

亚铁离子和亚铁血红素的小分子荧光探针研究进展

陈 晨, 陈义鑫, 张崇敬*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室,
活性物质发现与适药化研究北京市重点实验室, 北京 100050)

摘要: 小分子荧光探针以其选择性好、灵敏度高、便于操作等优点受到了广泛的关注, 在许多物种的检测中发挥了重要的作用, 并且在生物医药领域的研究中也表现出了巨大的潜力。铁作为人体中含量最丰富的过渡金属, 利用其氧化还原能力在许多生理功能中都扮演着关键的角色。由于细胞还原性微环境的影响, 亚铁离子 (Fe^{2+}) 是活细胞中游离铁的主要组成部分。亚铁血红素 (heme) 由 Fe^{2+} 和原卟啉 IX 组成, 是将人体内生物铁包裹在其中的主要信号分子之一, 同样参与许多生理病理过程。因此, 开发用于检测 Fe^{2+} 及 heme 的小分子荧光探针作为有效监测工具将有助于进一步了解它们的病理及生理功能, 并有望应用于其他领域。本文综述了近年来用于检测 Fe^{2+} 和 heme 的小分子荧光探针研究进展, 并对未来的发展方向进行了展望。

关键词: 小分子荧光探针; 亚铁离子; 亚铁血红素; 还原能力; 环化反应; 螯合作用

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)08-2250-10

Research progress of small molecule fluorescent probes for ferrous ion and heme

CHEN Chen, CHEN Yi-xin, ZHANG Chong-jing*

(State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines and Beijing Key Laboratory of Active Substance Discovery and Druggability Evaluation, Institute of Materia Medica, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

Abstract: Small molecule fluorescent probes have gained widespread attention for their advantages of high selectivity, sensitivity, and easy to operate, and have played a critical role in the detection of various species. They have also demonstrated great potential in the field of biomedical research. Iron, as the most abundant transition metal in the human body, plays a vital role in many physiological functions. Due to the influence of the reductive microenvironment of cell, ferrous ion (Fe^{2+}) is the main component of labile iron in living cells. Heme, consisting of Fe^{2+} and protoporphyrin IX, is one of the main signaling molecules that wrap biological iron in the human body, and also participates in many physiological and pathological processes. Therefore, the development of small molecule fluorescent probes for detecting Fe^{2+} and heme as effective monitoring tools will help to further understand their pathological and physiological functions, with potential applications in other fields. This review summarizes the research progress of small molecule fluorescent probes for Fe^{2+} and heme detection in recent years, and provides insights into future directions for their development.

Key words: small molecule fluorescent probe; ferrous ion; heme; reduction; cyclization; chelation

收稿日期: 2023-05-03; 修回日期: 2023-05-25.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (22177136); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程 (2022-I2M-2-002).

*通讯作者 Tel: 13161073739, E-mail: zhangchongjing@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0547

铁是生物体内不可或缺的金属元素,也是人体中含量最丰富的过渡金属^[1]。除与蛋白或酶紧密结合的铁外,游离的弱蛋白或无蛋白结合的铁离子具有更高的反应性^[2]。铁离子以两种价态相互转化的形式(Fe^{3+} 或 Fe^{2+})存在于骨髓、血液、肝脏和肌肉^[3]中,利用独特的氧化还原能力^[4,5],参与了包括血红素合成^[6]、氧输送^[7]、DNA合成^[8]、神经活动^[9]等多种生理过程。而这种独特的氧化还原能力也可以通过催化芬顿反应产生活性氧,从而诱导细胞损伤^[10]。在细胞还原性的微环境中, Fe^{2+} 的含量要高于 Fe^{3+} ,其代谢异常与人的多种疾病有关。例如,铁过量出现在帕金森症^[11]、癌症^[12]、动脉粥样硬化^[13]等疾病的发生发展中,铁缺乏时可能会导致肌无力和缺铁性贫血^[14]。除此之外, Fe^{2+} 的累积可能会引起细胞铁死亡(ferroptosis)^[11,15-18]。不难看出, Fe^{2+} 的稳态对人体的健康来说是十分重要的。另一方面,人体内还存在许多将生物铁紧紧包裹在其中的蛋白^[19]。亚铁血红素(heme)便是将生物铁包裹在其中的信号分子之一^[20],主要存在于血红蛋白、肌红蛋白、细胞色素、过氧化氢酶、过氧化物酶等蛋白中^[21]。而这种与蛋白紧密结合的heme无法参与依赖heme的信号转导过程^[22]。类似于游离的 Fe^{2+} ,与蛋白弱结合或不与蛋白结合的heme也被称为游离的heme,在多种细胞和生物过程中都发挥调节作用^[23]。研究指出,heme可激活青蒿素类药物的过氧桥键^[24],是这类化合物发挥抗疟作用的关键。除此之外,有证据表明,细胞铁死亡的过程中 Fe^{2+} 与heme的水平均升高^[25]。并且,在许多癌症中发现了heme的高表达^[26]。因此,有效监测 Fe^{2+} 和heme对进一步了解其生理和病理功能以及相关应用的开发至关重要。

小分子荧光探针可通过识别基团与被检测物特异性反应或结合,导致探针本身的光物理学性质发生改变,进而引起荧光信号的变化,因此可以利用变化的荧光信号对不同体系中的待测物进行检测。小分子荧光探针的生物成像技术由于操作简单、选择性好、灵敏度高^[27,28]等优点已经成功应用于多种疾病研究中。过去的十几年间,人们致力于开发各种作用于 Fe^{2+} 、heme的小分子荧光探针,这些探针可用于监测生物体或环境中的 Fe^{2+} 和heme,并且许多探针在生物医药领域都显示出进一步应用的潜力。本文将对这些小分子荧光探针进行综述,希望能对同类探针的开发有所启示。

1 用于亚铁离子(Fe^{2+})的小分子荧光探针

目前报道的 Fe^{2+} 的小分子荧光探针大多是基于 Fe^{2+} 能够选择性促进的反应开发的,其中大部分利用了 Fe^{2+} 的还原能力(图1),以及 Fe^{2+} 介导的环化反应(图2),除此之外,还有利用 Fe^{2+} 与配体的螯合作用开发的

探针(图2)。

1.1 利用 Fe^{2+} 的还原能力开发的小分子荧光探针

1.1.1 过氧桥键还原类 2016年,Aron等^[29]和Spangler等^[30]分别报道了基于 Fe^{2+} 断裂过氧桥键开发的荧光探针(图1A)。探针的合成受到以青蒿素为代表的抗疟药物中过氧桥键可以被 Fe^{2+} 断裂的启发。Aron等^[29]报道的小分子荧光探针**1**为比率型探针,也是第一代用于活细胞环境的内过氧化物探针。该探针使用含有过氧桥键的1,2,4-三氧戊环作为linker来调节供体5-AME和受体Cy3染料间的荧光共振能量转移(FRET)。在没有受到 Fe^{2+} 的作用时,这两个荧光团可发生FRET效应,在515和556 nm处发出两个荧光信号。当 Fe^{2+} 存在时,过氧桥键被打开,两个荧光团分离,无法发生FRET效应,此时可以观察到515 nm处的荧光信号增加,556 nm处的荧光信号减弱,因此,细胞内的 Fe^{2+} 的变化可以通过荧光信号比来评估。探针**1**对 Fe^{2+} 表现出很好的选择性,不受其他金属离子、氧化剂和还原剂的干扰。并且,探针**1**可以检测包括HEK293细胞在内的多种细胞模型中 Fe^{2+} 的增加和减少。除此之外,使用探针**1**实现了在铁死亡模型中监测 Fe^{2+} 浓度的变化,证实了细胞铁死亡与细胞 Fe^{2+} 浓度有关,为进一步理解这种新型的细胞死亡奠定了基础。

