

文章编号: 1000-7032(2025)07-1333-10

近红外次氯酸荧光探针的构建及其类风湿性关节炎成像研究

何 静^{1†}, 杨心怡^{1†}, 尚主业^{1*}, 张志强¹, 王艳色², 孟庆涛^{1*}

(1. 辽宁科技大学 化学工程学院, 辽宁 鞍山 114051;

2. 大连理工大学 化工学院, 辽宁 大连 116024)

摘要: 次氯酸(HOCl)水平升高可能是慢性炎症性关节疾病的标志之一。因此,开发有效的、快速准确检测或监测HOCl的方法对于进一步了解HOCl在类风湿性关节炎(RA)中的作用具有重要意义。为此,本文报道了一种用于检测和监测HOCl的近红外(NIR)荧光探针(HN)。在HOCl的存在下,HN的酚羟基被氧化生成醌类化合物,导致其近红外荧光被猝灭。探针HN具有多种优势,如较长的发射波长($\lambda_{em}=660$ nm)、较大的Stokes位移(200 nm)、较高的选择性和灵敏度(LOD为54.8 nmol/L)以及较宽的pH适用范围(4.5~10.5)。利用探针HN基测试条实现了实际水样中HOCl的“肉眼”检测。另外,该探针已成功用于活的斑马鱼和小鼠体内外源性和内源性HOCl的荧光成像。最重要的是,探针HN在监测HOCl介导的RA治疗反应方面效果显著。因此,HN为进一步了解HOCl在RA中的作用和评价RA的药物治疗效果提供了新的方法。

关键词: 生物成像; 荧光探针; 次氯酸; 真实水样; 类风湿性关节炎

中图分类号: O482.31 文献标识码: A

DOI: 10.37188/CJL.20250050 CSTR: 32170.14.CJL.20250050

Construction of Near-infrared Hypochlorous Acid Fluorescent Probe and Its Imaging in Rheumatoid Arthritis

HE Jing^{1†}, YANG Xinyi^{1†}, SHANG Zhuye^{1*}, ZHANG Zhiqiang¹, WANG Yanshai², MENG Qingtao^{1*}

(1. School of Chemical Engineering, University of Science and Technology Liaoning, Anshan 114051, China;

2. School of Chemical Engineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

* Corresponding Authors, E-mail: shangzhuye@ustl.edu.cn; qtmeng@ustl.edu.cn

Abstract: Elevated levels of hypochlorous acid (HOCl) may be one of the hallmarks of chronic inflammatory joint disease. Therefore, the development of effective methods for rapid and accurate detection or monitoring of HOCl is important for further understanding the role of HOCl in rheumatoid arthritis (RA). Herein, a near-infrared (NIR) fluorescent probe (HN) for the detection and monitoring of HOCl was reported. In the presence of HOCl, the phenolic hydroxyl group of HN is oxidized to produce quinone compounds, resulting in quenching of its NIR fluorescence. Probe HN has several advantages such as long emission wavelength ($\lambda_{em}=660$ nm), large Stokes shift (200 nm), high selectivity and sensitivity (LOD is 54.8 nmol/L), and wide pH applicability range (4.5–10.5). The “naked-eye” detection of HOCl in real water samples has been realized using the probe HN-based test strip. In addition, the probe has been successfully used for fluorescence imaging of exogenous and endogenous HOCl in living zebrafish and mice. Most importantly, the probe HN has shown remarkable effectiveness in monitoring HOCl-mediated responses to RA therapy. Thus, HN provides a novel approach to further understand the role of HOCl in RA and evaluate the efficacy of drug therapy for RA.

Key words: bioimaging; fluorescent probes; hypochlorous acid; real water samples; rheumatoid arthritis

收稿日期: 2025-02-28; 修订日期: 2025-03-21

基金项目: 辽宁省自然科学基金(2024LNYKJ27); 辽宁科技大学省级重点实验室开放课题基金(2024KFKT-10)

Supported by The Natural Science Foundation of Liaoning Province (2024LNYKJ27); Open Fund Project of Key Laboratory of Functional Materials in Universities of Liaoning Province (2024KFKT-10)

†: 共同贡献作者

1 引 言

类风湿性关节炎(RA)是一种广泛存在的慢性全身性炎症性自身免疫性疾病,以软骨破坏和慢性关节滑膜炎为主要特征。该病长期以来严重威胁人类健康,被认为是导致人类残疾和死亡的主要原因之一^[1-3]。由于病因不清,RA的发病机制复杂,至今尚未完全阐明其病因学^[4-5]。最近的研究结果发现,次氯酸(HOCl)的过量生成与各种炎症性疾病的发病密切相关。过多的HOCl生成被认为是RA的标志之一^[6-7]。HOCl是由髓过氧化物酶催化的H₂O₂和Cl⁻的过氧化作用产生的^[8-9]。然而,HOCl的表达紊乱可导致一些严重的疾病,包括神经元退化、关节炎、肺损伤、类风湿、动脉粥样硬化,甚至癌症^[10]。此外,HOCl通常作为一种高效的消毒剂和漂白剂,用于自来水的预处理和工业废水处理或工业漂白^[11]。但HOCl的过量排放会对生态环境造成严重破坏,高剂量摄入也会引起一些致命性疾病^[12-14]。因此,开发高效、准确的HOCl在RA中的作用以及评估HOCl相关疾病的药物治疗疗效具有重要意义和价值。此外,还需要基于探针的试纸来使用肉眼评估真实水样中的HOCl水平。

与其他检测技术(如化学发光、比色、电化学和色谱分析等)相比,荧光成像技术因其灵敏度高、时空分辨率好、生物相容性好、实时成像等独特优势,逐渐发展成为一种很有前途的成像方法^[15-17]。到目前为止,已经开发了许多基于不同响应机制的荧光探针,包括与HOCl介导的C=C双键^[18]、C=N双键^[10-11,19]、胍^[20]、对甲氧基苯酚^[21]、对烷氧基苯胺^[22]、芳基甲基硫醚^[23]、N,N-二甲基硫代氨基甲酸酯^[24]、螺环酰肼基团^[25]、芳基硼酸和芳基硼酸频哪醇酯^[26-27]和吩噻嗪的S原子^[28]的氧化反应。然而,大多数先前开发的HOCl荧光探针仍然存在一些问题,包括较短的发射波长^[11,20,22]、较差的水溶性^[10,29]和较小的斯托克斯位移^[6,11],这限制了它们在生物系统和真实水样中的应用。同时,荧光化学传感器用于检测和监测体内HOCl水平以及评估RA治疗反应的报道也很少。

基于此,本文设计合成了一种近红外HOCl荧光探针HN,该探针HN分子中的C=C双键能够被HOCl特异性氧化发生断键反应,导致其近红外荧光发生猝灭。探针HN具有多种优势,如近红外发射(λ_{em} =660 nm)、较大的Stokes位移(200 nm)、较高的选择性和灵敏度(LOD为54.8 nmol/L)以及较

