

用于检测细胞中亚硝酰氢的近红外荧光探针及其生物应用

刘萍¹ 韩潇玥^{1,2} 于法标^{*1} 陈令新^{*1}

¹(中国科学院海岸带环境过程与生态修复重点实验室, 山东省海岸带环境工程技术研究中心,
中国科学院烟台海岸带研究所, 烟台 264003)

²(中国科学院大学, 北京 100049)

摘 要 亚硝酰氢(HNO)是NO的单电子质子化还原产物。在治疗心血管疾病中,HNO与NO起不同的药理活性。针对HNO活性高,难以实时检测的问题,本实验设计合成了一种新型不含金属离子的近红外荧光探针ER-JN,用于实时检测模拟生理条件下和活细胞内HNO浓度的变化。此探针由荧光团氮杂氟硼吡咯(Aza-BODIPY)和HNO的识别基团三苯基膦两部分组成。探针采用硅胶柱层析分离,洗脱剂为二氯甲烷。产品为墨绿色晶体,产率为28%。此探针具有灵敏度高、选择性强、细胞毒性低等优点,可用于定量检测模拟生理条件下HNO的浓度。检测前后探针的量子产量从0.01增加到0.35。线性范围为0~50 μmol/L,探针的检出限($S/N=3$)是0.03 μmol/L。激光扫描共聚焦显微镜成像分析表明,此探针可以用于可视化检测活细胞内HNO浓度的变化。流式细胞分析的结果显示ER-JN能定性和定量检测细胞内HNO的水平。实验结论表明,探针ER-JN不仅能够检测溶液中的HNO,还能定位于细胞内质网,检测细胞中HNO的变化。可为研究亚细胞、细胞、器官乃至活体中HNO的生理病理功能提供重要的实验依据。

关键词 荧光探针; 亚硝酰氢; 细胞分析; 近红外成像

1 引 言

亚硝酰氢(Nitroxyl, HNO)是一氧化氮(NO)的单电子还原并质子化的衍生物。其所具有的生物和药理作用特征与NO迥然不同。由于其潜在的生物药理活性,近年来引起了广泛关注。HNO与心绞痛、急性高血压、动脉粥样硬化等众多心血管疾病有着紧密的关系^[1]。有报导证实,在体内外实验中,Angeli's盐(HNO供体)是强效的血管舒张剂,它能引起离体大动脉、小阻力动脉及完整的冠状动脉舒张^[2,3]。另外,在心肌收缩功能方面HNO与NO所起的药理作用也不同,HNO以心肌肌浆的兰尼碱受体为靶点增强心肌收缩^[4]。该药理特性为应对心力衰竭提供了一种潜在的治疗方案,并可有效避免硝酸甘油耐受性的问题。尽管越来越多的证据表明了HNO生物药理作用的重要性,然而由于HNO活性高,在生物体环境中极易脱水发生不可逆的二聚化反应生成 N_2O ^[1,2,5],使得对细胞内源性HNO作用机制的研究因缺乏有效的检测手段而无法顺利开展。

传统的检测HNO的方法主要有电化学法、电子自旋共振波谱法、化学发光法和比色法等^[6,7]。与这些方法相比,荧光探针法不仅具有灵敏度高、操作简单、选择性好、非侵入性等特点,还能对检测对象在原位进行实时监控和观察^[8,9]。因此,设计合成能特异性响应HNO的荧光探针凸显重要。目前,检测亚硝酰氢的探针较少,且主要基于铜络合物^[10~12]。该类含金属内核的荧光探针易受到细胞内源性还原物种,例如谷胱甘肽和抗坏血酸等的干扰;而且所报道探针的荧光发射大多集中在紫外-可见区域,因为许多生物体及其组织在紫外-可见光的激发下会发射生物背景荧光,会严重干扰生物样品的荧光检测,严重影响了荧光分析的灵敏度和精确性。而近红外荧光探针的最大吸收波长和发射波长位于650~900 nm光区。该光区可有效避免生物背景荧光干扰,使探针能够获得较高的信噪比,并降低生物样品的光损伤^[13,14]。本研究组一直致力于开发用于检测活性氮物种、活性硫物种和活性氧物种的荧光探针^[15~19]。最近报道了用于检测HNO的荧光探针Lyso-JN和Cyto-JN^[20,21],并将其应用于活细胞内

2015-05-28 收稿; 2015-08-21 接受

本文系国家自然科学基金资助项目(Nos. 21405172, 21575159, 21275158) 和中国科学院青年创新促进会(Grant2015170)