Spangler等^[30]报道的探针**2**是通过将含有1,2,4-三氧戊环的单元与嘌呤霉素连接构成的,在利用 Fe^{2+} 对过氧桥键的选择性的同时,构建了一个基于嘌呤霉素的探针(图1A)。具体而言,探针与 Fe^{2+} 作用后,释放出嘌呤霉素,后者与生长的多肽链结合产生共价标签,该共价标签在细胞固定时可以与嘌呤霉素特异性的抗体结合,通过免疫荧光法进行检测。探针**2**对 Fe^{2+} 有高选择性,能够比较不同细胞系中 Fe^{2+} 的水平。研究结果进一步证实了与非肿瘤细胞系相比,癌症细胞中 Fe^{2+} 池增加。此外,在人类结肠癌细胞(RKO)中,使用探针**2**发现,通过瞬时转染异位表达铁储存蛋白(FTH-1)或铁转运蛋白(SLC40A1)会导致细胞内 Fe^{2+} 浓度显著变化。这种高通量免疫荧光成像的方法为研究细胞内 Fe^{2+} 的稳态和代谢提供了新的思路。值得注意的是,上述两个研究的作者对探针**1**和探针**2**作用机制中金刚烷部分裂解产物的结构解析并不相同。遗憾的是,这两个工作都没有对裂解产物进行结构确证。含金刚烷结构的1,2,4-三氧戊环与 Fe^{2+} 的反应产物还需进一步研究。

1.1.2 N-氧化物还原类 N-氧化物是叔胺保护基团中常见的一类,被还原后可以脱保护生成三级胺,N-氧化物类 Fe^{2+} 小分子荧光探针便是利用了这一点。Nagasawa课题组在这方面做了广泛的研究。2013年,该课题组的Hirayama等^[31]首次报道了基于N-氧化物

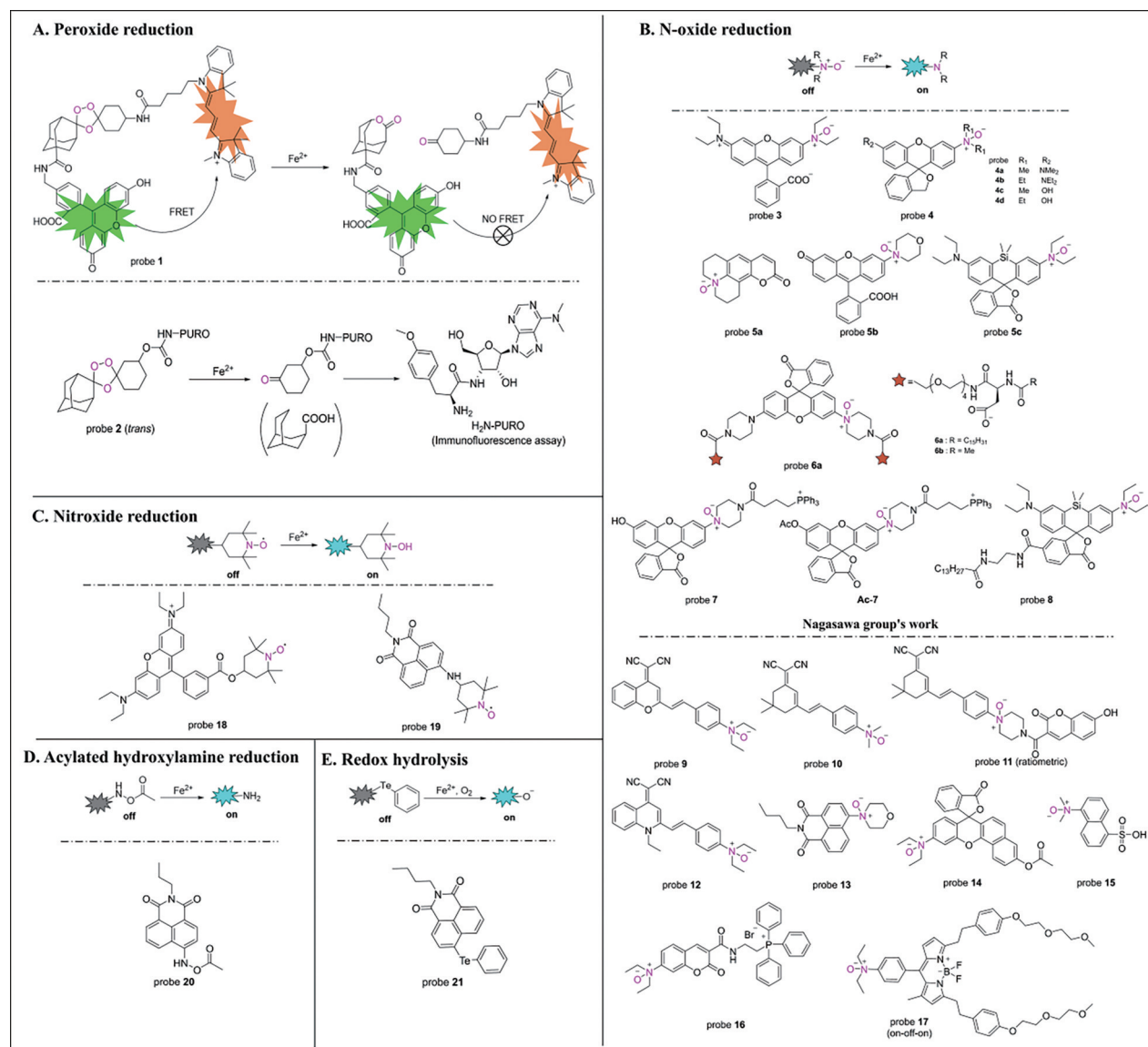


Figure 1 Reduction-based Fe^{2+} small molecule fluorescent probes and their design strategies

还原反应的 Fe^{2+} 选择性小分子荧光探针 **3** (图 1B)。在没有 Fe^{2+} 存在时, 探针的氮原子由于“N-O”部分的存在, 无法参与到共轭体系中。当 N-氧化物单元被 Fe^{2+} 还原后, 生成了给电子的叔胺, 探针的荧光开启。并且, 核磁、DFT 计算、电化学证实了只有在生理 pH 范围内, 探针 **3** 才会以开放的醌型结构存在。探针 **3** 对 Fe^{2+} 表现出高选择性, 不受到其他金属离子、还原剂和 ROS 的影响。活细胞成像结果表明, 探针 **3** 不仅可以检测外部补充的 Fe^{2+} , 还可以观察到细胞内源性的 Fe^{2+} 。

该课题组的 Niwa 等^[32]随后报道了 4 个基于螺环骨架的 N-氧化物类小分子荧光探针 **4a~4d** (图 1B)。与第一代的探针 **3** 相比, 螺环化策略显著提高了探针荧光开启速率, 并且通过减小 N-氧化物基团的大小提高了对 Fe^{2+} 的反应速率。探针 **4** 同样对 Fe^{2+} 有很好的

选择性, 均能够以剂量依赖的方式观察细胞内的 Fe^{2+} 。其中使用荧光倍数增加最多的探针 **4a** 监测了转铁蛋白介导的内吞作用和溶酶体中 Fe^{2+} 的累积。该课题组的这部分研究在探针 **3** 的基础上将 N-氧化物策略引入到了不同的荧光团中, 因此他们认为 Fe^{2+} 选择性 N-氧化物还原体系可以扩展到荧光团中含有芳基叔胺的其他染料中, 接下来的研究也证实了这一点。