宽的pH适用范围(4.5~10.5)。利用探针HN基试纸,成功地使用“肉眼”对实际水样中的HOCl进行了半定量分析。另外,探针HN被成功应用于活体动物模型中内源性和外源性HOCl的成像。最重要的是,探针HN在监测HOCl介导的RA治疗反应方面效果显著(图1(b))。

2 实 验

2.1 主要仪器与试剂

AVANCE 400 MHz型核磁共振波谱仪(瑞士BRUKER公司);6530Q-TOFLC/MC型液相质谱联用仪;Lambda-900型紫外分光光度计;FS5型爱丁堡荧光光谱仪;Ami小动物活体成像系统。

4-甲基喹啉和4-羟基苯甲醛购自麦克林试剂有限公司。碘乙烷来源于北京百灵威科技有限公司。哌啶、金属离子(硝酸盐)、阴离子(钠盐)均来自国药化学试剂有限公司。所有的溶剂和试剂都是来自商业供应商的分析级,使用时没有进一步纯化。

2.2 探针HN的合成

将碘化N-乙基-4-甲基-喹啉鎓盐(0.3 g, 1 mmol)、6-羟基-2-萘甲醛(0.171 g, 1 mmol)、哌啶(200 μ L)和20 mL乙醇加入到圆底烧瓶中并回流1.5 h,温度设置为80 $^{\circ}$ C,然后将热过滤得到的暗红色固体,经乙醇重结晶得到血红色固体产物HN,产率为55%,熔程为205.2~205.5 $^{\circ}$ C。ESI: m/z [M3-I]⁺ = 326.153 1, 计算值326.153 9。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.12 (s, 1H), 9.39 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 9.11 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 8.59~8.50 (m, 2H), 8.39~8.23 (m, 4H), 8.17 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 8.08~8.02 (m, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.28~7.09 (m, 2H), 5.02 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 1.61 (t, J = 7.2 Hz, 3H)。¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 157.7, 153.3, 147.4, 144.2, 138.1, 136.4, 135.6, 131.4, 131.0, 130.7, 129.5, 127.9, 127.4, 127.1, 125.2, 119.9, 119.5, 118.8, 116.6, 109.7, 52.6, 15.6(补充文件方案S1、图S1~S3)。

2.3 溶液配制及光谱分析

将HN固体(0.016 g)溶解于二甲基亚砜(DMSO)中,配制成浓度为 5×10^{-4} mol/L的荧光探针HN的浓溶液。测试时取出2.0 mL浓溶液于100 mL的容量瓶中,然后用PBS缓冲液将其稀释到 1×10^{-5} mol/L。在紫外和荧光光谱测试中,将由各种阴离子、活性氧及硫醇制成的分析液与探针

HN溶液均匀混合,3 min后记录紫外和荧光数据。荧光激发和发射狭缝宽度均为5 nm。

2.4 探针HN基测试条的制备及实际水样分析

将硅胶板(25 mm×75 mm)浸没在50 mL HN(0.5 mmol/L)的二氯甲烷溶液中10 min后自然干燥得到具有HOCl检测功能的探针HN基测试条。为了探究该测试条检测实际水样中HOCl的能力,将HN基测试条浸泡在含有不同浓度HOCl的实际水样中10 s,然后自然干燥并记录在自然光和紫外光(365 nm)下测试条的颜色变化。

2.5 体内成像实验

所有的动物实验均得到了“大连理工大学”动物伦理委员会的批准(编号:DUTSCE250325-02)。对于外源性HOCl的荧光成像,将成年斑马鱼在HN(20 μmol/L)的PBS缓冲液中孵育3 min,然后在含有HOCl(20 μmol/L)的PBS缓冲液中孵育1 min、3 min、6 min进行荧光成像。外源性HOCl的荧光成像是以PBS缓冲液孵育的斑马鱼作为对照组。对于斑马鱼内源性HOCl的荧光成像,首先,用2 μg/mL的脂多糖(LPS)孵育成年斑马鱼3 h,随后将LPS孵育的成年斑马鱼在20 μmol/L HN中孵育3 min。内源性HOCl的荧光成像是以分别用PBS缓冲液和LPS孵育的斑马鱼作为对照组,且处理程序相同。

在所有荧光实验中,裸鼠均在异氟烷气流中麻醉。对于外源性HOCl的荧光成像,在小鼠的大腿皮下注射探针20 μmol/L、125 μL HN后,在相同部位注射0.1 mmol/L、80 μL HOCl,分别在1,3,6,9 min时小鼠进行成像。使用未处理的小鼠作为对照组。对于裸鼠体内内源性HOCl的成像,首先

在小鼠左腿皮下注射5 μg/mL、80 μL LPS,然后将小鼠放入恒温箱中等待5 h。随后,原位注射探针HN(20 μmol/L,125 μL),同时在小鼠右腿相应部位注射等量HN作为对照组,分别在1 min、3 min、6 min、9 min和12 min时小鼠进行成像。

2.6 RA模型中HOCl的荧光成像

将含有2 μg/mL λ-卡拉胶10 μL PBS缓冲液注射到小鼠左腿关节处,然后将小鼠置于生物培养箱中4 h以制备RA模型。右后肢注射10 μL PBS作为对照组。随后将20 μL、20 μmol/L HN注射到RA模型小鼠的左腿关节中。同时,在健康小鼠的右腿关节注射等量的HN作为对照组,然后进行荧光成像。为检测治疗后RA关节中HOCl水平,在RA关节中注射10 μL、2 μg/mL的抗关节炎药物甲氨蝶呤(MTX)。注射MTX 6 h后,在左右关节注射20 μL、20 μmol/L HN,然后进行生物成像。

3 结果与讨论

3.1 探针HN对HOCl的识别机制研究

在HOCl的存在下,探针HN的酚羟基能够被氧化生成醌类化合物,导致探针HN的ICT效应被抑制,使其荧光被猝灭(图1(a))。为了证实所提出的HN对HOCl的识别机理,首先,通过HR-MS测定了HN和HOCl的混合溶液,如图S3和S4所示。在加入HOCl之后,HN在 $m/z=326.1531$ (理论值 $m/z=326.1545$)处的分子离子峰并未消失,这是由于在正模式下测试条件下生成的HN=O的 m/z 与探针HN的 m/z 是相同的,因此,HR-MS分析表明探针HN被氧化生成了HN=O。然后,进

