中国科学 B辑:化学 2009 年 第 39 卷 第 6 期: 473 ~ 480
www.scichina.com chem.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

基于磺酸酯的荧光探针用于活细胞内过氧化氢的成像检测

徐克花, 刘芬, 汪会霞, 王姗姗, 王璐璐, 唐波*

山东师范大学化学化工与材料科学学院; 分子与纳米探针教育部重点实验室;
农药、医药中间体清洁生产教育部工程研究中心, 济南 250014

* 通讯作者, E-mail: tangb@sdnu.edu.cn

收稿日期: 2008-12-24; 接受日期: 2009-02-12

摘要 基于过氧化氢(H_2O_2)特异性催化水解磺酸酯, 设计合成了新型绿色荧光探针: 荧光素二磺酸酯(FS-1)和二氯荧光素二磺酸酯(FS-2)两种螺环内酯型化合物, 用于活细胞内过氧化氢的检测. 探针结构由元素分析、IR、^{1}H NMR及^{13}C NMR表征. 实验表明: 探针FS-1 和FS-2 在模拟生物体系中检测过氧化氢具有良好的选择性和灵敏度, 且线性范围较宽. 细胞成像显示: 探针FS-1 和FS-2 用于PMA刺激或外加不同浓度H_2O_2孵育的小鼠腹膜巨噬细胞均呈现明亮的绿色荧光, 且能对细胞内H_2O_2微摩尔级浓度变化产生响应, 证明两探针均具有良好的膜渗透性、高的选择性及良好的灵敏度. 该方法的建立对研究生物体内H_2O_2的产生, H_2O_2导致的各种疾病机制及H_2O_2介导的信号转导途径具有重要的理论及实际意义.

关键词
荧光素二磺酸酯
荧光探针
细胞成像
过氧化氢

1 引言

活性氧(ROS)对生物体的危害作用, 20 世纪以来就受到人们极大的关注. 但活性氧作为细胞信号分子的研究却是近年来的热点领域[1~6]. 与其他活性氧相比, 过氧化氢性质的相对稳定性、反应的选择性及自身的易扩散性, 使其作为信号分子的研究相对容易[3~6]. 然而, 如何高选择性、高灵敏度的定量信号转导过程中的H_2O_2, 则是能否从分子水平上研究H_2O_2如何介导细胞信号转导途径的关键.

利用荧光探针与激光扫描共聚焦显微镜技术结合检测细胞内H_2O_2为更好地理解H_2O_2的生理作用开辟了一种新的途径. 这种方法能够提供细胞内目标生物分子的时空信息, 换言之, 我们可以实现实时观测细胞内目标分子的行为变化. 近年来用于检测过氧化氢的荧光探针主要有: (1) 基于H_2O_2的氧化作用而设计的探针, 如二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFDA)[7]、二氢罗丹明 123[8] 等; (2) 基于H_2O_2水解切断荧光团的保护基团, 使荧光团荧光恢复的探针, 如单五氟苯磺酸酯二氟荧光素[9]、二硼酸酯基荧光素[10,11]等. 然而, 由于探针易自氧化、快速光漂白、短的发射波长及选择性等问题的存在, 使其实际应用受到了一定的限制. 在这些探针中, DCFDA是经常被用于检测细胞中H_2O_2的探针, 但是DCFDA可以与很多活性氧反应产生荧光, 不仅包括H_2O_2, 还包括其他的过氧化物, 如过氧化亚硝酰($ONOO^-$) [12]、次氯酸(HOCl)[13]和谷胱甘肽(GSH)损耗介导的内氧化产物[14,15]等. 正是由于DCFDA检测H_2O_2存在选择性不高的问题, 最近Jacek Zielonka对在Science

杂志上发表的一篇文章提出了讨论[16], 因为该文章中用DCFDA定量了细胞内H_2O_2的水平. 因此, 研究发展新型的用于检测H_2O_2的高选择性、高灵敏度的荧光探针是非常迫切的.

另一个方面, 生物体内过氧化氢和超氧阴离子总是共存且处于动态平衡之中. 一旦超氧阴离子产生, 通过酶解或非酶反应会瞬间产生过氧化氢. 因此, 为了更好的理解生理过程尤其是信号转导途径中过氧化氢的作用, 同时定量检测生物体内的过氧化氢和超氧阴离子是非常有意义的. 因此, 在目前的工作中, 我们的目标就是开发适用于复杂体系中过氧化氢及超氧阴离子自由基同时检测的过氧化氢探针, 尤其是适用于信号转导过程中低水平过氧化氢的检测及活细胞内过氧化氢可视化示踪的试剂.