* E-mail: fbyu@yic.ac.cn, lxchen@yic.ac.cn

HNO 水平变化检测,及小鼠体内 HNO 的荧光成像分析。在此基础上,本研究合成了新的 ER-JN 荧光探针,并用于定性和定量检测活细胞内的 HNO。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

PH-3C 型酸度计(上海雷磁公司); RF-5301PC 型荧光分光光度计(岛津公司); NanoDrop 2000/2000C 型紫外可见分光光度计(Thermo Scientific 公司); XS105 型分析天平(Mettler Toledo 公司); Cascade-bio 型超纯水系统(Pall 公司); AVANCE III 500 型核磁共振仪(Bruker 公司); FluoView FV1000 型激光共聚焦显微镜(Olympus 公司); 流式细胞仪(BD); 小动物活体成像系统(Bruker 公司); RAW264.7 细胞(中国科学院细胞库); DMEM 培养基,胰酶(Gibco 公司); 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT, Sigma 公司); 实验用水为二次纯水; 其它试剂均为市售产品(上海国药集团)。

2.2 探针 ER-JN 的合成

探针 ER-JN 合成路线如图 1 所示。Aza-BODIPY 荧光团(52.9 mg, 0.1 mmol)、2-(二苯基膦)苯甲酸(61.2 mg, 0.2 mmol)、4-二甲氨基吡啶 DMAP(24.4 mg, 0.2 mmol)、1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDCI, 19.2 mg, 0.1 mmol)溶于 25 mL 经过干燥二氯甲烷中,常温下搅拌 24 h,氩气保护, TLC 追踪反应进程。粗产品由 NaBr 的饱和溶液洗涤至中性,二氯甲烷萃取,蒸干有机相。残余物采用硅胶柱层析分离,洗脱剂为二氯甲烷。产品为墨绿色晶体,产率为 28%。¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 8.31 ~ 8.01 (m, 1H), 7.53 ~ 7.40 (m, 6H), 7.25 ~ 7.23 (m, 23H), 7.16 (m, 2H), 6.98 ~ 6.94 (m, 2H), 4.05 (m, 2H), 1.98 (m, 2H), 1.26 ~ 0.98 (m, 37H), ¹³C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 165.02, 162.82, 157.01, 152.12, 137.63, 137.54, 134.31, 134.14, 133.97, 133.63, 131.84, 131.66, 131.00, 129.96, 129.77, 129.63, 129.52, 125.39, 129.31, 129.26, 129.21, 129.16, 122.40, 121.27, 116.72, 60.22, 30.01, 21.02, 14.55. ³¹P NMR (200 MHz, CDCl₃-D) δ (ppm): -4.05. LC-MS (ESI⁻): C₇₁H₇₅BF₂N₃O₃P calcd. 1097.56 found 1097.57。

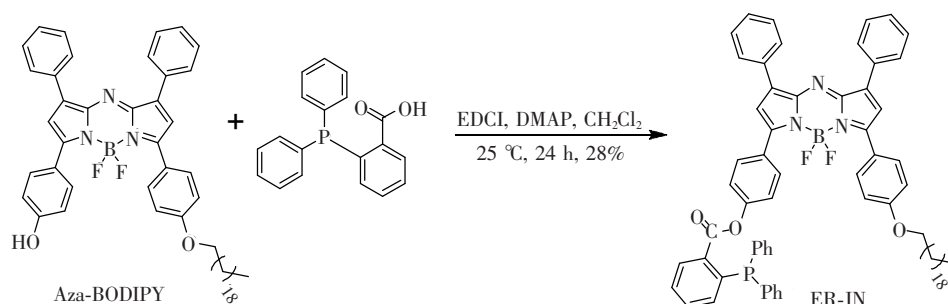


图 1 探针分子 ER-JN 合成路线

Fig. 1 The synthetic steps for probe ER-JN

Azo-BOTIPY: A BF₂-chelated tetraarylazadipyrromethane fluorophore.

2.3 探针 ER-JN 光谱分析

将 Tween 80(10% 0.4 mL)加入到 10.0 mL 比色管中,用 HEPES 缓冲液(10 mmol/L, pH = 7.4)稀释到近 10.0 mL,然后加入不同浓度的 AS(全文以 HNO 为代表)。最后加入探针 ER-JN。将混合液平衡 20 min 后以待测定。紫外-可见吸收光谱在 NanoDrop 2000/2000C 紫外-可见分光光度计上进行测定。用荧光分光光度计测定荧光光谱。

2.4 细胞培养

小鼠巨噬细胞株(RAW264.7)细胞购自中国科学院生物化学和细胞生物学研究所细胞库,并按照说明进行培养。细胞培养基为含 10% 胎牛血清的高糖 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM),细胞置于 37℃ 通入 5% CO₂/95% 空气的 MCO-45AC 培养箱(日本 Sanyo 公司)中,细胞达到融合状态