2017 年, 该课题组^[33]再次将 N-氧化物还原策略扩展到了其他荧光团中 (香豆素, morpholinorhodol 和 Si-罗丹明 B), 得到了含有不同荧光团的小分子荧光探针 **5a~5c** (图 1B)。所合成的探针在水性缓冲液中均对 Fe^{2+} 表现出选择性的开启响应, 其中探针 **5c** 由于螺环结构的存, 本身背景信号最低, 对 Fe^{2+} 的响应最好。3 个探针均可用于检测活细胞中的 Fe^{2+} 。使用探针 **5c**

观察到在细胞缺氧条件下 Fe^{2+} 的氧化还原平衡轻微向 Fe^{2+} 转变,且 Fe^{2+} 的上调明显依赖于细胞中的含氧量,与细胞中的总铁量、铁蛋白以及缺氧激活的酶无关。

2018年,他们分别报道了两个基于N-氧化物还原的小分子荧光探针(图1B)。其中探针**6a**^[34]结构中含有两个棕榈酰基团,能够靶向细胞表面并且停留较长时间,因此可以检测细胞膜表面的 Fe^{2+} 。用乙酰基替代**6a**的棕榈酰基得到的模型探针**6b**进行了体外实验,结果表明在水性缓冲液中,模型探针可以选择性地检测 Fe^{2+} 。膜靶向的探针**6**证实了 Fe^{2+} 是在细胞主要的铁摄取途径(直接转运和内吞作用)中瞬时产生的。探针**7**^[35]通过在结构中引入三苯基膦基,从而选择性地靶向线粒体。探针**7**同样对 Fe^{2+} 有很好的选择性,使用细胞更容易摄取的乙酰化形式探针**Ac-7**可以特异性检测HepG2细胞线粒体中的 Fe^{2+} 。此外,通过血红素生成抑制剂与HEK293细胞预孵育,**Ac-7**成功地检测到了血红素合成抑制导致的细胞内线粒体中 Fe^{2+} 的累积。

次年,该课题组^[36]又报道了一个可以靶向检测高尔基体中 Fe^{2+} 的小分子荧光探针**8**(图1B)。通过将基于脂质的高尔基体靶向分子与N-氧化物整合到一个结构中,探针**8**实现了对细胞高尔基体中的 Fe^{2+} 选择性成像,不会受到其他金属离子、还原剂及活性氧的干扰。细胞成像结果表明,在补充了外源性 Fe^{2+} 后,细胞的荧光强度显著增加,证实了高尔基体作为 Fe^{2+} 潜在的亚细胞储存器的作用。使用探针**8**和他们原先开发的检测溶酶体中 Fe^{2+} 的探针进行同步成像,发现 Fe^{2+} 在高尔基体和溶酶体之间的细胞分布平衡通常以高尔基体为主,并且这种平衡会因为逆转录酶蛋白VPS35的功能障碍而受到干扰。

除了上述课题组外,其他课题组也利用N-氧化物还原反应,开发了一系列对 Fe^{2+} 高选择性的小分子荧光探针。例如,Yang等^[37]在2019年报道了一种基于分子内电荷转移机制开发的近红外双光子小分子荧光探针**9**(图1B)。探针**9**的结构中含有二氰基甲基-4*H*-吡喃荧光团(DCM),能够检测MCF-7细胞中的 Fe^{2+} 。探针**9**对 Fe^{2+} 有高选择性,能够15 min内对 Fe^{2+} 快速响应。使用680 nm的双光子显微成像,探针**9**成功用于实时监测活细胞中的 Fe^{2+} 。

Feng课题组分别在2020年^[38]和2022年^[39]基于N-氧化物还原反应报道了两个含有双氰胺异佛尔酮(DCI)染料近红外小分子荧光探针**10**和**11**(图1B)。探针**10**易于合成,是在DCI-NMe₂染料的基础上将二甲氨基转化为N-氧化物得到的,可以靶向检测细胞脂滴中的 Fe^{2+} 。在 Fe^{2+} 存在下,探针**10**可表现出明显的近红

外荧光增加(700 nm处增强约120倍),对 Fe^{2+} 具有高选择性、高灵敏度(检测限51 nm)及快速响应(5 min)的特点,能够对细胞和小鼠体内的 Fe^{2+} 进行实时成像。探针**11**是将香豆素荧光团和被N-氧化物保护的DCI染料利用哌嗪单元到一个分子中,通过FRET效应用于 Fe^{2+} 检测的近红外比率型小分子荧光探针。与 Fe^{2+} 作用后,FRET作用开启,465 nm处的香豆素的荧光信号减弱,675 nm处DCI的荧光信号逐渐增强,在0~15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内荧光信号的比率与 Fe^{2+} 浓度有较好的线性关系。探针**11**可对细胞内源性和外源性的 Fe^{2+} 进行成像,并且可用于监测缺铁性贫血和药物引起的肝损伤中 Fe^{2+} 浓度的变化。

Yang等^[40]报道了一个基于N-氧化物还原开发的用于检测 Fe^{2+} 的近红外聚集诱导发光(AIE)探针**12**(图1B)。探针**12**对 Fe^{2+} 具有很好的选择性,能够对HepG2细胞中的内源性和外源性的 Fe^{2+} 进行成像。AIE探针相对于传统的聚集诱导淬灭(ACQ)探针具有长期原位生物成像的优势^[41]。探针**12**作为AIE探针,其与用抗坏血酸钠预处理的HepG2细胞孵育后,即使在12 h仍保持了原始值的52.1%,说明探针**12**在长期追踪 Fe^{2+} 水平方面具有明显的优势。

Lee等^[42]开发了一个将冷冻浓缩效应与N-氧化物化学相结合的小分子荧光探针**13**(图1B)。研究表明,与25 °C相比,冷冻后可以显著提高探针**13**的检测灵敏度。共聚焦激光显微成像表明, Fe^{2+} 参与的N-氧化物还原反应主要发生在类液层。所合成的探针**13**是用于检测自然界极地和寒冷环境中的 Fe^{2+} 的一种有潜力的工具,有助于更好地理解 Fe^{2+} 对环境的影响。

Dong等^[43]在2020年报道的小分子荧光探针**14**同样是基于N-氧化物还原策略开发的(图1B)。探针的结构中引入了一个甲酸酯键,在活细胞中被酯酶水解后,对 Fe^{2+} 具有高度灵敏性和选择性,而死细胞中由于没有有效的酯酶,与探针**14**共孵育后,即使添加了 Fe^{2+} ,也无法观察到明显的荧光变化。因此,**14**是一个活细胞特异性的探针。成像结果表明,探针**14**不仅可以检测活细胞内源性的 Fe^{2+} ,还可以检测补充还原物质维生素C诱导的外源性 Fe^{2+} 的增加。使用探针**14**对小鼠急性炎症模型中酯酶的活性进行了评价,表明探针**14**可用于活体动物酯酶的评估。

此外,Gao等^[44]利用N-氧化物还原构建了一个可以选择性检测 Fe^{2+} 的小分子荧光探针**15**(图1B)。该探针结构简单,可以通过丹酰氯一步反应合成。在Tris-DMSO(4:1, pH = 7.4, v/v)溶液中,探针**15**以高选择性和优异灵敏度检测 Fe^{2+} ,具有较宽的pH范围(4~7)和较低检测限(18 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$),能够在生理盐水和活细

