

## 肿瘤微环境敏感型化学荧光探针的研究进展

李柯良<sup>1#</sup>, 刘杨<sup>2#</sup>, 楼春杨<sup>1</sup>, 黄天乐<sup>1</sup>, 洪战英<sup>1</sup>, 武善超<sup>1\*</sup>, 盛春泉<sup>1\*</sup>

(1. 中国人民解放军海军军医大学药学院, 教育部医药基础研究创新中心, 上海 200433; 2. 中国人民解放军海军第九七一医院药剂科, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 恶性肿瘤严重威胁人类生命健康, 针对肿瘤发展快速检测、精确定位与有效治疗的策略有助于肿瘤的诊治与治疗。肿瘤微环境具有特异性, 基于肿瘤微环境开发敏感型化学荧光探针对于肿瘤诊疗具有重要意义, 目前已经开发出了多种诊疗一体化化学荧光探针。本文根据生物学特征和微环境的变化同时结合光谱或响应机制对肿瘤微环境敏感型化学荧光探针进行分类, 较为系统地综述了近年来基于缺氧、低极性、高黏度、异常 pH、高活性氧等肿瘤微环境发展而来的敏感型化学荧光探针的研究进展, 以期为该探针的研发和应用提供借鉴和参考。

**关键词:** 肿瘤; 肿瘤微环境; 诊疗一体化; 化学荧光探针

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)08-2180-13

## Recent advances in chemical fluorescent probes sensitive to tumor microenvironments

LI Ke-liang<sup>1#</sup>, LIU Yang<sup>2#</sup>, LOU Chun-yang<sup>1</sup>, HUANG Tian-le<sup>1</sup>, HONG Zhan-ying<sup>1</sup>,  
WU Shan-chao<sup>1\*</sup>, SHENG Chun-quan<sup>1\*</sup>

(1. The Center for Basic Research and Innovation of Medicine and Pharmacy (MOE), School of Pharmacy, Second Military Medical University (Naval Medical University), Shanghai 200433, China; 2. Department of Pharmacy, No. 971 Hospital of the People's Liberation Army Navy, Qingdao 266071, China)

**Abstract:** Cancer seriously threatens human life and health, it is urgent for the development of rapid detection, precise localization and effective treatment of tumors. Chemical fluorescent probes that are sensitive to tumor-specific microenvironments have important significance in tumor theranostics and a variety of such probes have been developed. In this review, we classified chemical fluorescent probes that are sensitive to tumor microenvironments according to biological characteristics and microenvironmental changes while combining spectroscopy or response mechanisms, and systematically introduced the research progress of chemical fluorescent probes with sensitivity to hypoxia, low polarity, high viscosity, abnormal pH values and abundant reactive oxygen species in tumor microenvironments, in order to provide references for the development and applications of these probes.

**Key words:** tumor; tumor microenvironment; theranostics; chemical fluorescent probe

恶性肿瘤严重威胁人类生命健康, 全球每年有超

过 900 万人死于不同类型的恶性肿瘤, 更为严重的是, 在部分国家、地区肿瘤死亡率已超过心血管疾病, 位居全球人类死亡病因首位<sup>[1]</sup>。因此, 除了发展抗肿瘤药物外, 临床上还亟待发展快速检测、精确定位兼具有效治疗肿瘤的手段。

化学荧光探针具有灵敏度高、响应快速、结构灵活多样等优势<sup>[2,3]</sup>, 在肿瘤诊疗一体化领域具有重要研究意义。其中, 肿瘤微环境敏感型化学荧光探针在肿瘤

收稿日期: 2023-05-08; 修回日期: 2023-07-12.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (22077138, 22107115, 81725020);  
上海市青年科技启明星计划 (22QA1411300); 山东省医药卫生科技发展计划项目 (202013050490).

<sup>#</sup>共同第一作者.

\*通讯作者 Tel: 86-21-81871242, E-mail: wushanchao07\_2@126.com;

Tel: 86-21-81871201, E-mail: shengcq@smmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0590

的局部特殊环境中表现出“开-关”样效应, 信噪比高, 与传统的化学荧光探针相比, 能够更加清晰地传递生物信息<sup>[4]</sup>。目前基于肿瘤微环境已经开发了多种诊疗一体化化学荧光探针, 并在肿瘤诊疗中发挥着重要作用。本文将通过介绍对缺氧、低极性、高黏度、异常 pH、高活性氧肿瘤微环境敏感的代表性化学荧光探针, 综述近年来肿瘤微环境敏感型化学荧光探针的研究进展。

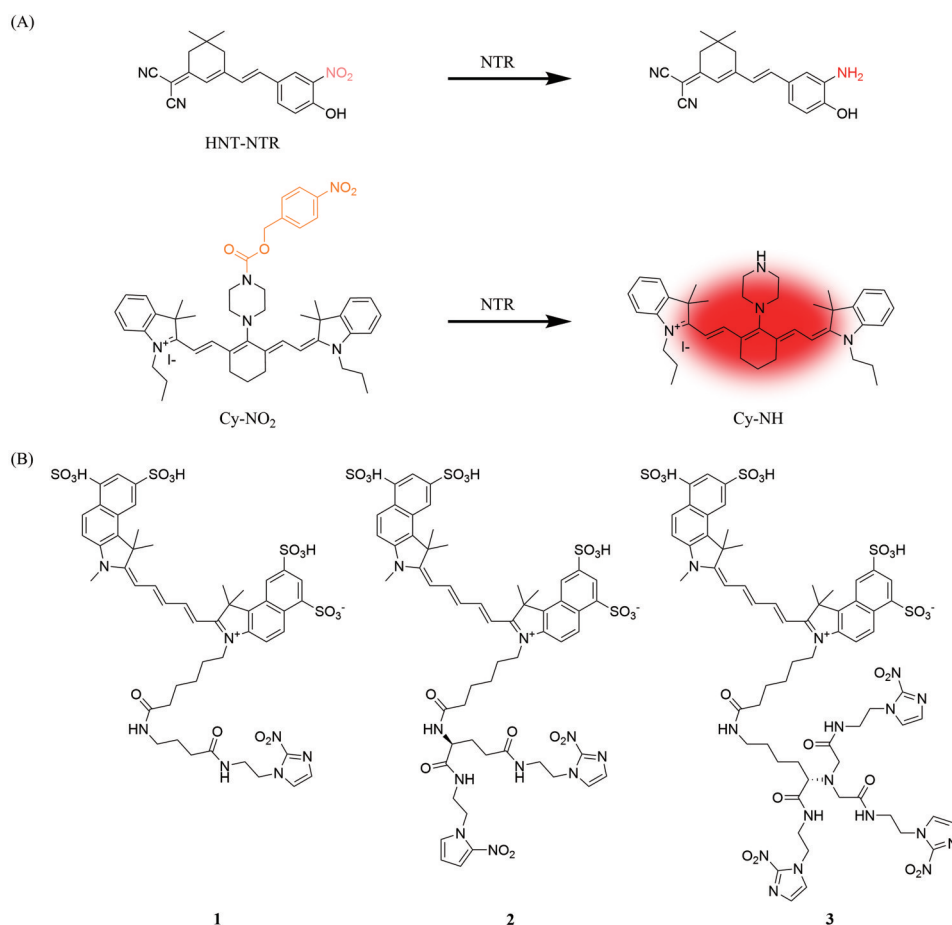
### 1 肿瘤缺氧微环境敏感型化学荧光探针

肿瘤细胞在快速增殖形成实体瘤时, 可用血管仍未形成, 而实体瘤的组织间质压力大, 氧气无法有效弥散至此, 实体瘤就处于缺氧环境中, 缺氧在肿瘤的增殖和代谢、基因的不稳定性、免疫应答、血管再生、患者预后、治疗抗性等方面具有重要影响<sup>[5]</sup>。在肿瘤的缺氧微环境中, 硝基还原酶 (nitroreductase, NTR) 过度表达, 可将硝基芳香化合物催化还原为芳香胺, 是检测肿瘤缺氧状态的常用靶标, 当烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NADH) 或烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide

phosphate, NADP) 存在时, 可将硝基还原为羟胺或氨基 (图 1A)<sup>[6]</sup>。基于此, 设计相应探针用以检测 NTR, 可反映肿瘤侵袭性。

#### 1.1 近红外第一窗口 (650~900 nm) NTR 荧光探针

为评价肿瘤的缺氧程度, 同时能够对肿瘤成像, 深入研究肿瘤的发生发展机制, Chen 等<sup>[7]</sup>发展了一种可特异性快速检测 NTR 的新型近红外荧光探针 HNT-NTR (图 1A), 该探针在各浓度下对口底癌细胞 HSC2 和人舌鳞癌细胞 Cal-27 的毒性与 DMSO 相当, 组织病理学分析显示, 使用 HNT-NTR 给药 ( $1.34 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 24 和 48 h 后, 小鼠的心脏、肝脏、肺、肾、脑等主要器官形态与空白组无明显差异, 说明 HNT-NTR 具有良好的生物相容性, 体内应用安全。经 HNT-NTR 染色, HSC2 和 Cal-27 细胞在缺氧条件下的荧光强度明显高于常氧条件, 随后, HSC2、Cal27 和 HUVEC 细胞 (脐静脉内皮细胞) 经 3D 培养, 用 HNT-NTR ( $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 处理 2 h 后, HSC2 细胞球体的荧光强度大于 Cal27, HUVEC 的荧光强度最弱, 说明 HNT-NTR 能够评价肿瘤的缺氧程度, 此外, 该探针还能够对裸鼠异种移植瘤进行成



**Figure 1** Mechanisms for detecting nitroreductase (NTR) of HNT-NTR and Cy-NO<sub>2</sub> (A) and chemical structures of fluorescent multivalent probes 1-3 (B)