时, PBS 缓冲液洗涤两遍后 0.25% 胰酶消化传代。

2.5 细胞毒性实验

RAW264.7 细胞培养在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 中, 并置于 37℃ 的通入 5% CO₂/95% 空气的 MCO-15AC 培养箱中。密度为 8000/孔的 RAW264.7 细胞接种到 96-孔板中并培养 24 h。随后, 分别用浓度 0.1 ~ 100 μmol/L 的探针孵育 RAW264.7 细胞 24 h。然后在每个孔中分别加入 MTT (Sigma 公司) 溶液 (5.0 mg/mL 20 μL), 在 37℃ 下培养 4 h, 然后将 96-孔板中 MTT 溶液去除, 每个孔加入 150 μL 二甲基亚砜 (DMSO), 溶解蓝紫色甲瓖 (Formazan) 晶体。最后将 96-孔板放置在微孔板读数器上, 振荡 10 min, 用酶联免疫检测仪 OD 在 490 nm 处测量各孔的吸光值。

2.6 激光共聚焦显微镜成像

细胞培养皿中充满 1 mL 新鲜的 DMEM 培养基, 依次加入细胞核染料 Hoechst 33342 (1 μg/mL) 细胞内质网定位染料 DiOC₆ (3) (3,3'-Dihexyloxacarbocyanine iodide, 0.1 μmol/L), 探针 ER-JN (DMSO, 1 μmol/L) 和 HNO (200 μmol/L) 在细胞培养箱中 37℃ 条件下分别孵育相应的时间。在细胞成像之前, 除去培养基, 然后用 DMEM 洗涤细胞 3 次, 除去过多探针等。用激光共聚焦显微镜进行细胞成像 (×60)。

2.7 流式细胞仪检测

取对数生长期的 RAW264.7 细胞 30 万个/孔, 种于六孔板, 置 37℃、5% CO₂ 培养箱孵育 24 ~ 48 h, 加入 5 μmol/L ER-JN 孵育 15 min 后, 分别加入 200 μmol/L AS, 孵育 10 和 20 min, 将细胞消化收集到流式管中, 用 DMEM 洗涤两次后, PBS 重悬, 流式细胞仪 (BD Aria) 检测, 激发波长 633 nm, 收集波长 750 ~ 810 nm。

3 结果与讨论

3.1 探针 ER-JN 的设计

设计合成了一种用于检测 HNO 的近红外荧光探针 ER-JN。该探针可定位于细胞内质网 (Endoplasmic reticulum, ER)。如图 2 所示, 荧光探针 ER-JN 由 3 部分组成: 荧光团 Aza-BODIPY、识别单元三苯基膦基团、内质网定位烷基链。荧光团 Aza-BODIPY 的激发和发射区均位于近红外区。作为 HNO 的识别单元的三苯基膦基团可与 HNO 反应生成氮叶立德中间体, 氮叶立德继而与分子内合适位置的酯基发生亲核反应形成一个酰胺, 脱去后释放出荧光团 Aza-BODIPY, 使荧光团恢复发射荧光^[20, 21]。长链脂溶性烷基则具有典型的内质网定位功能。实验结果表明, 荧光探针 ER-JN 可以成功用于检测活细胞内质网的 HNO 浓度变化。

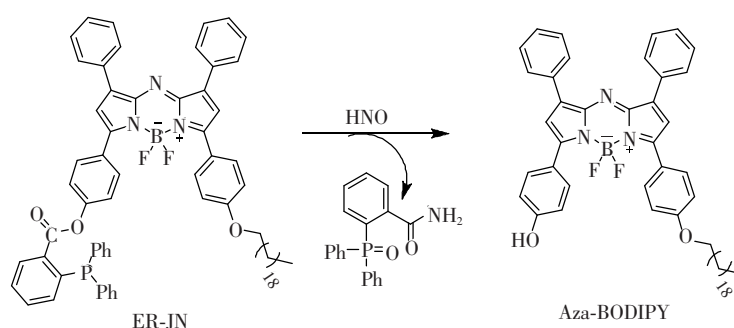


图 2 探针 ER-JN 检测 HNO 的建议机理

Fig. 2 Proposed reaction mechanism for HNO detection

3.2 探针光谱特性研究

模拟生理条件下 (10 mmol/L HEPES 缓冲液, pH 7.4 0.5% 吐温 80) 对探针 ER-JN 的光谱特性进行考察。如图 3a 所示, 探针 ER-JN (5 μmol/L) 最大吸收波长为 675 nm ($\epsilon = 5.2 \times 10^4$ mol/L · cm), 当加入 50 μmol/L AS 后, 675 nm 处吸收峰消失, 707 nm 处出现一个新的吸收峰 ($\epsilon = 6.9 \times 10^4$ mol/L · cm), 表明探针和 AS 发生反应导致酯键断裂, 释放出荧光团 Aza-BODIPY。为了评估 ER-JN