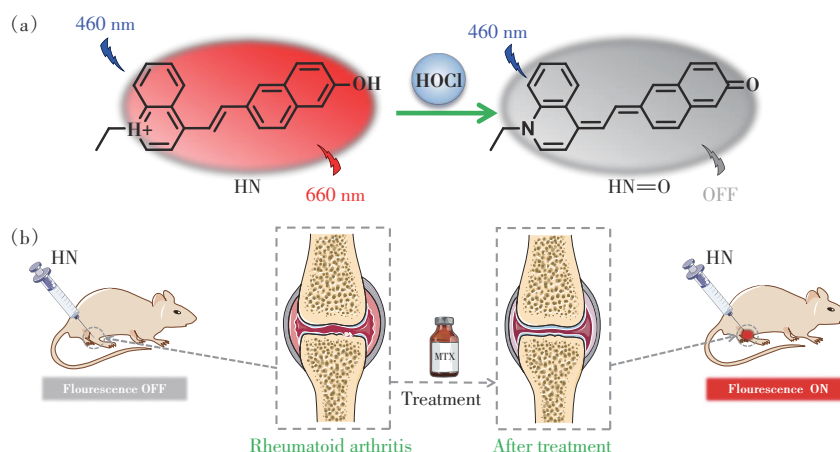


图1 (a)探针HN对HOCl的响应机制;(b)利用HN监测RA模型中的HOCl

Fig.1 (a) Response mechanism of probe HN to HOCl. (b) Monitoring of HOCl in RA model using HN

一步通过 ^1H NMR对识别机制进行了验证,发现向探针HN中加入HOCl之后,在 $\delta=10.12$ 处的酚羟基上H的信号峰消失,同时喹啉N-乙基上H的信号峰向高场发生移动(由 $\delta=5.05, 5.03, 5.01, 5.00$ 移动到 $\delta=4.84$;由 $\delta=1.63, 1.61, 1.59$ 移动到 $\delta=1.53$)(图S5)。因此, ^1H NMR有力地验证了我们所提出的传感机制(图1(a))。

3.2 探针HN对HOCl的紫外-可见光谱响应

首先,在含10% DMSO的PBS(20 mmol/L, pH=

7.4)缓冲液中研究了HN对HOCl的紫外-可见光谱滴定。结果如图2(a)所示,随着HOCl(0~1 mmol/L)浓度的增加,探针HN在425 nm处的吸收峰不断下降,同时在515 nm处逐渐出现了一个新的吸收峰,吸光度比($A_{425\text{ nm}}/A_{515\text{ nm}}$)显著降低。然而,当HOCl浓度达到1 mmol/L时,HN吸收峰强度不再变化,达到滴定平衡。随着HOCl的加入,吸收峰的比值($A_{425\text{ nm}}/A_{515\text{ nm}}$)从6.9降低到了0.46,下降了14倍(图2(a)插图)。

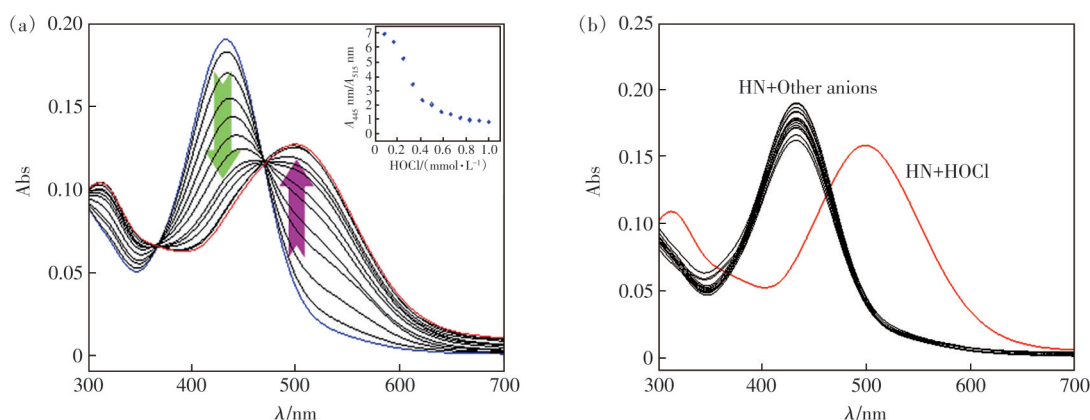


图2 (a) HN(10 $\mu\text{mol/L}$)溶液中加入HOCl(0~1 mmol/L)后的UV-Vis光谱(插图:吸光度比值($A_{425\text{ nm}}/A_{515\text{ nm}}$)与HOCl浓度的曲线);(b)探针HN(10 $\mu\text{mol/L}$)溶液中分别加入各种离子(1 mmol/L)后的UV-Vis光谱

Fig.2 (a) UV-Vis spectra of HN (10 $\mu\text{mol/L}$) upon the addition of HOCl (0–1 mmol/L) (Inset: Curve of absorbance ratio ($A_{425\text{ nm}}/A_{515\text{ nm}}$) versus the HOCl concentration). (b) UV-Vis spectra of probe HN (10 $\mu\text{mol/L}$) upon the addition of various ions (1 mmol/L)

随后,进一步探索了HN对HOCl的特异性识别。如图2(b)所示,在HOCl的存在下,HN的紫外-可见光谱显著下降,而当HN与其他分析物(1 mmol/L)共存时,没有观察到显著变化,包括 SO_3^{2-} , ClO^- , HSO_3^- , HCO_3^- , Cl^- , SO_4^{2-} , OH^- , Br^- , S^{2-} , NO_2^- , HSO_4^- , PO_4^{3-} , $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, AcO^- , F^- , NO_3^- , H_2PO_4^- , ONOO^- , $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 , $^1\text{O}_2$, Hcy, Cys, GSH和 $\cdot\text{O}_2^-$,表明探针HN对HOCl具有较高的选择性。

3.3 探针HN对HOCl的荧光光谱响应

在进一步研究HN对HOCl的发射光谱响应之前,在PBS缓冲液(DMSO: $\text{H}_2\text{O}=1:9$, 20 mmol/L, pH=7.4)中探究了探针HN的动力学稳定性,发现探针HN在660 nm处的最大发射峰峰值在45 h内保持稳定(图S6),表明探针HN具有高稳定性。随后,研究了HN对HOCl的发射光谱响应,探针HN在660 nm处的发射强度逐渐减弱,当HOCl浓度达到1 mmol/L时,探针HN的峰值降到最低值(图3(a)插图)。此外,在660 nm处的荧光强度与HOCl浓度(0~0.166 mmol/L)呈现完美的线性关系

($R^2=0.9988$)(图3(b)),由 $\text{LOD}=3\sigma/k^{[30]}$ 计算得到探针HN的检测限为54.8 nmol/L。结果表明,探针HN对HOCl的识别具有较高的灵敏度。