像, 皮下注射 2~4 h 后荧光强度达到最大, 综上, HNT-NTR 为研究肿瘤的发生发展机制提供了有力工具。2018 年, Zheng 等<sup>[8]</sup>基于结构修饰开发了一种新型近红外荧光“开-关”探针 Cy-NO<sub>2</sub>, 当花青素结构被对硝基苄基氨基甲酸酯基团修饰后, 对 NTR 表现出高灵敏度和优秀的选择性, 并通过动力学光学研究、质谱分析和对接计算阐明了 NTR 激活还原 Cy-NO<sub>2</sub> 的机制 (图 1A), 该探针不仅能够有效检测 NTR, 而且还靶向肿瘤细胞 (非小细胞肺癌 A549、肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 PC-12) 的线粒体。此外, Kwon 等<sup>[9]</sup>以磺基花青素为近红外荧光团, 在荧光团上连接一个、两个或三个 2-硝基咪唑分别得到了新型多价近红外荧光探针 1~3 (图 1B)。该类探针显示出适合体内外成像的光学特性, 并在血清中性质稳定, 可用于监测肿瘤内部的缺氧微环境。缺氧肿瘤细胞 (神经母细胞瘤细胞 SK-N-BE (2) 和结肠癌细胞 SW620) 对该类探针的摄取率显著高于常氧细胞, 体内光学成像实验表明, 探针 2、3 在异种移植瘤 (SK-N-BE (2) 和 SW620) 小鼠模型中具有更高的摄取率。

以上近红外荧光探针均能在小鼠体内对缺氧肿瘤进行成像, 可用于检测 NTR, 反映肿瘤侵袭性, 具有潜在临床应用价值。

## 1.2 近红外第二窗口 (1 000~1 700 nm) NTR 荧光探针

近红外第二窗口荧光探针在活体和组织中荧光成像的光子散射和吸收减少且背景自荧光极其微弱, 因而具有更深的穿透能力和更高的时空分辨率<sup>[10]</sup>, 但该类探针以 NTR 为靶点的研究较少, 因此, 开发近红外第二窗口 NTR 荧光探针对于肿瘤的体内灵敏成像具有重要意义。Zhang 等<sup>[10]</sup>发展了可在近红外第二窗口成像的高灵敏度荧光探针 RHC-NO<sub>2</sub> (图 2), 对 NTR 的检测限仅为 5.9 ng·mL<sup>-1</sup>, 并可对荷瘤小鼠的肿瘤边缘进行准确成像。

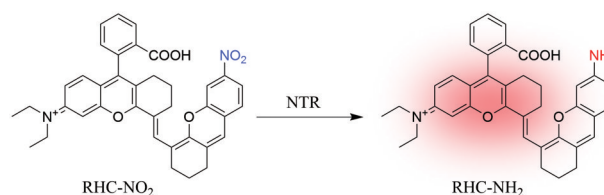


Figure 2 The detection mechanism of RHC-NO<sub>2</sub>

## 1.3 非近红外 NTR 荧光探针

近年来, 一些非近红外荧光探针也可以通过监测 NTR 反映肿瘤的缺氧情况, 用于肿瘤成像, 设计策略为将硝基单元作为 NTR 响应位点结合到发光基团上, 当硝基被还原后, 呈现出不同的荧光, 进而实现肿瘤部位成像。例如, Kim 等<sup>[11]</sup>开发了一种比率荧光探针 4 (图 3A), 在非小细胞肺癌 A549 和宫颈癌 HeLa 细胞中的荧光强度较其在小鼠胚胎细胞 NIH/3T3 (非肿瘤细胞) 中显著增加, 表明探针 4 在肿瘤细胞中对 NTR 具有高度的生物相容性和敏感性。Fan 等<sup>[12]</sup>通过将硝基单元作为 NTR 响应位点结合到苯并噻唑衍生物中设计得到荧光探针 NTNO, 该探针的荧光强度在 NTR 为 0.5~8.0 μmol·L<sup>-1</sup> 内具有良好线性, 检测限为 48 ng·mL<sup>-1</sup>, 已成功用于缺氧水平的肿瘤细胞和组织成像 (图 3A)。2020 年, Adair 等<sup>[13]</sup>基于 4-氨基-1,8-萘酰亚胺结构通过合理设计得到了荧光探针 Asp-1NO<sub>2</sub> (图 3B), 实现了对实体瘤缺氧和坏死区域的选择性成像。Wang 等<sup>[14]</sup>通过一步合成得到了用于检测 NTR 的双光子荧光探针 hTP-NNO<sub>2</sub> (图 3C), 其荧光强度随着氧浓度的降低而增加, 且对脑部肿瘤的成像深度高达 100 μm。

## 2 肿瘤低极性、高黏度微环境敏感型化学荧光探针

### 2.1 靶向蛋白的溶致变色型荧光探针

溶致变色荧光团在极性和/或亲水性环境中表现

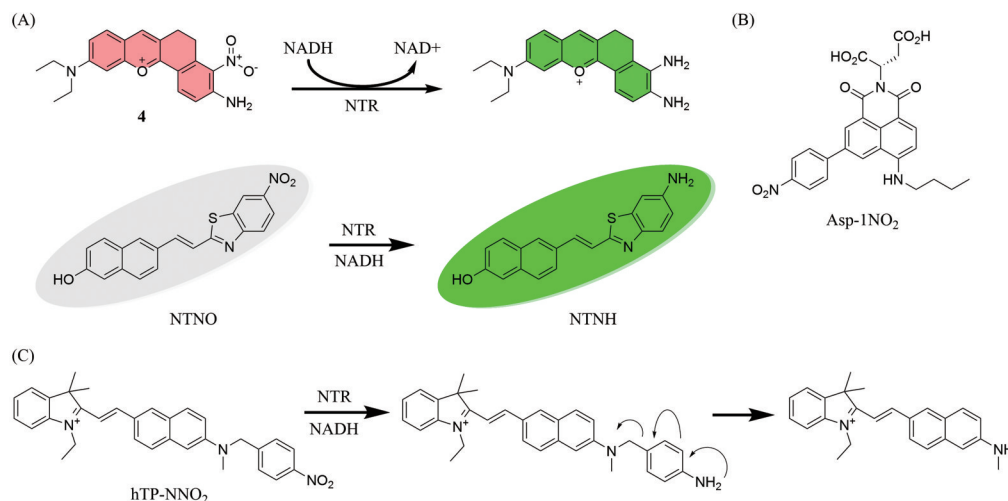


Figure 3 Detection mechanisms of 4, NTNO (A), chemical structure of Asp-1NO<sub>2</sub> (B) and detection mechanisms of hTP-NNO<sub>2</sub> (C)

出微弱荧光,但在非极性和/或疏水性环境中荧光显著增强<sup>[15]</sup>,常见的溶致变色荧光团有7-硝基-1,2,3-苯并噁二唑(7-nitro-1,2,3-benzoxadiazole, NBD)或磺酰基苯并噁二唑(sulfonyl benzoxadiazole, SBD),利用肿瘤细胞中靶蛋白空腔呈疏水性的特点,将溶致变色荧光团与蛋白质特异性小分子配体连接得到荧光探针,该类探针与靶蛋白结合后,处于低极性环境中,荧光开启,信噪比显著提高,从而更清晰地标记靶蛋白,为蛋白质功能研究提供了有效的可视化工具<sup>[16-18]</sup>。

**2.1.1 蛋白-蛋白相互作用溶致变色型荧光探针** p53蛋白可诱导肿瘤细胞凋亡,其能够与鼠双微体-2(mouse double minute 2, MDM2)蛋白发生相互作用并被泛素化降解,从而失去抗肿瘤功能<sup>[18]</sup>,因此,研究p53-MDM2相互作用对于开发新型抗肿瘤药物具有重要意义。Liu等<sup>[18]</sup>开发了一类对p53-MDM2蛋白-蛋白相互作用具有开启效应的荧光探针**5~7**(图4A)。其中,探针**6**对p53-MDM2相互作用的 $K_i$ 值为 $0.03 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,优于阳性对照nutlin-3( $K_i = 0.23 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),显示出更好的结合亲和力。该系列探针已成功在微摩尔水平应用于A549细胞(p53野生型)中p53-MDM2相互作用的成像。在此研究基础上,经过结构优化,Dong等<sup>[19]</sup>又进一步设计得到了新一代具有优秀荧光性质的p53-MDM2荧光探针**8~10**(图4B)。该类探针对于p53-MDM2相互作用的 $K_i$ 值小于 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,其中,探针**9**和**10**的 $K_i$ 值分别为 $126 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $74.8 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,优于nutlin-3。探针**8~10**通过抑制p53-MDM2相互作用提高A549细胞系中p53和MDM2蛋白的表达水平,特别是探针**9**和**10**对p53表达水平的提高优于nutlin-3。此外,该类探针在肿瘤细胞和组织水平上对野生型p53-MDM2相互作用的成像效果良好,有望用于p53-

MDM2领域的生物成像、药物筛选以及病理和生理研究。

**2.1.2 特异性高表达蛋白溶致变色型荧光探针** 肿瘤中特异性高表达蛋白也是设计环境敏感型荧光探针的靶点。髓样细胞白血病-1(myeloid cell leukemia-1, Mcl-1)蛋白在恶性肿瘤中过度表达,具有抗凋亡功能<sup>[20]</sup>,然而其抗凋亡机制尚不明确。Liu等<sup>[20]</sup>开发了靶向Mcl-1蛋白的探针**11**(图5A),对Mcl-1表现出选择性结合亲和力( $K_i = 2.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),在HeLa细胞中实现了Mcl-1成像并能够检测Mcl-1抑制剂的细胞分布,为开发靶向B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)家族蛋白的化学荧光探针提供了范例。

