吲哚七甲川类荧光探针在生物体应用的研究现状

楚宁宁 冯成亮 吉民*

(东南大学化学化工学院 南京 211189)

摘要 菁染料是一种商品化的近红外荧光染料,其光谱范围位于近红外区域,此光谱区域内生物基体光吸收或荧光强度较小,因此利用菁染料对生物体进行成像,可以降低背景干扰。吲哚七甲川菁染料是一类具有代表性的菁染料,其由吲哚杂环、七甲川链和 N-取代基侧链组成,由于具有溶解性好,最大吸收波长可调,摩尔消光系数大等优良的光学性质,被广泛用于肿瘤靶向治疗、蛋白标记、痕量金属离子检测等生物方面。以吲哚七甲川为母体,通过向母体中引入活性基团或改变它们的结构,使探针具有不同的功能,这已成为生物领域荧光成像的研究热点。分别从检测金属阳离子、pH 变化、小分子和靶向标记肿瘤细胞、蛋白质等方面综述了近年来用于生物体荧光成像的吲哚七甲川类荧光探针的研究进展,其中也对荧光探针在生物体内(模型)分布、光学成像及代谢方面进行了介绍,最后讨论了这类荧光探针存在的问题及发展趋势。

关键词 吲哚七甲川; 荧光; 探针; 生物; 应用

Advances in Applications of Fluorescent Probes Based on Indole Heptamethine *in Vivo*

Chu, Ningning Feng, Chengliang Ji, Min*

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Southeast University, Nanjing 211189)

Abstract Cyanine dye is a commercially available near-infrared fluorescent dye, its spectral range is in the near infrared region, in this spectrum, absorption or fluorescence intensity of biological sample is very small, so applied cyanine dye to image living body can reduce background interference. Indole heptamethine fluorescent probes which are representative of cyanine dyes are consisted of indole heterocycle, heptamethine and N-substituted side chains. They are widely used for targeted cancer therapy, labling protein, detecting of metal cations and other biological aspects because of their excellent photophysical properties like good solubility, tunable maximum absorption wavelength, large molar extinction coefficient. Based on the structure of indole heptamethine, introducing reactive groups to the parent compounds or changing their structures can make fluorescent probes have different functions like labeling protein and tumour, detecting intracellular metal cations, which has become the hotspot in the field of fluorescence imaging of biological research. Therefore in this paper, the recent progress in the field of applications of indole heptamethine based fluorescent probes for detecting metal cations, changes of pH, molecules and imaging cancer, protein *in vivo* are reviewed. Besides, the distribution, imaging results and metabolism of probes *in vivo* (model) have also been elaborated. The biological application trends and problems of this kind of fluorescent probes are also discussed in the end.

Keywords indole heptamethine; fluorescent; probe; biological; application

1 引言

荧光探针是一种广泛使用的荧光标示剂(又称为荧光染料),它提供了比传统的同位素检测更实用、更安全的标记方法,具有检测速度快、重复性好、用样量少、无辐射且可实现测序的实时、在线、计算机处理等优点。在抗体免疫分析、疾病诊断、抗癌药物分析等方面已得到广泛应用。

常用的荧光染料探针主要有吡啶、菲啶类染料,荧光素类、罗丹明类、噻嗪和噁嗪类染料, BODIPY (bomn dipy II omethene dinuoride)染料,二氟烷硼类、二苯乙烯

类、萘酰亚胺类、茆类荧光染料和菁类染料等。其中菁染料以其光谱范围广、摩尔消光系数大、无荧光背景、荧光量子产率高、灵敏度好等特征,正逐步取代传统的荧光标记染料成为新一代标记染料^[1~7]。

吲哚七甲川菁染料是菁染料中应用最广泛的一类染料,最大吸收和发射光谱位于 530~1200 nm 的近红外区域(此光谱范围内,生物样品基体光吸收或荧光强度小,检测时背景干扰低,并且散射光强度与波长的四次方成反比,随波长的增加,拉曼散射迅速减小,散射干扰也大为减少^[8]),是检测生物体内 DNA、蛋白质、核酸、金属离子等的商品化荧光探针的主要品种^[9]。吲哚

* E-mail: minji888@hotmail.com

Received July 1, 2013; published August 14, 2013.

Project supported by National Basic Research 973 Project (No. 2011CB9335073).

项目受国家基础研究 973 (No. 2011CB9335073)资助。

七甲川菁染料由吲哚杂环, 七甲川和 N-取代的侧链组成, 其一般结构如图 1^[9]. 由图 1 中可看出, A 类型结构的吲哚七甲川菁染料相较于 B 类, 结构中多了一个反应位点 R^2 , 其可以使染料在 R^2 处与不同类型的 linker(如对巯基苯胺、对氨基苯酚、硫代丙醇酸、3-巯基丙酸等)反应, 产生游离的氨基, 羧基等, 增加染料的反应位点, 进而扩大了染料及其衍生物的应用范围. 近年来吲哚七甲川在生物领域的应用越来越多, 引起了广大学者的注意, 因此结合本实验小组工作, 本文主要从体内金属离子、pH 变化及小分子检测, 肿瘤细胞及蛋白质靶向成像方面综述了 A 类吲哚七甲川菁染料在生物体内的应用, 为进一步开发研究新型的, 可用于生物领域的染料提供参考和借鉴.

图 1 吲哚七甲川菁染料结构图

Figure 1 Molecular structure of indole heptamethine fluorescent probes

2 金属离子选择性探针

金属离子在人体内含量甚微, 但却有着重要的生物功能: Ca^{2+} 是组成骨髓中羟基磷灰石的主要成分, 参与血液凝固、肌肉收缩、神经递质的合成与释放等^[10]; Mg^{2+} 是细胞内酶的辅助因子和内部结构的稳定剂, 参与能量代谢、糖代谢、遗传信息的传递和表达等^[11]; 铜离子是人体必需的金属元素, 参与基因的表达和酶的催化反应等^[12]; 锌离子广泛参与细胞生长发育及基因转录、金属酶催化和神经传递等生命过程^[13,14]; 体内金属离子过多或过少都将导致人体正常生理功能的紊乱, 引起各种各样的疾病^[15], 一些重金属离子(如 Pb^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} 等)在很低的浓度时就对生物体具有极强的毒性^[16]; 铜离子与一些神经退行性疾病有关, 如门克斯、阿尔茨海默氏病等^[17]; 汞离子可被转化为甲基汞, 而甲基汞则会导致急性或慢性的神经系统方面的疾病^[18]. 因此建立快速准确的检测金属离子的科学系统迫在眉睫.

2000 年 Ozmen 和 Akkaya^[19]报道了一种可以用于检测体内 Ca^{2+} 的近红外荧光探针 1(图 2), 它最大吸收和发射波长分别为 766 和 782 nm. 当探针 1 与游离的螯合剂结合时, 荧光量子产率仅为 0.05, 但与含 Ca^{2+} 化合物结

合时, 量子产率达到 0.12. 且离解常数为 240 nmol/L, 接近细胞内游离的 Ca^{2+} 浓度.

图 2 探针 1 的结构

Figure 2 The structure of probe 1

2008 年 Kiyose^[20]首次设计合成了用于检测 Zn^{2+} 的近红外探针荧光 2(图 3). 探针 2 的最大摩尔消光系数是 $7.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, 有很大的斯托克斯位移. 他们发现若探针结构中氨基的电子密度越低, 则探针最大吸收波长就越长. 当探针 2 中二吡啶甲基胺与锌离子结合时, 二吡啶甲基乙二胺电子密度降低, 从而降低荧光团(三碳菁)中胺的供电子能力, 进而改变探针的最大吸收波长. 实验证实当 Zn^{2+} 浓度较高时, 探针最大吸收波长红移 44 nm. 探针 2 对 Zn^{2+} 具有很高的选择性, 除了 Co^{2+} 和 Cu^{2+} 以外的其他离子, 对 Zn^{2+} 引起的最大吸收波长红移几乎没有影响.

图 3 探针 2 的结构

Figure 3 The structure of probe 2

2006 年 Tang 等^[21]报道了另外一种检测 Zn^{2+} 的荧光探针 3(图 4), 他们用三碳菁和 2 个丙基基团(异丙基可以很容易穿透细胞膜)作为荧光团, DPA (2,3-吡啶甲基胺)作为 Zn^{2+} 螯合剂, 探针 3 对检测 Zn^{2+} 有 20 倍的接通响应. 他们通过把探针 3 与 Zn^{2+} 载体、巨噬细胞结合的实验证实了探针 3 能够穿透细胞, 且对 Zn^{2+} 快速反应.