胞中对 Fe^{2+} 进行检测。

2020年, Khatun等^[45]将N-氧化物引入到氨基香豆素衍生物中, 开发了小分子荧光探针**16**(图1B)。探针**16**对 Fe^{2+} 的检测不受到其他金属离子、生物还原剂、酶和氨基酸的干扰。能够检测各种化妆品和活细胞中 Fe^{2+} 的水平。与存在 Fe^{2+} 的化妆品反应后, 探针**16**在视觉上显示出从无色到橙色的转变, 并且可以通过460 nm处的荧光信号对化妆品中的 Fe^{2+} 进行定量检测。

Xu等^[46]在2021年基于N-氧化物还原策略报道了可同时检测 Fe^{2+} 和 H^+ 的小分子荧光探针**17**(图1B)。不同于大部分利用N-氧化物还原开发的“turn-on”型探针, 与 Fe^{2+} 作用后, 探针**17**利用光诱导的电子转移机制(PET)导致荧光淬灭, 再接着与 H^+ 作用后PET过程被阻止, 从而荧光再次开启, 因此探针**17**是一个“on-off-on”型探针。探针**17**能够选择性检测细胞溶酶体中外源性的 Fe^{2+} 和 H^+ 的水平, 并且由于其强烈的近红外荧光信号, 在小鼠模型中探针**17**可以无创性(无须去除小鼠皮毛)地观察补充的 Fe^{2+} 和 H^+ 。

1.1.3 氮氧自由基还原类 类似于N-氧化物可被 Fe^{2+} 还原生成叔胺, 氮氧自由基同样可以被 Fe^{2+} 还原生成羟胺结构, 消除原本的荧光淬灭。因此, 科研人员基于氮氧自由基也开发了针对 Fe^{2+} 的探针。2015年, Maiti等^[47]利用氮氧自由基还原策略, 将罗丹明荧光团与氮氧自由基结合到一个分子中, 开发了一个对 Fe^{2+} 高选择性的磁响应小分子荧光探针**18**(图1C)。在没有 Fe^{2+} 存在时, 探针**18**本身的顺磁性导致荧光很弱, 与 Fe^{2+} 作用后, 氮氧自由基被还原为抗磁性的羟胺, 从而荧光开启, 观察到2.5倍的荧光增强。探针**18**对 Fe^{3+} 、 Cu^+ 、 Zn^{2+} 等其他金属离子响应很低。共聚焦实验结果表明, 探针**18**能够检测活细胞中 Fe^{2+} 水平的动态变化。此外, 通过共定位实验, 探针**18**成功地检测了线粒体中的细胞 Fe^{2+} 池及其动态变化。

Zhang等^[48]在2020年报道了一个可以用来检测活细胞和斑马鱼中 Fe^{2+} 的小分子荧光探针**19**(图1C)。在 Fe^{2+} 的存在下, 探针结构中的氮氧自由基被还原为羟胺, 荧光强度在50 s内显著增加, 快速的响应时间有利于生物体系中 Fe^{2+} 的实时监测。探针**19**对 Fe^{2+} 的检测不受其他金属离子、还原剂及半胱氨酸的干扰。在 Fe^{2+} 浓度 $0\sim 5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内, 荧光强度与 Fe^{2+} 浓度有良好的线性关系, 检测限低至 $89\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.1.4 酰化羟胺还原类 Fe^{2+} 不仅可以将N-氧化物还原为叔胺, 也可以断裂酰化羟胺中的N-O键, 将其还原为胺。Xuan等^[49]2015年开发的用于检测 Fe^{2+} 的小分子荧光探针**20**便是利用该机制开发的(图1D)。将乙酰基引入到萘酰亚胺荧光团中, 乙酰基的吸电子作用淬

灭了荧光团本身的荧光, Fe^{2+} 作用后, N-O键断裂, 氨基的给电子作用恢复, 荧光增强。探针**20**可通过一步反应得到, 与 Fe^{2+} 反应后1 min内荧光增强27倍, 且对 Fe^{2+} 有较好的选择性, 灵敏度低至 $0.5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。使用探针**20**, 成功地监测了星形胶质细胞中的 Fe^{2+} 。在体外实验中, 虽然观察到 Cu^{2+} 和 Cu^+ 一定程度上也可点亮探针, 但由于神经元中 Cu^{2+} 和 Cu^+ 含量明显低于 Fe^{2+} ^[50], 因此并不会影响探针**20**对 Fe^{2+} 的检测。除此之外, 通过用 Zn^{2+} 与脑细胞预孵育, 与未用 Zn^{2+} 预孵育的细胞相比, 荧光信号明显增强, 说明 Zn^{2+} 可诱导 Fe^{2+} 水平增加。并且采用探针**20**, 该项研究还证实了 Fe^{2+} 在缺血性脑组织中含量较高。

1.1.5 氧化还原水解类 Qu等^[51]在2016年报道了一个利用 Fe^{2+} 参与的氧化还原水解级联反应开发的探针**21**(图1E)。探针的结构中含有重金属砷, 在氧气的存在下, 通过 Fe^{2+} 引发的氧化还原反应, 去除砷原子, 消除砷原子对萘酰亚胺荧光团的重原子作用, 导致荧光开启, 从而实现对 Fe^{2+} 的检测。探针**21**对 Fe^{2+} 表现出了良好的选择性, Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等生物富集金属离子及活性氧对荧光信号的影响很小。在 $0\sim 25\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Fe^{2+} 浓度范围内, 荧光强度与 Fe^{2+} 浓度有良好的线性关系, 检测限低至 $0.15\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。探针**21**可用于监测HL-7702细胞中补充的 Fe^{2+} 。

1.2 利用 Fe^{2+} 介导的环化反应开发的小分子荧光探针
2018年, Long等^[52]利用 Fe^{2+} 介导的环化反应得到了一个对 Fe^{2+} 选择性响应的探针**22**(图2A)。探针**22**通过C=N双键将香豆素荧光团与邻氨基苯酚的氨基连接起来, C=N键的异构化使探针本身的荧光可以忽略不计, 与 Fe^{2+} 作用后, 发生环化反应, 生成苯并噁唑环, 从而荧光开启。探针**22**能够对 Fe^{2+} 快速响应, 不受其他金属离子、半胱氨酸及谷胱甘肽的影响, 荧光强度在2 min内达到平台期。目前探针**22**已成功地用于检测活细胞中的 Fe^{2+} 。

1.3 利用 Fe^{2+} 与配体的螯合作用开发的小分子荧光探针

前面所描述的利用 Fe^{2+} 的还原能力, 环化策略开发的小分子荧光探针大部分是基于“turn-on”的荧光开启类探针(探针**1**、**2**、**11**、**17**除外)。在利用 Fe^{2+} 与配体的螯合作用开发的小分子荧光探针中, 大量传统的探针是基于 Fe^{2+} 的荧光淬灭作用开发的, 也就是“turn-off”型探针。这类探针在铁代谢相关的生理病理学研究中发挥了关键的作用, 但在金属选择性和体内成像方面仍存在一定的挑战^[53]。因此科研人员利用 Fe^{2+} 的螯合作用还开发了“turn-on”和比率型的小分子荧光探针, 在此主要对这两类探针进行综述(图2B, C)。