大鼠肉瘤病毒癌基因同源物(kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, KRAS)在胰腺癌中突变率高达90%,是胰腺癌发生发展的主要因素,磷酸二酯酶 $\delta$ (phosphodiesterase-delta, PDE $\delta$ )蛋白在调节KRAS的功能中发挥重要作用,然而现有的PDE $\delta$ 抑制剂普遍抗肿瘤活性低且选择性差<sup>[21]</sup>,因此,PDE $\delta$ 的生物学功能亟待深入研究。Dong等<sup>[21]</sup>首次报道了用于检测PDE $\delta$ 蛋白的荧光探针**12~14**(图5B),探针**12**和**14**的 $K_{D2}$ 值分别为 $682 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $501 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (表1),较先导化合物SBVS-HBSS的结合力( $K_{D2} = 467 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )有所下降,而探针**13**的结合力( $K_{D2} = 440 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )略有提高。该类探针对KRAS依赖的胰腺癌细胞MIA PaCa-2的抗增殖活性( $\text{IC}_{50} = 15.9\sim 37.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )优于阳性药Deltazinone( $\text{IC}_{50} = 61.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),对胰腺癌细胞Capan-1( $\text{IC}_{50} = 30.9\sim 43.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )的抗增殖活性与阳性药( $\text{IC}_{50} = 35.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )相当,表现一定的抗肿瘤效果,并通过磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)/雷

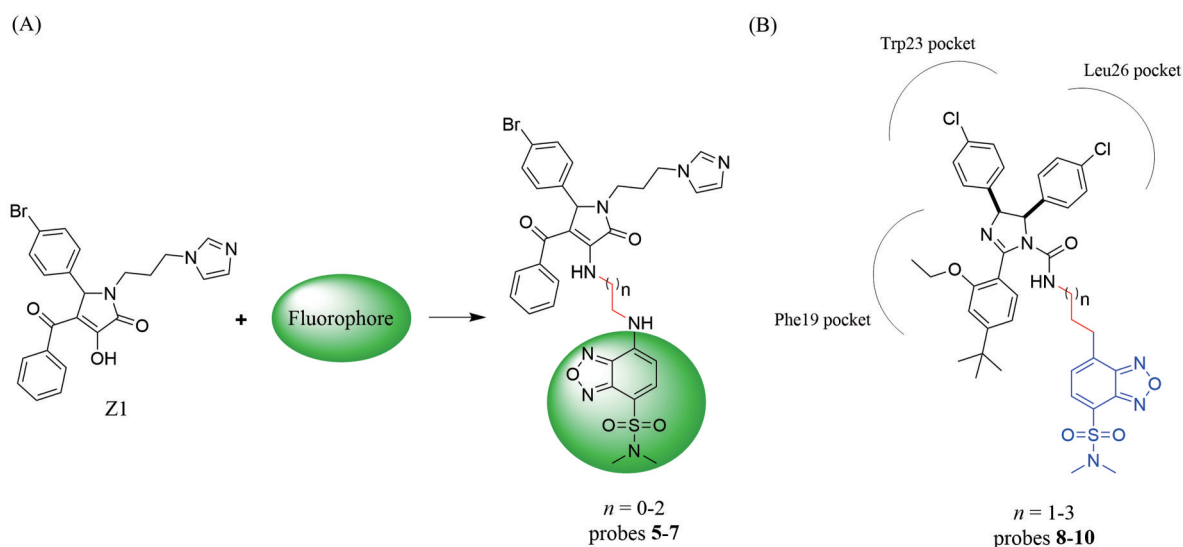
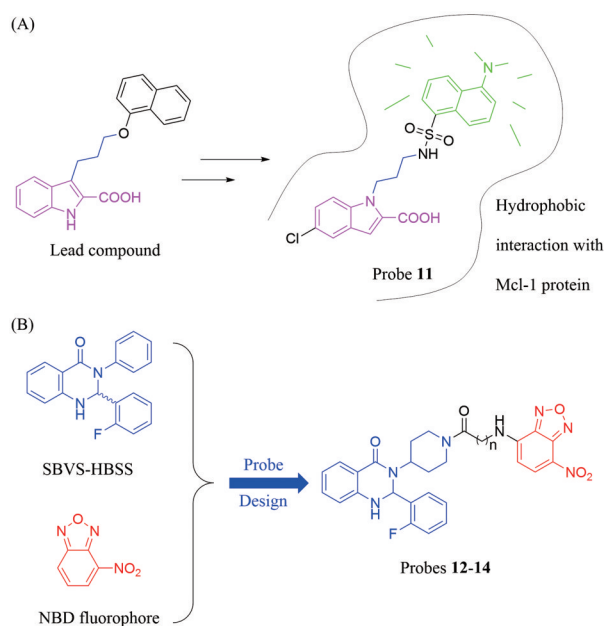


Figure 4 Design strategies of probes 5-7 (A) and chemical structures of 8-10 (B)



**Figure 5** The design strategy of probe **11** targeting Mcl-1 (A) and structure-based drug design of probes **12–14** targeting PDE $\delta$  (B)

帕霉素靶蛋白 (mechanistic target of rapamycin, mTOR) 和丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路下调 KRAS、PDE $\delta$ 、AKT1、MAPK1、丝裂原活化的细胞外信号调节激酶 7 (mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase 7, MEK7)、核酮糖二磷酸羧化酶富集因子 1 (rubisco accumulation factor 1, RAF1) 和 mTOR 的信使核糖核酸 (messenger ribonucleic acid, mRNA) 表达。探针 **12–14** 在胰腺癌细胞和组织水平实现了 PDE $\delta$  的可视化, 有望用于筛选靶向 PDE $\delta$  的抗胰腺癌药物, 深入研究 PDE $\delta$  的病理和生理作用。

**Table 1** PDE $\delta$  binding affinity and *in vitro* antitumor activity of Probes **12–14**

Compound	$K_{D2}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	$\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	
		MIA PaCa-2	Capan-1
<b>12</b>	$682 \pm 91$	$37.7 \pm 4.18$	$43.4 \pm 8.83$
<b>13</b>	$440 \pm 73$	$24.7 \pm 4.48$	$30.9 \pm 7.88$
<b>14</b>	$501 \pm 82$	$15.9 \pm 1.28$	$33.4 \pm 8.25$

**2.1.3 酶或受体蛋白溶致变色型荧光探针** 针对酶或受体蛋白, 同样可设计相应探针。Zhou 等<sup>[22]</sup>首次报道了一类具有开关机制的环境敏感型荧光探针 **6a**、**6b**、**11a** 和 **11b** (图 6A), 用以研究组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylases, HDACs) 的活性。其中, **6b** 的体外抗肿瘤活性适中 (急性淋巴瘤细胞白血病细胞 MOLT-4,  $\text{IC}_{50} = 7.84 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 慢性髓原白血病细胞 K562,  $\text{IC}_{50} = 11.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 前列腺癌细胞 PC-3,  $\text{IC}_{50} =$

$52.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 体外抑酶活性 ( $\text{IC}_{50} = 109 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 优于阳性药 SAHA ( $\text{IC}_{50} = 135 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 并可在 HDACs 高表达的肿瘤细胞 (PC-3、MOLT-4) 和肿瘤组织 (PC-3) 中选择性成像。因此, **6b** 可用于深入研究 HDACs 的病理和生理作用, 为 HDACs 相关疾病的诊断和治疗提供了新思路。Wang 等<sup>[23]</sup>通过将环境敏感型荧光团 NBD 取代吉非替尼的咪唑基团, 得到了靶向人表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 蛋白的代表性荧光探针 GN3 (图 6B), 可用于过度表达 EGFR 的肿瘤细胞和荷瘤裸鼠的荧光成像, 并能够显著抑制皮肤鳞癌 A431 细胞中 EGFR 的磷酸化。

## 2.2 靶向细胞器的低极性、高黏度响应型荧光探针

**2.2.1 靶向脂滴** 目前有研究发现, 由于肿瘤细胞异常的脂质代谢, 导致其脂滴的极性低于正常细胞, 因此, 可通过检测脂滴的极性, 用于肿瘤的诊断和深入研究<sup>[24]</sup>。基于扭曲的分子内电荷转移 (twisted intramolecular charge transfer, TICT), Pei 等<sup>[25]</sup>报道了一种对低极性和高黏度敏感的快速响应、高灵敏度荧光探针 DPAR (图 7A), Pei 等<sup>[26]</sup>设计得到了对极性和黏度变化敏感的荧光探针 TPA-TRDN (图 7B), Samanta 等<sup>[27]</sup>报道了低极性响应的近红外荧光探针 L (图 7C), 以上探针在肿瘤细胞中通过对脂滴的特异性成像与正常细胞进行区分。基于分子内电荷转移 (intramolecular charge transfer, ICT), Fan 等<sup>[24]</sup>设计得到了对极性变化表现出高灵敏度的荧光探针 LD-TTP (图 7D), 在癌症患者的手术标本中实现了脂滴异常极性的可视化。近期, Yan 等<sup>[28]</sup>报道的新型荧光探针 TzAr-N 对低极性和高黏度环境敏感 (图 7E), 该探针耐 pH 变化、斯托克斯位移大、靶向脂滴能力良好且生物毒性低, 可用于 HeLa 细胞中脂滴分布的荧光成像。

