

· 综述 ·

## HCIO 双光子荧光探针研究进展

赵晓斌, 秦亚娟, 厉廷有\*

南京医科大学药学院, 江苏 南京 211166

**[摘要]** 次氯酸(hypochlorous acid, HCIO)由于其高氧化性和反应活性, 与神经退行性疾病、炎症、癌症等多种病理生理过程相关。在细胞水平上检测HCIO对了解各种疾病的发病机制具有重要意义。因此, 科学家设计并合成了多系列的小分子荧光探针用于细胞内HCIO成像。本文综述了基于识别机制的双光子荧光探针的代表性案例, 为相关工作者提供设计策略参考。

**[关键词]** 次氯酸; 双光子荧光探针; 组织成像; 双光子显微镜

**[中图分类号]** R446.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2024)01-115-08

**doi:** 10.7655/NYDXBNSN230961

## Research progress in two-photon fluorescence probes for detecting HCIO molecules

ZHAO Xiaobin, QIN Yajian, LI Tingyou\*

School of Pharmacy, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

**[Abstract]** Hypochloric acid (HCIO) is associated with various pathological and physiological processes such as neurodegenerative diseases, inflammation, and cancer due to its high oxidation and reactivity. Detecting HCIO at the cellular level is of great significance for understanding the pathogenesis of various diseases. Therefore, scientists have designed and synthesized multiple series of small molecule fluorescent probes for intracellular HCIO imaging. This article reviews representative cases of two-photon fluorescence probes based on recognition mechanisms, with the aim of providing design strategies for relevant workers.

**[Key words]** hypochlorous acid; two-photon probes; tissue imaging; two-photon microscopy

[J Nanjing Med Univ, 2024, 44(01): 115-122]

次氯酸(hypochlorous acid, HCIO)是一种活性氧(reactive oxygen species, ROS), 凭借其对多种蛋白质侧链和肽的特异性反应, 在溶酶体吞噬过程中破坏生物系统中的病原体。因此HCIO是免疫系统对抗入侵细菌和多种病原体的有效抗菌剂<sup>[1]</sup>。在健康情况下, HCIO在维持生物体氧化平衡的生理活动和免疫保护中起着重要的作用。但是由于HCIO具有很强的氧化性, 异常水平的HCIO会对机体造成严重的损害, 从而导致许多疾病, 如心血管疾病<sup>[2-3]</sup>、神经炎症<sup>[4]</sup>、肝损伤<sup>[5]</sup>、帕金森病<sup>[6]</sup>、癫痫<sup>[7]</sup>、阿尔茨海默病<sup>[8-9]</sup>, 甚至癌症<sup>[10]</sup>等。因此, 开发生物系统中HCIO高灵敏度和选择性检测工具, 对阐明HCIO在

疾病发生发展中的作用具有重要意义。

在生物体中, 内源性HCIO主要通过过氧化氢(hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)与Cl<sup>-</sup>的反应产生, 该反应由髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)催化。近年来, 人们开发了多种检测HCIO的方法, 如电化学分析、化学发光分析、比色法、高效液相色谱法等<sup>[11]</sup>。虽然这些分析方法具有很高的灵敏度, 对HCIO也有一定的选择性, 但这些检测需要复杂的设备和专业的操作技术。此外, 这些测试的样品制备复杂, 检测费用昂贵, 生物样本经常在样品前处理中遭到破坏, 不适合检测活细胞、组织和体内的HCIO。近几十年来荧光成像技术受到广泛关注。虽然荧光成像设备价格昂贵, 但荧光成像具有灵敏度高、选择性高、时空分辨率高、无创、实时分析、操作简单等优点<sup>[12-13]</sup>。荧光成像在观察活细胞的功能和分

**[基金项目]** 国家自然科学基金(82373728)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: l\_tingyou@njmu.edu.cn

子识别方面具有独特的优势,已成为在亚细胞水平监测生物分子、亚细胞结构定位和运动的不可替代的技术。随着荧光分析技术的发展,用于检测HClO的荧光探针的种类和数量不断增多。探针分子中常含有对HClO具有选择性反应的基团或原子,如碳氮双键<sup>[14]</sup>、碳碳双键<sup>[15]</sup>、硫原子<sup>[16-17]</sup>、苯环<sup>[7]</sup>等。

不同的荧光探针有不同的激发和发射模式,如单光子/双光子、开关/比率等。与单光子荧光探针相比,双光子荧光探针波长较长,具有更深的组织穿透力,减少活细胞和组织中的背景荧光,同时产生更少的光损伤和更小的背景干扰<sup>[18]</sup>。同时,与短波长光相比,长波长光的光损伤和光漂白更小,对细胞的毒性也更小<sup>[19]</sup>。

