

噻吩基氟硼二吡咯近红外光敏染料的合成、双光子荧光成像及光动力治疗研究

刘巴蒂 王承俊 钱鹰*

(东南大学化学化工学院 南京 211189)

摘要 设计并合成了两种新型噻吩基氟硼二吡咯(Thienyl-BODIPY)近红外光敏染料 ITBDP-1 和 ITBDP-2. 两种光敏染料的吸收和发射波长均达到近红外区, ITBDP-1 的吸收与发射峰分别是 617 nm 和 650 nm; ITBDP-2 的吸收与发射峰分别是 687 nm 和 731 nm. 两种光敏染料均具有较高的单线态氧产率, ITBDP-1 与 ITBDP-2 的单线态氧产率(Φ_{Δ})分别为 51% 和 24%. 通过密度泛函理论(DFT)计算研究了光敏染料激发态下的能量变化, 理论计算表明, ITBDP-1 和 ITBDP-2 在激发至单重态后可通过系间窜越(ISC)到达三重态, 从而提高单线态氧产率. ITBDP-1 和 ITBDP-2 在 A549 细胞内具有良好的荧光成像效果, 并且在 900 nm 激光激发下, ITBDP-1 能够在斑马鱼体内显示出清晰的双光子荧光成像. 单线态氧成像实验证明了光敏染料在光激发下可以在肿瘤细胞和斑马鱼中产生单线态氧. 通过噻唑蓝(MTT)比色法测定了两种光敏染料的光毒性和暗毒性, ITBDP-1 和 ITBDP-2 的最大半抑制浓度(IC₅₀)分别为 2.22 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 2.86 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 并且无光照条件下细胞的存活率在 80% 以上, 证明了两种光敏染料均具有较高的光毒性和良好的生物相容性. ITBDP-1 和 ITBDP-2 可以在近红外光激发下实现荧光成像指导的光动力学治疗, 并且可以实现生物体内的双光子荧光成像, 这一结果也为噻吩基氟硼二吡咯光敏染料在长波激发下的双光子光动力学治疗应用打下了基础.

关键词 近红外光敏剂; 噻吩基氟硼二吡咯; 光动力学治疗; 双光子荧光成像

Synthesis, Two-photon Fluorescence Imaging and Photodynamic Therapy of Near Infrared Thienyl-BODIPY Photosensitizer

Liu, Badi Wang, Chengjun Qian, Ying*

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

Abstract In this paper, two novel thienyl boron dipyrromethene (thienyl-BODIPY) near infrared (NIR) photosensitive dyes, ITBDP-1 and ITBDP-2 were designed and synthesized. The absorption and emission wavelengths of two photosensitizers reach near infrared region. The absorption and emission peaks of ITBDP-1 are 617 and 650 nm while the absorption and emission peaks of ITBDP-2 are 687 and 731 nm respectively. The singlet oxygen yields (Φ_{Δ}) of photosensitizers were determined using 1,3-diphenyliso-benzofuran (DPBF) as singlet oxygen scavenger. The results turned out that two photosensitizers both could generate singlet oxygen under 660 nm light irradiation, and the absorption of DPBF decreased over 50% within 1 min. Φ_{Δ} of ITBDP-1 and ITBDP-2 are 51% and 24% respectively. Excited state energy level of photosensitizers were studied by density functional theory (DFT) calculation. Theoretical calculation indicates that ITBDP-1 and ITBDP-2 can reach triplet state through intersystem crossing (ISC) after being excited to singlet state, thus improving singlet oxygen yield. ITBDP-1 and ITBDP-2 showed satisfying imaging effect in A549 cells, and ITBDP-1 could show distinct two-photon fluorescence in zebrafish under 900 nm excitation. Apart from good cell imaging effect, these two photosensitizers showed abilities to generate reactive oxygen species (ROS) in tumor cells as well. It can be proved that photosensitizers could produce singlet oxygen in tumor cells and zebrafish under light excitation with dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) as ROS indicator. Besides, ITBDP-1 and ITBDP-2 also presented high cytotoxicity under 660 nm light irradiation. In the tetrazolium (MTT) experiment, the maximum half inhibitory concentration (IC₅₀) of ITBDP-1 and ITBDP-2 were 2.22 and 2.86 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ respectively, and the cell viability was over 80% without irradiation, which proved that both photosensitizers possess high phototoxicity and good biocompatibility. ITBDP-1 and ITBDP-2 could realize imaging-guided photodynamic therapy under excitation of NIR light in tumor cells, and displayed two-photon fluorescence imaging *in vivo*. Photosensitizers ITBDP-1 and ITBDP-2 are expected to lay good foundation for the application of thienyl-BODIPY photosensitizers in two-photon photodynamic therapy under NIR excitation.

