and biological applications of fluorescent probes are summarized. Moreover, the application prospect and development trend of fluorescent probe for hypoxia have been discussed.

Keywords: hypoxia, fluorescence probe, fluorescence imaging analysis, cell

doi: [10.1360/N032018-00011](https://doi.org/10.1360/N032018-00011)