双光子荧光探针利用双光子显微镜(two-photon microscopy, TPM)进行高分辨率成像。这种长波长激发(约800 nm)并利用TPM成像是提高生物成像应用中检测灵敏度的一种重要方法,可以减少自吸收和背景荧光。在成像技术方面,双光子超分辨率荧光显微镜技术成功克服了传统光学显微镜无法获得200 nm以下空间分辨率的局限<sup>[20]</sup>。此外,超分辨率荧光显微镜可用于实时观察亚细胞器与HClO反应前后的变化<sup>[17,21]</sup>,方便科学家进一步了解HClO在生物和病理过程中的作用。目前科学家们已经开发出一些基于TPM技术的双光子(two-photon, TP)HClO探针。

本文总结了近年来用于检测HClO的小分子荧光探针的设计策略、识别机制、响应类型(比例、靶

向)、传感机制和在生物成像中的应用,助益更优HClO探针的发现。

## 1 基于硫探头的双光子荧光探针

据报道,甲硫氨酸中的硫原子容易被HClO氧化为亚砷和砷<sup>[16]</sup>。以此开发了很多含硫原子的HClO探针。

在水溶液中,咪唑啉-2-硫酮可与HClO反应产生咪唑啉衍生物,并伴有荧光开关。韩国科学家Juyoung Yoon团队设计并构建了咪唑啉-2-硫酮类双光子荧光探针PIS(图1),用于检测HClO分子<sup>[16]</sup>。PIS探针可特异性地与HClO反应,产生相应的咪唑啉荧光离子。2016年,该课题组在PIS设计思路上改造并合成了PNIS(图1)双光子HClO荧光探针<sup>[17]</sup>。该PNIS分子中含线粒体靶向基团——三苯基磷,咪唑啉-2-硫酮是HClO的识别单元,使得PNIS具有检测内源性线粒体HClO的能力。值得指出的是PNIS具有良好的水溶性,不需要有机溶剂进行助溶。该类型的PIS、PNIS探针在与HClO反应后,荧光强度约提高100倍,而对于其他ROS,如H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、NO·、ROO·、ONOO<sup>-</sup>、·OH和叔丁基超氧化物,几乎没有荧光变化,即使在更高浓度的其他ROS孵育30 min后,也不会引起探针溶液明显的荧光变化。该类探针在HeLa细胞和RAW 264.7巨噬细胞中具有良好的选择性成像。此外,利用TPM,PIS探针在小鼠海马区有良好的成像效果,PNIS探针在亚细胞结构线粒体共定位实验中有良好的成像效果。PIS、PNIS的反应机制如图1所示。

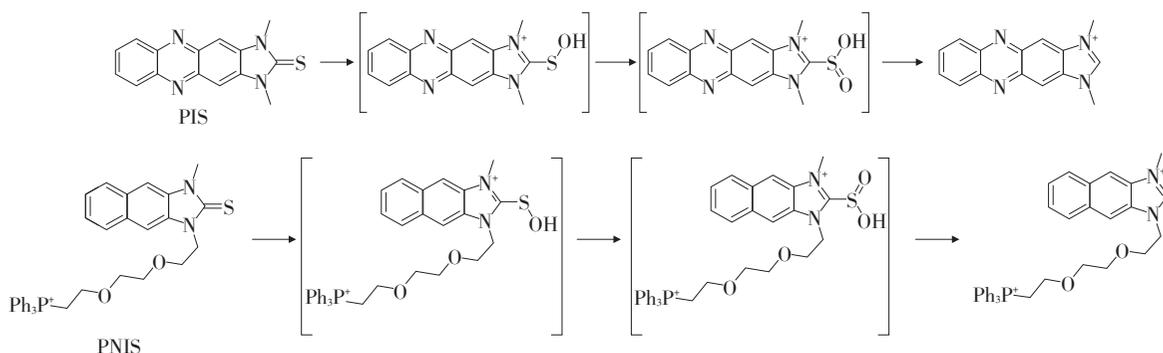


图1 PIS/PNIS化学结构及其反应机制

Figure 1 Chemical structure and reaction mechanism of PIS/PNIS

硫醚的富电子特性使硫原子能够快速与HClO发生反应,显著改变硫原子的电子云密度,从而导致探针荧光强度发生明显变化(图2)。吩噻嗪中的硫原子对HClO具有很强的反应性。吩噻嗪的荧光

性质通过硫原子氧化成亚砷而改变。苯并噻唑是一种常见的吸电子基团,王建勇团队则利用吩噻嗪和苯并噻唑构建了一种新型的双光子探针NS-CIO<sup>[22]</sup>。苯并噻唑在氧化还原条件下稳定,保证了探针在过

量的 HClO 中的稳定性。室温条件下, NS-C1O 在 PBS(pH=7.4, 5%二甲基甲酰胺)中, 360 nm 激发时, 450 nm 处没有荧光发射; 但当加入 HClO 后, 其在 360 nm 处出现吸收, 且用 360 nm 激发时在 450 nm 处出现强烈荧光(约 860 倍)。经实验验证, NS-C1O 对其他 ROS、活性氮(reactive nitrogen species, RNS)、生物硫醇等没有反应活性, 说明探针对于 HClO 表现出良好的选择性。NS-C1O 在 HeLa 细胞和 RAW264.7 巨噬细胞中具有良好的选择性成像。利用 TPM, NS-C1O 可对 400  $\mu\text{m}$  厚的小鼠肝脏活体组织切片成像, 且可以对活体斑马鱼成像。