**2.2.2 靶向溶酶体** 溶酶体在肿瘤的发生、发展和耐药中起着独特作用, 其已成为肿瘤诊断和治疗中最具吸引力的靶标之一, 最近的研究表明, 肿瘤细胞溶酶体较高的黏度和较低的 pH 值 (3.8~4.7) 值具有作为肿瘤标志物的潜力<sup>[29]</sup>。Pal 等<sup>[30]</sup>基于光致电子转移 (photo induced electron transfer, PET) 设计得到了一种对极性敏感、耐 pH 变化的溶酶体特异性荧光探针 LyPol (图 8A), 该探针的荧光核心通过脂肪链与咪唑基团连接, 使其能够靶向肿瘤细胞的溶酶体。Song 等<sup>[29]</sup>基于扭曲的分子内电荷穿梭 (twisted intramolecular charge shuttle, TICS) 设计得到了对肿瘤细胞溶酶体的黏度和 pH 值双重响应的荧光探针 **15** (图 8B), 能够选择性区分肿瘤细胞与正常细胞以及瘤体与正常器官。

**2.2.3 靶向线粒体** 肿瘤细胞线粒体较正常细胞的极性较低且 pH 值较高, Liang 等<sup>[31]</sup>利用肿瘤细胞线粒体

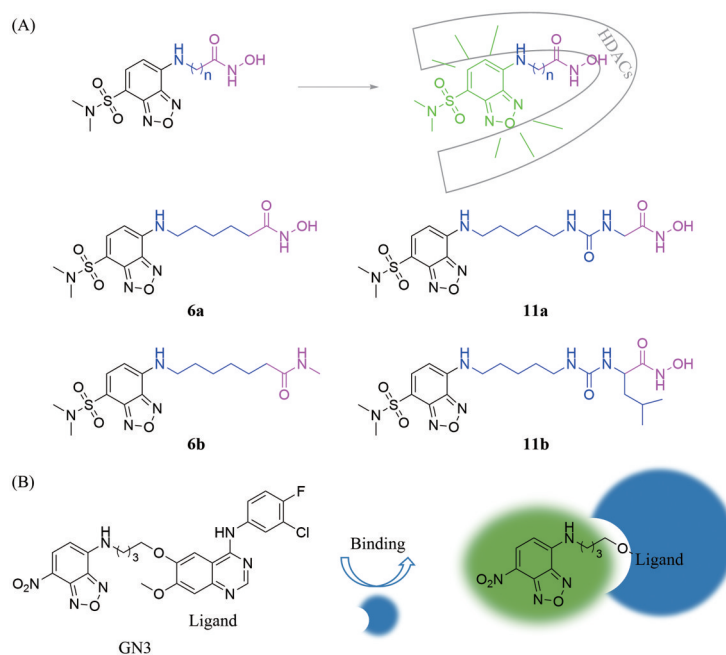


Figure 6 Design strategies and chemical structures of probes targeting HDACs (A) and the mechanism of GN3 detecting EGFR (B)

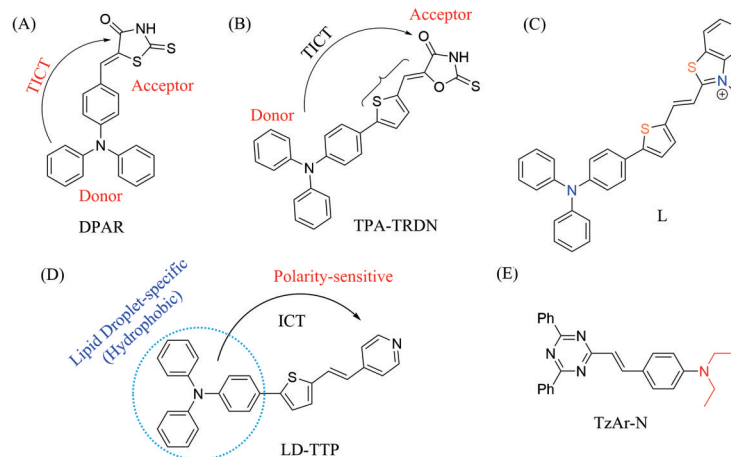


Figure 7 The chemical structures of fluorescent probes which targeting lipid droplets and sensitive to polarity and viscosity. A: DPAR; B: TPA-TRDN; C: L; D: LD-TTP; E: TzAr-N

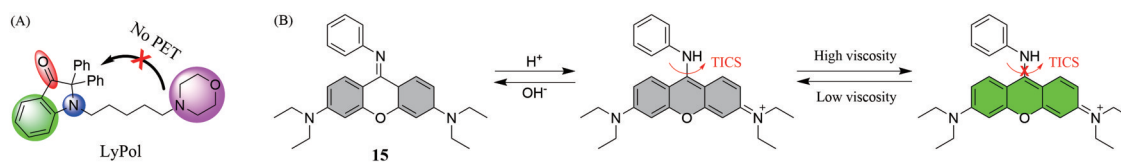


Figure 8 The chemical structure of lysosome-specific fluorescent probe LyPol (A) and dual response mechanism of probe 15 (B)

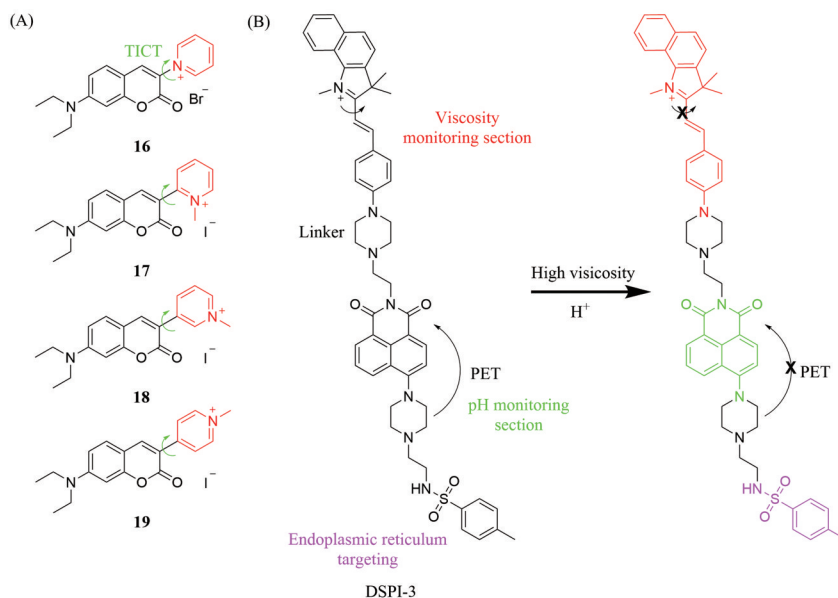
特殊的微环境开发了共激发荧光探针 **16~19** (图9A), 仅在 pH 大于 7.0 和低极性条件同时存在下, 香豆素骨架才能水解并产生荧光信号, 肿瘤细胞线粒体较高的膜电位进一步增强了探针的亲和力。其中, 探针 **18** 在细胞和组织水平上实现了对癌症的特异性诊断。

**2.2.4 靶向内质网** 细胞内环境的轻微变化可能会引起内质网的应激反应, 然而, 对于铁死亡过程中肿瘤细

胞内质网微环境变化的研究相对较少, Song 等<sup>[32]</sup>将监测黏度、pH 和靶向内质网的三类基团通过哌嗪环连接, 得到了一种新型共激发荧光探针 DSPI-3 (图9B), 用以研究内质网黏度和 pH 的变化与肿瘤细胞铁死亡过程的关系。

### 3 肿瘤异常 pH 微环境敏感型荧光探针

质子在维持细胞的生命活动中起着重要作用, 然



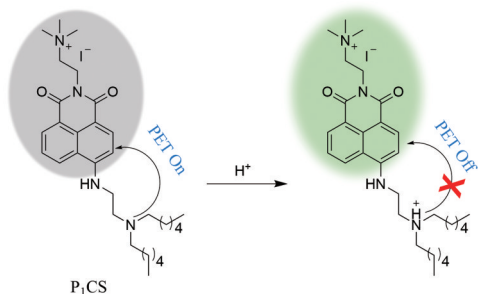
**Figure 9** The chemical structures of probes 16–19 (A) and the design strategy of DSPI-3 (B)

而肿瘤细胞过度活跃的磷酸戊糖途径会使 CO<sub>2</sub> 水平升高并生成碳酸, 导致肿瘤细胞的质子水平异常提高, 使肿瘤微环境的 pH 值通常低于正常细胞, 然而, 由于肿瘤细胞线粒体的氧化磷酸化水平高于正常细胞, 使其膜电位升高, 阳离子增加, 进而保持了较高的 pH 值<sup>[31,33]</sup>, 基于此, 研究人员设计了大量对肿瘤异常 pH 微环境敏感的荧光探针。