2011 年 Li 等^[17]报道了用于检测 Cu^{2+} 的荧光探针 4(图 5), 其具有很好的光稳定性, 不易发生光漂白, 最大吸收和激发波长分别位于 750, 800 nm. 当探针 4 与 Cu^{2+} 结合后, 最大激发波长蓝移 30 nm. 探针的荧光强

图4 探针3的结构
Figure 4 The structure of probe 3

度与 Cu^{2+} 的浓度有关: 当 Cu^{2+} 浓度为 $5.0 \mu\text{mol/L}$ 时, 探针的荧光密度(与未结合 Cu^{2+} 时探针4的荧光强度相比)增强十倍, 已结合 Cu^{2+} 的探针其量子产率(0.11)要比未结合的(0.016)高6倍. 探针4对 Cu^{2+} 具有高选择性, 高亲和力, 其余阳离子与探针4结合时, 探针荧光增强作用很微弱, 共存离子的影响也可忽略. 且探针4选择性的结合 Cu^{2+} 的反应可逆.

图5 探针4的结构
Figure 5 The structure of probe 4

探针4在人体肝癌细胞 HepG2 和巨噬细胞 Raw264.7 中很好的成像效果及在海马切片和在斑马鱼的成像实验充分证实了探针4能很好地监测活体内 Cu^{2+} , 具有很好的生物应用前景.

2012年 Li 等^[22]报道了一种肉眼可视的, 选择性检测 Fe^{2+} 的荧光探针5(图6所示), 它以三碳菁为荧光团, 4-(氨甲基苯基)-2,2,6,2-三联吡啶(Tpy)作为 Fe^{2+} 受体, 在模拟的生理条件下(40 mmol/L HEPES, $\text{pH } 7.4$), 其最大激发和发射波长分别是 648 和 750 nm , $\Phi=0.07$, 在生理 pH 范围内性质较稳定.

图6 探针5的结构
Figure 6 The structure of probe 5

探针5具有低细胞毒性, 且对阳离子 Fe^{2+} 有高度选择性, 把探针应用于 HL-7702 细胞(人肝细胞株)和 HepG2 细胞(人肝细胞肝癌细胞株), 来检测细胞内 Fe^{2+} 的变化. 实验结果显示探针能穿透细胞膜, 在细胞质中累积, 能实时检测细胞中 Fe^{2+} 浓度的变化. 充分说明探针5在检测生物系统中 Fe^{2+} 方面有较好的应用前景.

Tang 等^[18]研发了可用于检测 Hg^{2+} 荧光探针6(图7所示), 其最大激发和发射波长分别是 $685, 763 \text{ nm}$, 荧光量子密度为 0.02 . 当探针与汞离子结合时, 随 Hg^{2+} 浓度增大, 荧光密度增大, 但当 Hg^{2+} 浓度增大到 1 equiv. 时, 荧光密度不再增加. 探针荧光强度受基底 pH 的影响较大, 但当 pH 为 $7.00 \sim 7.80$ 时, 探针的荧光密度较高且不受 pH 的影响.

图7 探针6的结构
Figure 7 The structure of probe 6

向 HepG2 细胞和 5 d 斑马鱼中注射探针6, 可通过荧光显微镜实时监测两者摄取 Hg^{2+} 的情况, 这说明探针6可以用于生物样品中 Hg^{2+} 的检测, 有助于扩展金属离子荧光探针在生物方面的应用.

Zhu 等^[23]曾报道了用于检测汞离子的近红外可视化探针7(图8所示). 当采用分析法滴定 Hg^{2+} 时, 染料颜色由蓝色变成无色, 结合了汞离子后的探针7, 其最大吸收波长红移 122 nm , 且探针7对汞离子有高度选择性.

图8 探针7的结构
Figure 8 The structure of probe 7

Gd^{3+} 复合物一般是无法穿透细胞的, 经常分布在细胞外. 通常使 Gd^{3+} 复合物连接可穿透细胞的多肽使其进入细胞内, HIV-1 TAT 多肽是使 Gd^{3+} 复合物细胞内化的常用多肽.

Yamane 等^[24]利用近红外荧光团结合蛋白质及 Gd^{3+} 螯合剂合成了近红外荧光探针8(图9). 探针8可以进入活体细胞, 在溶酶体和线粒体中聚集. 为了进一步探索

图9 探针8及其衍生物的结构^[23]

Figure 9 Structures of probe 8 and its derivatives

Gd^{3+} 复合物化学结构与细胞穿透力之间的关系, 他们又合成了探针8的衍生物探针9~14(图9).

分别把探针8和探针9~10与细胞一起培养并通过荧光显微镜观察成像结果. 探针9观察不到荧光, 探针10~13的细胞摄取度比探针8低, 探针11和13(含有羰基)的细胞穿透度比探针10和探针12(无羰基基团)要低, 探针14比探针8有更高的荧光密度, 且细胞穿透力最强. 这些结果说明阴离子化合物细胞穿透力效率要低, 而疏水基团和非阴离子结构有助于 Gd^{3+} 复合物穿透细胞.

探针14由于具有PEG链, 有助于提高细胞穿透力及水溶性, 是最佳可穿透细胞的MRI造影剂, 为进一步开发MRI造影剂打下基础.

Yang等^[25]以三碳菁为基础, 合成了两种近红外荧光探针15和16(图10), 它们的吸收和激发波长都位于近红外区域, 两个探针对 Cd^{2+} 都有很好的选择性和敏感性, 尤其是探针16, 既能从中性缓冲溶液, 也可以从含有其他离子的 Tris-HCl 溶液中检测出 Cd^{2+} .

探针15能够从 Tris-HCl (12.5 mmol/L 溶液, 乙腈/水, 9/1, V/V, 含有 0.05 mmol/L 磷酸钠溶液, pH 7.2) 检测出 Cd^{2+} . 细胞内的成像实验显示它们均可应用于生物成像.

血清中 Li^+ 的浓度超过 1.6 meq/L(每升摩尔离子浓

图10 探针15和16的结构

Figure 10 The structure of probe 15 and 16

度单位)时, 心脏血管、中枢神经系统、神经肌肉和肾脏都有可能受到损伤. 人体对 Li^+ 的承受极限是 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$. Tarazi 和 Choi 等^[26]所合成的染料17(图11所示)对 Li^+ 的检测极限为 $7.43 \times 10^{-2} \text{ ppb}$. 这类探针还可以用于检测其它金属离子, 如 ppb 级的 Pb, Cd 离子和低于 ppb 级的 K^+ 等.

Ting 等^[27]用硼酸盐阱与近红外荧光基团结合合成了新型荧光探针18(图12), 并首次把这种探针应用于标记 Lymphoseek (technetium Tc 99m tilmanocept), 这种检

图 11 探针 17 的结构
Figure 11 The structure of probe 17

测方法比目前使用的 SLN(受体特异性前哨淋巴结)造影剂,如非靶 $[^{99m}\text{Tc}]$ 硫胶体和异硫蓝及三期目标配体 $[^{99m}\text{Tc}]$ SPECT Lymphoseek counterpart 要优越, ^{18}F 与 NIRF 探针简易结合会促进更多协同作用的 PET 与 NIRF 结合。

图 12 探针 18 的结构
Figure 12 The structure of probe 18

2011 年 Smith 等^[28]报道荧光探针 19(图 13),可用于对细胞凋亡进行成像。他们在由离子载体、乙醇、氯胺酮造成的肌病体内模型中注射荧光探针 19,通过荧光显微镜可在肌肉损伤位点观察到有荧光吸收,而用 NIR 荧光探针 20(图 13 所示)与膜联蛋白 V 结合的对比实验中,肌肉损伤的位点并没有强烈的吸收,只在膀胱处大量累积,荧光基团 20 也只是在肝脏和肠处观察到。注射探针 19 的动物比对照 20 和活体膜联蛋白 750 的活体显示出更高的 T/NT(靶物质-T, 非靶物质-NT)。24 h 后,探针 19 在由离子载体产生的组织损伤中的 T/NT 是 5.97 ± 0.42 ,由乙醇产生的是 4.15 ± 0.25 ,氯胺酮则是 2.83 ± 0.09 。而注射荧光探针 20 的对照小鼠在受损伤的组织位点几乎无吸收。而且与已上市的 Annexin-

Vivo750 相比,探针 19 能产生更高的 T/NT 比。

Leevy 等^[29]发现荧光分子探针中含有锌离子与吡啶甲酰胺结合的基团(Zn-DPA)能选择性标记细菌细胞和凋亡的动物细胞。他们曾报道探针 19 可以用于动物体内细菌感染的标记及荧光成像。