随后,利用荧光光谱进一步探讨了HN对HOCl的特异性识别。如图3(c)所示,当HN与其他分析物(1 mmol/L)(包括阴离子: SO_3^{2-} , H_2PO_4^- , HSO_3^- , HCO_3^- , Cl^- , SO_4^{2-} , OH^- , Br^- , S^{2-} , NO_2^- , HSO_4^- , PO_4^{3-} , $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, AcO^- , F^- , NO_3^- ;四种活性氧: H_2O_2 , ONOO^- , $\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$ 和 $\cdot\text{O}_2^-$;及三种硫醇:GSH, Hcy和Cys)共存时发射光谱保持不变。然而,单独加入HOCl后,发射光谱发生了显著变化(图3(d))。探针在其他离子的干扰下仍然能对HOCl进行识别,说明探针HN具备在复杂环境特异性识别HOCl的能力。

此外,还探究了HN在不同的pH条件下识别HOCl的能力(图S7)。识别HOCl前,探针HN的荧光强度在pH=4.5~10.5范围内荧光强度保持相对稳定。然而,加入HOCl后荧光发生明显猝灭,表明探针HN具有广泛的pH应用范围。

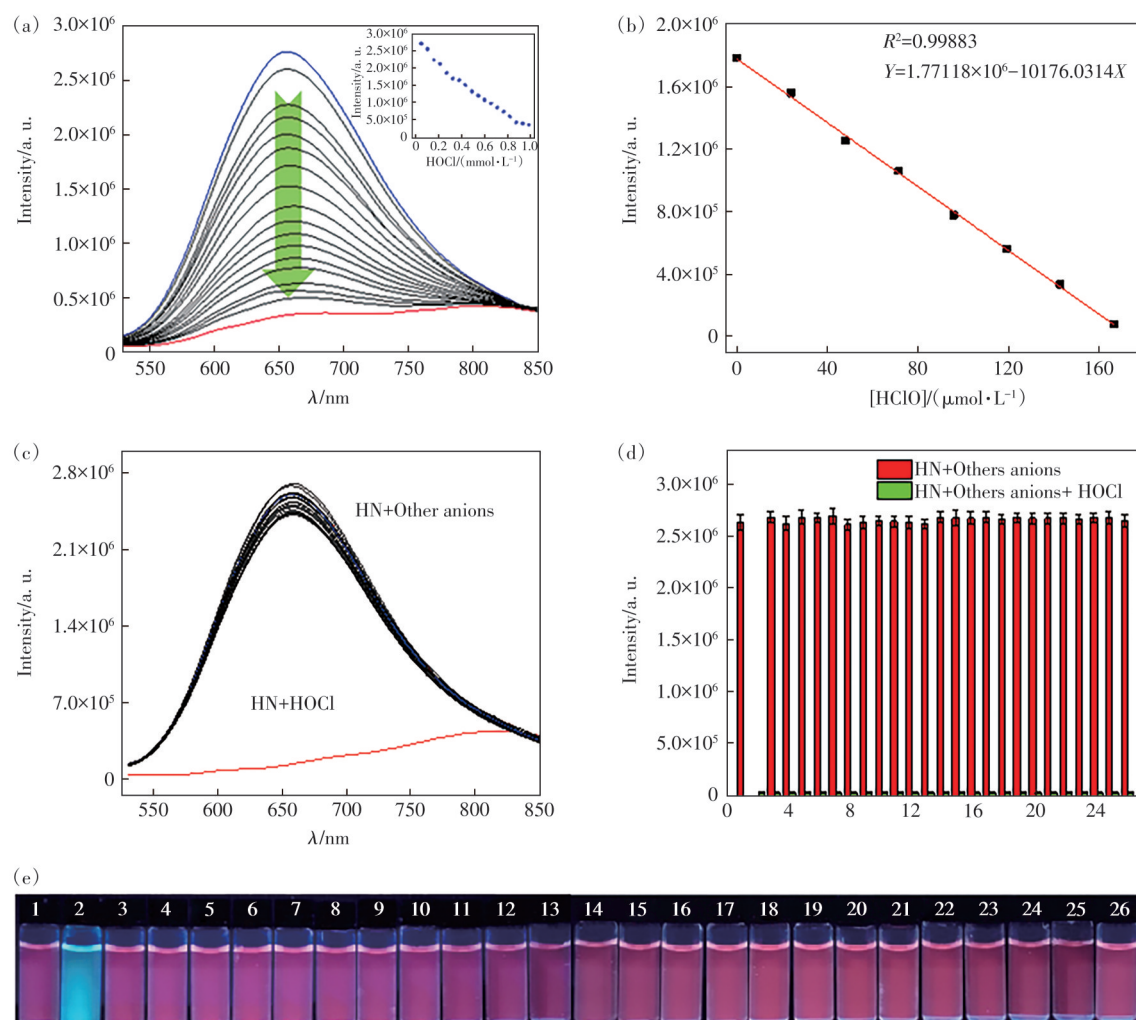


图3 (a)加入HOCl(0~1 mmol/L)后的HN(10 $\mu\text{mol/L}$)的荧光光谱(插图:HN在660 nm处的荧光强度随着HOCl浓度的变化曲线);(b)HN(5 $\mu\text{mol/L}$)在660 nm处的荧光强度随HOCl浓度变化曲线;(c)分别加入不同离子(1 mmol/L)后的HN(10 $\mu\text{mol/L}$)的荧光光谱;(d)HN(10 $\mu\text{mol/L}$)在不同干扰物存在下HOCl的荧光响应(1. Blank, 2. ClO^- , 3. HCO_3^- , 4. Cl^- , 5. SO_4^{2-} , 6. OH^- , 7. Br^- , 8. S^{2-} , 9. NO_2^- , 10. HSO_4^- , 11. PO_4^{3-} , 12. $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, 13. AcO^- , 14. F^- , 15. NO_3^- , 16. H_2PO_4^- , 17. SO_3^{2-} , 18. $\cdot\text{OH}$, 19. H_2O_2 , 20. ONOO^- , 21. $^1\text{O}_2$, 22. Cys, 23. GSH, 24. Hcy, 25. $\cdot\text{O}_2^-$, 26. HSO_3^-)

Fig.3 (a) Fluorescence spectra of HN (10 $\mu\text{mol/L}$) upon the addition of HOCl (0~1 mmol/L) (Inset: Fluorescence intensity of HN at 660 nm as a function of HOCl concentration). (b) Fluorescence intensity of HN (5 $\mu\text{mol/L}$) as a function of HOCl concentration. (c) Fluorescence spectra of HN (10 $\mu\text{mol/L}$) upon the addition of different ions (1 mmol/L). (d) Fluorescence response of HN (10 $\mu\text{mol/L}$) to HOCl in the presence of different interfering substances (1. Blank, 2. ClO^- , 3. HCO_3^- , 4. Cl^- , 5. SO_4^{2-} , 6. OH^- , 7. Br^- , 8. S^{2-} , 9. NO_2^- , 10. HSO_4^- , 11. PO_4^{3-} , 12. $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$, 13. AcO^- , 14. F^- , 15. NO_3^- , 16. H_2PO_4^- , 17. SO_3^{2-} , 18. $\cdot\text{OH}$, 19. H_2O_2 , 20. ONOO^- , 21. $^1\text{O}_2$, 22. Cys, 23. GSH, 24. Hcy, 25. $\cdot\text{O}_2^-$, 26. HSO_3^-)