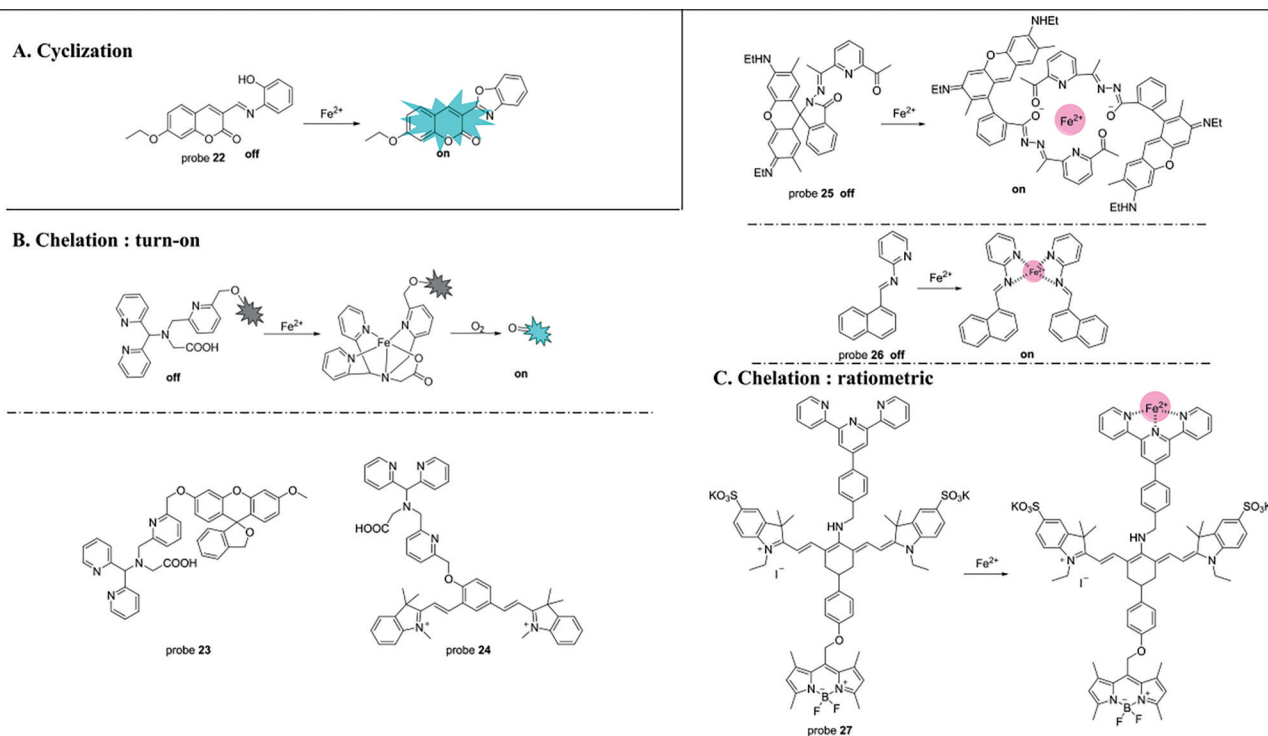


Figure 2 Cyclization and chelation-based Fe^{2+} small molecule fluorescent probes and their design strategies

1.3.1 turn-on型 Au-Yeung等^[54]在2013年报道了一个利用仿生配体与 Fe^{2+} 的螯合作用开发的小分子荧光探针**23**(图2B)。通过C-O键将仿生配体*N*-(双-2-吡啶基甲基)-*N*-(2-吡啶基甲基)甘氨酸与荧光素结合起来, Fe^{2+} 与配体螯合后,在 O_2 的作用下,C-O断裂,释放出荧光团,从而实现对 Fe^{2+} 的高选择性检测。虽然体外实验中显示探针**23**也可被 Co^{2+} 点亮,但钴胺素作为细胞中 Co^{2+} 存在的主要形式,对探针并无反应,说明生理条件下的 Co^{2+} 并不会干扰 Fe^{2+} 的检测。探针**23**可用于检测水溶液和活细胞中的 Fe^{2+} ,共定位实验表明,探针**23**主要存在于溶酶体中。作者指出,这是第一代检测 Fe^{2+} 的荧光化学工具,可以可视化补充或消耗铁后活细胞中可以交换的铁的储备变化。除此之外,Wu等^[55]在2019年基于类似的策略开发了小分子荧光探针**24**(图2B)。探针**24**是一个近红外小分子荧光探针,使用探针**24**首次观察到了药物诱导的小鼠肝损伤模型中 Fe^{2+} 水平的增加。

基于 Fe^{2+} 的螯合作用科研人员还开发了其他“turn-on”型小分子荧光探针。例如,Hou等^[56]在2013年报道的基于罗丹明的小分子荧光探针**25**便是利用 Fe^{2+} 与氮原子和氧原子的螯合作用开发的(图2B)。探针在 Fe^{2+} 存在下,按照 Fe^{2+} :探针=1:2的比例螯合,阻止螺环和开环结构之间的互变,从而导致荧光增强。在pH 7.4的PBS中,探针**25**对 Fe^{2+} 具有高选择性,可用于监测活细胞中的 Fe^{2+} 。

与探针**25**类似,Santhoshkumar等^[57]开发的探针**26**与 Fe^{2+} 的螯合比也为1:2(图2B)。由于C=N的异构化,探针本身的荧光很弱,与 Fe^{2+} 螯合后,C=N无法自由旋转,因此荧光增强。探针**26**可用于检测 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}=1/1$ 中的 Fe^{2+} ,目前已用于市售片剂、番茄汁、黑巧克力和自来水中 Fe^{2+} 的测定。

1.3.2 比率型 Li等^[58]在2011年报道了一个基于 Fe^{2+} 的螯合作用开发的比率型探针**27**(图2C)。探针的结构中含有可与 Fe^{2+} 螯合的4'-(氨基-甲基苯基)-2,2',6',2''-三联吡啶(Tpy)单元以及发射波长为635 nm的花青染料(Cy)和发射波长为507 nm的BODIPY荧光团。在 Fe^{2+} 的存在下,Tpy部分与 Fe^{2+} 发生螯合,通过PET作用将花青染料的荧光淬灭,但并不淬灭BODIPY的荧光,且随着 Fe^{2+} 浓度的逐渐增加,荧光淬灭作用逐渐增强,因此可以通过不同波长处的荧光信号比来对 Fe^{2+} 进行检测。探针**27**具有良好的细胞膜穿透能力和低的细胞毒性,可对细胞中的 Fe^{2+} 进行成像。

2 用于亚铁血红素(heme)的小分子荧光探针

监测生物体内的游离heme的变化对与heme相关的生理病理过程来说有着重要的意义。生理过程中,heme与氯高铁血红素(hemin)之间存在相互转化,也与蛋白质之间存在相互作用^[59],这就使得对heme的特异性、高选择性的检测存在一定的困难。传统的检测方法一般检测的为总血红素,并不是单独的heme,即使近年来开发的检测血红素的基因编码荧光探针,它

们对 heme 的选择性也受到 hemin 和锌卟啉 (ZnPP) 的干扰, 并且较复杂的操作限制了其在野生型细胞中的使用^[60-63]。而单独用于高选择性检测 heme 的小分子荧光探针最近几年才被开发出来, 目前主要有两种类型, 分别是过氧桥键还原类和 N-氧化物还原类, 均为“turn-on”型小分子荧光探针。

2.1 过氧桥键还原类

2020年, Xu等^[64]受到青蒿素等含有过氧桥键的化合物生物活性机制的启发, 设计了第一个可以检测 heme 的小分子荧光探针 **28** (图3)。该探针通过氨基甲酸酯键将4-氨基-1,8-萘酰亚胺荧光团与含有过氧桥键的部分连接起来。在 heme 存在下, 探针 **28** 通过发生 β -消除反应释放出荧光团, 在 540 nm 处的荧光强度增加了 13 倍, 探针的荧光强度与低浓度的 heme ($20 \sim 750 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 有较好的线性关系。所开发的探针 **28** 对 heme 有很好的选择性, 对 heme 的反应性高于常见的干扰, 包括 hemin、ZnPP、蛋白质相互作用的血红素和 Fe^{2+} 。除此之外, 探针 **28** 可用于监测活细胞中的内源性 heme 水平, 并在溶血模型小鼠中发现 heme 的水平与溶血程度呈正相关。