### 3.1 靶向细胞膜或细胞器的 pH 响应型荧光探针

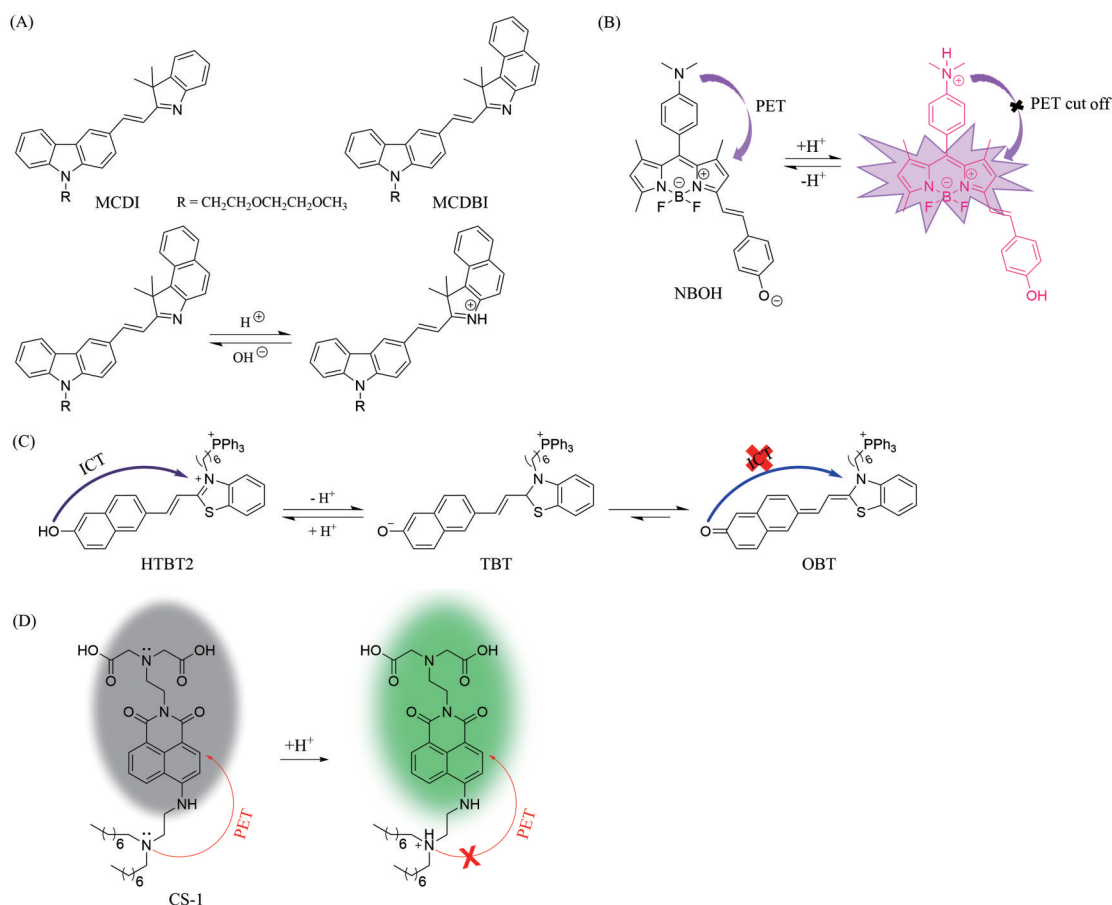
鉴于高度侵袭性肿瘤细胞的细胞膜表面质子非常丰富, Podder 等<sup>[33]</sup> 基于 PET 开发了荧光探针 P<sub>1</sub>CS (图 10), 该探针的叔胺在酸性环境中发生质子化导致荧光增强, 且能够在碱性环境中释放质子进而监测 pH 值的波动, P<sub>1</sub>CS 主要标记在肿瘤细胞的细胞膜上并以 pH 依赖性方式检测细胞膜的 pH 水平, 可通过荧光强度的定量分析将肿瘤细胞 (乳腺癌细胞 MDA-MB-231, 宫颈癌细胞 HeLa) 与正常细胞 (WI-38) 区分开, 同时能够标记 3D 培养条件下 HeLa 细胞球体的表面。

靶向细胞器的 pH 响应型荧光探针主要用于监测肿瘤细胞溶酶体或线粒体的 pH 值变化。基于咪唑结



**Figure 10** The mechanism of P<sub>1</sub>CS

构, Ge 等<sup>[34]</sup> 报道了两种新型具有不同发射波长的高灵敏度比率荧光探针 MCDI 和 MCDBI (图 11A), 用于溶酶体的 pH 监测。以咪唑或苯并咪唑为酸敏感位点的 MCDI 和 MCDBI 的 pK<sub>a</sub> 值分别为 4.51 和 4.26, 适合定量分析活细胞中溶酶体的 pH 值变化, 可对微小的 pH 变化作出快速和线性响应。此外, MCDI 和 MCDBI 具有优异的可逆性、光稳定性、溶酶体靶向性和细胞膜渗透性, 并可对肝癌细胞 HepG2 的溶酶体进行选择比率成像, 经 MCDI 和 MCDBI 染色后的 HepG2 细胞在外源性刺激下溶酶体的 pH 值下降, 细胞荧光强度随之增加, 实现了对溶酶体 pH 波动的监测。Shi 等<sup>[35]</sup> 报道了一种靶向溶酶体的新型荧光探针 NBOH (图 11B), 该探针具有 BODIPY 荧光团, 并可根据不同的 pH 环境区分肿瘤与正常组织, 其荧光强度在 pH = 3.0~11.0 内表现出显著的 pH 依赖性变化, 尤其在 3.5~5.5 之间最为敏感, 与肿瘤细胞溶酶体的酸性微环境相适应。NBOH 的毒性低且细胞膜渗透性良好并已成功应用于小鼠肿瘤组织的成像, 有望应用于临床。Lin 等<sup>[36]</sup> 基于苯并噻唑结构设计得到了一种存在 ICT 的线粒体 pH 荧光探针 HTBT2 (图 11C)。该探针的 pK<sub>a</sub> 为 8.04 ± 0.02, 与线粒体基质的 pH (约 8.0) 接近, 并对 pH 的变化高度敏感、选择性良好且具有大的斯托克斯位移, 可用于监测肿瘤细胞线粒体的 pH 变化, 并区分肿瘤和正常细胞线粒体之间的 pH 差异。Kim 等<sup>[37]</sup> 报道了一种自组装荧光探针 CS-1 (图 11D), 用于监测肿瘤细胞和组织内 pH 的波动, 该探针的叔氮原子可作为电子供体通过 PET 抑制碱性条件下 CS-1 的荧光强度。CS-1 在肿瘤细胞的酸性环境中可发生自组装, 产生两亲结构, 率先定位在 A549 细



**Figure 11** The chemical structures and response mechanisms to pH of fluorescent probes targeting organelles in tumor cells. A: MCDBI and MCDI; B: NBOH; C: HTBT2; D: CS-1

胞的细胞膜,后以时间依赖性方式标记溶酶体和线粒体,并能够选择性标记小鼠的异种移植瘤(A549)组织。

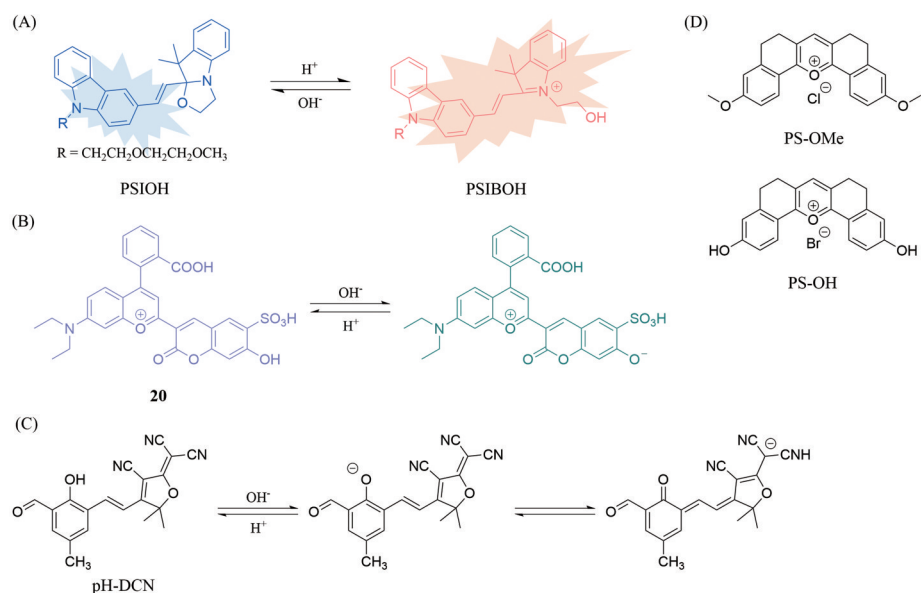
### 3.2 非靶向性pH响应型荧光探针

除了上述靶向性pH探针外,人们还设计了其他类型的pH响应型荧光探针。Xu等<sup>[38]</sup>报道了两种新型高分辨率比率型双光子荧光探针PSIOH和PSIBOH(图12A),能够有效传感和监测生物系统中的酸性pH。当pH从碱性变为酸性时,PSIOH的最大的发射波长从435 nm偏移至604 nm,其自身的pK<sub>a</sub>为6.6并在pH为6.2~7.0内作出线性响应,已成功监测由各种外源性刺激引起的HeLa细胞的pH变化。Wang等<sup>[39]</sup>通过引入磺酸基团设计得到了对pH敏感的水溶性探针**20**(图12B)。该探针的pK<sub>a</sub>为5.79 ± 0.14,随着溶液pH值的升高,其最大吸收波长和荧光强度发生显著变化,已成功应用于HepG2和HeLa细胞成像。此外,该探针的结构中含有许多反应基团,如羧基、酚羟基等,可用于构建其他荧光探针,扩展其应用。Li等<sup>[40]</sup>设计得到的新型pH敏感荧光探针pH-DCN(图12C)水溶性优秀,在pH值为4~12时敏感,尤其在碱性环境中敏感,

该探针选择性高、毒性低、可逆性和稳定性良好,可通过监测细胞内不同的pH水平,区分肿瘤与正常细胞。Chakraborty等<sup>[41]</sup>通过改进的Vilsmeier-Haack反应一步合成荧光团PS-OMe,脱甲基得到“开启”式荧光探针PS-OH(图12D),用于监测肿瘤细胞凋亡过程中pH值的动态变化。