生物体内荧光显微法对探针 19(最大吸收峰 794 nm,最大发射峰 810 nm)标记细菌的研究表明,探针 19 选择性在裸鼠大腿肌肉的细菌感染位点累积,能有效的标记细菌细胞的周边。相反,相同条件下,细胞不能被探针 21(图 13)标记,这证实 Zn-DPA 组合在标记细菌细胞中是必要的。

图 13 探针 19, 20, 21 的结构
Figure 13 The structure of probe 19, 20 and 21

3 pH 敏感型荧光探针

细胞 pH 在细胞活动中起着重要的作用, 受体介导的信号传输, 酶活性, 细胞生长和死亡离子运输进而内稳态, 钙调节, 内吞作用, 趋药性和细胞粘附等都与细胞 pH 有关. 正常生理条件下, 细胞外 H^+ 浓度保持在很窄的范围内, 正常值是 40 nmol/L (pH 7.40), 约有 5 nmol/L 的变化 (pH 7.35~7.45). 若有 0.10~0.20 pH 单位的误差, 就能引起心肺和神经系统的疾病(如老年痴呆症), 更大的 pH 变化将是致命的. 因此 H^+ 变化是生物体内最主要研究的目标之一.^[30]

Tang 等^[30]设计合成了 pH 敏感型探针 **22**(图 14), 它以三碳菁作为荧光团, 4'-(氨甲基苯基)-2,2',6,2''-三联吡啶作为受体, 最大激发和发射波长分别是 648 和 750 nm. pH 滴定法显示探针 **22** 能检测接近生理 pH 值附近 pH 微小的波动.

图 14 探针 **22** 的结构
Figure 14 The structure of probe **22**

研究表明探针 **22** 溶液对光和空气是稳定的, 对 H^+ 具有高度选择性, 能够有效地避免生物自身产生的荧光干扰, 可用于监测细胞内 pH 微小的变化.

Myochin 等^[31]在含有二胺基团的氨基菁染料的基础上, 设计合成了新型的具有不同 pK_a 的近红外荧光 pH 探针(图 15). 在酸性条件下这些 pH 探针的最大吸收波长红移 46~83 nm, 且反应可逆. 探针的 pK_a 可以通过计算二胺基团的 pK_a 来预测.

Lee 等^[32]报道的近红外荧光染料 **28**(图 16), 在酸性介质中的最大吸收波长位于近红外区域, 当在碱性介质中, 波长蓝移至可见光区, 且这种变化可逆.

当 $pH > 6$ 时, 探针 **28** 在 800 nm 处观察不到荧光, 相反 $pH < 6$ 时, 观察到很强的荧光. 利用探针的这个性质可以使体内酸性组织间质中精氨酸产生荧光.

随后他们把探针 **28** 与 ABIR 连接(在肿瘤细胞中过量表达的 RGD 肽对 ABIR 有很强的亲和力), 合成了染料 **29**(图 17), 进行肿瘤靶向成像. 向接种乳腺癌的老鼠中注射探针 **29**, 通过荧光显微镜可观察到小鼠体内荧光信号随时间逐渐增强, 肿瘤细胞区域的信号在注射

图 15 氨基染料及其衍生物的结构
Figure 15 Structures of aminocyanines derivatives

图 16 探针 **28** 的结构
Figure 16 The structure of probe **28**

4 h 后信号更强, 并一直持续到注射后 24 h. 且在其中一只老鼠的肺中检测出转移的癌症细胞 (≈ 1 mm),

T1/luc(乳腺癌)肿瘤高转移到肺. 说明探针 **29** 可对早期和转移性癌细胞进行成像, 对转移性癌细胞有高灵敏性和特异性.

图 17 探针 **29** 的结构
Figure 17 The structure of probe **29**

Xing 等^[33]以三碳菁为基础设计合成了 pH 敏感的近红外荧光聚合物药物输送系统(NIRF DDS), 如图 18^[33].

图 18 pH 敏感的近红外荧光聚合物药物输送系统
Figure 18 Endocytosis of the NIRF prodrug micelle and its subsequent pH triggered drug release

中性条件下, 刚开始的 30 h 内, 药物释放速度很慢, 80 h 内, 药物释放量不足 40% (37%); 酸性条件下, 能明显观察到酸催化下药物释放加速. 整个时间范围内都能观察到快速和持续的药物释放, 80 h 时间周期下, 释放药物量为 80%.

细胞注射 NIRF 前药聚合物后, NIRF 前药在整个细胞内分布, 信号强度在 1~8 h 内逐渐增强. 在细胞核中未检测到染料的荧光信号, 表明聚合物基体不能进入细胞核.

培养 72 h 后, 在细胞质中几乎观察不到药物信号,

表明 NIRF 前药断裂出来的药物分子几乎被转移到细胞核, 而聚合物基体仍留在细胞质中.

实验证明这种材料可以作为治疗诊断试剂, 可将化合物用于癌症前期诊断及治疗, 使癌症危险降低.

4 小分子敏感型荧光探针

人体的 NO 是通过 *L*-精氨酸向 *L*-瓜氨酸转化生成的, 是生物体内很重要的信号传导分子, 许多疾病与 NO 信号的减损有关.

Sasaki 等^[34]在有氧条件下, 通过 NO 把二胺转化成三唑, 使 *O*-邻苯二胺体系供电子能力产生变化, 设计合成了检测 NO 的近红外荧光探针 **30** 和 **31**(图 19, 相应的三唑化合物称作 **30-T** 及 **31-T**), 三唑化合物的荧光量子产率比二唑化合物高出 14 倍.

图 19 NO 荧光探针的结构和光化学性质
Figure 19 Structures of NIR NO probes

小鼠体内实验证明探针 **30** 和 **31** 与 NO 的反应迅速, 且体内成像效果受生物基质的影响小, NO-荧光探针可用于细胞内与生物体内成像.

细胞内的单线态氧(¹O₂), 是一种生物体内氧化剂, 能氧化不同种类的生物分子, 如蛋白质、DNA、脂肪等, 导致退化性疾病或破坏癌症治疗中的恶性细胞, 而且单线态氧还与细胞信号传导及诱导基因表达有关.

Johnson 等^[35]报道称具有穿透性阳离子的荧光探针能选择性地活体细胞线粒体中累积.

Xu 等^[36]合成的探针 **32** 是针对线粒体中单线态氧的, 因为线粒体是活性氧的主要来源. 探针 **32**(图 20)与 ¹O₂ 的作用具有迅速, 高灵敏, 选择性特点. 巨噬细胞中

的实验证明探针 **32** 能有效地阻止生物系统本身的荧光干扰, 能可视化细胞内单线态氧, 拥有低毒和优越的光稳定性. 这种探针可以广泛地应用于活体细胞及组织中的 $^1\text{O}_2$ 的检测、成像.

图 20 探针 **32** 的结构

Figure 20 The structure of probe **32**

活性氧(ROS)是重要的信号分子, 能调节众多生理功能, 但是过量的 ROS 可以导致氧化性应激, 诱导疾病, 如心血管疾病, 神经系统疾病等. 因此对体内 ROS 的成像, 对研究疾病的病理有着十分重要的作用.

Oushiki 等^[37]发现菁染料与 ROS 的反应与它们的氧化电势相关, 可以通过修饰它们的化学结构来控制氧化电势, 并以此为基础设计了近红外荧光探针 **33**(图 21), 探针 **33** 由两种菁染料相连接组成, 这两种染料与 ROS 反应活性不同. 探针 **33** 能检测生理学上范围较广的 ROS, 可以在腹膜炎的小鼠内对氧化应激成像.

图 21 探针 **33** 的结构

Figure 21 The structure of probe **33**

众所周知, H_2O_2 和 H_2S 是生物体内小分子信号传输者, 在生理和病理过程中起着至关重要的作用.

2013 年 5 月 Zhu 等^[38]报道了一类可通过荧光比率变化进行检测小分子的三碳菁荧光探针 **34** 及 **35**(图 22), 其可以用于检测体内 H_2O_2 和 H_2S 分子. 探针 **34** 在 H_2O -DMSO (9 : 1, $V:V$, 10 mmol/L HEPES, 100 mmol

NaCl, pH=7.4)中最大吸收和激发波长分别是 785, 808 nm; 探针 **35** 在 H_2O -CH₃CN (8 : 2, $V:V$, 40 mmol/L HEPES, pH 7.4)中的最大吸收和激发波长与 **34** 相近.