2022年, 本课题组^[65]受到鹰爪甲素的过氧桥键可以被 heme 断裂为单独两部分的启发, 通过合理设计, 开发了3个含有 BODIPY 的小分子荧光探针 **29**~**31** (图3), 其中探针 **31** 在 heme 作用后有高达 118 倍的荧光增强, 并且对疟原虫进行成像时并不会受到 Fe^{2+} 和血红蛋白的干扰。使用探针 **31** 对疟原虫进行特异性成像, 发现所合成的探针均可以时间依赖性地同步成像疟原虫, 探针 **31** 有最好的敏感性。通过探针 **31** 分别对耐药和不耐药的疟原虫进行成像, 发现相对于不耐药的疟原虫, 耐药的疟原虫发育更为迟缓, 其环期 (低 heme 水平) 更长。除此之外, 使用探针 **31** 通过高通量筛选, 发现了一个可以和双氢青蒿素 (DHA) 发挥协同作用的化合物扁塑藤素 (pristimerin), 其作为疟原虫的环期抑制剂, 在添加 pristimerin 后, 可显著增加 DHA

对耐药疟原虫的消融作用。

2.2 N-氧化物还原类

Nagasawa 课题组^[25]在他们开发的用于 Fe^{2+} 的小分子荧光探针的基础上, 受到细胞色素 P450 仿生反应的启发^[66], 于 2022 年报道了第一个基于 N-氧化物还原的用来检测 heme 的小分子荧光探针 **32** (图4)。通过将吸电子的 4,4-二氟吡啶结构引入环状胺的氮氧化合物中促进了 heme 以 Fe^{2+} 形式诱导的脱氧反应, 从而得到了对 heme 有高选择性和敏感性的探针 **32**, 检测限可低至 $100 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。采用细胞更容易摄取的 **Ac-32** 进行实验, 发现在补充了 heme 合成诱导剂和铁源的细胞中, 所合成的探针也能够有效区分 heme 和 Fe^{2+} 。荧光成像结果表明, 在外源性 NO 刺激后, 探针 **32** 可直接检测外源上调的 heme 和内源性的 heme。另外, 探针 **32** 验证了 FLVCR1a 和 ABCG2 作为 heme 输出体分别被敲低和抑制后细胞内 heme 的累积。除此之外, 使用探针 **32** 进行监测, 证实了 G-四链体作为细胞内 heme 储存库的作用。并且, 通过 **Ac-32** 和他们已开发的探针 **5c** 进行双目标成像实验, 发现在铁死亡时, Fe^{2+} 和 heme 均升高, 表明 heme 参与了细胞铁死亡的过程。

3 总结与展望

不难看出, 近 10 年来, 不断有用于 Fe^{2+} 的小分子荧光探针被开发, 用于检测 heme 的小分子荧光探针由于 hemin、ZnPP 等相关物质的干扰以及 heme 本身的荧光淬灭作用^[65]目前开发得还较少, 考虑到 heme 在生理环境中的重要作用, 因此这类型的探针也受到了广泛的关注。目前已报道的荧光探针大部分在 Fe^{2+} 和 heme 相关的生理病理学研究中都表现出了巨大的潜力, 对这类探针的开发有一定启示。一是基于作用机制指导探针设计。从利用 Fe^{2+} 以及 heme 参与的反应开发的探针中不难看出, 这种从目标分子可促进的反应出发, 基于作用机制来指导探针的设计可运用到一系列同类探针的开发中。二是利用药效团开发小分子荧光探针。在检测 heme 的小分子荧光探针中, 过氧桥键作为

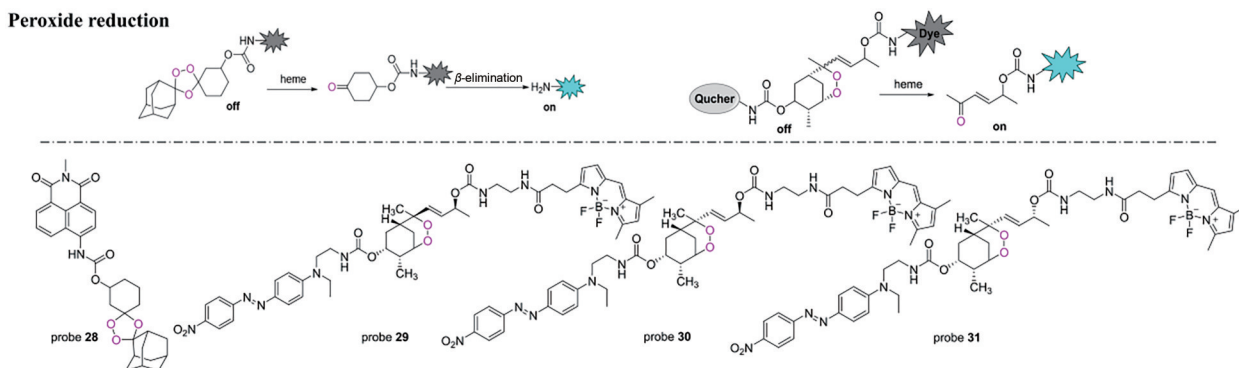


Figure 3 Peroxide reduction-based heme small molecule fluorescent probes and their design strategies

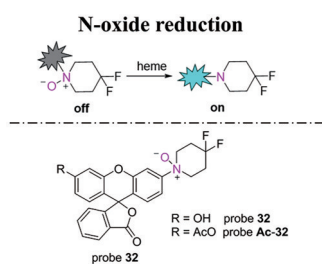


Figure 4 N-oxide reduction-based heme small molecule fluorescent probes and their design strategies

活性天然产物青蒿素类抗疟药物的药效团, 在探针 **28~31** 的结构中起到关键作用。随着青蒿素类药物抗癌活性^[67]的不断指出, 利用药效团开发小分子荧光探针的策略不仅能够对目标分子 heme 进行检测, 也有利于进一步理解活性天然产物是如何发挥作用的。

与此同时, 用于 Fe^{2+} 及 heme 的小分子荧光探针的发展仍然面临着许多挑战。在检测 Fe^{2+} 的小分子荧光探针设计中, 基于 Fe^{2+} 参与的反应来开发探针是最常用的策略, 其中 N-氧化物还原应用较多, 其他策略也表现出了不错的潜力。在这其中, 虽然大部分探针都可对细胞中的 Fe^{2+} 进行检测, 并且有部分探针应用到了小鼠和石斑鱼中, 不过除个别探针外, 对生物体内 Fe^{2+} 的实时快速动态检测还是有一定的困难。在用于 heme 的小分子荧光探针中, 目前还未有在亚细胞水平上靶向不同细胞器中 heme 的小分子荧光探针, 并且考虑到近红外 (NIR) 荧光相对于短波长荧光的优势^[68], 为了进一步理解 heme 的生理病理学功能, 这两类探针的开发也是必需的。另外, 目前的研究中有部分指出, 探针的荧光强度与一定浓度范围内 Fe^{2+} 或 heme 呈线性关系, 但在实际工作中利用线性关系对生物体系不同环境中的 Fe^{2+} 或 heme 进行定量还是有一定的困难。市售的相关定量检测试剂盒大多是利用吸光度进行检测, 最低检测限往往在 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 级, 而已报道小分子荧光探针的最低检测限可低至 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甚至 $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 级 (探针 **32**), 因此, 利用小分子荧光探针采用合适的方法对不同生物体系中的 Fe^{2+} 或 heme 进行定量也是一项有待开发的研究。再者, 无论是用于检测 Fe^{2+} 还是 heme 的小分子荧光探针中比率型探针的开发都较少, 相比于“turn-on”型探针, 比率型探针受到其他因素的干扰更小, 往往具有更低的背景荧光信号, 可进一步提高检测的灵敏度和选择性。最后, 在 Fe^{2+} 和 heme 的小分子荧光探针开发中均用到了相似的反应基团, 例如过氧桥键和 N-氧化物, 说明这类反应基团在特定的条件下可被 Fe^{2+} 或 heme 激活, 因此在后续利用这类反应基团开发探针时如何通过巧妙设计避免 Fe^{2+} 和 heme