### 3.3 双重响应型或具有连续监测能力的pH荧光探针

除仅对pH敏感的探针外,人们针对肿瘤中其他因素和pH环境,设计了双重响应型荧光探针。例如,Niu等<sup>[42]</sup>设计得到的近红外荧光探针NPCF(图13A)对SO<sub>2</sub>和pH值具有双重响应效应。该探针HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>表现出高灵敏度(检测限为22.7 nmol·L<sup>-1</sup>),且当pH值从9.21降为4.26时,其在610 nm处的荧光强度显著增加,可以通过双重指标区分肿瘤与正常细胞,为癌症的早期诊断提供了简捷、实时的检测工具。She等<sup>[43]</sup>首次报道了一种连续检测H<sub>2</sub>S和H<sup>+</sup>的新型近红外荧光探针CyO-DNP,用于癌症的早期诊断。该探针以2,4-二硝基苯醚为识别基团(图13B),在H<sub>2</sub>S存在的条件下,CyO-DNP转化为CyO,在663 nm处显示出强烈荧光,



**Figure 12** The chemical structures and detection mechanisms to pH changes of other probes. A: PSIOH and PSIBOH; B: **20**; C: pH-DCN; D: PS-OMe and PS-OH

随后, H<sup>+</sup>诱导 CyO 质子化得到 CyOH, 在 793 nm 处的荧光强度明显增加, 最终实现连续监测肿瘤细胞中的内源性 H<sub>2</sub>S 和 H<sup>+</sup>, 并可有效避免肝、肾引起的假阳性信号, 准确区分荷瘤与正常小鼠。

#### 4 肿瘤高活性氧微环境敏感型荧光探针

目前, 在各类肿瘤中已检测到活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平升高, 并已被证实具有多种生物功能, 如激活促肿瘤信号、利于细胞存活和增殖、导致 DNA 损伤和遗传不稳定等<sup>[44]</sup>, 因此, 通过检测活性氧水平, 能够实现肿瘤的诊断和治疗评估。

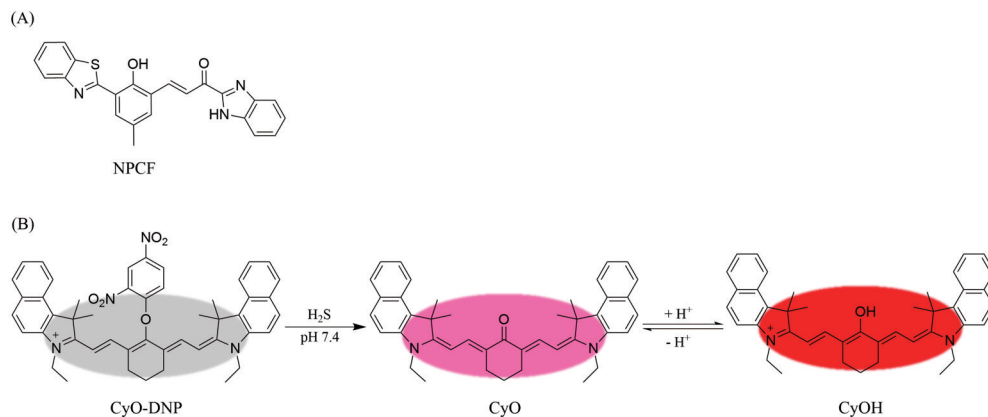
##### 4.1 超氧阴离子响应型荧光探针

Wang 等<sup>[45]</sup>将用于检测超氧阴离子 (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) 的经典响应单元三氟甲磺酸酯和双光子荧光团 TP-OH 连接, 设计得到首次报道的比率荧光探针 TP-Tfs, 可在肿瘤治疗过程中检测活细胞和体内的超氧阴离子 (活性氧前

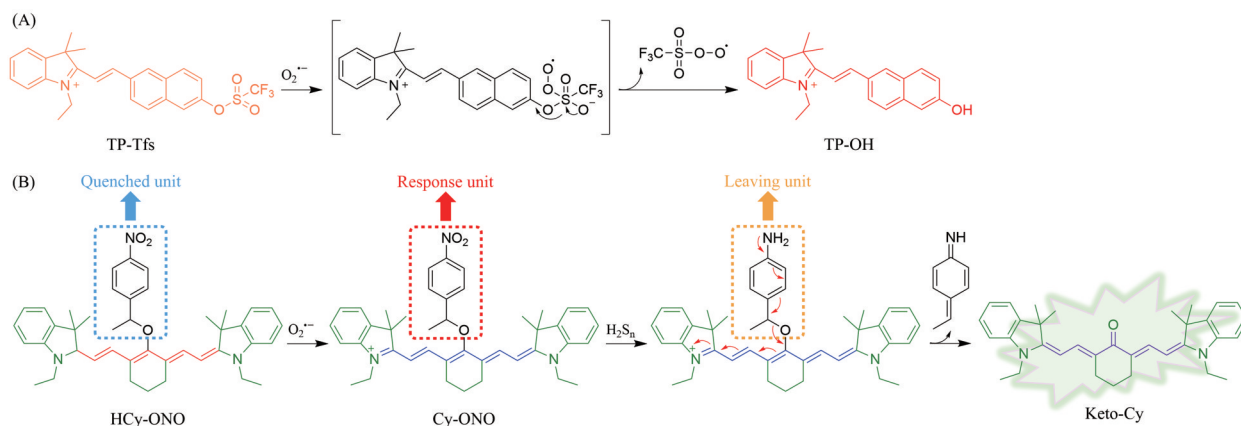
体), 并有望用于抗癌药物筛选和肿瘤治疗评估 (图 14A)。除单独检测超氧阴离子外, Gao 等<sup>[46]</sup>基于串联反应报道了一种用于连续检测超氧阴离子 (检测限 90 nmol·L<sup>-1</sup>) 和多硫化氢 (检测限 100 nmol·L<sup>-1</sup>) 的荧光探针 HCy-ONO (图 14B)。该探针成功应用于 SH-SY5Y (神经母细胞瘤细胞) 荷瘤小鼠模型中超氧阴离子和多硫化氢的成像, 有助于阐明癌症的生理和病理过程。

##### 4.2 过氧化氢响应型荧光探针

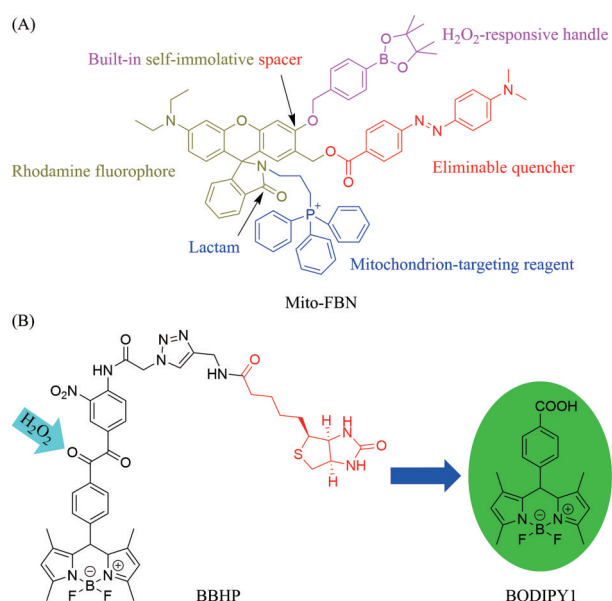
Liu 等<sup>[47]</sup>开发了一种新型荧光探针 Mito-FBN (图 15A), 通过双猝灭效应降低背景荧光, 实现了对肿瘤细胞线粒体中内源性过氧化氢的高灵敏度检测。Wang 等<sup>[48]</sup>以苯偶酰作为过氧化氢识别位点并以生物素作为靶向配体, 设计得到了荧光探针 BBHP (图 15B), 用于选择性检测肿瘤细胞中的过氧化氢, 成功区分肿瘤和正常组织。



**Figure 13** The chemical structure of NPCF (A) and the detection mechanism of CyO-DNP (B)



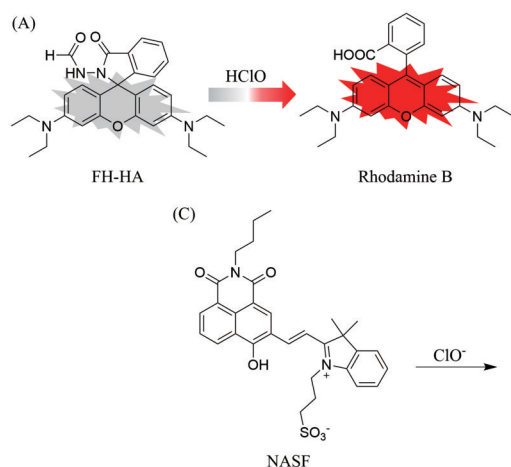
**Figure 14** The mechanism of superoxide anions detected by TP-Tfs (A) and the continuous detection mechanism for HCy-ONO (B)



**Figure 15** The design strategy of Mito-FBN (A) and the mechanism of  $H_2O_2$  detected by BBHP (B)

### 4.3 高活性氧响应型荧光探针

#### 4.3.1 HClO 响应型荧光探针

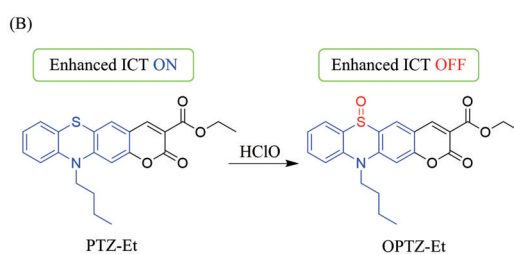


**Figure 16** The mechanism of HClO detected by fluorescent probes. A: FH-HA; B: PTZ-Et; C: NASF

为荧光团,以甲酰肼为HClO特异性识别受体设计得到了水溶性好、灵敏度高的荧光探针FH-HA(图16A),可对肿瘤细胞中的HClO进行快速响应。Chen等<sup>[50]</sup>以吩噻嗪作为供电子基团开发了一种响应快速、灵敏度高的探针PTZ-Et(图16B),用于监测RAW 264.7细胞中的内源性和外源性HClO。Wu等<sup>[51]</sup>通过连接1,8-萘酰亚胺和吡啶磺酸盐得到了双通道比率荧光探针NASF(图16C),实现了对肿瘤细胞内源性ClO的高灵敏度和高选择性检测。