图 22 探针 **34** 及 **35** 的结构

Figure 22 The structures of probe **34** and **35**

当探针 **34** 结合 H_2O_2 (300 $\mu\text{mol/L}$)时, 其最大吸收波长蓝移 140 nm, 光谱范围蓝移 61 nm, 荧光强度从 0.15 变为 3.4; 当 H_2O_2 的浓度较低时(30 $\mu\text{mol/L}$), 探针 **34** 也会显示出明显的荧光比率的变化, 且探针 **34** 对 H_2O_2 有高度的选择性, 当溶液中有其他 ROS(活性氧)及 RNS(活性 N)时均不会产生明显的荧光比率变化.

当探针 **35** 与 H_2S (4 mmol/L)结合时, 荧光范围的变化情况与 **34** 相似, 荧光强度从 0.16 变化至 2.9; 当探针 **35** 与低浓度的 H_2S (0.4 mmol/L)结合时, 也可观察到明显的荧光比率的变化; 当溶液中有其他负离子, ROS, RNS, RSS(活性硫化物)等时, 探针 **35** 对 H_2S 仍具有高度选择性. 且两种荧光探针对生理范围内的 pH 下都是稳定的. 分别把两种探针应用于成纤维细胞 NIH 3T3 中检测 H_2O_2 和 H_2S , 实验结果表明两种探针都能很好用于生物体内检测 H_2O_2 和 H_2S 分子.

内源性过氧亚硝基(ONOO^-)是生物体内的强氧化剂, 是多种疾病的生物学致病因素, 如心血管疾病, 神经退行性疾病和炎症等. 细胞内源性 GSH(谷胱甘肽)是 GSH 是最丰富的内源性硫醇, 主要以还原剂的状态存在于 GSH/GSSG 摩尔比为 100 : 1 (GSH 的二硫化物)的氧化还原平衡中. 而 ONOO^- 可明显干扰 GSH/GSSG 的比值, 产生不可逆转的伤害^[39]. 因此有必要对体内 ONOO^- 和 GSH 之间的氧化还原状态进行实时的检测.

2013 年 5 月 Yu 等^[39]报道了可用于实时检测体内 ONOO^-/GSH 平衡的七甲川染料 **36**(图 23). 其在模拟生理条件下(50 mmol/L PBS pH 7.4, 10 $\mu\text{mol/L}$)下的最大吸收和激发波长分别是 793 和 820 nm.

图 23 探针 **36** 的结构及其转换成相应氧化物的反应机理

Figure 23 The structure of probe **36** and proposed reaction mechanism of its oxidized product

当探针与 ONOO^- (10 $\mu\text{mol/L}$)结合时, 荧光信号增强, 10 min 内荧光信号变化就会达到饱和状态; 探针与 ONOO^- 有高度选择性, 在生理条件下由其他可被 GSH 还原的离子所产生的荧光信号的变化与 ONOO^- 产生的变化都比较弱, 且这种变化可逆.

接着利用小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 来测试探针在细胞中与 ONOO^- 的作用. 结果显示探针 **36** 可用于细胞中 ONOO^- 的检测. 且细胞毒性实验显示探针 **36** 具有低细胞毒性.

以上结果表明荧光探针 **36** 可用于检测细胞和生物体内 ONOO^- 浓度的变化.

5 标记肿瘤细胞型探针

恶性肿瘤严重威胁着人类的生命和健康, 全世界每年死于恶性肿瘤的患者达数百万之多, 约占总死亡人数的 1/4. 恶性肿瘤一直以来都是生物医学领域研究的主要课题之一^[40].

恶性肿瘤细胞与正常细胞相比糖酵解率增高, 这是因为肿瘤细胞中葡萄糖载体(GLUTs)过量表达. 利用这些生理代谢方面的差异进行成像, 可鉴别癌症细胞及肿瘤细胞.

Vendrell 等^[41]以此为基础合成的新型 NIR 荧光葡萄糖衍生物 **37**(图 24), 在癌症细胞株的吸收率比在初级纤维细胞的高, 与已上市的 IRDye 800CW 2-DG(应用于癌症细胞近红外区域成像, 图 24)相比, 荧光探针 **37** 对癌症细胞的标记能力更强.

图 24 探针 **37** 及 IRDye 800CW 2-DG 的结构

Figure 24 The structure of probe **37** and IRDye 800CW 2-DG

叶酸受体(folate receptor, FR)在许多癌细胞都有过量表达, 如卵巢癌、子宫癌、肾癌、结肠癌、肺癌及其他一些癌症. 叶酸作为叶酸受体的高亲和配体, 成为肿瘤成像和治疗的理想靶点. Liu 等^[42]用聚二乙二醇(PEG)将叶酸和有机染料 ICG-Der-01 连接合成荧光探针 folate-PEG-ICGDer-01 probe(FPI-01), 如图 25 所示. 研究测定其细胞毒性和对肿瘤细胞的亲和力及在不同肿瘤模型裸鼠中的肿瘤靶向能力. 结果显示此探针与 FR 有高亲和力, 且无明显细胞毒性, 在体内由肾经尿排泄, 对肿瘤有高灵敏度, 在 FR 阳性肿瘤的诊断尤其是早期诊断有巨大的潜力.

邓大伟等^[43]以三碳菁 **38** 为基础合成了近红外有机荧光探针 LDL-**38**(图 26), 它以低密度脂蛋白(LDL)受体为靶点. LDL-**38** 探针的荧光强度及光稳定性高于对应的染料单体(探针 **38**). 探针 LDL-**38** 既能保持 LDL 的生物活性, 有效地靶向到相关肿瘤部位, 清晰成像, 又在一定程度上提高了探针的光稳定性.

LDL-**38** 探针经静脉注入到裸鼠体内后, 5 min 时在肿瘤下侧的小瘤块及肝脏部位有较明显的荧光信号, 并且信号同样可以持续较长时间(5 min~12 h). 36 h 后 LDL-**38** 探针能基本从体内清除. 与小分子靶点相比, LDL 是纳米粒子, 尺寸大, 并有疏水性的内核. 因此, LDL 不仅可以作为靶向配体, 而且还可同时作为药物

图 25 探针 FPI-01 的结构

Figure 25 The structure of probe FPI-01

图 26 探针 38 的结构

Figure 26 The structure of probe 38

载体进行使用, 预示着 LDL-38 探针可能会对新生肿瘤有更好的诊断效果^[43].

腺病毒(Ad)作为载体治疗疾病的方法占基因疗法实验的四分之一^[44], 其优点有: 不会把它们的染色体组镶嵌到宿主染色体组中; 腺病毒不能自身复制; 与其他病毒载体相比, 具有低致免疫性和低毒, 与非病毒类载体相比, 腺病毒感染能力强。

由于腺病毒衣壳更倾向于与大分子结合, 通常利用腺病毒作为运输造影剂和药物的载体. 血清 5 腺病毒(摘除 E1/E3 的腺病毒 5, Ad.5)是常用的基因转移载体^[45].

研究表明腺病毒受体(CAR)是决定腺病毒载体靶向能力的决定性因素, 为了扩大 Ad 对低 CAR 表达的肿瘤细胞的靶向性, Shan 等^[46]把 FA(叶酸)与 Ad.5 衣壳共价结合, 再与 ICG-Der-02 结合, 合成了 FA-Ad-ICG-02 探针(图 27), 并进行活体成像. 体外实验观察的现象与体内一致, 荧光探针首先分散在所有器官中, 然后逐渐移至肝脏, 在 4 h 左右, 集中在肾脏及肠胃消化系统处, 然后通过尿和废渣排出系统. 在低感染计量时, FA-Ad-ICG02 能选择性杀死 CAR 及 FA 阳性癌症细胞, 对正常细胞没有明显的毒性, 高计量的 FA-Ad-ICG02 也不会对正常组织引起损害. 因为 ICG-Der-02 是 ICG 的衍生物, Ad 能选择性感染某些特殊细胞, 对无 Ad 受体的细胞无感染性, 因此 FA-Ad-ICG02 探针对所有正常细胞是无毒的。

通过近红外荧光成像检测 FA-Ad-ICG02 对不同肿瘤细胞的靶向性, 结果显示探针对于 CAR 或高度表达的 FR 的肿瘤细胞有很强的靶向性. 因此用配体 FA 修饰的 Ad 近红外荧光探针用于诊断治疗癌症有很大的潜力。

Chen 等^[47]合成了两种近红外菁染料 39 和 40, 如图 28 所示. 染料 40 没有显示出肿瘤选择性, 它快速从肿瘤和皮肤清除。

图 27 与叶酸 FA 及腺病毒 Ad 及 ICG-Der-02 结合的探针 FA-Ad-ICG-02 的结构

Figure 27 The structure of probe FA-Ad-ICG-02 consisted by FA, Ad and ICG-Der-02

而把探针 **39** 注射到皮下接种 RIF 肿瘤的老鼠体内 24 h 后, 经荧光显微镜观察, 探针其在肿瘤中的细胞摄取度远大于在皮肤中. 注射 24~48 h, 肿瘤细胞中药物的摄取度持续增加, 而在皮肤中的吸收度没有变化. 在注射 48 h 后, 药物在肿瘤细胞中的浓度开始降低, 至 72 h 后, 在皮肤中的浓度可以忽略, 但在肿瘤细胞中的浓度还相对较高. 这类菁染料能进一步改善分子的药代动力学, 能快速的从皮肤排出, 消除长期皮肤光毒性(许多卟啉光敏剂的缺点).