2005 年我们课题组已报道了一种基于萘荧光素的红色荧光探针用于高选择性地、高灵敏度地检测细胞内过氧化氢[17]. 但是, 为了能与检测超氧阴离子自由基的PNF-1 探针[18](其发射波长为 662 nm)联合使用去同时检测活细胞内过氧化氢和超氧阴离子自由基, 在这篇文章中, 我们又设计合成了新型绿色荧光探针-荧光素二磺酸酯衍生物(FS-1 和FS-2, 其中FS-2 的发射波长为 520 nm). FS-2 与PNF-1 分别作为检测过氧化氢与超氧阴离子自由基的探针, 其荧光光谱互不干扰, 很好地解决了同时检测活细胞内过氧化氢和超氧阴离子自由基的难题.

本文合成的新型荧光探针FS-1 和FS-2 见式 1. 探针结构由元素分析、IR、^{1}H NMR和^{13}C NMR进行表征. 在模拟生理条件下, 该探针对H_2O_2显示了极好的选择性, 同倍量的其他活性氧和生物物质不干扰. 细胞成像表明, 探针FS-1 和FS-2 用于PMA刺激或外加不同浓度H_2O_2孵育的小鼠腹膜巨噬细胞均呈现明亮的绿色荧光, 且能对细胞内微摩尔级H_2O_2浓度变化产生响应. 证明两探针均具有良好的膜渗透性、高的选择性及良好的灵敏度. 该探针为研究H_2O_2介导的信号转导途径提供了一定的分析方法.

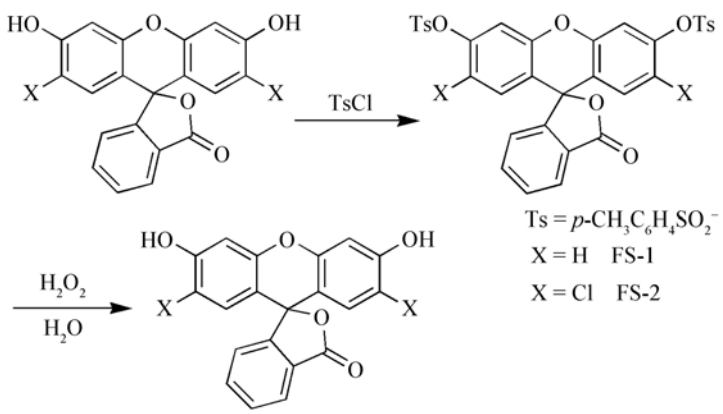
2 实验部分

2.1 合成及分析试剂

柱层析硅胶(100~200 目, 青岛海洋化工厂); 薄层层析硅胶涤纶片 GF254(台州路桥四甲生化塑料厂); 其他化学药品均购自中国化学产品公司.

黄嘌呤氧化酶(XO), 次黄嘌呤(HPX), L-谷胱甘肽(GSH, 还原型), 过氧化叔丁醇(*t*-BuOOH, 70%水溶液), 过氧化氢(H_2O_2, 30%水溶液), 次氯酸钠(NaOCl, 5%水溶液), 二甲基亚砜(DMSO), 超氧化钾(KO_2), 5-氨基-3-(4-吗啉基)-1, 2, 3-噁二唑盐酸盐(SIN-1), 3-(氨基丙基)-1-羟基-3-异丙基-2-氧-1-三氮烯(NOC-5), 酯酶(Esterase), 佛波醇-12-十四酸酯-13-乙酸酯(PMA), 2-[4-(羟乙基)-1-哌嗪基]乙磺酸(HEPES), 细胞培养基（RPMI1640）均购于Sigma公司; 1, 4-氢醌 (HQ)购于Fluka公司.

所用其余试剂均为分析纯, 水为超纯水(18.2 MΩcm). 昆明 Balb/c 小鼠购于山东大学生物实验中



式 1 荧光素二磺酸酯的合成及探针与H_2O_2的反应

心(6~12 周).