在模拟生理条件下测定 HNO 浓度的能力,实验选择 690 nm 作为荧光激发波长。向缓冲溶液中添加 AS,当 HNO 的浓度从 0 增加到 50 $\mu\text{mol/L}$ 时,ER-JN 的荧光强度不断增强,相应的荧光最大值在 710 nm 处,量子产量从 0.01 增加到 0.35。此外,当 AS 浓度在 0 ~ 50 $\mu\text{mol/L}$ 之间时,其与荧光强度之间呈良好的线性关系(见图 4),线性回归方程是 $F_{710\text{ nm}} = 6.3 C_{\text{HNO}} (\mu\text{mol/L}) + 39.7 (r = 0.9981)$ 。探针的检出限($S/N = 3$)是 0.03 $\mu\text{mol/L}$,表明 ER-JN 对 HNO 具有较高的灵敏度。结果表明,此探针的吸收和发射波长都在近红外区域,表明荧光探针 ER-JN 适用于细胞和活体内成像。

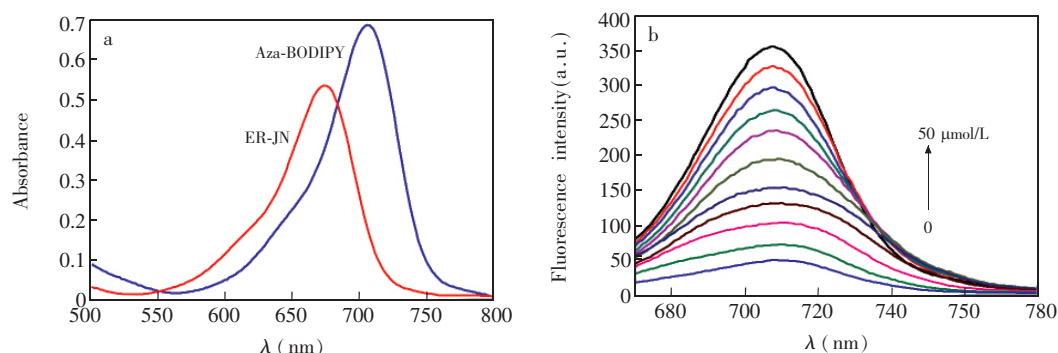


图 3 加入 50 $\mu\text{mol/L}$ HNO 后,探针 ER-JN 吸收光谱的变化(a);加入 0 ~ 50 $\mu\text{mol/L}$ HNO 20 min 后,探针 ER-JN (10 $\mu\text{mol/L}$) 的荧光发射光谱变化(b)

Fig. 3 a. UV-vis absorption spectral of probe ER-JN (10 $\mu\text{mol/L}$) before and after addition of 50 $\mu\text{mol/L}$ HNO; b. Fluorescence spectra of ER-JN (10 $\mu\text{mol/L}$) upon addition of HNO (0–50 $\mu\text{mol/L}$) for 20 min

3.3 探针检测选择性研究

为了验证 ER-JN 对 HNO 的特异性响应,针对生理相关活性氧、活性氮以及其它常见生物物种在溶液中对探针进行了测试。结果表明,在 0, 5, 10, 15 和 20 min 后,ER-JN 对 HNO 的荧光的响应超过其它生物相关物种,选择性良好(图 5)。探针对谷胱甘肽、半胱氨酸以及其它还原性物质、活性氧物种、活性氮物种的荧光响应极为微弱。有研究表明,GSNO 可与 HNO 发生相似反应,生成酰胺。如图 5 所示,GSNO 能在 20 min 内引发响应,做出有限的荧光响应。然而,其增加的荧光强度远弱于 HNO 所引起的荧光变化。以上实验结果表明,ER-JN 对 HNO 的选择性明显优于 GSNO。与此同时, NO_2^- 作为 AS 的另一分解产物,探针 ER-JN 对其的前后荧光响应没有显著的差异。因此,在竞争实验中,探针 ER-JN 对于 HNO 的识别几乎不受其它生物相关物种的干扰,也就是探针 ER-JN 表现出对 HNO 良好的专一性。

3.4 探针的细胞毒性研究

低细胞毒性是探针能够应用于活细胞检测的一个重要标准。因此,MTT 实验选用 RAW264.7 细胞为细胞模型进行了测试,以便对此探针的细胞毒性做出评价。检测结果如图 6 所示,探针的浓度在 (0.1 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$) 递增,细胞的 24 h 成活率均大于 90%。此探针具有良好的生物兼容性,能够很好地满足细胞实验要求,可用于活细胞内 HNO 的检测。