在温和条件下, HClO 可以介导硫代螺内酰胺苯酚转化为苯并噻唑(图3)。毛国江团队利用罗丹明类似物为基础, 研制了一种用于 HClO 生物成像的长波长(630 nm)双光子荧光探针 HN2-TP<sup>[1]</sup>。HN2-TP 在 PBS 缓冲液(pH=7.4, 5%二甲基亚砜)中, 没有特征吸收和发射。但当加入 HClO 后, 90 s 内 HClO 诱导重排

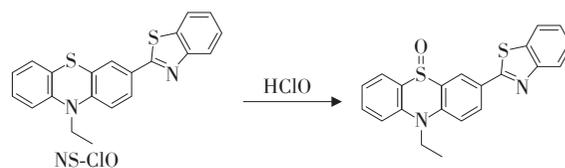


图2 NS-C1O 化学结构及其反应机制

Figure 2 Chemical structure and reaction mechanism of NS-C1O

反应, 检测到在 630 nm 处的荧光发射。HN2-TP 探针在体外检测 HClO 时表现出较大的荧光增强, 且具有良好的线性范围、高灵敏度(检测下限: 40 nmol/L)和快速响应的优点。HN2-TP 探针溶液与各种 ROS、RNS、生物硫醇不发生反应, 探针只对 HClO 有高选择性。利用单光子显微镜, HN2-TP 可以对 HeLa 细胞内的外源性 HClO 成像, 也可以对巨噬细胞 RAW 264.7 内源性 HClO 成像。利用 TPM, HN2-TP 可以对大鼠肝脏冷冻切片组织进行 HClO 显像。

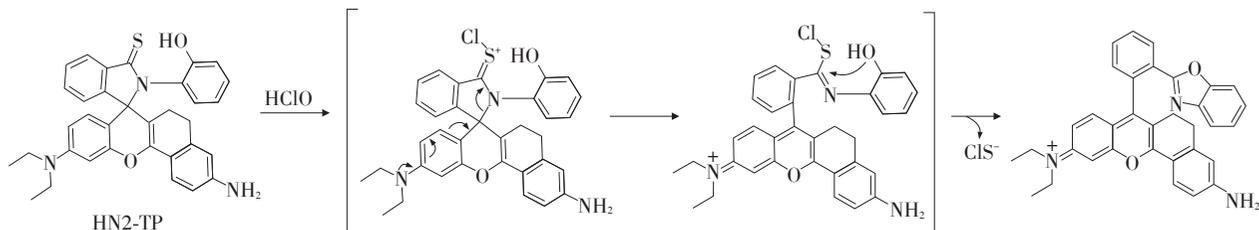


图3 HN2-TP 化学结构及其反应机制

Figure 3 Chemical structure and reaction mechanism of HN2-TP

## 2 氧硫杂环戊缩醛(酮)类双光子荧光探针

HClO 双光子探针中, 荧光团大多数是典型的“推-拉”(胺酮)结构, 这种结构可以产生优异的光物理性质。Acдан是一种双光子荧光团(图4)。利用 2-巯基乙醇对 Acдан 的酮羰基进行保护, 使其

变为氧硫杂环戊缩酮结构, 降低羰基“拉”的作用, 而导致荧光强度降低或淬灭。作为 HClO 分子的反应位点, 探针分子中的 S 原子先被 HClO 氧化为亚砷, 再进一步氧化为砷, 最后使缩酮结构水解成羰基, 使荧光团恢复荧光或者荧光增强(图4)。

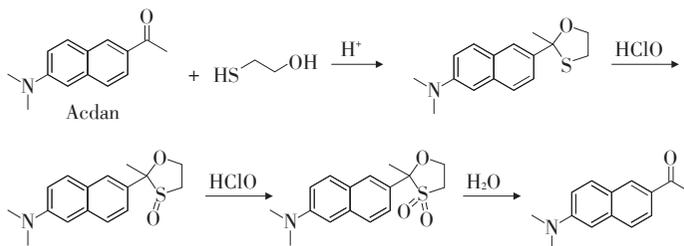


图4 Acдан 化学结构及其反应机制

Figure 4 Chemical structure and reaction mechanism of Acдан

溶酶体是细胞的循环中心, 催化分解各种废物, 如蛋白质、核酸、碳水化合物、脂质和细胞碎片,

其内含有丰富的 HClO。2015 年, Young-Tae Chang 团队利用 Acдан 分子骨架, 设计并合成了第一个

靶向溶酶体的 HClO 双光子荧光探针 LYSO-TP (图 5)<sup>[23]</sup>。LYSO-TP 是一种反应时间极短(几秒钟内),选择性良好,灵敏度高(16.6 nmol/L)的双光子探针,并通过双光子成像成功地应用于炎症小鼠模型的溶酶体 HClO 成像。除此之外,将靶向基团换成三苯基磷开发了具有线粒体靶向性质的探针 MITO-TP(图 5)。两种探针在对 HeLa 外源性 HClO 和巨噬细胞内源性 HClO 存在的亚细胞结构(溶酶体和线粒体)都有较好的靶向性,能成功识别两种细胞器中的 HClO。