**4.3.2 羟基自由基响应型荧光探针** 受神经保护药物依达拉奉对羟基自由基( $\cdot OH$ )清除机制的启发,Chen等<sup>[52]</sup>基于TICT开发了一种不受其他活性氧干扰的新型羟基自由基特异性荧光探针RH-EDA(图17)。在促进活性氧产生的抗癌药物 $\beta$ -拉帕醌的作用下,RH-EDA的依达拉奉亚基转化为2-氧-3-(苯基脲)-丁酸,荧光强度显著增加,此外,RH-EDA对羟基自由基具有较高的敏感性和选择性,不受其他活性氧的干扰,可通过检测细胞内羟基自由基的水平区分肿瘤与正常细胞。

**4.3.3 过氧亚硝酸盐响应型荧光探针** Li等<sup>[53]</sup>报道了



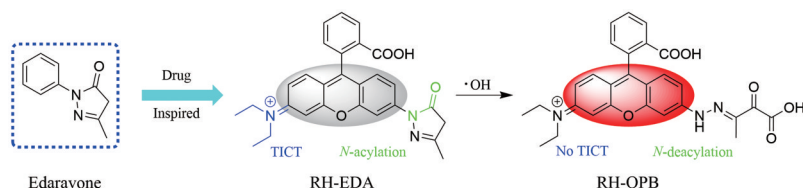


Figure 17 The mechanism of hydroxyl radical detected by RH-EDA

一种基于葱醌的荧光探针 M (图 18A), 该探针的氨基为识别基团, 可被过氧亚硝酸盐氧化为亚硝基, 在肝癌细胞 SMMC-7721 中实现了对过氧亚硝酸盐的选择性快速检测 (检测限  $13 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。Wang 等<sup>[54]</sup>利用 1-甲基喹啉-2,3-二酮修饰荧光染料 DHQ-Rd 设计得到的可激活双光子近红外荧光探针 DHQ-Rd-PN, 该探针在过氧亚硝酸盐条件下可释放 DHQ-Rd, 能够在小鼠体内实现对肿瘤中的过氧亚硝酸盐进行成像 (图 18B)。Li 等<sup>[55]</sup>基于 ICT 设计得到近红外比率荧光探针 CDMS, 该探针的硫醚结构可被过氧亚硝酸盐氧化为亚砜, 吸收光谱和发射光谱发生蓝移, 能够在小鼠体内监测肿瘤发展过程中过氧亚硝酸盐水平的波动 (图 18C)。

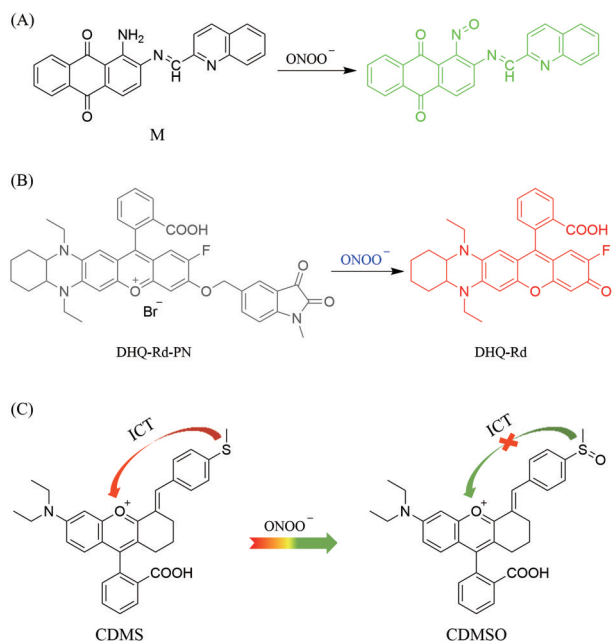


Figure 18 The mechanism of peroxynitrite detected by fluorescent probes. A: M; B: DHQ-Rd-PN; C: CDMS

**4.3.4 总高活性氧响应型荧光探针** Zhang 等<sup>[56]</sup>基于 Si-罗丹明结构设计得到了荧光探针 PSiR (图 19), 该探针的吡咯环可对高活性氧 ( $\text{HClO}$ 、 $\cdot\text{OH}$  和  $\text{ONOO}^-$ ) 发生 *N*-羟基化特异性反应,  $680 \text{ nm}$  处的荧光强度显著增加, 能够实现肿瘤细胞溶酶体中的高活性氧进行选择灵敏成像, 进而与正常细胞和组织进行区分。

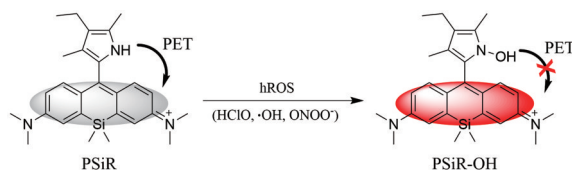


Figure 19 The mechanism of highly reactive oxygen species detected by PSiR

## 5 总结和展望

化学荧光探针具有灵敏度高、响应快速、结构灵活多样等多种优势, 其中, 肿瘤微环境敏感型化学荧光探针具有更高的特异性和信噪比, 能够更加清晰直观地传递生物信息<sup>[4]</sup>, 近年来发展迅速, 为肿瘤的诊疗提供了有效策略和物质基础。但现有的肿瘤诊疗一体化荧光探针仍存在诸多不足, 如相当一部分荧光探针仅适用于肿瘤成像, 治疗效果有限; 部分探针被激活后不可逆, 无法实现肿瘤的动态监测; 部分探针存在选择性差、不良反应大、水溶性不理想等问题, 限制了其在医学、生命科学等领域的应用; 有些探针荧光成像停留在肿瘤细胞或组织水平, 无法有效实现肿瘤体内成像等, 因而, 开发性质优异的诊疗一体化探针仍面临诸多挑战。可基于以下三方面开展深入研究:

① 针对靶点基于结构开展合理的探针设计, 选择活性优秀化合物, 在不影响抗肿瘤活性的前提下, 根据蛋白结构选择合适的化学位点, 根据上文提及的探针设计策略与相应的荧光团连接, 开发具有诊疗效果的环境敏感型荧光探针。

② 优化现有荧光探针的生物功能和理化性质, 如将药物设计策略引入探针设计中提升探针活性、改善探针性质等, 此外, 在设计探针时可引入光调控元件, 如偶氮苯, 实现肿瘤的可逆动态监测。

③ 开发新型荧光团, 对已报道的荧光团进行充分调研, 结合响应机制, 如光诱导电子转移、分子内电荷转移和荧光共振能量转移等, 开发新型荧光团克服肿瘤成像的缺陷。

总之, 肿瘤微环境敏感型化学荧光探针具有良好的发展前景, 随着人们对肿瘤发生发展过程中机制的阐明和新技术的应用, 具有更大优势的新型诊疗一体化探针分子也将随之被开发并应用于肿瘤的临床诊断