Keywords near infrared photosensitizer; thienyl-BODIPY; photodynamic therapy; two-photon imaging

* E-mail: yingqian@seu.edu.cn

Received April 1, 2022; published June 16, 2022.

Supporting information for this article is available free of charge via the Internet at <http://sioc-journal.cn>.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 62075039).

项目受国家自然科学基金(No. 62075039)资助.

1 引言

光动力治疗(PDT)是一种新兴的癌症治疗策略,具有无创性、低毒性、应用范围广以及潜在的抗菌特性等优点^[1-2]. 光敏剂在光动力治疗过程中起着重要作用,良好的光敏剂应当具备较高的光稳定性、高单线态氧产率、较好的生物相容性,以及低暗毒性、高光毒性等特点^[3]. 目前,多种类型的光敏剂已被开发出来,包括花菁类光敏剂^[4-5]、氟硼二吡咯类光敏剂^[6-12]、罗丹明类光敏剂^[13]及荧光蛋白类光敏剂^[14-15]等. 在诸多类型的光敏剂中,氟硼二吡咯(BODIPY)由于具有较高的摩尔消光系数、明亮的荧光、优异的光稳定性及较好的生物相容性而被认为是一类理想的光敏染料^[8,16-21]. 2021年,赵建章课题组^[22]报道了一种二溴乙烯基取代的氟硼二吡咯光敏染料,该光敏染料具有较高的单线态氧产率和良好的荧光成像效果,并且在细胞中表现出了较高的光细胞毒性;2022年Wen等^[23]报道了一种8位三苯基膦阳离子取代的氟硼二吡咯光敏剂,这种阳离子型光敏剂表现出了良好的抗菌性能;Yuan等^[24]利用碘代BODIPY光敏剂和两亲性聚合物四苯基卟啉(TPP)的自组装作用,开发了一种近红外光敏染料纳米粒子PBDPI-TPP,增强了光敏剂对肿瘤细胞的通透性. 通过多种设计策略构建的氟硼二吡咯类光敏染料在光动力学治疗领域研究中表现出了较好的效果,如通过材料化方法或引入亲水性基团可以提升光敏染料的生物相容性;在光敏染料结构中引入具有定位功能的基团可以实现光敏染料对生物体内肿瘤细胞及细胞器的定位作用等,增强光敏剂在生物体内的光动力治疗效果. 然而,尽管氟硼二吡咯具有较好的荧光成像能力和光动力治疗效果,这类染料较短的吸收和发射波长成为了限制其进一步应用于生物体内光动力治疗的因素. 使用短波激发会对生物体造成一定损害,同时可能产生生物组织内的自发光现象,不利于细胞内荧光成像,因而开发新型近红外光敏剂具有重要意义. 在光动力治疗中,近红外光敏染料具有更好的光稳定性、更小的背景干扰,可以减少自发光,实现更高的信噪比,并且红光在生物组织中具有更好的穿透性以及较低的损害^[25-29].