图 28 探针 **39** 及 **40** 的结构

Figure 28 The structures of probe **39** and **40**

uMUC-1 (Underglycosylated mucin-1 tumor antigen) 是多种肿瘤早期特征之一, 在几乎所有人类上皮细胞腺癌中过量表达, 包括 90% 以上的乳腺癌, 卵巢癌, 胰腺癌, 结肠癌, 肺癌, 前列腺癌, 胃癌等; MUC-1 在非上皮癌症细胞株(星型细胞瘤, 黑色素瘤, 神经母细胞瘤, 血液恶性瘤如多发性骨髓瘤和一些 B-细胞非霍奇金淋巴瘤等人类 50% 以上的癌症)的表达也有报道.

靶向 uMUC-1 抗原的缩氨酸(EPPT 缩氨酸)由治疗人上皮癌细胞的单克隆抗体的 CDR3V_α 区域衍生而来, 它的序列已知(AREPPTRTFAYWG). Pham 等^[48]利用染料 **41** 与 EPPT 缩氨酸结合合成探针 **42**, 如图 29 所示.

体内注射探针 **42**, 10 h 后在肿瘤细胞中观察到强烈的 NIR 荧光信号, 荧光信号持续 24 h, 且肿瘤细胞中的

图 29 探针 **41** 和与 EPPT 缩氨酸结合的探针 **42** 的结构

Figure 29 The structure of probe **41** and **42** connected with EPPT

荧光密度很高, 明显区别于背景荧光. 对离体肿瘤和肌肉组织成像时, 在肿瘤细胞中观察到强烈的 NIR 信号, 但是在肌肉组织中几乎没有信号, 相比之下, 注射相同剂量的未结合 EPPT 缩氨酸的染料 **41**, 则在肿瘤中观察不到信号. 探针 **42** 可成功用于检测表达 uMUC-1 抗原的肿瘤细胞.

Yang 等^[49]将 NIR 荧光染料 **43**(图 30)尾静脉注射前列腺癌、胰腺癌等移植瘤动物模型、转移动物模型和自发性肿瘤转基因动物模型, 染料在肿瘤区域都有较好的荧光信号, 甚至能灵敏地监测到血液中癌细胞的表达.

图 30 探针 **43** 的结构

Figure 30 The structure of probe **43**

Shi 等^[50]发现了无需化学偶联能在肿瘤细胞中 780 nm 下 NIR 成像的近红外荧光探针 IR-780(图 31). 与小分子非靶向性的有机染料吡啶菁绿(ICG)不同, 通过静脉或腹腔注射此染料, 能特异的在肿瘤细胞内聚集, 而未结合的染料迅速通过循环系统排出, 其在肿瘤组织和周围正常对照组织荧光信号比超过 20(一般比值达到 2.5). 而且这些染料在体内非常稳定且没有毒害, 在肿瘤组织中可稳定表达 2 周以上, 可以对肿瘤区域重复成像, 持续监测肿瘤发展及转移变化.

田迎等^[51]建立人肺癌细胞系 NCI-H460、结肠癌细胞系 HCT-116 及鼠源肝癌细胞系 Hepa1-6 皮下移植瘤三种裸小鼠模型, 未接种癌细胞的裸小鼠作对照. 尾静脉

IR-780

图 31 探针 IR-780 的结构

Figure 31 The structure of probe IR-780

注射同等剂量染料 IR-808, 分别在不同时间点对裸小鼠正常组织及肿瘤组织进行近红外荧光成像, 追踪探针在裸小鼠体内的分布, 探究其肿瘤靶向作用. 结果在未接种的裸小鼠体内, IR-808 染料首先在肝脏、心脏聚集, 随后信号减弱, 48 h 后基本代谢排出体外; 在肿瘤裸小鼠模型体内, IR-808 染料注入 24 h 后开始靶向肿瘤, 72 h 后荧光信号仍很稳定; 取肿瘤裸小鼠组织进行近红外荧光成像, 发现仅肿瘤组织有信号, 其他组织无信号. 全部实验小鼠状态良好, 未见明显毒性反应. 近红外荧光染料 IR-808 能特异性靶向肿瘤成像, 且信号稳定, 无明显毒性, 具有很好的应用前景.

超小型 Au 纳米簇(Au NCs)是肿瘤成像及治疗非常有潜力的材料, 具有低毒、内荧光、能与多种生物分子形成共价键等优点. 为了改善金纳米簇对高度表达叶酸受体的癌细胞的选择性亲和性, Chen 等^[52]把叶酸固定在金纳米簇的表面(Au-FA NCs), 并与近红外荧光染料 MPA 结合合成荧光探针 Au-FA-MPA(图 32)进行体内和体外荧光成像. 细胞和体内毒性实验研究显示: Au-FA-MPA 对正常细胞组织是低毒的; 对 Au-FA-MPA 的动态行为及靶向能力的研究表明, Au-FA-MPA 对高度表达 FR 的肿瘤细胞有高度的选择性亲和性. 配体修饰的金纳米簇对肿瘤成像和治疗有更高的潜力.

恶性肿瘤的一个显著的特点是厌氧, 不同实体瘤的厌氧程度影响恶性肿瘤对常规照射、化学治疗和其他非外科方式治疗的反应. 因此, 研发对肿瘤非侵入式成像

非常有必要.

Youssif 等^[53]合成的用于对恶性肿瘤进行非侵入性成像的探针 44(图 33), 其激发和发射波长分别是 785 和 802 nm, 量子产率为 0.05.

体外, 向胰腺癌细胞注射探针 44 后, 低氧细胞中的荧光强度比常氧细胞中的荧光强度高. SUI-2/HRE-Luc 细胞能稳定携带 5HRE 荧光酶, 荧光酶受体基因由 HIF(缺氧诱导因子)控制, HIF-1 α 的表达只在厌氧条件下能检测到. 向肿瘤小鼠中注射探针 44, 24 h 后在 HIF-1 α 活性厌氧细胞中观察到生物荧光. 说明肿瘤中的探针 44 与厌氧有关. 但是肿瘤中 44 的荧光信号在注射 6 h 后, 在肿瘤中积累明显下降, 迅速消失, 说明探针 44 荧光在厌氧肿瘤中不稳定, 会快速从体内清除.

把药物镶嵌到纳米颗粒中不仅能有效地抑制药物与血液作用还能降低其在生物系统中非特异性累积(会引起明显的毒性).

Xing 等^[54]把抗癌药阿霉素装入 NIRF 凝胶的多肽核心, 形成 NIRF 前体药物 45(图 34). 当体内谷胱甘肽(GSH)为 10 mmol/L 时, NIRF 前体药释放速度加快, 借助 NIRF 标记可以直接通过成像观察到被释放的药物分子紧接着被转移到细胞核而 NIRF 凝胶还留在细胞质, NIRF 凝胶及 NIRF 前体药在有肿瘤的裸鼠体内分布显示尾部静脉注射 24 h 后两者在肿瘤细胞中聚集. NIRF 前体药对癌症治疗有很大的潜力.

6 蛋白标记类荧光探针

人体转铁蛋白受体(TfR)是一类跨膜糖蛋白, 几乎存在于所有哺乳动物中, 负责体内铁的运输. 因此 Tf/TfR(转铁蛋白/转铁蛋白受体)系统已被用于诊断和治疗. 例如, Tf 可与白喉毒素、CRM107(一种用于治疗脑肿瘤的化疗治疗剂)结合, 或与氧化铁单晶纳米粒子(MION)结合, 用于 MRI 检测基因表达.