相互干扰或者如何利用这类反应基团开发可同时检测不与蛋白结合的总 Fe^{2+} 水平也是一个关键问题。相信随着研究的不断深入, 将来定会有更优性能的用于检测 Fe^{2+} 和 heme 的荧光探针不断出现, 并在生物医药等相关领域成功应用。

作者贡献: 张崇敬对论文进行整体的构思和修改; 陈晨负责全文的撰写和修改; 陈义鑫对论文进行修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Kaplan CD, Kaplan J. Iron acquisition and transcriptional regulation [J]. *Chem Rev*, 2009, 109: 4536-4552.
- [2] Enami S, Sakamoto Y, Colussi AJ. Fenton chemistry at aqueous interfaces [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111: 623-628.
- [3] Pantopoulos K, Porwal SK, Tartakoff A, et al. Mechanisms of mammalian iron homeostasis [J]. *Biochemistry*, 2012, 51: 5705-5724.
- [4] Xu W, Barrientos T, Andrews NC. Iron and copper in mitochondrial diseases [J]. *Cell Metab*, 2013, 17: 319-328.
- [5] Andrews NC. Iron homeostasis: insights from genetics and animal models [J]. *Nat Rev Genet*, 2000, 1: 208-217.
- [6] Lieu PT, Heiskala M, Peterson PA, et al. The roles of iron in health and disease [J]. *Mol Asp Med*, 2001, 22: 1-87.
- [7] Wilson MT, Reeder BJ. Oxygen-binding haem proteins [J]. *Exp Physiol*, 2008, 93: 128-132.
- [8] Ye H, Rouault TA. Human iron-sulfur cluster assembly, cellular iron homeostasis, and disease [J]. *Biochemistry*, 2010, 49: 4945-4956.
- [9] Liu C, Zhang CW, Lo SQ, et al. S-Nitrosylation of divalent metal transporter 1 enhances iron uptake to mediate loss of dopaminergic neurons and motoric deficit [J]. *J Neurosci*, 2018, 38: 8364-8377.
- [10] Reczek CR, Chandel NS. ROS-dependent signal transduction [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2015, 33: 8-13.
- [11] Zhao Z, Bao XQ, Zhang D. Mechanisms of ferroptosis and its involvement in Parkinson's disease [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2019, 54: 399-406.
- [12] Toyokuni S. Role of iron in carcinogenesis: cancer as a ferrotoxic disease [J]. *Cancer Sci*, 2010, 100: 9-16.
- [13] Toyokuni S. Iron as a target of chemoprevention for longevity in humans [J]. *Free Radic Res*, 2011, 45: 906-917.
- [14] Lee TW, Kolber MR, Fedorak RN, et al. Iron replacement therapy in inflammatory bowel disease patients with iron deficiency anemia: a systematic review and meta-analysis [J]. *J Crohns Colitis*, 2012, 6: 267-275.
- [15] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149: 1060-1072.

- [16] Le J, Ning K, Li T, et al. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression [J]. *Nature*, 2015, 520: 57-62.
- [17] Liu Y, Song Z, Liu Y, et al. Identification of ferroptosis as a novel mechanism for antitumor activity of natural product derivative a2 in gastric cancer [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11: 1513-1525.
- [18] Doll S, Freitas FP, Shah R, et al. FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor [J]. *Nature*, 2019, 575: 693-698.
- [19] Winkler M, Geier M, Hanlon SP, et al. Human enzymes for organic synthesis [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57: 13406-13423.
- [20] Shimizu T, Lengalova A, Martinek V, et al. Heme: emergent roles of heme in signal transduction, functional regulation and as catalytic centres [J]. *Chem Soc Rev*, 2019, 48: 5624-5657.
- [21] Poulos TL. Heme enzyme structure and function [J]. *Chem Rev*, 2014, 114: 3919-3962.
- [22] Ishikawa H, Nakagaki M, Bamba A, et al. Unusual heme binding in the bacterial iron response regulator protein: spectral characterization of heme binding to the heme regulatory motif [J]. *Biochemistry*, 2011, 50: 1016-1022.
- [23] Keel SB, Doty RT, Yang Z, et al. A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis [J]. *Science*, 2008, 319: 825-828.
- [24] Zhang CJ, Wang JG, Zhang JB, et al. Mechanism-guided design and synthesis of a mitochondria-targeting artemisinin analogue with enhanced anticancer activity [J]. *Angew Chem Int Ed*, 2016, 55: 13770-13774.
- [25] Kawai K, Hirayama T, Imai H, et al. Molecular imaging of labile heme in living cells using a small molecule fluorescent probe [J]. *J Am Chem Soc*, 2022, 144: 3793-3803.
- [26] Schaffer M, Schaffer PM, Panzer M, et al. Porphyrins associated with malignant tumors: results of treatment with ionizing irradiation [J]. *Onkologie*, 2001, 24: 170-172.
- [27] Chin J, Kim HJ. Near-infrared fluorescent probes for peptidases [J]. *Coord Chem Rev*, 2017, 354: 169-181.
- [28] Liu X, Li N, Li M, et al. Recent progress in fluorescent probes for detection of carbonyl species: formaldehyde, carbon monoxide and phosgene [J]. *Coord Chem Rev*, 2020, 404: 213109.
- [29] Aron AT, Loehr MO, Bogena J, et al. An endoperoxide reactivity-based FRET probe for ratiometric fluorescence imaging of labile iron pools in living cells [J]. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 14338-14346.
- [30] Spangler B, Morgan CW, Fontaine SD, et al. A reactivity-based probe of the intracellular labile ferrous iron pool [J]. *Nat Chem Biol*, 2016, 12: 680-685.
- [31] Hirayama T, Okuda K, Nagasawa H. A highly selective turn-on fluorescent probe for iron(II) to visualize labile iron in living cells [J]. *Chem Sci*, 2013, 4: 1250-1256.
- [32] Niwa M, Hirayama T, Okuda K, et al. A new class of high-contrast Fe(II) selective fluorescent probes based on spirocyclized scaffolds for visualization of intracellular labile iron delivered by transferrin [J]. *Org Biomol Chem*, 2014, 12: 6590-6597.
- [33] Hirayama T, Tsuboi H, Niwa M, et al. A universal fluorogenic switch for Fe(II) ion based on N-oxide chemistry permits the visualization of intracellular redox equilibrium shift towards labile iron in hypoxic tumor cells [J]. *Chem Sci*, 2017, 8: 4858-4866.
- [34] Niwa M, Hirayama T, Oomoto I, et al. Fe(II) ion release during endocytotic uptake of iron visualized by a membrane-anchoring Fe(II) fluorescent probe [J]. *ACS Chem Biol*, 2018, 1: 1853-1861.
- [35] Hirayama T, Kadota S, Niwa M, et al. A mitochondria-targeted fluorescent probe for selective detection of mitochondrial labile Fe(II) [J]. *Metallomics*, 2018, 10: 794-801.
- [36] Hirayama T, Inden M, Tsuboi H, et al. A Golgi-targeting fluorescent probe for labile Fe(II) to reveal an abnormal cellular iron distribution induced by dysfunction of VPS35 [J]. *Chem Sci*, 2019, 10: 1514-1521.
- [37] Yang X, Wang Y, Liu R, et al. A novel ICT-based two photon and NIR fluorescent probe for labile Fe²⁺ detection and cell imaging in living cells [J]. *Sens Actuator A Phys*, 2019, 288: 217-224.
- [38] Zheng J, Feng S, Gong SY, et al. *In vivo* imaging of Fe²⁺ using an easily obtained probe with a large Stokes shift and bright strong lipid droplet-targetable near-infrared fluorescence [J]. *Sens Actuators B Chem*, 2020, 309: 127796.
- [39] Feng SM, Zheng JR, Zhang JZ, et al. Fe²⁺ imaging in ferroptosis and drug-induced liver injury with a ratiometric near-infrared fluorescent probe [J]. *Sens Actuators B Chem*, 2022, 371: 132512.
- [40] Yang L, Chen QX, Gan SL, et al. An activatable AIEgen probe for in-situ monitoring and long-term tracking of ferrous ions in living cells [J]. *Dyes Pigm*, 2021, 190: 109271.
- [41] Zhao CX, Liu T, Xu MY, et al. A fundamental study on the fluorescence-quenching effect of nitro groups in tetraphenylethene AIE dyes with electron-withdrawing groups [J]. *Chin Chem Lett*, 2021, 32: 1925-1928.
- [42] Lee YH, Verwilt P, Kim HS, et al. Enhanced sensitivity of fluorescence-based Fe(II) detection by freezing [J]. *Chem Commun*, 2019, 55: 12136-12139.
- [43] Dong B, Song W, Lu Y, et al. Live cell-specific fluorescent probe for the detection of labile Fe(II) and the evaluation of esterase activity in live animals [J]. *Sens Actuators B Chem*, 2020, 305: 127470.
- [44] Gao GQ, Wang X, Wang ZM, et al. A simple and effective dansyl acid based "turn-on" fluorescent probe for detecting labile ferrous iron in physiological saline and live cells [J]. *Talanta*, 2020, 215: 120908.
- [45] Khatun S, Biswas S, Binoy A, et al. Highly chemoselective turn-on fluorescent probe for ferrous (Fe²⁺) ion detection in cosmetics and live cells [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2020, 209: 111943.
- [46] Xu WJ, Wu P, Li XX, et al. Two birds with one stone: a highly