本课题组近年来报道了多种类型的氟硼二吡咯光敏染料,包括具有正交结构的给受体(D-A)型吡啶氟硼二吡咯光敏剂^[10]、基于自旋轨道电荷转移系间窜越(SOCT-ISC)的无重原子氟硼二吡咯光敏染料^[12]、具有溶酶体定位效应的氟硼二吡咯光敏剂^[30]等. 本文设计并合成了图式1所示的两种新型噻吩基氟硼二吡咯近红外光敏染料ITBDP-1和ITBDP-2. 在BODIPY的8位引入噻吩基团构建BODIPY母核结构,随后在2,6位引入重原子碘促进分子的系间窜越,并在3,5位引入对羟基苯乙烯基将光敏剂的吸收和发射波长延长至近红外区. 两种近红外光敏剂均具有较好的生物相容性,并且

ITBDP-1在斑马鱼中能够显示出清晰的双光子荧光成像. ITBDP-1和ITBDP-2具有较高的单线态氧产率,在A549细胞内表现出了低暗毒性和高光毒性,可以实现光诱导肿瘤细胞凋亡. 此外,通过密度泛函理论研究了重原子效应和3,5位共轭链延长对光敏染料系间窜越过程的影响,计算了光敏染料在激发态下各能级的能量. 噻吩基氟硼二吡咯近红外光敏染料为新型近红外光敏剂的开发提供了设计策略,并且在光动力学治疗及双光子成像方面具有较大的应用潜力和研究意义.

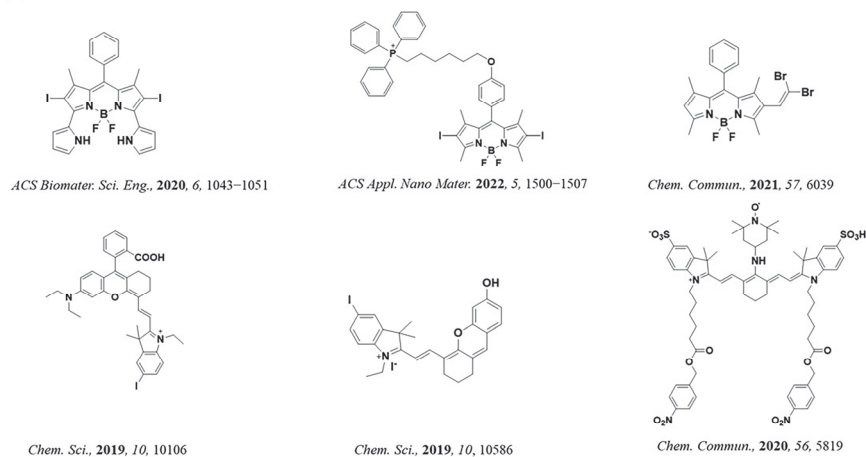
2 结果与讨论

2.1 噻吩基氟硼二吡咯近红外光敏染料的设计合成

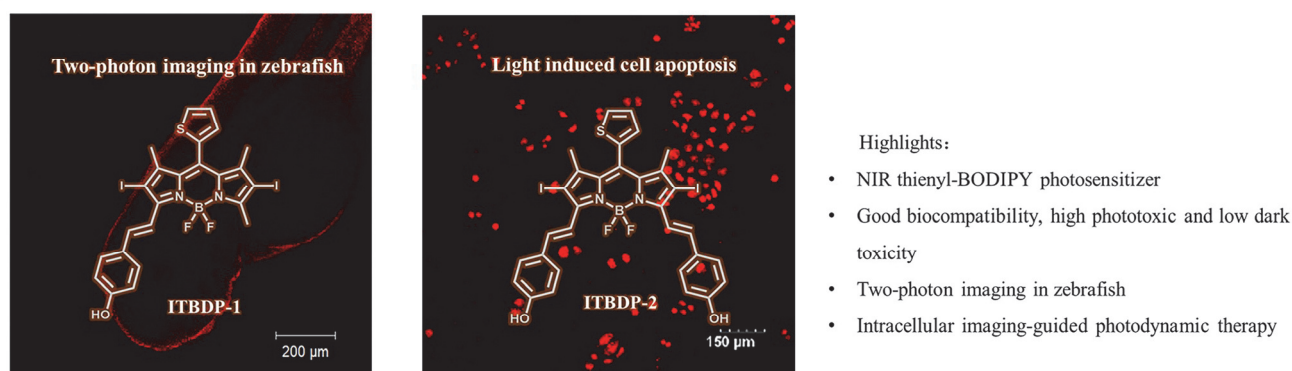
荧光染料的双光子吸收强度与材料的非线性光学系数相关. 研究表明,非线性光学系数主要与HOMO-LUMO能隙 ΔE_g 和基态到激发态的吸收强度有关,此外分子的离域程度、共轭效应和基团给/吸电子能力等也会一定程度上影响双光子吸收. 设计具有较强单光子吸收效果、共轭程度较大的荧光染料可以提高其双光子吸收能力^[31-32]. 噻吩类杂环上的电子云密度较大,相较于苯环体系其共振能较低,并且噻吩中硫原子d轨道参与分子体系共轭会使得化合物的双光子吸收能力增强,因此将噻吩基团引入荧光染料可能会增强其双光子吸收能力^[33-34]. 此外,在含杂原子的芳环中由于孤对电子的存在会促进 $^1(n, \pi^*) \rightarrow ^3(\pi, \pi^*)$ 或 $^1(\pi, \pi^*) \rightarrow ^3(n, \pi^*)$ 跃迁的发生,从而促进单重态到三重态的系间窜越^[35].