2.2 仪器

Cary Eclipse型荧光分光光度计(澳大利亚Varian)附有 1 cm石英比色皿; pH-3C型酸度计(上海雷磁仪器厂); MT-3CHN型元素分析仪(Liuben, Japan); Advance 300 核磁共振仪(DMSO做溶剂, Bruker, Sweden); PE-983 型红外检测仪(KBr压片cm^{-1}, Perkin-Elmer, Norwalk,CT); Yanaco 熔点仪(日本); LSM510 共聚焦激光扫描显微镜(Carl Zeiss Co., Ltd), 40 倍物镜, 及其Zeiss LSM Data Server软件系统.

2.3 荧光探针的合成

2.3.1 荧光素二磺酸酯(FS-1)

荧光素(1.0 g, 3.0 mmol)和对甲基苯磺酰氯(1.9 g, 10 mmol)加入到 50 mL吡啶中, 室温搅拌过夜. 浓缩干燥, 所得固体用乙酸乙酯溶解, 分别用 1 mol/L HCl(2×50 mL), 水(2×50 mL)和饱和食盐水(2×50 mL)洗涤, 分出有机层, 用无水Na_2SO_4干燥, 真空浓缩得粗产品. 用硅胶柱色谱分离纯化, 洗脱剂为正己烷-乙酸乙酯(2∶1 *V*/*V*), 得FS-1 白色固体 1.54 g, 产率 80%, mp: 91~94℃. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6, TMS): δ 8.03 (d, $^3J_{H,H}$ = 7.2 Hz, 1H), 7.80 (d, $^3J_{H,H}$ = 8.3 Hz, 4H), 7.72~7.73 (m, 2H), 7.49 (d, $^3J_{H,H}$ = 8.3 Hz, 4H), 7.32 (m, 1H), 7.16 (d, $J_{H,H}$ = 2.0 Hz, 2H), 6.84~6.86 (m, 4H), 2.42(s, 6H); ^{13}C NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ168.5, 153.3, 151.0, 150.6, 146.2, 136.4, 132.0, 131.1, 130.5, 130.0, 128.0, 125.6, 124.8, 119.1, 118.0, 111.2, 103.4, 80.5, 21.6; FTIR (KBr): ν = 1771 (CO, s) cm^{-1}. Elemental analysis (%) calcd. for $C_{34}H_{24}O_9S_2$: C 63.75, H 3.75, S 10.00; found: C 63.95, H 3.65, S 10.10.

2.3.2 二氯荧光素二磺酸酯(FS-2)

将 2.3.1 体系中的荧光素用二氯荧光素(1.2 g)取代, 其他条件不变. 最后得淡黄色FS-2 粉末 1.65 g, 产率 78%, mp: 165-167℃. ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 300 MHz): δ 8.05 (d, $^3J_{H,H}$ = 7.1 Hz, 1H), 7.82 (d, $^3J_{H,H}$ = 8.2 Hz, 4H), 7.73~7.74 (m, 2H), 7.50 (d, $^3J_{H,H}$ = 8.20 Hz, 4H), 7.17 (m, 1H), 7.04 (d, $J_{H,H}$ = 2.1 Hz, 2H), 6.95 (d, $J_{H,H}$ = 2.1 Hz, 2H), 2.43 (s, 6H). FTIR (KBr): ν = 1775 (CO, s) cm^{-1}. Elemental analysis (%) calcd. for $C_{34}H_{22}Cl_2O_9S_2$: C 57.59, H 3.10, S 9.03; found: C 57.55, H 3.12, S 9.06.

2.4 实验步骤

2.4.1 样品制备

FS-1 和FS-2 分别溶解在二甲基亚砜(DMSO)中配制成 0.20 mmol·L^{-1} 探针储备液. XO(1.0 U mL^{-1}), HPX (10 mmol·L^{-1}), GSH (1.0 mmol·L^{-1}), H_2O_2 (1.0 mmol·L^{-1}), $CoSO_4$ (1.0 mmol·L^{-1}), NaClO (1.0 mmol·L^{-1}), *t*-BuOOH (1.0 mmol·L^{-1}), SIN-1 (1.0 mmol·L^{-1}), 1,4-氢醌 (HQ, 1.0 mmol·L^{-1})溶于水配成溶液. NOC-5 溶于 10 mmol·L^{-1} NaOH溶液配成 1.0 mmol·L^{-1}, KO_2溶于DMSO配成 1.0 mmol·L^{-1}的溶液.