图 32 探针 Au-FA-MPA 的结构

Figure 32 The structure of probe Au-FA-MPA

图 33 探针 44 的结构

Figure 33 The structure of probe 44

图 34 NIF 前体药物纳米凝胶 45 的结构

Figure 34 The structure of NIR Nanogel 45

Pham 等^[55]报道的 NIR820 适用于一切反应条件, 它的激发和发射波长分别是 793 和 826 nm, 利用 TfR 设计合成 NIR820-Tf(图 35). NIR820-Tf 与肿瘤细胞培养 1 h 后, 在胶质肉瘤细胞中初步观察到荧光, 表明 NIR 标记的 Tf 被受体摄入. 而且 NIR820-Tf 标记不会阻碍细胞对 Tf 的吸收, 而未结合 Tf 的 NIR820 不能穿透细胞膜, 进而从体内清除. NIR820 化学性质稳定, 适合固相缩氨酸合成及蛋白质标记.

整合蛋白 $\alpha\beta_3$ 受体在多种肿瘤细胞和肿瘤血管上皮细胞中大量表达而在正常组织中不表达, 所以整合蛋白 $\alpha\beta_3$ 受体可作为近红外荧光探针的靶点. Houston 等^[56]分别用 IRDye800 和放射性同位素 ^{111}In 标记整合蛋白 $\alpha\beta_3$, 形成特异性结合的肽, 并将其用于对黑色素瘤检测, 结果发现, 近红外光学显影在浅表组织中的分辨率和放射显影相似. 在深层组织中前者的信噪比更高, 表明近红外技术在深层肿瘤组织成像有助于肿瘤诊断且有良好的应用前景.

图 35 探针 NIR820-Tf 的结构

Figure 35 The structure of NIR820-Tf

程红等^[8]使用不带活性基团的水溶性近红外七甲川花菁染料结合血清总蛋白, 以 20 mmol/L, pH 4.0, AcOH-AcONa 体系为最佳缓冲介质, 近红外七甲川花菁染料浓度为 6.0×10^{-6} mol/L 时, 得到体系对蛋白质的检出限为 50 $\mu\text{g/L}$, 检测的线性范围为 100~1900 $\mu\text{g/L}$. Baars 等^[57]利用七甲川花菁染料 46(图 36)作为多肽标记试剂, 经电泳分离、激光诱导荧光检测分离了 6 种多肽, 其检出限为 100~300 zmol.

图 36 探针 46 的结构
Figure 36 The structure of probe 46

张娜娜等^[58]合成的三种近红外荧光探针 47~49(图 37), 其在甲醇中的最大吸收波长均为 782 nm, 最大发射波长分别为 818, 816, 818 nm; 摩尔吸光系数分别为 2.93×10^5 , 2.95×10^5 , 3.02×10^5 L·mol⁻¹·cm⁻¹; Stokes shifts 分别为 36, 34, 36 nm. 在血清中的最大吸收波长分别为 795, 796, 798 nm; 最大发射波长分别为 826, 811, 809 nm. 探针 47 在血清中发射荧光的强度最强, 且与探针 48, 49 比较, 最大发射波长红移最大, 探针 47 在血清中的荧光强度显著高于 48, 49.

图 37 探针 47, 48, 49 的结构
Figure 37 The structures of probe 46, 47 and 48

探针 47 经尾静脉注射后立即成像, 在肝脏的荧光最强, 其次是脾、肺、肾的分布较多. 此外还发现小鼠的粪便有较强的荧光信号, 推测染料 47 可以通过胆汁分泌进入肠道随粪便排出体外. 以上结果说明探针 47 可用于体内组织器官的近红外显像, 有望成为生物医学成像研究的新型显影剂.

MMPs 是一组依赖锌离子的蛋白酶, 能降解细胞外基质(ECM)和其他细胞外蛋白质. 不活泼的蛋白酶原 MMPs 被分泌到细胞外或细胞膜, 需要通过水解去除前肽区域, 使活性位点暴露在催化区域, 进而激活 MMPs. 许多 MMPs 在人类多种肿瘤细胞中过分表达, 这些

MMPs 包括: MMP-2(白明胶酶 A)和 MMP-9 (白明胶酶 B). 过度表达 MMP-2 和 MMP-9 的癌症包括乳腺癌, 结肠癌, 前列腺癌, 胃癌等. MMP-2 的过度表达与黑色素瘤的发展有关, 但是在皮肤的正常组织中很难观察到 MMP-2 的表达.

Akers 等^[59]报道了一种可用于检测体内与癌症有关的 MMPs 的新型可激活 NIR 荧光探针 LS276-THP(近红外荧光探针 LS276 结构如图 38 所示), 它以三螺旋肽(THP)为基础(THP 相较于其他 MMP 系列化合物, 对 MMP-2 和 MMP-9 有高度选择性), 每 5 kDa 肽链的中心是对白明胶酶敏感的序列, 其侧面是连接 NIR 荧光染料的赖氨酸残基, 三股螺旋结构自行组装后, 3 条肽链相互缠绕, 致使荧光团极为贴近, 产生荧光猝灭, 降低荧光强度; 三螺旋肽被 MMPs 水解激活后, 释放 6 条标记的肽链, 使荧光信号增强, 探针的荧光产率增大 3.8 倍.

图 38 探针 LS276 的结构
Figure 38 The structure of probe LS276

向接种人类纤维肉瘤移植瘤的小鼠体内注射 LS276-THP, 结果肿瘤的荧光信号比肌肉中的荧光信号增强 5 倍. 注射 MMP 抑制剂 Ilomastat 后, 信号强度减弱. LS276-THP 适用于体内检测与肿瘤有关的 MMP-2 和 MMP-9.

Samanta 等^[60]报道了具有光稳定的 NIR 三碳菁染料 50 和 51, 如图 39 所示. 通过光稳定性分析, 染料 51 的乙酰基基团能降低染料的光降解. 在染料 51 的基础上合成的 CyNA-414, 它比吲哚菁绿(ICG)具有更好的光稳定性, 且研究表明 CyNA-414 可应用于体内蛋白质的荧光标记.

Pham 等^[61]报道了一种检测 MMP-7 蛋白酶(其在胰腺癌、结肠癌、乳腺癌等多种肿瘤细胞中过量表达)活性的新型染料 52, 如图 40 所示, 它由 NIRQ820 (ex/em790/820 nm)与 Cy5.5 通过蛋白酶多肽链相结合构成. 探针在体内的初始信号低, 一旦与目标化合物(MMP-7)结合, 探针的荧光信号增强 7 倍, Kcat/Km 值可达到 $100000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

7 其他近红外荧光探针

Zhang 和 Achilefu^[62]合成了以吲哚菁绿和半乳糖为基础的 NIR 荧光分子探针 53(图 41), 其结构中含有

图 39 探针 50 和 51 的结构

Figure 39 The structure of probe 50 and 51

图 40 探针 52 的结构

Figure 40 The structure of probe 52

多个羟基, 有助于增强探针的水溶性, 也有助于降低探针在水溶液中的聚集, 可标记不同的分子提供多个反应位点. 结构框架中的环形结构, 非离子的羟基基团和许多活性功能团使探针有着各种不同的化学和生物方面的应用.

图 41 探针 53 的结构

Figure 41 The structure of probe 53

Hilderbrand 等^[63]合成了一系列近红外荧光染料 54~57, 如图 42. 含有烷基-硫醚的 54 在 PBS 中的最大吸收波长 807 nm, 最大激发波长 839 nm, 它和染料 55 一样在 PBS 中没有染料聚集现象, 与结构相似的染料 55 相比, 吸收和发射区间分别红移 30 nm 和 27 nm.

在 DPBS 缓冲液中, 与噬菌体结合的染料 55 吸收区间从 777 nm 红移至 798 nm. 染料 56 吸收和最大激发波长大于 800 nm, 且在水溶液中不聚集. 染料 55 与 VHS

噬菌体结合, 可对血管细胞粘附分子调节的细胞内化噬菌体成像.

我们小组^[64]也合成了一系列七甲川菁染料 58~60(图 43). 三种染料的最大吸收和激发波长均在近红外区域.

Lenkinski 等^[65]报道的荧光染料 Pam78(图 44), 可用于对羟基磷灰石微钙化进行成像.

注射羟基磷灰石悬浮液的肿瘤细胞与 Pam78 培养后, 可在每个肿瘤细胞中观察到强烈的 NIR 荧光, 且信噪比大于 4, 血液的光渗透非常高; 在未注射羟基磷灰石悬浮液的肿瘤细胞中则观察不到任何荧光. Pam78 有可能选择性地用于乳腺癌中羟基磷灰石的微小钙化的检测^[61].