3.5 细胞成像

基于探针 ER-JN 对 HNO 的检测具有高选择性和高灵敏度等特点,将此探针应用于细胞检测中,利用激光扫描共聚焦显微镜对细胞内 HNO 的变化进行荧光成像分析。细胞用 1 $\mu\text{mol/L}$ ER-JN 孵育 15 min 后,DMEM 洗涤去掉过量的探针,细胞呈现微弱的荧光(图 7a)。向此细胞体系中加入

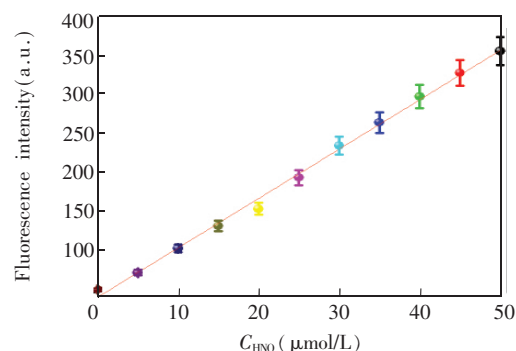


图 4 HNO 浓度(0 ~ 50 $\mu\text{mol/L}$) 和波长 710 nm 处的荧光强度之间的线性关系

Fig. 4 Linear relationship between fluorescent intensity at 710 nm and Angeli's salt (AS) (0–50 $\mu\text{mol/L}$) in buffer solution

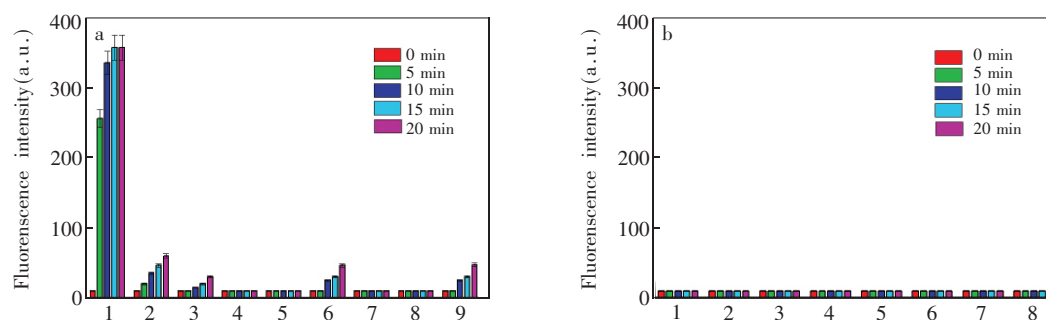


图 5 10 $\mu\text{mol/L}$ ER-JN 对 HNO 和其他相关物种随时间变化的荧光响应

Fig. 5 Fluorescence responses of 10 $\mu\text{mol/L}$ ER-JN to testing species in 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) buffer solution

(a) 1, 50 $\mu\text{mol/L}$ HNO ; 2, 20 $\mu\text{mol/L}$ S-nitrosoglutathione (GSNO); 3, 200 $\mu\text{mol/L}$ Peroxynitrite (ONOO^-); 4, 50 $\mu\text{mol/L}$ 3-(Aminopropyl)-1-hydroxy-3-isopropyl-2-oxo-1-triazene (NOC-5); 5, 500 $\mu\text{mol/L}$ NO_2^- ; 6, 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 ; 7, 100 $\mu\text{mol/L}$ O_2^- ; 8, 20 $\mu\text{mol/L}$ Methyl linoleate hydroperoxide (MeLOOH); 9, 200 $\mu\text{mol/L}$ ClO^- . (b) 1, 50 $\mu\text{mol/L}$ 半胱氨酸(L-Cysteine, Cys); 2, 100 $\mu\text{mol/L}$ 谷胱甘肽(Glutathione, GSH); 3, 500 $\mu\text{mol/L}$ NaHS; 4, 200 $\mu\text{mol/L}$ 抗坏血酸(L-Ascorbic acid, Ve); 5, 200 $\mu\text{mol/L}$ 生育酚(Tocopherol, VE); 6, 100 $\mu\text{mol/L}$ 柠檬酸盐(Citrate); 7, 200 $\mu\text{mol/L}$ 酪氨酸(Tyrosine, Tyr); 8, 50 $\mu\text{mol/L}$ 羟胺(Hydroxylamine, HA)。