喹诺酮也是一种优良的双光子荧光团<sup>[7, 24-25]</sup>。2018年刘志洪和李春涯团队利用喹诺酮类设计了第一个用于监测小鼠伤口愈合过程中 HClO 生成的双光子荧光探针 QCIO(图 5)<sup>[24]</sup>。该探针的设计基于分子内电荷转移(intramolecular charge transfer, ICT)原理,是一种双光子比例荧光探针。QCIO 探针自身在 492 nm 处显示出一个发射峰,在与 HClO 反应后, QCIO 的氧硫杂环戊基团脱保护,形成典型的“推-拉”结构 6-(二甲氨基)喹啉-2-甲醛。“推-拉”结构有利于双光子吸收的产生,并且可以增强“ICT 效应”,而显示出红移荧光发射,导致 492 nm 处荧光减弱, 562 nm 处荧光发射增强。因此,该探针为高灵敏度的 HClO 检测提供了比率信号,且该探针在生理 pH 范围内对 HClO 表现出高灵敏、高选择性

的响应。双光子激发的性质也使探针在检测活细胞内源性和外源性 HClO 方面具有良好的性能,并能够通过 TPM 监测小鼠损伤组织中 HClO 的细微变化,荧光穿透深度达 180  $\mu\text{m}$ 。该双光子比率探针在 1 min 内响应 HClO 的存在, 492 nm 处蓝色发射下降, 562 nm 处绿色发射增加, 这为 HClO 提供了比率检测方式。该探针可在体外实现 HClO 的比例检测,线性范围为 0.8~12.0 mmol/L,检测下限为 89 nmol/L。此外,该探针还可以在双光子显微镜下分别观察活细胞中外源性和内源性 HClO 水平的波动,由于优异的传感性能和双光子激发特性,该探针成功揭示了受伤组织区域中 HClO 的过量产生。

He 等<sup>[26]</sup>通过引入四氢喹啉基团作为电子供体来增强 ICT 效应,设计了一种具有大斯托克斯位移的双光子比例荧光探针 TQC-HClO(图 5)。该探针具有长波长比率发射( $I_{650}/I_{583}$ )。与 QCIO 类似,探针 TQC-HClO 在 PBS 缓冲液(pH=7.4, 30%  $\text{CH}_3\text{CN}$ )中,以 485 nm 为激发波长,在 583 nm 处有荧光发射。但当加入 HClO 后,检测到在 649 nm 处的荧光发射。作者研究了探针 TQC-HClO 在 720~880 nm 不同输出波长下的双光子吸收截面,发现探针 TQC-HClO 在 800~840 nm 的激发光谱区域具有超过 100 GM 的双光子吸收截面,表明探针具有良好的双光子性质,并成功应用在 HeLa 细胞和斑马鱼 HClO 成像中。

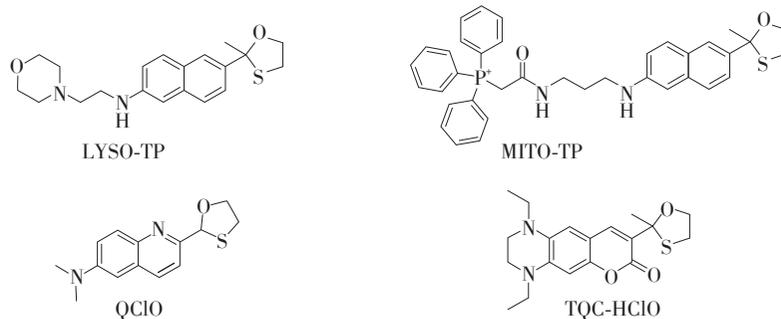


图 5 氧硫杂环戊缩醛(酮)类双光子荧光探针化学结构

Figure 5 Chemical structure of two-photon fluorescence probes of oxychlorothoxyral

同样基于 ICT 机制,吴养洁团队利用乙酰香豆素这一重要的双光子荧光团,对乙酰基进行修饰开发了探针 CMOS(图 6)<sup>[27]</sup>。双光子荧光探针 CMOS 合成简单,对 HClO 表现出高灵敏度、快速响应的特点,是一种“开-关-开”探针。CMOS 对其他不同的 ROS、RNS 和活性硫无反应活性,仅对 HClO 有活性,说明 CMOS 对 HClO 具有高度的选择性。HClO 可以使 CMOS 原有荧光淬灭,其淬灭原理是硫原子被 HClO 氧化为亚砷,而引起原有荧光的淬灭。细