在脊椎动物中, 骨骼的成长与完整性需要成骨细胞的羟基磷灰石(HA)沉淀物, 羟基磷灰石沉淀物也会导致癌症及动脉粥样硬化的形成. 目前生物体内成骨细胞的活性位点只能用 γ 射线放射性同位素成像的方法来检测, 扫描所需时间长, 且成像结果分辨率低.

Zaheer 等^[66]报道称 Pam78 可对体内 HA 进行成像. 并进行了活体实验: 静脉注射 Pam78, Pam78 迅速的在体内分布, 在体内有很强的近红外荧光, 1 min 内也达到最大血药浓度, 其在体内代谢的速度很快, 早期和晚期的半衰期分别是 5.0, 15.4 min. 当 Pam78 从体内清除后, 成骨细胞的活动区域变的可见. 注射后 15 min, 在脊

图 42 染料 54~57 的结构

Figure 42 The structure of probe 54~57

椎、肋骨、爪和膝盖处能观察到 Pam78 的荧光, 3 h 后, 大部分骨结构都可见. Pam78 为高分辨率成像检测 HA 提供了可能.

2011 年 Zhang 等^[67]报道, 可将 IR-780(图 45)与干细胞共培育, 被 IR-780 标记的干细胞经静脉转移至小鼠体内后, 通过对整个生物体进行 NIR 成像, 能观察到干细胞在肺部迁移. 相似的, 用 IR-780 预处理的 SNP(硝普酸钠, 血管扩张剂)能显著降低细胞在肺中被捕获, 使细胞通过肺毛细血管迁移. 这些证实荧光染料 IR-780

图 43 染料 58~60 的结构

Figure 43 The structures of probe 58~60

图 44 探针 Pam78 的结构

Figure 44 The structure of probe Pam78

可用于干细胞标记, 并检测其在生物体内迁移.

8 总结及展望

吡啶七甲川菁染料的应用范围非常广泛, 但目前主要的研究方向是利用近红外荧光染料对生物体进行成像. 研究者可以通过向染料结构中引入不同的基团, 改

图 45 探针 IR-780 的结构

Figure 45 The structure of probe IR-780

变染料分子骨架,使其具有不同的功能。尤其现在人们对肿瘤的研究一直方兴未艾,利用近红外荧光探针肿瘤进行靶向定向或治疗成了近几年的热点。但吖啶七甲川也存在着一些不足,如种类不多,产率低,纯化困难,对光、热、化学性质不太稳定^[68];或染料自身无细胞毒性,但与生物物质结合后毒性较大等。因此研究开发具有化学性质稳定,良好光稳定性,低细胞毒性及高度生物相容性等特点的近红外荧光探针将成为荧光染料在未来几年发展的新趋势。

作者简介

楚宁宁,东南大学化学化工学院硕士,目前在苏州东南药物研发有限责任公司实习。

吉民,东南大学化学化工学院教授、博士生导师、东南大学制药工程研究所所长,东南大学化学化工学院制药工程系主任。江苏省“青蓝工程”学术带头人培养对象、江苏省“333工程”培养对象、教育部优秀教师奖励计划资助对象。

References

- [1] Fei, X.-N.; Liu, L.-J.; Zhang, B.-L.; Shi, B.-J.; Yao, K.-D. *Prog. Chem.* **2006**, *18*, 801. (费学宁, 刘丽娟, 张宝莲, 石博杰, 姚康德, 化学进展, **2006**, *18*, 801.)
- [2] Yang, Z.-G.; He, Y.-X.; Dai, B.; Dou, B.-R.; Wang, J.-Y.; Peng, X.-J. *Acta Chim. Sinica* **2011**, *60*, 445. (杨志刚, 和艳霞, 戴彬, 龚柏蕊, 王静云, 彭孝军, 化学学报, **2011**, *60*, 445.)
- [3] Que, S.-L.; Peng, Y.-R.; Zhang, H.; Chen, L.-L.; Huang, L.-S.; Liu, J.-S.; Chen, K.-Z.; Wu, S.-Y. *Acta Chim. Sinica* **2011**, *69*, 731. (阙寿林, 彭亦如, 张宏, 陈莉莉, 黄丽珊, 刘建生, 陈奎治, 吴松一, 化学学报, **2011**, *69*, 731.)
- [4] Gao, L.-H.; Zhang, J.-F.; Sun, Q.-L.; Wang, K.-Z. *Acta Chim. Sinica* **2012**, *70*, 441. (高丽华, 张金凤, 孙庆玲, 王科志, 化学学报, **2012**, *70*, 441.)
- [5] Chen, X.-Y.; Guo, L.; Zheng, C.-G.; Gao, H.-Y.; Wang, H.-J.; Zhang, D. *Chin. J. Org. Chem.* **2012**, *32*, 1445. (陈秀英, 郭琳, 郑昌戈, 高海燕, 王海军, 张丹, 有机化学, **2012**, *32*, 1445.)
- [6] Wang, Z.-Y.; Wang, R.-Y.; Fu, N.-Y. *Chin. J. Org. Chem.* **2011**, *31*, 415. (王振宇, 王如勇, 傅南雁, 有机化学, **2011**, *31*, 415.)
- [7] Kang, Q.; Fan, F.-L.; Bi, W.-B.; Huang, Y.; Fu, Y.-L.; Wang, L.-Y. *Chin. J. Org. Chem.* **2012**, *32*, 567. (康琼, 范芳丽, 毕渭滨, 黄怡, 付义乐, 王兰英, 有机化学, **2012**, *32*, 567.)
- [8] Yu, K.-C.; Jin, L.; Cheng, H. *Chin. J. Synth. Chem.* **2004**, *1*, 38. (俞开潮, 金玲, 程红, 合成化学, **2004**, *1*, 38.)
- [9] Men, J.-F.; Cheng, H.-F.; Chen, Z.-H.; Chu, Z.-Y. *Mater. Rev.* **2008**, *22*, 4. (门金凤, 程海峰, 陈朝辉, 楚增勇, 材料导报, **2008**, *22*, 4.)
- [10] Wei, L. *Scientific Information* **2011**, *27*, 145. (韦磊, 科技信息, **2011**, *27*, 145.)
- [11] Liu, J.-X. *Journal of Jiangxi College of Education (Nature Science)*, **2001**, *22*, 44. (刘金香, 江西教育学院学报(自然科学), **2001**, *22*, 44.)
- [12] Boening, D. W. *Chemosphere* **2000**, *40*, 1335.
- [13] Da Silva, J. J. R. F.; Williams, R. J. P. *The Biological Chemistry of the Elements: The Inorganic Chemistry of Life*, Oxford University Press, New York, **2001**, p. 575.
- [14] Tang, Y.-Y.; Luo, C.-H.; Wu, Z.-Y.; Shen, G.-L.; Yu, R.-Q. *Acta Chim. Sinica* **2007**, *65*, 1229. (唐友云, 罗春花, 吴朝阳, 沈国励, 俞汝勤, 化学学报, **2007**, *65*, 1229.)
- [15] Sun, H.-Z.; Chen, R.; Zhi, Z.-M. *Prog. Chem.* **2002**, *14*, 257. (孙红哲, 陈嵘, 支志明, 化学进展, **2002**, *14*, 257.)
- [16] Sun, W.; Hu, D.-Y.; Wu, Z.-B.; Song, B.-A.; Yang, S. *Chin. J. Org. Chem.* **2011**, *31*, 997. (孙伟, 胡德禹, 吴志兵, 宋宝安, 杨松, 有机化学, **2011**, *31*, 997.)
- [17] Li, P.; Duan, X.; Chen, Z.-Z.; Liu, Y.; Xie, T.; Fang, L.-B.; Li, X.-R.; Yin, M.; Tang, B. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 7755.
- [18] Tang, B.; Cui, L.-J.; Xu, K.-H.; Tong, L.-L.; Yang, G.-W.; An, L.-G. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1159.
- [19] Ozmen, B.; Akkaya, E. U. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 9185.
- [20] Kiyose, K.; Kojima, H.; Nagano, T. *Chem. Asian J.* **2008**, *3*, 506.
- [21] Tang, B.; Huang, H.-H.; Xu, K.-H.; Tong, L.-L.; Yang, G.-W.; Liu, X.-L.; An, L.-Q. *Chem. Commun.* **2006**, (34), 3609.
- [22] Li, P.; Xiao, H.-H.; Tang, B. *Chin. J. Chem.* **2012**, *30*, 1992.
- [23] Zhu, M.; Yuan, M.-J.; Liu, X.-F.; Xu, J.; Lv, J.; Huang, C.-S.; Liu, H.-B.; Li, Y.-L.; Wang, S.; Zhu, D.-B. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1481.
- [24] Yamane, T.; Hanaoka, K.; Muramatsu, Y.; Tamura, K.; Adachi, Y.; Miyashita, Y.; Hirata, Y.; Nagano, T. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 2227.
- [25] Yang, Y.-Y.; Cheng, T.-X.; Zhu, W.-P.; Xu, Y.-F.; Qian, X.-H. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 246.
- [26] Tarazi, L.; Choi, H.; Christian Mason, J.; Sowell, J.; Strekowski, L.; Patonay, G. *Microchem. J.* **2002**, *72*, 55.
- [27] Ting, R.; Aguilera, T. A.; Crisp, J. L.; Hall, D. J.; Eckelman, W. C.; Vera, D. R.; Tsien, R. Y. *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 1811.
- [28] Smith, B. A.; Gammon, S. T.; Xiao, S.; Wang, W.; Chapman, S.; McDermott, R.; Suckow, M. A.; Johnson, J. R.; Piwnica-Worms, D.; Gokel, G. W.; Smith, B. D.; Leevy, W. M. *Mol. Pharmaceutics* **2011**, *8*, 583.
- [29] Leevy, W. M.; Gammon, S. T.; Jiang, H.; Johnson, J. R.; Maxwell, D. J.; Jackson, E. N.; Marquez, M.; Piwnica-Worms, D.; Smith, B. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16476.
- [30] Tang, B.; Yu, F.-B.; Li, P.; Tong, L.-L.; Duan, X.; Xie, T.; Wang, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3016.
- [31] Myochin, T.; Kiyose, K.; Hanaoka, K.; Kojima, H.; Terai, T.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 3401.
- [32] Lee, H.; Akers, W.; Bhushan, K.; Bloch, S.; Sudlow, G.; Tang, R.; Achilefu, S. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 777.
- [33] Xing, T.; Yang, X.-Z.; Wang, F.; Bin, L.; Yan, L.-F. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 22290.
- [34] Sasaki, E.; Kojima, H.; Nishimatsu, H.; Urano, Y.; Kikuchi, K.; Hirata, Y.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3684.
- [35] Johnson, L. V.; Walsh, M. L.; Bockus, B. J.; Chen, L.-B. *Cell Biol.* **1981**, *88*, 526.
- [36] Xu, H.-X.; Wang, L.-L.; Qiang, M.-M.; Wang, L.-Y.; Li, P.; Tang, B. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 7386.
- [37] Oshiki, D.; Kojima, H.; Terai, T.; Arita, M.; Hanaoka, K.; Urano, Y.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2795.
- [38] Zhu, D.-J.; Li, G.-P.; Xue, L.-H.; Jiang, H. *Org. Biomol. Chem.* **2013**,