200 $\mu\text{mol/L}$ HNO 作用 10 min 后, 荧光强度明显增强(图 7b)。随着时间的推移, 细胞发出越来越强的荧光(图 7c)。以上结果表明, 探针 ER-JN 能够用于检测细胞内 HNO 浓度的变化。利用细胞内质网染料 $\text{DiOC}_6(3)$ (3, 3'-dihexyloxycarbocyanine iodide) 和细胞核染料 Hoechst 33342 研究探针在 RAW264.7 中的亚细胞定位。通过细胞复染图可以看出探针与 $\text{DiOC}_6(3)$ 的荧光重合度较大, 而与细胞核染料 Hoechst 33342 的荧光几乎没有重合。因此, 探针 ER-JN 具有良好的亚细胞定位功能, 可用于活细胞中 HNO 的荧光检测。探针在细胞中主要定位于细胞内质网。

3.6 流式细胞仪检测

激光扫描共聚焦显微镜分析视野中相对少的细胞, 而流式细胞仪能够快速检测上百万的细胞, 得到更可信的结果。为了进一步验证图 7 中的实验结果, 采用流式细胞技术分析 HNO 引起的细胞内荧光变化。图 8 中 X 轴代表荧光强度, Y 轴代表细胞数目。细胞分成 4 组: (a) 对照组; (b) 加探针对照组; (c) 探针加 200 $\mu\text{mol/L}$ HNO 孵育 10 min 组; (d) 探针加 200 $\mu\text{mol/L}$ HNO 孵育 10 min 组。如图 8 所示, 对照组 a 和 b 几乎没有显示出荧光。c 组荧光有所增强, 而 d 组荧光有了更明显的增强。上述实验结果与图 7 中荧光成像分析结果的趋势一致。上述结果表明, 探针 ER-JN 能够定性和定量地检测细胞内 HNO 的浓度变化。

4 结论

本实验设计合成了一种用于检测细胞内 HNO 浓度变化的近红外荧光探针 ER-JN。此探针采用 Aza-BODIPY 为荧光团, 三苯基膦为 HNO 的响应基团。此探针对 HNO 具有明显的荧光“开启”功能。此探针具有选择性好、灵敏度高和细胞毒性低等优点。除此之外, 探针不仅能够检测溶液中的 HNO , 还

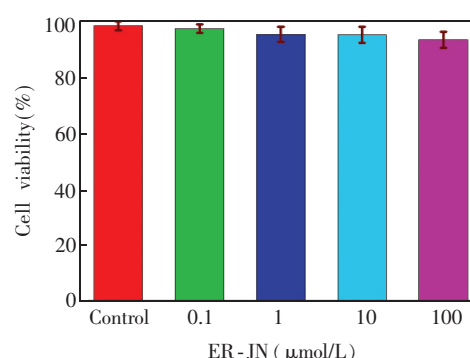


图 6 探针 ER-JN 对 RAW264.7 细胞的毒性实验。细胞用 0.1 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$ 的探针孵育 24 h。数据代表平均值 \pm 标准差, 每组设 3 个平行实验

Fig. 6 Cell viabilities of ER-JN against RAW264.7 cells. Cells were treated with 0.1 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$ of ER-JN for 24 h. Data were expressed as the means \pm SD of data obtained from triplicate experiment