3.4 实际水样中HOCl的测定

接下来,进一步探究了探针HN基试纸快速测定实际水样中HOCl含量的能力。如图4所示,探针HN基试纸在自然光下显示浅黄色,在紫外光(365 nm)下显示强烈的黄色荧光。探针HN基试纸浸泡在水样中5 min后颜色不断加深,同时,随着HOCl浓度(0~1.0 mmol/L)的不断加,试纸

的荧光强度不断降低,荧光颜色从浅黄色变为棕色。研究结果表明,探针HN基试纸可以方便、快速地测定实际水样中的HOCl。

3.5 体内HOCl的荧光成像

在进行体内HOCl荧光成像之前,通过MTT法^[29]评估了探针HN的细胞毒性,发现使用30 $\mu\text{mol/L}$ 探针HN孵育HeLa细胞,细胞的活力仍

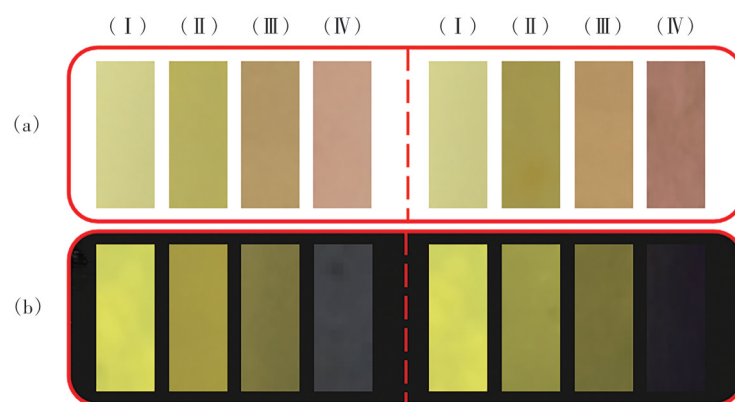


图4 探针 **HN** 基测试条检测实际水样中 HOCl 的比色(a)和荧光比色图(b)。左四组:饮用水,右四组:自来水。(I) 0 mmol/L, (II) 0.1 mmol/L, (III) 0.5 mmol/L, (IV) 1.0 mmol/L

Fig.4 Colorimetric (a) and fluorescence colorimetric plots (b) of probe **HN**-based test strip for the detection of HOCl in real water samples. Left four groups: drinking water, right four groups: tap water. (I) 0 mmol/L, (II) 0.1 mmol/L, (III) 0.5 mmol/L, (IV) 1.0 mmol/L

保持在 83.2%(图 S8),表明探针 **HN** 具有较低的细胞毒性。

首先,利用成年斑马鱼作为脊椎动物模型,研究了 **HN** 对外源性 HOCl 的体内成像能力。如图 S9 所示,在未处理的斑马鱼中没有发现明显的荧光信号。然而,用 **HN** (20 $\mu\text{mol/L}$) 孵育 3 min 后,其腹部显示出强烈的荧光信号,表明成年斑马对探针 **HN** 进行了有效的摄取。随后,将 **HN** 预处理的斑马鱼进一步用 HOCl 孵育,可以清楚地看到,随着孵育时间的增加,注射区的信号强度逐渐减弱直至完全消失。然后,在斑马鱼体内进一步探索了 **HN** 对内源性 HOCl 的荧光成像能力。如图

S10 所示,**HN** 孵育的斑马鱼在其腹部显示出强烈的荧光信号,而用 LPS (2 $\mu\text{g/mL}$) 刺激的斑马鱼和未经处理的斑马鱼以及先用 LPS 再用 **HN** 处理的成年斑马鱼中均未发现明显的荧光信号。上述实验表明,**HN** 可用于斑马鱼体内外源性和内源性 HOCl 的荧光成像。

另外,还在裸鼠中评估了 **HN** 对外源性 HOCl 体内成像的可行性。如图 5 所示,在裸鼠大腿皮下注射 20 $\mu\text{mol/L}$ 、125 μL 探针 **HN** 后,注射区域显示出强烈的荧光信号。然而,将 HOCl 原位注射到裸鼠大腿皮下之后,其荧光强度随着时间的推移逐渐降低,并在 9 min 时基本消失,说明 **HN**

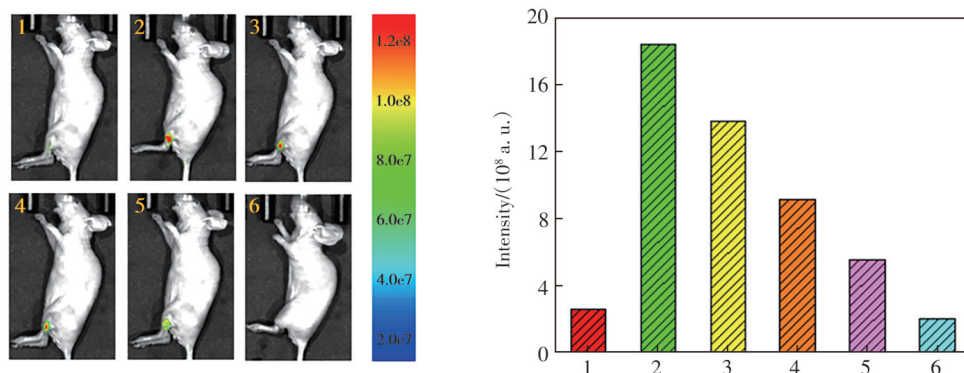


图5 小鼠体内外源性 HOCl 的荧光成像。(1)对照组,(2)小鼠腿部皮下注射 **HN** (20 $\mu\text{mol/L}$, 125 μL),(3)原位注射 HOCl (0.1 mmol/L, 80 μL),然后在(3) 1 min、(4) 3 min、(5) 6 min 和(6) 9 min 时记录成像图像。柱状图:注射区域平均荧光强度(激发波长:465 nm;发射波长:660 nm)

Fig.5 Fluorescence imaging of exogenous HOCl in mice. (1) Control group. (2) Mice were injected subcutaneously in the leg with **HN** (20 $\mu\text{mol/L}$, 125 μL). (3) HOCl (0.1 mmol/L, 80 μL) was injected *in situ*. Images were recorded at (3) 1 min, (4) 3 min, (5) 6 min and (6) 9 min. Histogram: Average fluorescence intensity of injected area (excitation wavelength: 465 nm; emission wavelength: 660 nm)