胞实验证实,用 5  $\mu\text{mol/L}$  CMOS 孵育 SKVO-3 细胞 30 min,在 425~525 nm 光学窗口中观察到 SKVO-3 细胞强烈的荧光,这就证明探针可以透过细胞膜进入细胞内部。再将该细胞用 100  $\mu\text{mol/L}$  NaClO 孵育 3 min 则发现细胞荧光猝灭。用 PBS 洗涤 3 次后,再分别加入 5  $\mu\text{mol/L}$  Cys/Hcy 孵育 1 h,然后荧光明显恢复。这就说明 CMOS 被 HClO 氧化成亚砷后,又被 Cys/Hcy 还原成了 CMOS。其反应机制如图 6。

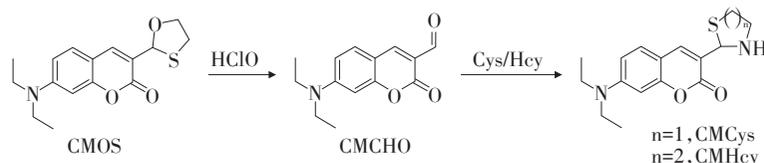


图6 CMOS化学结构及其反应机制

Figure 6 Chemical structure and reaction mechanism of CMOS

### 3 基于C=C和C=N裂解机制的双光子荧光探针

HClO具有很强的氧化和亲核能力,可以氧化裂解共轭的C=C双键和C=N双键释放出醛基,从而

导致探针分子荧光信号的显著变化(图7)。探针分子的羰基可以和丙二腈通过 Knoevenagel 反应生成C=C双键<sup>[15]</sup>,C=N双键可以通过羰基和胍类化合物反应生成<sup>[14]</sup>。



图7 基于C=C和C=N的设计策略

Figure 7 Design strategy based on C=C and C=N

基于6-羟基-2-萘醛荧光团,尤进茂团队开发了一种可以靶向线粒体的双光子荧光探针DNB(图8)<sup>[15]</sup>。该探针中的C=C键在与HClO反应后断裂,导致共轭结构被破坏,释放出醛基,而产生高强度荧光。释放出的醛基会进一步与SO<sub>2</sub>/HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>反应产生新的化学结构,而产生蓝移光学现象。因此,作者将探针DNB作为靶向线粒体检查细胞内源性HClO/SO<sub>2</sub>的一种双光子比率探针。同时,还将此探针成功运用到斑马鱼SO<sub>2</sub>与HClO之间的氧化还原循环监测中。在对DNB探针反应机制探究中,作者发现SO<sub>2</sub>不仅可以与醛基发生反应生成BTP-HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>,还可以与吸电子丙二腈部分发生反应产

生DNB-HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>(图8),DNB-HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>也可与HClO发生反应,释放醛基,醛基可进一步与SO<sub>2</sub>/HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>反应产生BTP-HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>。令作者意外的是,无论先检测HClO还是SO<sub>2</sub>,每个检测过程都有自己独特的光谱变化,完全满足了细胞内和体内协同检测SO<sub>2</sub>/HClO的要求,是一种良好的双光子比率探针。该探针具有双光子作用截面大、细胞毒性低、选择性好、灵敏度高的特点,可协同检测细胞内和体内的SO<sub>2</sub>/HClO。此外,DNB探针可用于实时成像HeLa和RAW 264.7细胞线粒体SO<sub>2</sub>/HClO的连续变化。该探针还可以通过双光子显微镜估计斑马鱼体内200 μm深度处的SO<sub>2</sub>/HClO。

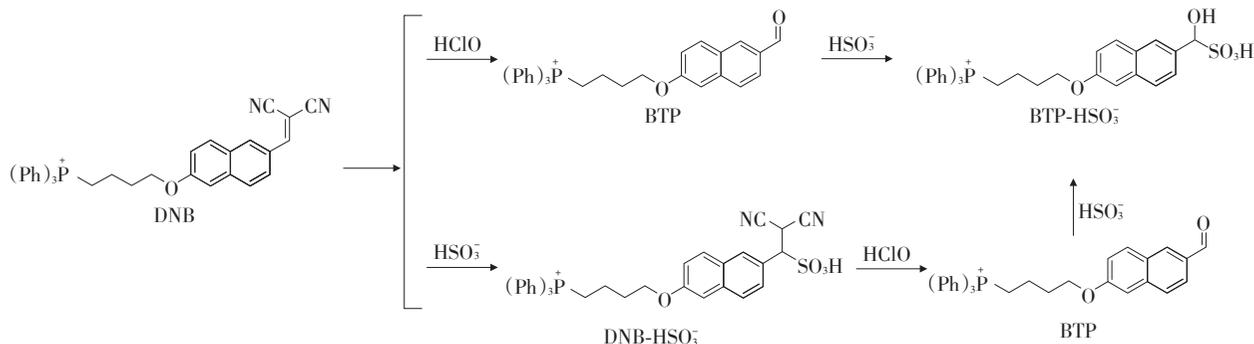


图8 DNB化学结构及其反应机制

Figure 8 Chemical structure and reaction mechanism of DNB

6-(二甲氨基)喹啉-2-醛具有双光子发射、良好的光稳定性和典型的“推-拉”电子体系,是一种良好的双光子荧光团。付强团队利用噻吩肼修饰喹啉中的醛基,得到Q-HOCl(图9)<sup>[14]</sup>。该探针与HClO反应后,噻吩酰肼基团被脱保护,生成具有典型双光子荧光信号的喹啉醛。Q-HOCl探针对HClO具有良好的选择性和快速的响应(20 s),检测下限达12.5 nmol/L。作者利用该探针通过双光子成