- 11, 4577.
- [39] Yu, F.-B.; Li, P.; Wang, B.-H.; Han, K.-L. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 7674.
- [40] Zhang, Y.; Meng, X.; Qin, D.-W.; Zhang, J.; Liu, W.-T.; Duan, H.-D. *Chem. Intermed.* **2011**, (1), 15. (张屹, 孟霞, 秦大伟, 张娟, 刘文涛, 段洪东, 化工中间体, **2011**, (1), 15.)
- [41] Vendrell, M.; Samanta, A.; Yun, S.-W.; Chang, Y.-T. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 4760.
- [42] Liu, F.; Deng, X.-Y.; Qian, Z.-Y.; Achilefu, S.; Gu, Y.-Q. *Mol. Imaging Biol.* **2010**, *12*, 595.
- [43] Deng, D.-W.; Liu, F.; Cao, J.; Chen, X.-Y.; Gu, Y.-Q. *Chin. J. Lasers* **2010**, *37*, 2735. (邓大伟, 刘飞, 曹洁, 陈新洋, 顾月清, 中国激光, **2010**, *37*, 2735.)
- [44] Ravi, S.; Kostas, K. *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 220.
- [45] Dash, R.; Dmitriev, I.; Su, Z.-Z.; Bhutia, S. K.; Azab, B.; Vozhilla, N.; Yacoub, A.; Dent, P.; Curiel, D. T.; Sarkar, D. *Cancer Gene Ther.* **2010**, *17*, 447.
- [46] Shan, L.-L.; Xue, J.-P.; Guo, J.; Qian, Z.-Y.; Samuel, A.; Gu, Y.-Q. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 567.
- [47] Chen, Y.-H.; Gryshuk, A.; Achilefu, S.; Ohulchansky, T.; Potter, W.; Zhong, T.-X.; Morgan, J.; Chance, B.; Prasad, P.; Henderson, B. W.; Oseroff, A.; Pandey, R. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1264.
- [48] Pham, W.; Medarova, Z.; Moore, A. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 735.
- [49] Yang, X.-J.; Shi, C.-M.; Tong, R.; Qian, W.-P.; Zhau, H.; Wang, R.-X.; Zhu, G.-D.; Cheng, J.-J.; Yang, V.; Cheng, T.-M. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 2833.
- [50] Shi, C.-M.; Zhang, C.; Su, Y.-P.; Cheng, T.-M. *Lancet Oncol.* **2010**, *11*, 815.
- [51] Tian, Y.; Sun, J.; Wang, J.-D.; Lu, G.-M. *J. Clin. Oncology* **2012**, *17*, 785. (田迎, 孙晶, 王建东, 卢光明, 临床肿瘤杂志, **2012**, *17*, 785.)
- [52] Chen, H.-Y.; Li, S.-L.; Li, B.-W.; Ren, X.-Y.; Li, S.-G.; Mahounga, D. M.; Cui, S.-S.; Gu, Y.-Q.; Achilefu, S. *Nanoscale* **2012**, *4*, 6050.
- [53] Youssif, B. G. M.; Okuda, K.; Kadonosono, T.; Salem, O. I. A. R.; Hayallah, A. A. M.; Hussein, M. A.; Kizaka-Kondoh, S.; Nagasawa, H. *Chem. Pharm. Bull.* **2012**, *60*, 402.
- [54] Xing, T.; Mao, C.-Q.; Lai, B.; Yan, L.-F. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *4*, 5662.
- [55] Pham, W.; Lai, W.-F.; Weissleder, R.; Tung, C.-H. *Bioconjugate Chem.* **2003**, *14*, 1048.
- [56] Houston, J. P.; Ke, S.; Sevick-Muraca, E. M.; Wang, W.; Li, C. J. *Biomes. Opt.* **2005**, *10*, 54010.
- [57] Baars, M. J.; Patonay, G. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 667.
- [58] Zhang, N.-N.; Guo, L.; Luo, S.-L.; Liang, Y.-F.; Qi, Q.-R. *West China J. Pharm. Sci.* **2012**, *27*, 349. (张娜娜, 郭丽, 罗圣霖, 梁玉峰, 齐庆蓉, 华西药科学杂志, **2012**, *27*, 349.)
- [59] Akers, W. J.; Xu, B.-G.; Lee, H.; Sudlow, G. P.; Fields, G. B.; Achilefu, S.; Edwards, W. B. *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 656.
- [60] Samanta, A.; Vendrell, M.; Das, R.; Chang, Y.-T. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7406.
- [61] Pham, W.; Choi, Y.-D.; Weissleder, R.; Tung, C.-H. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 1403.
- [62] Zhang, Z.-R.; Achilefu, S. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2067.
- [63] Hilderbrand, S. A.; Kelly, K. A.; Weissleder, R. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1275.
- [64] Zhou, M.-M. *M.S. Thesis*, Southeast University, Nanjing, **2012**. (周蒙蒙, 硕士论文, 东南大学, 南京, **2012**.)
- [65] Lenkinski, R. E.; Muneeb, M.; Atif, Z.; Frangioni, J. V.; Goldberg, S. N. *Acad. Radiol.* **2003**, *10*, 1159.
- [66] Zaheer, A.; Lenkinski, R. E.; Mahmood, A.; Jones, A. G.; Cantley, L. C.; Frangioni, J. V. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 1148.
- [67] Zhang, C.; Tan, X.; Tan, L.; Liu, T.; Liu, D.-Q.; Zhang, L.-L.; Fan, S.; Su, Y.-P.; Cheng, T.-M.; Zhou, Y.; Shi, C.-M. *Cell Transplant.* **2011**, *20*, 741.
- [68] Wang, X.; Qiu, J.-B.; Yin, Z.-Y.; Song, Z.-G. *First Yunnan Association for Science Annual Conference Proceedings*, **2011**, pp. 114~118. (王雪, 邱建备, 尹兆益, 宋志国, 首届云南省科协学术年论文集, **2011**, pp. 114~118.)

(Qin, X.)