可以用于活鼠外源性HOCl的成像。随后,在裸鼠中进一步研究了HN对内源性HOCl的成像能力。如图6所示,在小鼠的左腿和右腿分别注射 $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $80\text{ }\mu\text{L}$ 的LPS和PBS 5 h后,未在注射部位显示出明显的荧光。然后,在左、右腿的相同注

射部位分别注射 $20\text{ }\mu\text{mol/L}$ 、 $125\text{ }\mu\text{L}$ HN,在两条后腿的注射部位观察到强烈的荧光信号。随着时间的推移,信号强度在右腿中基本不变,左腿的发射强度逐渐减弱,当时间达到12 min时,发射强度达到最低。

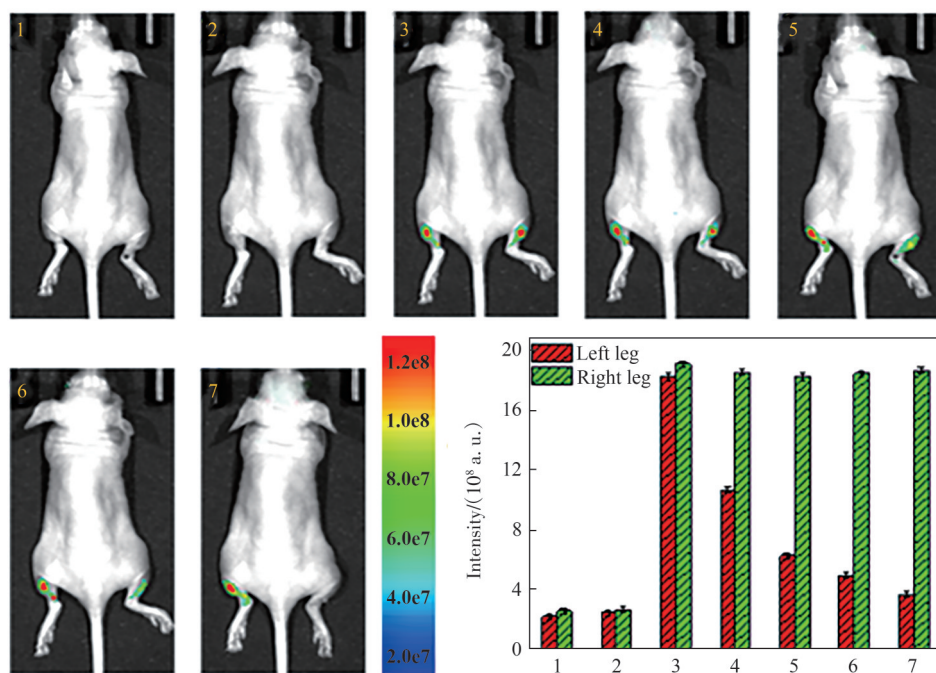


图6 小鼠体内内源性HOCl的荧光成像。(1)对照组(未处理小鼠),(2)小鼠左腿皮下注射LPS($5\text{ }\mu\text{g/mL}$, $80\text{ }\mu\text{L}$)5 h,然后原位注射HN($20\text{ }\mu\text{mol/L}$, $125\text{ }\mu\text{L}$),分别在(3)1 min、(4)3 min、(5)6 min、(6)9 min和(7)12 min时记录其荧光图像。柱状图:注射部位平均荧光强度。右腿仅注射HN($20\text{ }\mu\text{mol/L}$, $125\text{ }\mu\text{L}$)作为对照组(激发波长:465 nm,发射波长:660 nm)

Fig.6 Fluorescence imaging of endogenous HOCl in mice. (1) Control group (untreated mice). (2) mice were injected subcutaneously with LPS ($5\text{ }\mu\text{g/mL}$, $80\text{ }\mu\text{L}$) in the left leg for 5 h, and then HN ($20\text{ }\mu\text{mol/L}$, $125\text{ }\mu\text{L}$) was injected *in situ*. Images were recorded at (3) 1 min, (4) 3 min, (5) 6 min, (6) 9 min and (7) 12 min. Histogram: Average fluorescence intensity at the injection site. The right leg was injected only with HN ($20\text{ }\mu\text{mol/L}$, $125\text{ }\mu\text{L}$) as a control (excitation wavelength: 465 nm, emission wavelength: 660 nm)

3.6 RA模型中HOCl的荧光成像

基于探针HN在体内成像外源性及内源性HOCl的优异性能,进一步研究了HN在RA模型中成像内源性HOCl的可行性。首先在小鼠的左肢注射 $80\text{ }\mu\text{L}$ 、 $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ λ -卡拉胶并孵育4 h以产生RA,并在右侧肢体注射 $80\text{ }\mu\text{L}$ PBS作为对照组。然后,在左右后肢关节相同部位分别注射 $125\text{ }\mu\text{L}$ 、 $20\text{ }\mu\text{mol/L}$ HN。在RA产生的左关节中观察到明显的信号消失(图7(a)),这表明HN与内源性HOCl反应猝灭了其在660 nm的荧光信号。然而,由于在健康的右关节中没有内源性HOCl产生,所以在右关节中仍然保持强的荧光信号,说

明探针HN能够应用于炎症中HOCl的检测。

另外,进一步评估了HN在活体小鼠中评估HOCl介导的RA治疗的能力。如图7(b)所示,在用治疗RA的常用药物MTX处理RA产生的左腿关节后,将 $125\text{ }\mu\text{L}$ 、 $20\text{ }\mu\text{mol/L}$ HN注射到小鼠的左右腿关节中。在用MTX处理的左腿关节的注射部位出现明显的荧光信号,这表明在治疗RA的过程中抑制了HOCl的产生。相比之下,右腿未接受MTX处理的关节,RA的内源性HOCl仍然猝灭HN在660 nm处的荧光。结果证实,通过检测HOCl水平的变化,HN可用于监测RA的治疗效果。