2.4.2 荧光分析

荧光发射光谱是通过Cary Eclipse型荧光分光光度计(氙灯, 1.0 mmol·L^{-1}石英皿)获得的. 在 10 mL比色管中依次加入HEPES缓冲溶液(2.0 mL, 0.10 mol·L^{-1}), FS-1 或 FS-2 (1.0 mL, 0.20 mmol·L^{-1}), 和 H_2O_2 或 其他化合物. 然后用二次水稀释定容到刻度, 摇匀, 在 37℃放置反应 40 分钟, 分别测定$\lambda_{ex/em}$ = 491/515 nm和 493/520 nm的荧光强度. 同时测定空白.

2.4.3 细胞培养

单层巨噬细胞制备依据以前的文献报道[19]. 用不含血清的RPMI-1640 培养液(3×2 mL)灌洗Balb/c小鼠腹腔, 获得腹膜巨噬细胞. 在 1200 rpm离心机上 4 ℃离心 5 min, 去上清液, 用HEPES悬浮清洗一次, 再加入含 10%小牛血清的RPMI-1640 培养液, 调整细胞浓度为 1.0×10^4 cells mL^{-1}, 移入培养皿, 皿中提前放入无菌盖玻片. 将皿置于CO_2培养箱, 37℃下孵育 4 h. 取出后用温的无血清的培养液冲洗掉未贴壁的细胞, 再用FS-1(10 μmol·L^{-1}) 或FS-2 孵育 30 min, 然后向部分皿中加入PMA (2 ng/mL)或H_2O_2 (10 μmol·L^{-1}), 再孵育 30 min. 然后用HEPES (20 mmol·L^{-1}, pH 7.4) 清洗, 进行荧光成像.

2.4.4 荧光成像

将载有活细胞的盖玻片倒置于载玻片上, 进行

共聚焦激光扫描显微镜成像. 选 40 倍的物镜, 激发波长 488 nm, 发射滤光片为 505~550 nm.

3 结果与讨论

3.1 探针设计与合成

基于H_2O_2特异性催化水解磺酸酯[17], 我们设计合成了FS-1 和FS-2 两种探针. 选用荧光素作为荧光团, 主要是因为荧光素具有良好的生物兼容性, 高的荧光量子产率和大的消光系数, 以及它的长的激发和发射波长能够避免光对生物样品的损伤及细胞自发荧光的干扰, 而且它的激发和发射波长与目前的共聚焦激光扫描显微镜匹配良好. 探针合成方法简单, 产率高, 其结构均通过元素分析, IR, ^{1}H NMR和^{13}C NMR表征.

3.2 光谱性质和实验条件优化

本文在模拟生理条件下(20 mmol/L HEPES, pH 7.4)研究了FS-1和FS-2的荧光性质. 实验表明FS-1和FS-2探针自身几乎没有荧光, 但加入过氧化氢(H_2O_2)后荧光强度显著增大(图 1). 吸收最大波长和发射光谱证明了探针FS-1 和FS-2 与H_2O_2反应后分别产生了荧光素和二氯荧光素.

介质的pH值对于体系荧光强度起着非常重要的作用. 实验发现该探针对H_2O_2的应答, 最佳的pH范围是 7.4~7.8. 比较了体系在pH =7.4 的HEPES, Tris-HCl, NH_4Ac-NaOH, KH_2PO_4-Na_2HPO_4缓冲溶液中的荧光变化, 结果显示在HEPES缓冲溶液中体系的相对荧光强度变化最大. 由于HEPES是常用的生理缓冲溶液, 所以此实验体系我们选择HEPES(pH = 7.4) 作为检测H_2O_2的介质, 其最佳浓度是 20 mmol·L^{-1}.

图 2 显示了室温条件下 20 μmol·L^{-1} FS-1(20 mmol·L^{-1} HEPES, pH 7.4)和H_2O_2 (20 μmol·L^{-1}) 的反应时间对体系的荧光强度的影响. 实验结果表明FS-1和H_2O_2 反应40 min后体系的荧光强度达到最大且稳定.

在优化的实验条件下, 分别加入不同浓度的H_2O_2, 测得体系的标准工作曲线(图3). 实验表明, 对于探针FS-1, H_2O_2含量在 1.00×10^{-7}~2.00×10^{-5} mol·L^{-1}范围内与ΔF呈良好的线性关系(图 3(a)), 相关系数R=0.9929. 11 份平行空白的标准偏差S_0 = 0.046, 检测限为 2.6×10^{-8} mol·L^{-1}; 对于探针FS-2, H_2O_2含量在 1.00×10^{-7}~2.00×10^{-5} mol·L^{-1}范围内与ΔF呈良好的线性关系(图 3(b)), 相关系数 R=0.9973. 11 份平行空白的标准偏差S_0= 0.043, 检测限为 8.9×10^{-9} mol·L^{-1}.