像观察了内毒素引起的PC12细胞内HClO值的波动。此外,Q-HOCl探针可以通过血脑屏障(blood brain barrier, BBB),可以分析大脑中HClO的水平。作者利用该探针监测到阿尔兹海默病模型小鼠大脑中HClO水平比正常小鼠高。同时作者基于脑片双光子成像和Morris水迷宫实验,给予MPO抑制剂治疗,发现可有效改善阿尔兹海默病模型小鼠的认知能力。

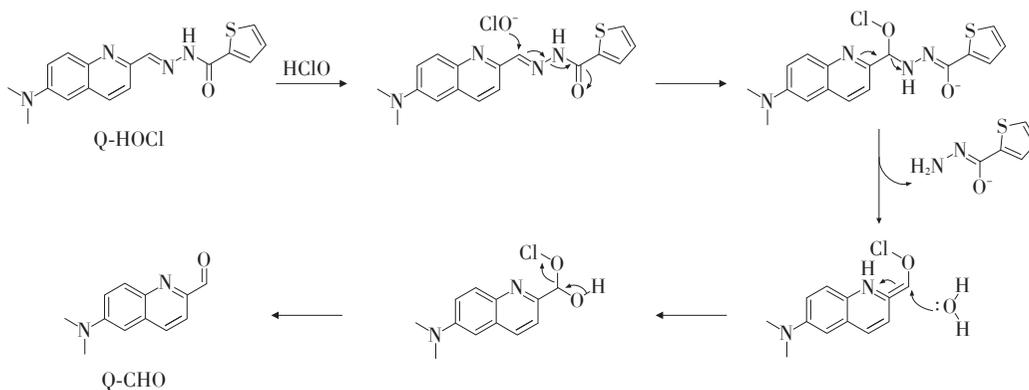


图9 Q-HOCl化学结构及其反应机制

Figure 9 Chemical structure and reaction mechanism of Q-HOCl

类似地,王建勇团体基于香豆素双光子荧光团构建了新型双光子探针CuO-ClO(图10)<sup>[28]</sup>,HClO可识别分子中的C=N双键,该探针双光子性质良好、选择性好、稳定性好、响应速度快(约30 s)、细胞毒性低。同时,利用CuO-ClO成功地HeLa细胞中

外源性HClO和RAW 264.7细胞中内源性HClO进行了成像。此外,利用双光子显微镜,CuO-ClO在800 nm激发条件下,可以对55 μm深的小鼠组织进行HClO检测,并且可用于斑马鱼的HClO荧光成像。

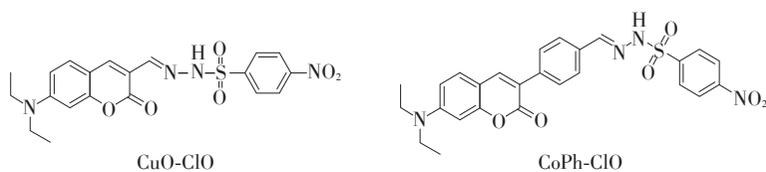


图10 CuO-ClO和CoPh-ClO化学结构

Figure 10 Chemical structures of CuO-ClO and CoPh-ClO

该团队对CuO-ClO进行继续改造,制备了另外一种C=N双键型特异性检测HClO的双光子荧光探针CoPh-ClO(图10)<sup>[11]</sup>。相比于CuO-ClO双光子探针,CoPh-ClO探针具有灵敏度更高、选择性良好和稳定性更好(10 min以上)、响应更快(20 s)、开启信号更大(45倍)、细胞毒性低和良好的双光子性能的优点。其主要原因是该探针在荧光团和响应点之间引入苯环,使CoPh-ClO更加灵敏、可修饰和稳定,这将为其他多功能探针的开发提供新的思路。CoPh-ClO成功地应用于HeLa活细胞外源性HClO

和活RAW264.7细胞内源性HClO的监测。此外,利用双光子显微镜该探针CoPh-ClO成功地实现了对穿透深度约为65 μm的组织 and 斑马鱼中HClO的成像。

#### 4 基于苯环氯取代机制的探针

受到喹诺酮类的神经保护药物<sup>[29-30]</sup>和显像剂<sup>[24-25]</sup>的启发,钱勇团队基于ICT原理利用喹诺酮构建了HCP双光子荧光探针(图11)<sup>[7]</sup>。在HCP中,共轭电子受体二氨基马来腈基团削弱了喹诺酮类