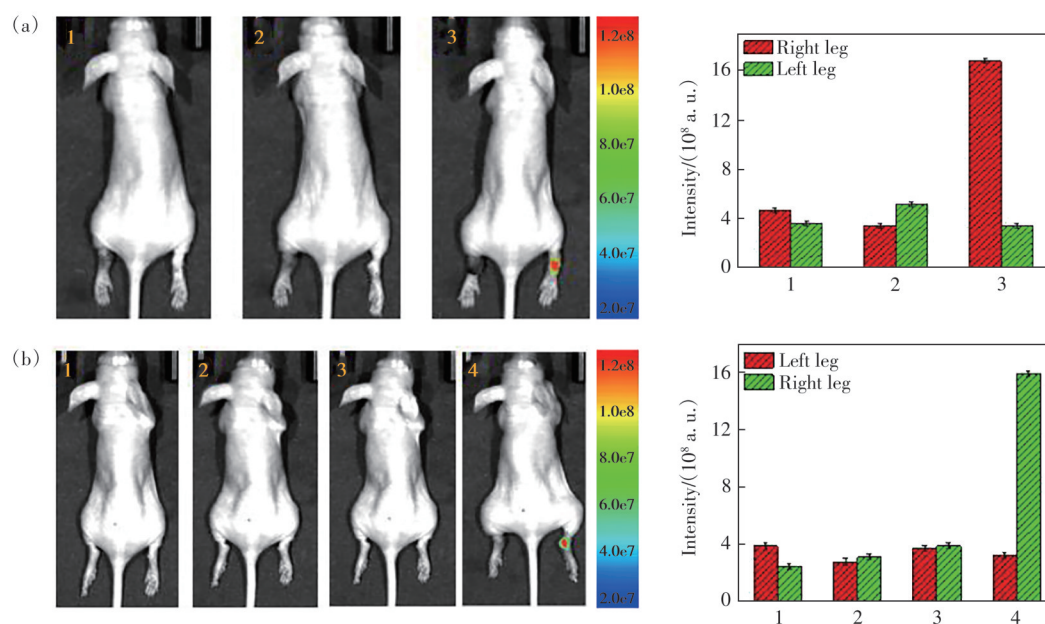


图7 (a)探针HN对HOCI介导的RA模型的监测。(1)对照组(未处理小鼠),(2)将 λ -卡拉胶($2\text{ }\mu\text{g/mL}$, $80\text{ }\mu\text{L}$)注射到小鼠关节处4 h,(3)将HN($20\text{ }\mu\text{mol/L}$, $125\text{ }\mu\text{L}$)注射到同一位置。右腿关节处仅注射HN($20\text{ }\mu\text{mol/L}$, $125\text{ }\mu\text{L}$)作为对照组。柱状图:注射区域的平均荧光强度。(b)探针HN对HOCI引起的小鼠关节炎模型治疗的监测。(1)对照组(未处理小鼠),(2)将 λ -卡拉胶($2\text{ }\mu\text{g/mL}$, $80\text{ }\mu\text{L}$)注射到小鼠左右关节处4 h,(3)左腿关节处注射MTX($20\text{ }\mu\text{g}$ in $20\text{ }\mu\text{L}$ PBS)6 h,(4)将HN($20\text{ }\mu\text{mol/L}$, $125\text{ }\mu\text{L}$)注射到小鼠左右关节处。柱状图:注射区域平均荧光强度(激发波长:465 nm;发射波长:660 nm)

Fig.7 (a) Monitoring of HOCI-mediated RA model by probe HN. (1) Control group (untreated blank mice), (2) λ -carrageenan ($2\text{ }\mu\text{g/mL}$, $80\text{ }\mu\text{L}$) was injected into the joints of mice for 4 h, and (3) HN ($20\text{ }\mu\text{mol/L}$, $125\text{ }\mu\text{L}$) was injected into the same location. Only HN ($20\text{ }\mu\text{mol/L}$, $125\text{ }\mu\text{L}$) was injected at the joint of the right leg as a control group. Histogram: Average fluorescence intensity of the injected area. (b) Monitoring of probe HN on the treatment of HOCI-induced arthritis model in mice. (1) Control group (untreated mice), (2) λ -carrageenan ($2\text{ }\mu\text{g/mL}$, $80\text{ }\mu\text{L}$) was injected into the right and left joints of mice for 4 h, (3) MTX ($20\text{ }\mu\text{g}$ in $20\text{ }\mu\text{L}$ PBS) was injected into the joints of the left leg for 6 h, and (4) HN ($20\text{ }\mu\text{mol/L}$, $125\text{ }\mu\text{L}$) was injected into the right and left joints of mice. Histogram: Average fluorescence intensity of the injected area (excitation wavelength: 465 nm; emission wavelength: 660 nm)

4 总 结

本文构建了一种近红外(NIR)HOCI荧光探针HN。在HOCI的存在下,探针HN分子的酚羟基被氧化生成醌类化合物,导致其近红外荧光被猝灭。探针HN具有多种优势,如较长的发射波长($\lambda_{\text{em}}=660\text{ nm}$)、较大的Stokes位移(200 nm)、较高的选择性和灵敏度(LOD为 54.8 nmol/L)以及较宽的pH适用范围($4.5\sim 10.5$)。利用探针HN基测试条实现了实际水样中HOCI的“肉眼”检

测。另外,该探针已成功用于活体斑马鱼和小鼠体内外源性和内源性HOCI的荧光成像。最重要的是,探针HN在监测HOCI介导的RA治疗反应方面效果显著。因此,HN为进一步了解HOCI在RA中的作用和评价RA的药物治疗效果提供了新的方法。

本文补充文件和专家审稿意见及作者回复内容的下载地址: <http://cjl.lightpublishing.cn/thesisDetails#10.37188/CJL.20250050>

参 考 文 献:

- [1] FIRESTEIN G S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis [J]. *Nature*, 2003, 423(6937): 356-361.
- [2] MCINNES I B, SCHETT G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2017, 389 (10086): 2328-2337.