另外, 本文测试了FS-1 和FS-2 与其他活性氧(ROS)种类, 还原剂, 谷胱甘肽(GSH)以及酯酶等反应的荧光变化. 20 μmol·L^{-1} FS-1(20 mmol·L^{-1} HEPES, pH 7.4)与H_2O_2(20 μmol·L^{-1})37℃反应 40 min, 测其荧光强度与同条件下探针与O_2^{-}, ·OH, NaOCl, *t*-BuOOH, GSH, NOC-5, 酯酶, SIN-1, 抗坏血酸(Vc)和 HQ等反应的荧光强度进行比较, 实验结果见表 1. 其中NaOCl, *t*-BuOOH, GSH, NOC-5, 酯酶, SIN-1,

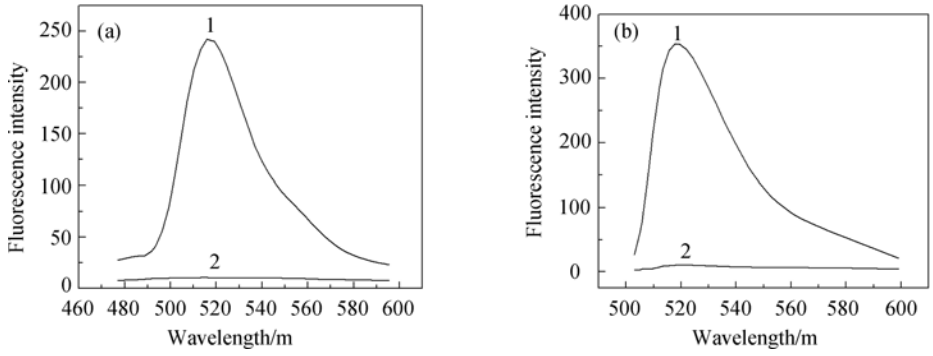


图 1 (a) 20 μmol·L^{-1} FS-1 和 100 μmol·L^{-1} H_2O_2 37℃反应 40 min后的发射光谱(1) 和空白发射光谱 (2) ($\lambda_{ex/em}$ = 491/515 nm). (b) 20 μmol·L^{-1} FS-2 和 100 μmol·L^{-1} H_2O_2 37℃反应 40 min后的发射光谱 (1)和空白发射光谱 (2) ($\lambda_{ex/em}$ = 493/520 nm)

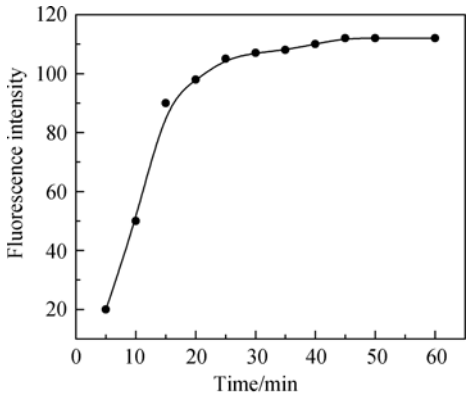


图 2　20 μmol·L^{-1} FS-1 (20 mmol·L^{-1} HEPES, pH 7.4) 和 H_2O_2 (20 μmol·L^{-1})在室温下反应的荧光动力学响应($\lambda_{ex/em}$ = 491/515 nm)

Vc和 HQ的浓度均为 20 μmol·L^{-1}; $O_2^{\cdot-}$是由次黄嘌呤(HPX: 1.0 mL, 10 mmol·L^{-1})和黄嘌呤氧化酶(XO: 1.0 mL, 1.0 UmL^{-1})反应产生或由KO_2 (20 μmol·L^{-1})溶液得到; ·OH 是由 H_2O_2 (20 μmol·L^{-1}) 和 Fe^{2+} (20 μmol·L^{-1}) 发生Fenton反应产生. 探针FS-2 与ROS和其他生物还原剂反应的实验条件、过程与探针FS-1的相似, 测定体系在$\lambda_{ex/em}$ = 493/520 nm处的荧光响应, 实验结果同样见表 1. 表中数据显示: 探针FS-1 和FS-2 与H_2O_2反应后有明显的荧光响应, 而与Vc, GSH, HQ, 酯酶及其他ROS反应后荧光很弱, 尤其与·OH反应后几乎不产生荧光. 所以我们认为探针FS-1 和FS-2 用于检测H_2O_2具有很高的选择性.