基于上述讨论,本文设计并合成了两种噻吩基氟硼二吡咯近红外光敏染料,分别为ITBDP-1和ITBDP-2,两种光敏染料的合成路线如图式2所示. 以噻吩-2-甲醛和2,4-二甲基吡咯为原料,通过一锅法合成了噻吩基氟硼二吡咯TBDP. 随后以N-碘代丁二酰亚胺(NIS)作为碘代试剂,通过自由基反应在TBDP的2,6位引入碘原子,得到ITBDP. 在甲苯中以ITBDP和对羟基苯甲醛为原料,在乙酸/哌啶催化下,通过Knoevenagel缩合反应在不同投料比和反应时间条件下合成了ITBDP-1和ITBDP-2. 目标分子的结构均已通过核磁共振谱及高分辨质谱表征. 理论计算结果表明,在3,5位引入对羟基苯乙烯基能够扩大共轭 π 键的离域程度. 通过图2中ITBDP-1和ITBDP-2的前线轨道电子云分布图可以明显地看到,BODIPY母核与对羟基苯乙烯基通过共轭双键连接后,基态下的电子云能够均匀地分布在整个分子上,由于共轭体系的离域程度增大,ITBDP-1和ITBDP-2的吸收和发射波长红移至近红外区. 在双光子荧光成像实验中,ITBDP-1在900 nm波长光激发下,在斑马鱼体内显示出了明亮的双光子荧光,这一结果表明噻吩基氟硼二吡咯近红外光敏剂可以用于生物体内的双光子荧光成像.