和治疗。

**作者贡献:** 所有作者都参与了文献调研、手稿设计与撰写。李柯良、刘杨、楼春杨和黄天乐开展文献调研和手稿撰写; 洪战英、武善超、盛春泉获取经费资助并指导整个研究。所有作者都认可手稿的最终版本。

**利益冲突:** 不存在任何利益冲突。

## References

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71: 209-249.
- [2] Alamudi SH, Chang YT. Advances in the design of cell-permeable fluorescent probes for applications in live cell imaging [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2018, 54: 13641-13653.
- [3] Jun JV, Chenoweth DM, Petersson EJ. Rational design of small molecule fluorescent probes for biological applications [J]. *Org Biomol Chem*, 2020, 18: 5747-5763.
- [4] Loving GS, Sainlos M, Imperiali B. Monitoring protein interactions and dynamics with solvatochromic fluorophores [J]. *Trends Biotechnol*, 2010, 28: 73-83.
- [5] Jing X, Yang F, Shao C, et al. Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment [J]. *Mol Cancer*, 2019, 18: 157.
- [6] Qiao J, Wang M, Cui M, et al. Small-molecule probes for fluorescent detection of cellular hypoxia-related nitroreductase [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 203: 114199.
- [7] Chen Y, Zhang X, Lu X, et al. Ultra-sensitive responsive near-infrared fluorescent nitroreductase probe with strong specificity for imaging tumor and detecting the invasiveness of tumor cells [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2022, 268: 120634.
- [8] Zheng J, Shen Y, Xu Z, et al. Near-infrared off-on fluorescence probe activated by NTR for *in vivo* hypoxia imaging [J]. *Biosens Bioelectron*, 2018, 119: 141-148.
- [9] Kwon YD, Oh JM, Chun S, et al. Synthesis and evaluation of multivalent nitroimidazole-based near-infrared fluorescent agents for neuroblastoma and colon cancer imaging [J]. *Bioorg Chem*, 2021, 113: 104990.
- [10] Zhang X, Li X, Shi W, et al. Sensitive imaging of tumors using a nitroreductase-activated fluorescence probe in the NIR-II window [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2021, 57: 8174-8177.
- [11] Kim SJ, Yoon JW, Yoon SA, et al. Ratiometric fluorescence assay for nitroreductase activity: locked-flavylum fluorophore as a NTR-sensitive molecular probe [J]. *Molecules*, 2021, 26: 1088.
- [12] Fan L, Zan Q, Lin B, et al. Hypoxia imaging in living cells, tissues and zebrafish with a nitroreductase-specific fluorescent probe [J]. *Analyst*, 2020, 145: 5657-5663.
- [13] Adair LD, Trinh N, Vrity PM, et al. Synthesis of nitro-aryl functionalised 4-amino-1,8-naphthalimides and their evaluation as fluorescent hypoxia sensors [J]. *Chemistry*, 2020, 26: 10064-10071.
- [14] Wang Y, Han X, Zhang X, et al. A high-selectivity fluorescent probe for hypoxia imaging in cells and a tumor-bearing mouse model [J]. *Analyst*, 2020, 145: 1389-1395.
- [15] Wang L, Hsiung CH, Liu X, et al. Xanthone-based solvatochromic fluorophores for quantifying micropolarity of protein aggregates [J]. *Chem Sci*, 2022, 13: 12540-12549.
- [16] Liu Z, Miao Z, Li J, et al. A fluorescent probe for imaging p53-MDM2 protein-protein interaction [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2015, 85: 411-417.
- [17] Liu Z, Jiang T, Wang B, et al. Environment-sensitive fluorescent probe for the human ether-a-go-go-related gene potassium channel [J]. *Anal Chem*, 2016, 88: 1511-1515.
- [18] Liu T, Jiang Y, Liu Z, et al. Environment-sensitive turn-on fluorescent probes for p53-MDM2 protein-protein interaction [J]. *Medchemcomm*, 2017, 8: 1668-1672.
- [19] Dong G, He S, Qin X, et al. Discovery of nonpeptide, environmentally sensitive fluorescent probes for imaging p53-MDM2 interactions in living cell lines and tissue slice [J]. *Anal Chem*, 2020, 92: 2642-2648.
- [20] Liu T, Gao Y, Zhang X, et al. Discovery of a turn-on fluorescent probe for myeloid cell leukemia-1 protein [J]. *Anal Chem*, 2017, 89: 11173-11177.
- [21] Dong G, Chen L, Zhang J, et al. Discovery of turn-on fluorescent probes for detecting PDE $\delta$  protein in living cells and tumor slices [J]. *Anal Chem*, 2020, 92: 9516-9522.
- [22] Zhou X, Dong G, Song T, et al. Environment-sensitive fluorescent inhibitors of histone deacetylase [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2020, 30: 127128.
- [23] Wang LX, Wang ZH, Sun XL, et al. Discovery of EGFR-targeted environment-sensitive fluorescent probes for cell imaging and efficient tumor detection [J]. *Bioorg Chem*, 2022, 121: 105585.
- [24] Fan L, Wang X, Zan Q, et al. Lipid droplet-specific fluorescent probe for *in vivo* visualization of polarity in fatty liver, inflammation, and cancer models [J]. *Anal Chem*, 2021, 93: 8019-8026.
- [25] Pei S, Li J, Kang N, et al. Synthesis of a new environment-sensitive fluorescent probe based on TICT and application for detection of human serum albumin and specific lipid droplets imaging [J]. *Anal Chim Acta*, 2022, 1190: 339267.
- [26] Pei S, Li J, Zhang C, et al. TICT-based microenvironment-sensitive probe with turn-on red emission for human serum albumin detection and for targeting lipid droplet imaging [J]. *ACS Biomater Sci Eng*, 2022, 8: 253-260.
- [27] Samanta S, Huang M, Lin F, et al. Solo smart fluorogenic probe for potential cancer diagnosis and tracking *in vivo* tumorous lymphatic systems *via* distinct emission signals [J]. *Anal Chem*,

- 2020, 92: 1541-1548.
- [28] Yan Y, Li S, Zhang ZH, et al. A sensitive bio-probe for tracking lipid droplets with large Stokes shift and its application in cell imaging [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2021, 260: 119988.
- [29] Song Y, Zhang H, Wang X, et al. One stone, three birds: pH triggered transformation of aminopyronine and iminopyronine based lysosome targeting viscosity probe for cancer visualization [J]. *Anal Chem*, 2021, 93: 1786-1791.
- [30] Pal K, Kumar P, Koner AL. Deciphering interior polarity of lysosome in live cancer and normal cells using spectral scanning microscopy [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2020, 206: 111848.
- [31] Liang Z, Sun Y, Duan R, et al. Low polarity-triggered basic hydrolysis of coumarin as an AND logic gate for broad-spectrum cancer diagnosis [J]. *Anal Chem*, 2021, 93: 12434-12440.
- [32] Song W, Zhang W, Yue L, et al. Revealing the effects of endoplasmic reticulum stress on ferroptosis by two-channel real-time imaging of pH and viscosity [J]. *Anal Chem*, 2022, 94: 6557-6565.
- [33] Podder A, Joseph MM, Biswas S, et al. Amphiphilic fluorescent probe self-encored in plasma to detect pH fluctuations in cancer cell membranes [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2021, 57: 607-610.
- [34] Ge J, Zhang K, Fan L, et al. Novel long-wavelength emissive lysosome-targeting ratiometric fluorescent probes for imaging in live cells [J]. *Analyst*, 2019, 144: 4288-4294.
- [35] Shi R, Huang L, Duan X, et al. Selective imaging of cancer cells with a pH-activatable lysosome-targeting fluorescent probe [J]. *Anal Chim Acta*, 2017, 988: 66-73.
- [36] Lin B, Fan L, Zhou Y, et al. A benzothiazolium-based fluorescent probe with ideal  $pK(a)$  for mitochondrial pH imaging and cancer cell differentiation [J]. *J Mater Chem B*, 2020, 8: 10586-10592.
- [37] Kim SY, Podder A, Lee H, et al. Self-assembled amphiphilic fluorescent probe: detecting pH-fluctuations within cancer cells and tumour tissues [J]. *Chem Sci*, 2020, 11: 9875-9883.
- [38] Xu D, Li Y, Poon CY, et al. A zero cross-talk ratiometric two-photon probe for imaging of acid pH in living cells and tissues and early detection of tumor in mouse model [J]. *Anal Chem*, 2018, 90: 8800-8806.
- [39] Wang J, Liu H, Wu M, et al. Water-soluble organic probe for pH sensing and imaging [J]. *Talanta*, 2019, 205: 120095.
- [40] Li Z, Yu C, Chen Y, et al. A novel water-soluble fluorescent probe with ultra-sensitivity over a wider pH range and its application for differentiating cancer cells from normal cells [J]. *Analyst*, 2019, 144: 6975-6980.
- [41] Chakraborty S, Joseph MM, Varughese S, et al. A new pentacyclic pyrylium fluorescent probe that responds to pH imbalance during apoptosis [J]. *Chem Sci*, 2020, 11: 12695-12700.
- [42] Niu H, Zhang Y, Tang J, et al. A bifunctional fluorescent sensor for CCCP-induced cancer cell apoptosis imaging [J]. *Chem Commun (Camb)*, 2020, 56: 12423-12426.
- [43] She ZP, Wang WX, Jiang WL, et al. Accurate fluorescence diagnosis of cancer based on sequential detection of hydrogen sulfide and pH [J]. *Anal Chem*, 2021, 93: 11826-11835.
- [44] Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2018, 80: 50-64.
- [45] Wang Y, Wang X, Zhang L, et al. A ratiometric fluorescent probe for detecting the endogenous biological signaling molecule superoxide anion and bioimaging during tumor treatment [J]. *J Mater Chem B*, 2020, 8: 1017-1025.
- [46] Gao M, Zhang X, Wang Y, et al. Sequential detection of superoxide anion and hydrogen polysulfides under hypoxic stress *via* a spectral-response-separated fluorescent probe functioned with a nitrobenzene derivative [J]. *Anal Chem*, 2019, 91: 7774-7781.
- [47] Liu J, Liang J, Wu C, et al. A doubly-quenched fluorescent probe for low-background detection of mitochondrial  $H_2O_2$  [J]. *Anal Chem*, 2019, 91: 6902-6909.
- [48] Wang M, Zhang F, Wang CQ, et al. Target-binding accelerated response for sensitive detection of basal  $H_2O_2$  in tumor cells and tissues *via* a dual-functional fluorescence probe [J]. *Anal Chem*, 2022, 94: 5962-5969.
- [49] Liu C, Li Z, Yu C, et al. Development of a concise rhodamine-formylhydrazine type fluorescent probe for highly specific and ultrasensitive tracing of basal HOCl in live cells and zebrafish [J]. *ACS Sens*, 2019, 4: 2156-2163.
- [50] Chen W, Li G, Chen C, et al. Aggregation-enhanced emission enables phenothiazine coumarin as a robust ratiometric fluorescent for rapid and selective detection of HClO [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2020, 228: 117724.
- [51] Wu L, Qi S, Liu Y, et al. A novel ratiometric fluorescent probe for differential detection of  $HSO_3^-$  and  $ClO^-$  and application in cell imaging and tumor recognition [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2021, 413: 1137-1148.
- [52] Chen L, Wu X, Yu H, et al. An edaravone-guided design of a rhodamine-based turn-on fluorescent probe for detecting hydroxyl radicals in living systems [J]. *Anal Chem*, 2021, 93: 14343-14350.
- [53] Li M, Gong X, Li HW, et al. A fast detection of peroxynitrite in living cells [J]. *Anal Chim Acta*, 2020, 1106: 96-102.
- [54] Wang W, Xiong J, Song X, et al. Activatable two-photon near-infrared fluorescent probe tailored toward peroxynitrite *in vivo* imaging in tumors [J]. *Anal Chem*, 2020, 92: 13305-13312.
- [55] Li Z, Lu J, Pang Q, et al. Construction of a near-infrared fluorescent probe for ratiometric imaging of peroxynitrite during tumor progression [J]. *Analyst*, 2021, 146: 5204-5211.
- [56] Zhang H, Liu J, Liu C, et al. Imaging lysosomal highly reactive oxygen species and lighting up cancer cells and tumors enabled by a Si-rhodamine-based near-infrared fluorescent probe [J]. *Biomaterials*, 2017, 133: 60-69.