3.3　活细胞内H_2O_2的荧光成像

荧光成像见图 4. 图 4(a)是巨噬细胞经探针孵育后的荧光图片, 荧光几乎可以忽略. 以图 4(a)的成像参数为基准, 探针孵育过的、用 PMA 刺激的细胞呈现明亮的绿色荧光(图 4(b)); 探针孵育过的、分别用

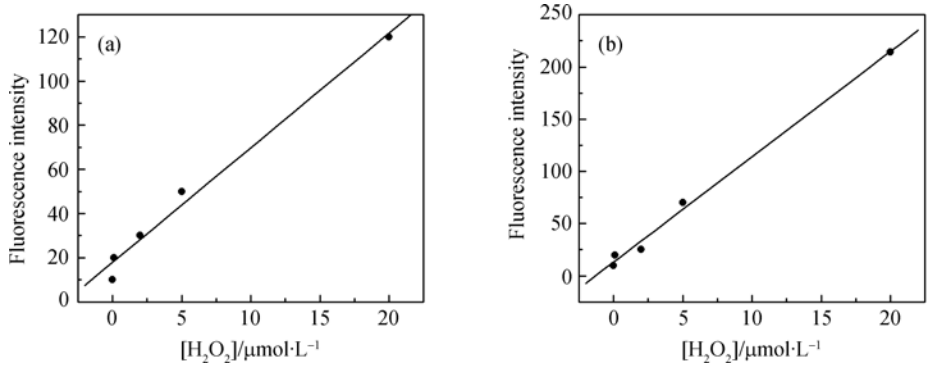


图 3　(a) 20 μmol·L^{-1} FS-1 (20 mmol·L^{-1} HEPES, pH 7.4)与不同浓度的H_2O_2的荧光响应. (b) 20 μmol·L^{-1} FS-2 (20 mmol·L^{-1} HEPES, pH 7.4)与不同浓度的H_2O_2的荧光响应. 实验条件: 室温下探针与H_2O_2反应 40 min后测荧光; 测定发射波长范围为 510~580 nm

表 1　FS-1 和 FS-2 与多种活性氧(ROS)和生物还原剂反应的相对荧光强度(RFI)

Compounds	RFI		Compounds	RFI	
	FS-1	FS-2		FS-1	FS-2
Blank	10	20	NO· (NOC-5)	17	25
H_2O_2	110	214	ONOO$^-$(SIN-1)	18	24
$O_2^{\cdot-}$ (XO/HPX)	23	18	HQ	18	26
$O_2^{\cdot-}$ (KO_2)	42	40	Esterase	10	21
OH	3	5	GSH	28	30
$^-$OCl	33	28	Vc	11	10
t-BuOOH	12	14			