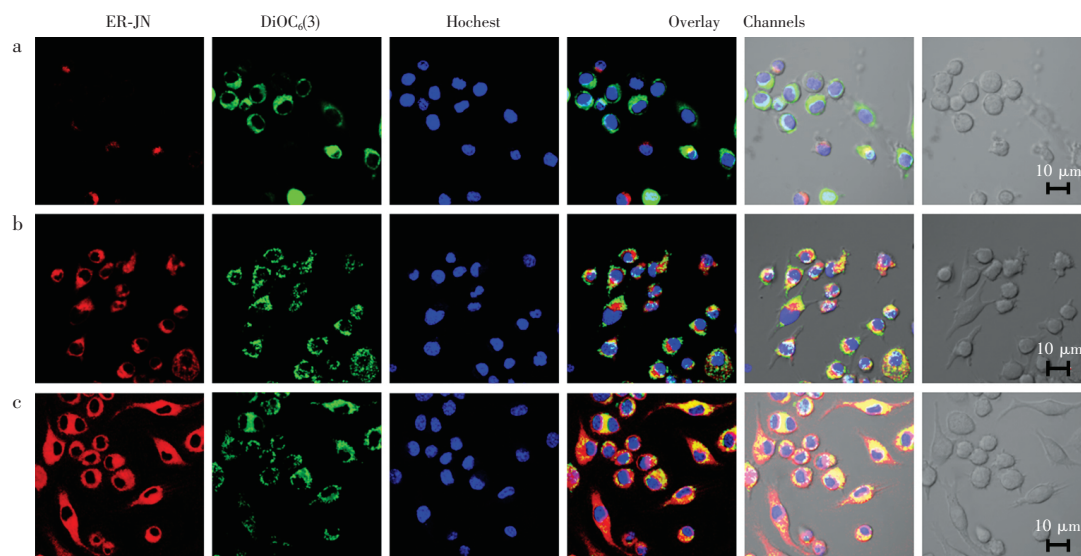


图 7 探针 ER-JN 检测 RAW264.7 细胞中 HNO 的激光共聚焦成像分析。(a) 细胞体系中加入探针 ER-JN (1 $\mu\text{mol/L}$) 孵育 15 min; (b) 和 (c) 细胞同上述 a 处理过后分别加入 200 $\mu\text{mol/L}$ HNO 孵育 10 和 20 min 后的荧光成像; 各组中: 细胞内质网染料 DiOC₆(3) 的荧光成像; 细胞核染料 Hoechst 33342 的荧光成像; 3 个荧光通道 ER-JN、DiOC₆(3)、Hoechst 33342 的叠加图像; 3 个荧光通道场叠加成像。红色通道: ER-JN 激发波长 690 nm, 荧光收集波段 700 ~ 800 nm; 绿色通道: DiOC₆ 激发波长 488 nm, 荧光收集波段 560 ~ 600 nm; 蓝色通道: Hoechst 33342 激发波长 405 nm, 收集波长 420 ~ 480 nm

Fig. 7 Confocal fluorescence images of HNO in RAW 264.7 cells with ER-JN. (a) Cells loaded with 1 $\mu\text{mol/L}$ probe for 15 min. (b) and (c) Cells treated with 200 $\mu\text{mol/L}$ HNO for 10 and 20 min, respectively; In each group: ER-JN bioimage from red channel. 3,3'-dihexyloxacarbocyanineiodide (DiOC₆(3) bio-image from green channel. Hoechst 33342 bioimage from blue channel. Overlay of red channel, green channel and blue channel, and overlay of red channel, green channel, blue channel and bright field. Red channel: $\lambda_{\text{ex}} = 690 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 700 - 800 \text{ nm}$; Green channel: $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 560 - 600 \text{ nm}$; Blue channel: $\lambda_{\text{ex}} = 405 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 420 - 480 \text{ nm}$

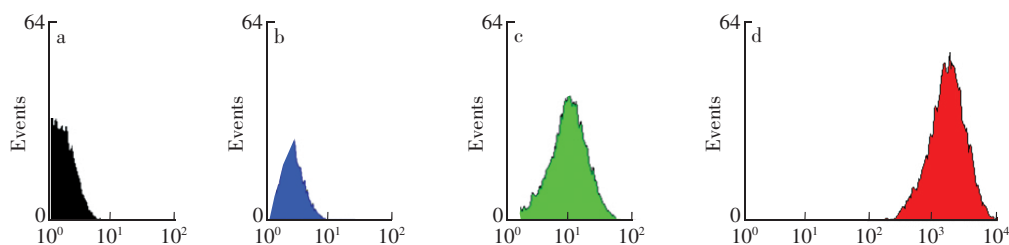


图 8 探针 ER-JN 检测 RAW264.7 细胞中 HNO 变化的流式细胞分析。(a) 对照组; (b) 加 1 $\mu\text{mol/L}$ 探针孵育 15 min 后, 细胞用 DMEM 洗 3 次; (c) 细胞按照 b) 处理后, 加 200 $\mu\text{mol/L}$ HNO 孵育 10 min 组; (d) 细胞按照 c) 处理后的细胞, 再加 200 $\mu\text{mol/L}$ HNO 孵育 20 min

Fig. 8 Represent data of flow-cytometric analysis: (a) Control; (b) The cells were incubated with 1 $\mu\text{mol/L}$ ER-JN for 15 min, then washed with dulbecco's modified eagle medixm (DMEM) three times to remove the overdose probe; (c) The cells were treated as described in (b), then incubated with 200 $\mu\text{mol/L}$ HNO for 10 min; (d) The cells were treated as described in (c), then exposed to another dosages of 200 $\mu\text{mol/L}$ HNO for an additional 20 min