荧光团的“推-拉”电子效应,使其仅产生微弱的黄色荧光。当在 HClO 存在下, HCP 结构中的苯环通过氯化反应生成 HCP-Cl, 改变分子间的电子效应, 实现蓝移, 荧光发射增强。HCP-Cl 在 800 nm 激发态条件下拥有最大双光子吸收截面(13.4 GM)。HCP 双光子性质良好、选择性好、稳定性好、响应速度快(约 5 s)、细胞毒性低。HCP 可以实时跟踪活细胞中的 HClO。HCP 可以透过血脑屏障, 对癫痫模型小鼠活体脑中 MPO 产生的 HClO 进行高灵敏检测成像, 且不受其他物质干扰。该团队通过使用 HCP, 构建了一种高通量筛选方法, 可以快速筛选潜在的抗癫痫药物来控制 MPO 介导的氧化应激反应。

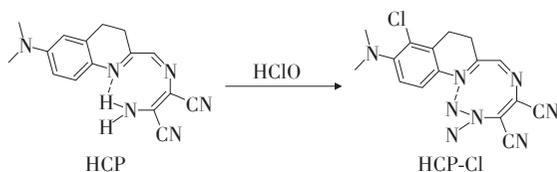


图 11 HCP 化学结构及其反应机制

Figure 11 Chemical structure and reaction mechanism of HCP

## 5 结论和展望

综上所述, 本文介绍了近年来用于 HClO 成像的双光子荧光探针, 重点介绍了它们的响应机制及应用。根据 C=N 裂解响应机制构建的 HClO 探针在疾病模型中具有更深远的意义, 部分探针可以对活体疾病模型小鼠成像。相比之下, 由 C=C 裂解机制、酮和硫化物构建的探针在组织成像和疾病模型中的应用较差, 仅停留在组织或者斑马鱼体内 HClO 成像。大多数探针在几秒钟内对 HClO 作出反应, 检测下限达到 nmol/L 级。由于 HClO 在复杂的生物环境中含量低、寿命短, 一些 HClO 探针的选择性需要进一步提高。因此迫切需要设计更高灵敏度和更好选择性的探针。

### [参考文献]

[1] GONG Y J, LV M K, ZHANG M L, et al. A novel two-photon fluorescent probe with long-wavelength emission for monitoring HClO in living cells and tissues [J]. *Talanta*, 2019, 192: 128-134

[2] WANG Z K, WANG S, WANG B Y, et al. A two-pronged detection of atherosclerosis with a dual-channel fluorescent probe for viscosity and hypochlorous acid [J]. *Chem Eng J*, 2023, 464: 142687-142696

[3] MATUZ - MARES D, RIVEROS - ROSAS H, VILCHIS -

LANDEROS M, et al. Glutathione participation in the prevention of cardiovascular diseases [J]. *Antioxidants*, 2021, 10(8): 1201-1220

[4] KIM K H, KIM S J, SINGHA S, et al. Ratiometric detection of hypochlorous acid in brain tissues of neuroinflammation and maternal immune activation models with a deep - red/near - infrared emitting probe [J]. *ACS Sens*, 2021, 6(9): 3253-3261

[5] LOU Y, WANG C X, CHI S Y, et al. Construction of a two-photon fluorescent probe for ratiometric imaging of hypochlorous acid in alcohol - induced liver injury [J]. *Chem Commun Camb Engl*, 2019, 55(86): 12912-12915

[6] CHEN J, LU Y, WU Y, et al. *De novo* design of a robust fluorescent probe for basal HClO imaging in a mouse Parkinson's disease model [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2021, 12(21): 4058-4064

[7] SHAO C W, YUAN J W, LIU Y N, et al. Epileptic brain fluorescent imaging reveals apigenin can relieve the myeloperoxidase - mediated oxidative stress and inhibit ferroptosis [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2020, 117(19): 10155-10164

[8] LIU S Z, XU J H, MA Q J, et al. A naphthalimide-based and golgi-targetable fluorescence probe for quantifying hypochlorous acid [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2023, 286: 121986-121993

[9] SAMANTA S, GOVINDARAJU T. Unambiguous detection of elevated levels of hypochlorous acid in double transgenic AD mouse brain [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2019, 10(12): 4847-4853

[10] LI S J, WANG P P, YANG K, et al. Construction of HClO activated near-infrared fluorescent probe for imaging hepatocellular carcinoma [J]. *Anal Chim Acta*, 2023, 1252: 341009-341017

[11] ZHANG Z H, LI C C, QU J B, et al. A novel and fast-responsive two - photon fluorescent probe with modified group for monitoring endogenous HClO accompanied by a large turn-on signal and its application in zebrafish imaging [J]. *Spectrochimica Acta Part A Mol Biomol Spectrosc*, 2022, 278: 121361