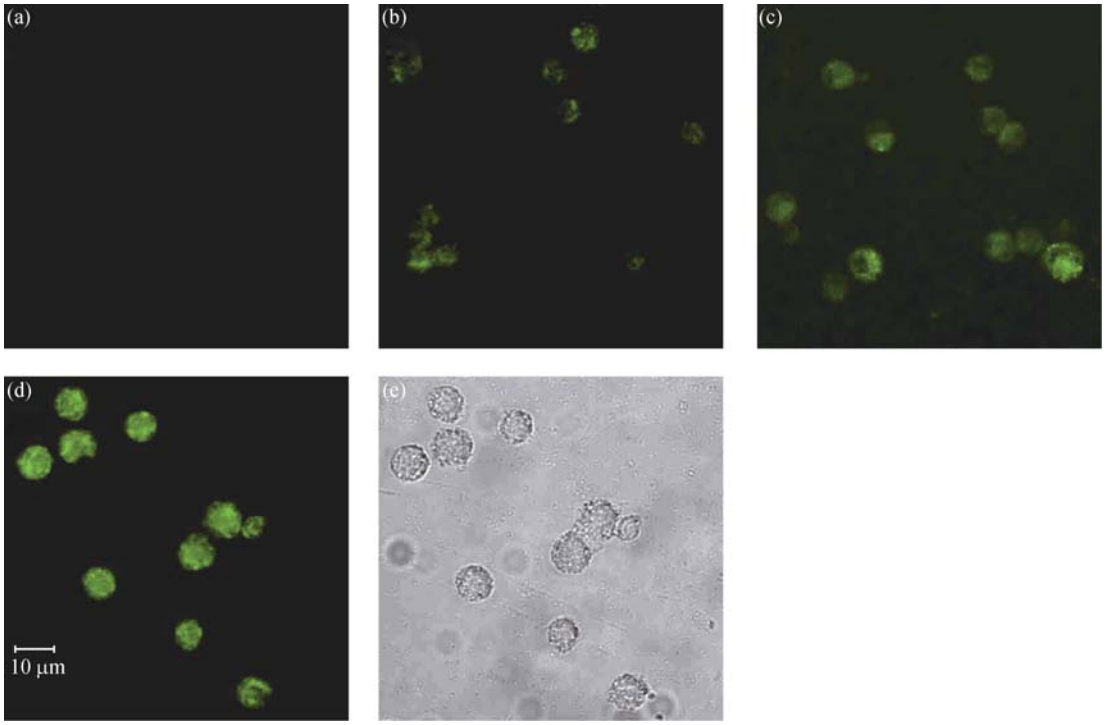


图 4　巨噬细胞(PM)内H_2O_2的荧光成像

(a) 用 10 μmol·L^{-1} FS-1, 37℃下孵育 30 min后PM的荧光成像; (b) 用PMA (2 ng/mL)刺激FS-1 孵育过的PM, 37℃下再孵育 30 min后的荧光成像; (c) 向FS-1孵育过的PM中外加10 μmol·L^{-1} H_2O_2, 37℃下孵育30 min后的荧光成像; (d) 向FS-2孵育过的PM中外加10 μmol·L^{-1} H_2O_2, 37℃下孵育 30 min后的荧光成像; (e) FS-2 孵育后外加H_2O_2处理的PM的亮场成像(标尺 =10 μm)

10 μmol·L^{-1} H_2O_2处理后的细胞, 亦呈现明亮的绿色荧光(图 4(c), (d)), 但荧光强度有一定的差异. 对应图4(d)的亮场照片图 4(e), 可以看出整个细胞成像过程中, 细胞存活状态良好. 这些实验表明: FS探针具有良好的膜渗透性, 低毒性, 能对活细胞内H_2O_2微摩尔级浓度变化产生响应, 而且细胞内本身存在的物质(如GSH和Vc)不影响荧光成像.

4　结论

本文设计合成了新型荧光探针FS-1 和FS-2; 详细讨论了两种探针对过氧化氢的荧光应答及细胞内过氧化氢的成像. 由该探针建立起来的检测H_2O_2的方法具有很高的选择性及灵敏度; 检测体系的激发和发射波长位于远可见光区, 可以有效避免细胞自发荧光的干扰及对细胞和组织的损伤. 细胞成像表明, 探针具有良好的膜渗透性, 低毒性, 且能对活细胞内H_2O_2微摩尔级浓度变化产生应答. 该方法的建立对研究生物体内H_2O_2的产生, H_2O_2导致的各种疾病机制及H_2O_2介导的信号转导途径具有非常重要的理论及实际意义.

致谢　本文得到国家重点基础研究发展计划 (批准号: 2007CB936000)、国家杰出青年基金(批准号: 20725518)、国家自然科学基金重大研究计划(批准号: 90713019)、国家自然科学基金(批准号: 20875057)、山东省自然科学基金(批准号: Y2007B02)和山东省科技发展计划(批准号: 2008GG30003012) 项目资助, 特此一并致谢.

参考文献

1 Benoît D A, Michel B T. ROS as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8: 813—824[DOI]

2 Ignacio D, Aneta S, Nuria A, Gabriella D V, Ana C, Angel R N. p38a MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. Cancer Cell, 2007, 11: 191—205[DOI]

3 Miller E W, Tulyathan O, Isacoff E Y, Chang C J. Molecular imaging of hydrogen peroxide produced for cell signaling. Nat Chem Biol, 2007, 3: 263—267[DOI]

4 Ishikawa K, Takenaga K, Akimoto M, Koshikawa N, Yamaguchi A, Imanishi H, Nakada K, Honma Y, Hayashi J. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. Science, 2008, 320: 661—664[DOI]

5 Wood Z A, Poole L B, Karplus P A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. Science, 2003, 300: 650—653[DOI]