- sensitive near-infrared BODIPY-based fluorescent probe for the simultaneous detection of Fe^{2+} and H^+ *in vivo* [J]. *Talanta*, 2021, 233: 122601.
- [47] Maiti S, Aydin Z, Zhang Y, et al. Reaction-based turn-on fluorescent probes with magnetic responses for Fe^{2+} detection in live cells [J]. *Dalton Trans*, 2015, 44: 8942-8949.
- [48] Zhang X, Chen Y, Cai X, et al. A highly sensitive rapid-response fluorescent probe for specifically tracking endogenous labile Fe^{2+} in living cells and zebrafish [J]. *Dyes Pigm*, 2019, 174: 108065.
- [49] Xuan W, Rong P, Wei Y, et al. Reaction-based "off-on" fluorescent probe enabling detection of endogenous labile Fe^{2+} and imaging of Zn^{2+} -induced Fe^{2+} flux in living cells and elevated Fe^{2+} in ischemic stroke [J]. *Bioconjug Chem*, 2015, 27: 302-308.
- [50] Xuan WM, Pan R, Cao YT, et al. A fluorescent probe capable of detecting H_2S at submicromolar concentrations in cells [J]. *Chem Commun*, 2012, 48: 10669-10671.
- [51] Qu Z, Li P, Zhang X, et al. A turn-on fluorescent chemodosimeter based on detelluration for detecting ferrous iron (Fe^{2+}) in living cells [J]. *J Mater Chem B*, 2016, 4: 887-892.
- [52] Long L, Wang N, Han Y, et al. A coumarin-based fluorescent probe for monitoring labile ferrous iron in living systems [J]. *Analyst*, 2018, 143: 2555-2562.
- [53] Hirayama T. Fluorescent probes for the detection of catalytic $\text{Fe}(\text{II})$ ion [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 133: 38-45.
- [54] Au-Yeung HY, Chan J, Chantarojsiri T, et al. Molecular imaging of labile iron(II) pools in living cells with a turn-on fluorescent probe [J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 15165-15173.
- [55] Wu LJ, Ding Q, Wang X, et al. Visualization of dynamic changes in labile iron(II) pools in endoplasmic reticulum stress-mediated drug-induced liver injury [J]. *Anal Chem*, 2019, 9: 1245-1251.
- [56] Hou GG, Wang CH, Sun JF, et al. Rhodamine-based "turn-on" fluorescent probe with high selectivity for Fe^{2+} imaging in living cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 439: 459-463.
- [57] Santhoshkumar S, Velmurugan K, Prabhu J, et al. A naphthalene derived Schiff base as a selective fluorescent probe for Fe^{2+} [J]. *Inorg Chim Acta*, 2016, 439: 1-7.
- [58] Li P, Fang LB, Zhou H, et al. A new ratiometric fluorescent probe for detection of Fe^{2+} with high sensitivity and its intracellular imaging applications [J]. *Chemistry*, 2011, 17: 10520-10523.
- [59] Jonathan C, Zhang L. Experimental methods for studying cellular heme signaling [J]. *Cells*, 2018, 7: 47.
- [60] Abshire JR, Rowlands CJ, Ganesan SM, et al. Quantification of labile heme in live malaria parasites using a genetically encoded biosensor [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114: 2068-2076.
- [61] Hanna DA, Harvey RM, Martinez-Guzman O, et al. Heme dynamics and trafficking factors revealed by genetically encoded fluorescent heme sensors [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113: 7539-7544.
- [62] Song Y, Yang M, Wegner SV, et al. A genetically encoded FRET sensor for intracellular heme [J]. *ACS Chem Biol*, 2015, 10: 1610-1615.
- [63] Gouveia Z, Carlos AR, Yuan X, et al. Characterization of plasma labile heme in hemolytic conditions [J]. *FEBS J*, 2017, 284: 3278-3301.
- [64] Xu S, Liu HW, Chen L, et al. Learning from artemisinin: bioinspired design of a reaction-based fluorescent probe for the selective sensing of labile heme in complex biosystems [J]. *J Am Chem Soc*, 2020, 142: 2129-2133.
- [65] Liu S, Wei CY, Liu T, et al. A heme-activatable probe and its application in the high-throughput screening of *Plasmodium falciparum* ring-stage inhibitors [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7: 160.
- [66] Groves JT, Watanabe Y. Reactive iron porphyrin derivatives related to the catalytic cycles of cytochrome P-450 and peroxidase. Studies of the mechanism of oxygen activation [J]. *J Am Chem Soc*, 1988, 110: 8443-8452.
- [67] Chen CP, Chen K, Feng Z, et al. Synergistic antitumor activity of artesunate and HDAC inhibitors through elevating heme synthesis *via* synergistic upregulation of ALAS1 expression [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9: 937-951.
- [68] Guo ZQ, Park S, Yoon J, et al. Recent progress in the development of near-infrared fluorescent probes for bioimaging applications [J]. *Chem Soc Rev*, 2014, 43: 16-29.