[12] XIA Q N, WANG X Y, LIU Y N, et al. An endoplasmic reticulum-targeted two-photon fluorescent probe for bio-imaging of HClO generated during sleep deprivation [J]. *Spectrochimica Acta Part A Mol Biomol Spectrosc*, 2020, 229: 117992

[13] WANG L, REN M, LI Z, et al. A ratiometric two-photon fluorescent probe for the rapid detection of HClO in living systems [J]. *Anal Meth*, 2019, 11(12): 1580-1584

[14] KE J, ZHAO P X, LI J F, et al. Visualization of HClO in

- the brains of Alzheimer's disease models using an easily available two-photon fluorogenic probe[J]. *J Mater Chem B*, 2022, 10(42):8744-8749
- [15] DOU K, CHEN G, YU F, et al. A two-photon ratiometric fluorescent probe for the synergistic detection of the mitochondrial SO(2)/HClO crosstalk in cells and *in vivo*[J]. *J Mater Chem B*, 2017, 5(42):8389-8398
- [16] XU Q, HEO C H, KIM G, et al. Development of imidazoline-2-thiones based two-photon fluorescence probes for imaging hypochlorite generation in a co-culture system [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, 54(16):4890-4894
- [17] XU Q L, HEO C H, KIM J A, et al. A selective imidazoline-2-thione-bearing two-photon fluorescent probe for hypochlorous acid in mitochondria [J]. *Anal Chem*, 2016, 88(12):6615-6620
- [18] MAO G J, WANG Y Y, DONG W P, et al. A lysosome-targetable two-photon excited near-infrared fluorescent probe for visualizing hypochlorous acid-involved arthritis and its treatment[J]. *Spectrochimica Acta Part A Mol Biomol Spectrosc*, 2021, 249:119326
- [19] GRZELAKOWSKA A, ZIELONKA M, D BOWSKA K, et al. Two-photon fluorescent probe for cellular peroxynitrite: fluorescence detection, imaging, and identification of peroxynitrite-specific products [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 169:24-35
- [20] JUVEKAR V, LEE H W, LEE D J, et al. Two-photon fluorescent probes for quantitative bio-imaging analysis in live tissues [J]. *TrAC Trends Anal Chem*, 2022, 157:116787-116806
- [21] YANG T T, SUN J Y, YAO W, et al. A two-photon fluorescent probe for turn-on monitoring HOCl level in endoplasmic reticulum [J]. *Dyes and Pigm*, 2020, 180:108438-108445
- [22] WANG J Y, QU J B, ZHANG H T, et al. A fast-responsive two-photon fluorescent probe for monitoring endogenous HClO with a large turn-on signal and its application in zebrafish imaging[J]. *RSC Adv*, 2019, 9(29):16467-16471
- [23] YUAN L, WANG L, AGRAWALLA B K, et al. Development of targetable two-photon fluorescent probes to image hypochlorous acid in mitochondria and lysosome in live cell and inflamed mouse model [J]. *J Am Chem Soc*, 2015, 137(18):5930-5938
- [24] MAO Z, YE M, HU W, et al. Design of a ratiometric two-photon probe for imaging of hypochlorous acid(HClO) in wounded tissues[J]. *Chem Sci*, 2018, 9(28):6035-6040
- [25] DAI C G, WANG J L, FU Y L, et al. Selective and real-time detection of nitric oxide by a two-photon fluorescent probe in live cells and tissue slices [J]. *Anal Chem*, 2017, 89(19):10511-10519
- [26] HE L, XIONG H Q, WANG B H, et al. Rational design of a two-photon ratiometric fluorescent probe for hypochlorous acid with a large stokes shift [J]. *Anal Chem*, 2020, 92(16):11029-11034
- [27] LIU Z, LI G P, WANG Y N, et al. A novel fluorescent probe for imaging the process of HOCl oxidation and Cys/Hcy reduction in living cells[J]. *RSC Adv*, 2018, 8(17):9519-9523
- [28] LI C C, DONG D, QU J, et al. A new and fast-response two-photon fluorescent probe based on(p-Nitrophenylsulfonfyl) hydrazine for detecting endogenous HClO and its application in zebrafish imaging[J]. *Photochem Photobiol A Chem*, 2023, 434:114204-114211
- [29] CHIOUA M, SALGADO-RAMOS M, DIEZ-IRIEPA D, et al. Novel quinolylnitrones combining neuroprotective and antioxidant properties[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2019, 10(6):2703-2706
- [30] CHIOUA M, MARTÍNEZ - ALONSO E, GONZALO - GOBERNADO R, et al. New quinolylnitrones for stroke therapy: antioxidant and neuroprotective(Z)-N-tert-butyl-1-(2-chloro-6-methoxyquinolin-3-yl)methanimine oxide as a new lead-compound for ischemic stroke treatment[J]. *J Med Chem*, 2019, 62(4):2184-2201

[收稿日期] 2023-10-16  
(本文编辑:蒋莉)