6 Elizabeth A V, Alison M D, Brian A M. Hydrogen peroxide sensing and signaling. Molecular Cell, 2007, 26: 1—14[DOI]

7 Keston A S, Brandt R. The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. Anal Biochem, 1965, 11: 1—5[DOI]

8 Royall J A, Ischiropoulos H. Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescin and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H_2O_2 in cultured endothelial cells. Arch Biochem Biophys, 1993, 302(2): 348—55[DOI]

9 Maeda H, Fukuyasu Y, Yoshida S, Fukuda M, Saeki K, Matsuno H, Yamauchi Y, Yoshida K, Hirata K, Miyamoto K. Fluorescent probes for hydrogen peroxide based on a non-oxidative mechanism. Angew Chem, Int Ed, 2004, 43: 2389—2391[DOI]

10 Chang M C Y, Pralle A, Isacoff E Y, Chang C J. A selective, cellpermeable optical probe for hydrogen peroxide in living cells. J Am Chem Soc, 2004, 126: 15392—15393[DOI]

11 Miller E W, Albers A E, Pralle A, Isacoff E Y, Chang C J. Boronate-based fluorescent probes for imaging cellular hydrogen peroxide. J Am Chem Soc, 2005, 127: 16652—16659[DOI]

12 Whiteman M., Armstrong J S, Jones D P, Halliwell B. Peroxynitrite mediates calciumdependent mitochondrial dysfunction and cell death via activation of calpains. FASEB J, 2004, 18: 1395—1397

13 Whiteman M, Rose P, Siau J L, Cheung N S, Tan G S, Halliwell B, Armstrong J S. Hypochlorous acid-mediated mitochondrial dysfunction and apoptosis in human hepatoma Hepg2 and human fetal liver cells: Role of mitochondrial permeability transition. Free Radic Biol Med, 2005, 38: 1571—1584[DOI]

14 Armstrong J S, Jones D P. Glutathione depletion enforces mitochondrial permeability transition and apoptosis in HL60 cells overexpressing Bcl-2. FASEB J, 2002, 16: 1263—1265

15 Armstrong J S, Whiteman M, Yang H, Jones D P, Sternberg P. Cysteine-starvation activates the redox-dependent mitochondrial permeability transition in retinal pigment epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45: 4183—4189[DOI]

16 Zielonka J, Kalyanaraman B. ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis——a critical commentary. Free Rad Biol & Med, 2008, 45: 1217—1219[DOI]

17 Xu K H, Tang B, Huang H, Yang G W, Chen Z Z, Li P, An L G. Strong red fluorescent probes suitable for detecting hydrogen peroxide generated by mice peritoneal macrophages. Chem Commun, 2005, 5974—5976

18 Xu K H, Liu X, Tang B. A phosphinate-based red fluorescent probe for imaging the superoxide radical anion generated by RAW264.7 macrophages. Chem Bio Chem, 2007, 8: 453—458

19 Sodhi A, Singh R K, Singh S M. Effect of IFN priming of murine peritoneal macrophages on the activation of tumoricidal state by IL-1, TNF and cisplatin. Clin Exp Immunol, 1992, 888: 350—355

Sulfonate-based fluorescent probes for imaging hydrogen peroxide in living cells

XU KeHua, LIU Fen, WANG HuiXia, WANG ShanShan, WANG LuLu & TANG Bo*

College of Chemistry, Chemical Engineering and Materials Science, Engineering Research Center of Pesticide and Medicine Intermediate Clean Production, Ministry of Education, Key Laboratory of Molecular and Nano Probes, Ministry of Education, Shandong Normal University, Jinan 250014, China

Abstract: Based on a mechanism of H_2O_2-mediated hydrolysis of sulfonates, two fluorescein disulfonates compounds (FS-1 and FS-2) are designed and synthesized as highly selective and sensitive fluorescent probes for imaging H_2O_2 in living cells, and the probes were characterized with elemental analysis, IR, ^{1}H NMR and ^{13}C NMR. Upon reaction with H_2O_2, the probes exhibit strong fluorescence responses and high selectivity for H_2O_2 over other reactive oxygen species and some biological compounds. Furthermore, the sulfonate-based probes, as novel fluorescent reagents, are cell-permeable and can detect micromolar changes in H_2O_2 concentrations in living cells by using confocal microscopy.

Keywords: fluorescein disulfonates, fluorescent probe, cell imaging, hydrogen peroxide