能定位于细胞内质网, 检测细胞中 HNO 浓度的变化。此探针对于研究亚细胞、细胞、器官乃至活体中 HNO 的生理病理功能具有重要的意义和实用价值。

References

- 1 Irvine J C , Ritchie R H , Favaloro J L , Andrews K L , Widdop R E , Kemp-Harper B K. *Trends Pharmacol. Sci.* , **2008** , 29(12) : 601 – 608
- 2 Paolocci N , Jackson M I , Lopez B E , Miranda K , Tocchetti C G , Wink D A , Hobbs A J , Fukuto J M. *Pharmacol. Ther.* , **2007** , 113(2) : 442 – 458
- 3 Favaloro J L , Kemp-Harper B K. *Cardiovasc. Res.* , **2007** , 73(3) : 587 – 596
- 4 Paolocci N , Saavedra W F , Miranda K M , Martignani C , Isoda T , Hare J M , Espey M G , Fukuto J M , Feelisch M , Wink D A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* , **2001** , 98(18) : 10463 – 10468
- 5 Dutton A S , Fukuto J M , Houk K. *J. Am. Chem. Soc.* , **2004** , 126(12) : 3795 – 3800
- 6 Malinski T , Taha Z. *Nature* , **1992** , 358(6388) : 676 – 678
- 7 Nagano T , Yoshimura T. *Chem. Rev.* , **2002** , 102(4) : 1235 – 1270
- 8 Li X , Gao X , Shi W , Ma H. *Chem. Rev.* , **2014** , 114(1) : 590 – 596
- 9 Wang R , Yu C , Yu F , Chen L. *TrAC. Trends Anal. Chem.* , **2010** , 29: 1004 – 1013
- 10 Wrobel A T , Johnstone T C , Deliz L A , Lippard S J , Rivera-Fuentes P. *J. Am. Chem. Soc.* , **2014** , 136(12) : 4697 – 4705
- 11 McQuade L E , Lippard S J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* , **2010** , 14(1) : 43 – 49
- 12 Zhou Y , Liu K , Li J , Fang Y , Zhao T , Yao C. *Org. Lett.* , **2011** , 13(6) : 1290 – 1293
- 13 Wang R , Yu F , Chen L , Chen H , Wang L , Zhang W. *Chem. Commun.* , **2012** , 48(96) : 11757 – 11759
- 14 Wang R , Yu F , Liu , Chen L. *Chem. Commun.* , **2012** , 48(43) : 5310 – 5312
- 15 JING Xiao-Tong , YU Fa-Biao , CHEN Ling-Xin. *Process in Chemistry* , **2014** , 26(5) : 866 – 878
景晓彤 , 于法标 , 陈令新. 化学进展 , **2014** , 26(5) : 866 – 878
- 16 GAO Min , YU Fa-Biao , CHEN Ling-Xin. *Process in Chemistry* , **2014** , 26(6) : 1065 – 1078
高 敏 , 于法标 , 陈令新. 化学进展 , **2015** , 87 (7) : 3631 – 3638
- 17 Wang R , Chen L , Liu P , Zhang Q , Wang Y Q. *Chem. Eur. J.* , **2012** , 18(36) : 11343 – 11349
- 18 Gao M , Yu F , Chen H , Chen L. *Anal. Chem.* , **2015** , 87 (7) : 3631 – 3638
- 19 Gao M , Wang R , Yu F , You J , Chen L. *Analyst* , **2015** , 140 (11) : 3766 – 3772
- 20 Jing X , Yu F , Chen L. *Chem. Commun.* , **2014** , 50(91) : 14253 – 14256
- 21 Liu P , Jing X , Yu F , Lv C , Chen L. *Analyst* , **2015** , 140(13) : 4576 – 4583

A Near-Infrared Fluorescent Probe for Detection of Nitroxyl in Living Cells

LIU Ping¹ , HAN Xiao-Yue^{1,2} , YU Fa-Biao^{*1} , CHEN Ling-Xin^{*1}

¹(Key Laboratory of Coastal Environmental Processes and Ecological Remediation ,

The Research Centre for Coastal Environmental Engineering and Technology ,

Yantai Institute of Coastal Zone Research , Chinese Academy of Sciences , Yantai 264003 , China)

²(University of Chinese Academy of Sciences , Beijing 100049 , China)

Abstract Nitroxyl (HNO) , the one-electron reduced and protonated congener of nitric oxide (NO) , has been demonstrated with excellent bio-pharmacological effects in cardiovascular disorder treatment , which is distinctive from that of NO. The high reactivity of HNO challenges the accurate detection. To resolve this problem , a near-infrared (NIR) metal-free fluorescent probe , ER-JN , was developed for the detection of intracellular HNO concentration in simulated physiological conditions and living cells. The probe was consisted of two moieties , the A BF₂-chelated tetraarylazadipyromethane fluorophore (aza-BODIPY) and the HNO recognition unit , diphenylphosphinobenzoyl group. The probe was purified by column chromatography on silica eluting with CH₂Cl₂ to give the product as a green solid with a yield of 28% . Our probe exhibited high