- [3] LI R X, HE Y W, ZHU Y, *et al.* Route to rheumatoid arthritis by macrophage-derived microvesicle-coated nanoparticles [J]. *Nano Lett.*, 2019, 19(1): 124-134.
- [4] FIRESTEIN G S, MCINNES I B. Immunopathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Immunity*, 2017, 46(2): 183-196.
- [5] WANG S S, CHEN R H, YU Q, *et al.* Near-infrared plasmon-boosted heat/oxygen enrichment for reversing rheumatoid Arthritis with metal/semiconductor composites [J]. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2020, 12(41): 45796-45806.
- [6] LUO Q, LUO Z Y, ZENG H, *et al.* A new HClO-activated “turn-off” mitochondria-targetable NIR fluorescent probe for imaging of osteoarthritis *in vivo* [J]. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2022, 273: 121017.
- [7] ZHANG R, SONG B, YUAN J L. Bioanalytical methods for hypochlorous acid detection: recent advances and challenges [J]. *TrAC Trend. Anal. Chem.*, 2018, 99: 1-33.
- [8] WANG L, CHEN X L, XIA Q, *et al.* Deep-red AIE-active fluorophore for hypochlorite detection and bioimaging in live cells [J]. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2018, 57(23): 7735-7741.
- [9] CHO M, NGUYEN V N, YOON J. Simultaneous detection of hypochlorite and singlet oxygen by a thiocoumarin-based ratiometric fluorescent probe [J]. *ACS Meas. Sci. Au*, 2022, 2(3): 219-223.
- [10] ZHANG C L, LI X L, JIANG Y H, *et al.* A super large Stokes shift ratiometric fluorescent probe for highly selective sensing of ClO⁻ in bio-imaging and real water samples [J]. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2022, 283: 121736.
- [11] CHENG W S, REN C P, LIU S, *et al.* A highly selective A- π -A “turn-on” fluorescent probe for hypochlorite in tap water [J]. *New J. Chem.*, 2022, 46(37): 18010-18017.
- [12] PAUL S, SENGUPTA S, BANDYOPADHYAY T K, *et al.* Stevioside induced ROS-mediated apoptosis through mitochondrial pathway in human breast cancer cell line MCF-7 [J]. *Nutr. Cancer*, 2012, 64(7): 1087-1094.
- [13] QIAO L, NIE H L, WU Y L, *et al.* An ultrafast responsive BODIPY-based fluorescent probe for the detection of endogenous hypochlorite in live cells [J]. *J. Mater. Chem. B*, 2017, 5(2): 525-530.
- [14] XU Z Y, WU Y, WANG X H, *et al.* Designing of a high-performance fluorescent small molecule enables dual-mode and ultra-sensitive fluorescence visualizing of HSO₃⁻ and HClO in dried fruit, beverage, and water samples [J]. *Food Chem.*, 2022, 397: 133754.
- [15] 周金涛, 朱天翔, 尚主业, 等. 咪唑基近红外亚硫酸氢根荧光探针及其在水样和生物成像中的应用 [J]. *发光学报*, 2024, 45(12): 2066-2073.
- ZHOU J T, ZHU T X, SHANG Z Y, *et al.* Carbazole-based near-infrared bisulfite fluorescent probe and its applications in water sample and bioimaging [J]. *Chin. J. Lumin.*, 2024, 45(12): 2066-2073. (in Chinese)
- [16] 王晔, 朱鑫玥, 怀玉, 等. 基于香豆素的 Zn²⁺荧光探针构建及其应用 [J]. *发光学报*, 2025, 46(1): 185-193.
- WANG Y, ZHU X Y, HUAI Y, *et al.* Construction and application of Zn²⁺ fluorescent probe based on coumarin [J]. *Chin. J. Lumin.*, 2025, 46(1): 185-193. (in Chinese)
- [17] HOU J T, KWON N, WANG S, *et al.* Sulfur-based fluorescent probes for HOCl: mechanisms, design, and applications [J]. *Coord. Chem. Rev.*, 2022, 450: 214232.
- [18] ZHONG X L, YANG Q, CHEN Y S, *et al.* A mitochondria-targeted fluorescent probe based on coumarin-pyridine derivatives for hypochlorite imaging in living cells and zebrafish [J]. *J. Mater. Chem. B*, 2019, 7(46): 7332-7337.
- [19] FENG H, ZHANG Z Q, MENG Q T, *et al.* Rapid response fluorescence probe enabled *in vivo* diagnosis and assessing treatment response of hypochlorous acid-mediated rheumatoid arthritis [J]. *Adv. Sci.*, 2018, 5(8): 1800397.
- [20] WANG Z L, ZHANG Y, LIANG Y Y, *et al.* Rational design of a facile camphor-based fluorescence turn-on probe for real-time tracking of hypochlorous acid *in vivo* and *in vitro* [J]. *Analyst*, 2022, 147(10): 2080-2088.
- [21] SUN Z N, LIU F Q, CHEN Y, *et al.* A highly specific BODIPY-based fluorescent probe for the detection of hypochlorous acid [J]. *Org. Lett.*, 2008, 10(11): 2171-2174.
- [22] LIAO Y M, WANG M D, LI K, *et al.* A highly sensitive and selective “turn-on” fluorescent probe for hypochlorous acid monitoring [J]. *RSC Adv.*, 2015, 5(24): 18275-18278.
- [23] XU L R, YU J, WANG Y P, *et al.* A mitochondria-targeted fluorescent probe with large Stokes shift for rapid detection of hypochlorite and its application in living cells [J]. *Dyes Pigm.*, 2022, 207: 110622.
- [24] QIAN X L, YU H, ZHU W C, *et al.* Near infrared fluorescent probe for *in vivo* bioimaging of endogenous hypochlorous acid [J]. *Dyes Pigments*, 2021, 188: 109218.

- [25] TIAN J Y, SHI D L, ZHANG Y H, *et al.* Stress response decay with aging visualized using a dual-channel logic-based fluorescent probe [J]. *Chem. Sci.*, 2021, 12(40): 13483-13491.
- [26] LAN J S, WANG Y, QIN Y H, *et al.* Dual-site mitochondria-targeted fluorescent probe for simultaneous distinguishing detection of hypochlorite and SO₂ derivatives in real water samples and bioimaging [J]. *Dyes Pigm.*, 2022, 207: 110706.
- [27] XU Q L, LEE K A, LEE S, *et al.* A highly specific fluorescent probe for hypochlorous acid and its application in imaging microbe-induced HOCl production [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, 135(26): 9944-9949.
- [28] JIAO X J, HUANG K, HE S, *et al.* A mitochondria-targeted near-infrared fluorescent probe with a large Stokes shift for real-time detection of hypochlorous acid [J]. *Org. Biomol. Chem.*, 2019, 17(1): 108-114.
- [29] FENG H, WANG Y, LIU J P, *et al.* A highly specific fluorescent probe for rapid detection of hypochlorous acid *in vivo* and in water samples [J]. *J. Mater. Chem. B*, 2019, 7(24): 3909-3916.
- [30] 尚主业, 舒丽, 王月, 等. 基于三苯胺的增强型 Fe³⁺ 荧光探针及性能 [J]. *发光学报*, 2022, 43(3): 453-461.
SHANG Z Y, SHU L, WANG Y, *et al.* Synthesis and performances of triphenylamine based turn-on fluorescent probe for Fe³⁺ by an enhancement pattern [J]. *Chin. J. Lumin.*, 2022, 43(3): 453-461. (in Chinese)



何静(2004-),女,山东菏泽人,在读本科生,主要从事分子识别与生物成像方面的应用基础研究。
E-mail: 3520707583@qq.com



尚主业(1996-),男,辽宁鞍山人,博士,讲师,2024年于辽宁科技大学获得博士学位,主要从事荧光分子探针智能识别与生物成像领域的研究。
E-mail: shangzhuye@ustl.edu.cn



杨心怡(1997-),女,辽宁铁岭人,硕士,2022年于辽宁科技大学获得硕士学位,主要从事分子探针及药物分析工作。
E-mail: yxz0601y@163.com



孟庆涛(1981-),男,山东曲阜人,博士,教授,博士生导师,2011年于大连理工大学获得博士学位,主要从事生物及医用新材料方面的应用基础研究。
E-mail: qtmeng@ustl.edu.cn