(a) Previous work

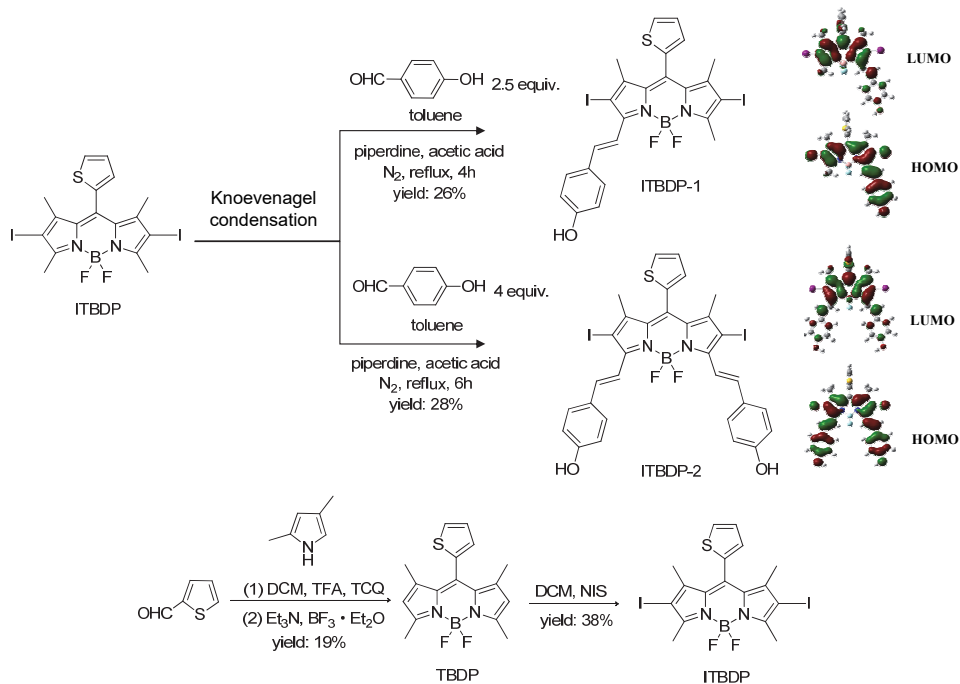


(b) This work



图式 1 (a)已报道的不同类型光敏剂; (b)噻吩基氟硼二吡咯近红外光敏剂 ITBDP-1 和 ITBDP-2 及其成像指导的光动力学治疗

Scheme 1 (a) Different types of reported photosensitizers; (b) NIR photosensitizer ITBDP-1, ITBDP-2 and their imaging-guided photodynamic therapy



图式 2 近红外噻吩基氟硼二吡咯光敏剂 ITBDP-1 和 ITBDP-2 的合成路线

Scheme 2 Synthesis routine of NIR thienyl-BODIPY photosensitizers ITBDP-1 and ITBDP-2

噻吩基氟硼二吡咯光敏染料在二氯甲烷溶液中的紫外-可见吸收和荧光发射光谱如图 1 所示. 相较于短波吸收的 TBDP 和 ITBDP, 共轭链延长后 ITBDP-1 与 ITBDP-2 的最大吸收波长分别红移至 617 和 687 nm, 最大发射波长为 650 和 731 nm. 使用密度泛函理论(DFT)方法对光敏染料的结构进行优化, 结果表明在 BODIPY 的 3,5 位引入的对羟基苯乙烯基和 BODIPY 母核结构共平面, 证明了在共轭链延长的同时光敏染料分子维持了较好的平面性, 有利于形成较大的离域 π 键结构, 吸收和发射波长在此基础上红移至近红外区.

2.2 近红外光激发下噻吩基氟硼二吡咯光敏染料的单线态氧产生与重原子促进的系间窜越

使用亚甲基蓝(二氯甲烷中的单线态氧产率为 0.57)为参比^[36], 用 1,3-二苯基异苯并呋喃(DBPF)作为单线态氧捕获剂, 在 660 nm 波长的光激发下测定了 ITBDP-1 和 ITBDP-2 的单线态氧量子产率 Φ_{Δ} . 如图 2 所示, 在

ITBDP-1 溶液中, DBPF 在 414 nm 处的吸光度在 18.44 s 内由 1.02 迅速下降至 0.49, ITBDP-2 溶液中 DBPF 的吸光度在 14.11 s 内由 0.96 下降至 0.42, 这说明两种光敏染料均能够在 660 nm 光照下产生单线态氧, 同时光敏剂本身的吸收峰基本没有改变, 表明光敏剂具有良好的光稳定性. ITBDP-1 的单线态氧产率测定为 0.51, ITBDP-2 的单线态氧产率测定为 0.24.

表 1 为噻吩基氟硼二吡咯系列化合物的具体的光物理性质数据. 引入碘之后的三种化合物均可以在光照下产生单线态氧, 而 TBDP 在光激发下不能产生单线态氧, 说明碘的重原子效应能够降低单重态和三重态间的能量差, 在降低了化合物荧光强度的同时促进了系间窜越. 另一方面, 随着吸收波长红移, 三种碘代化合物的单线态氧量子产率依次降低: ITBDP 的单线态氧产率为 0.63, ITBDP-1 的单线态氧产率为 0.51, 而 ITBDP-2 的单线态氧产率仅为 0.24.

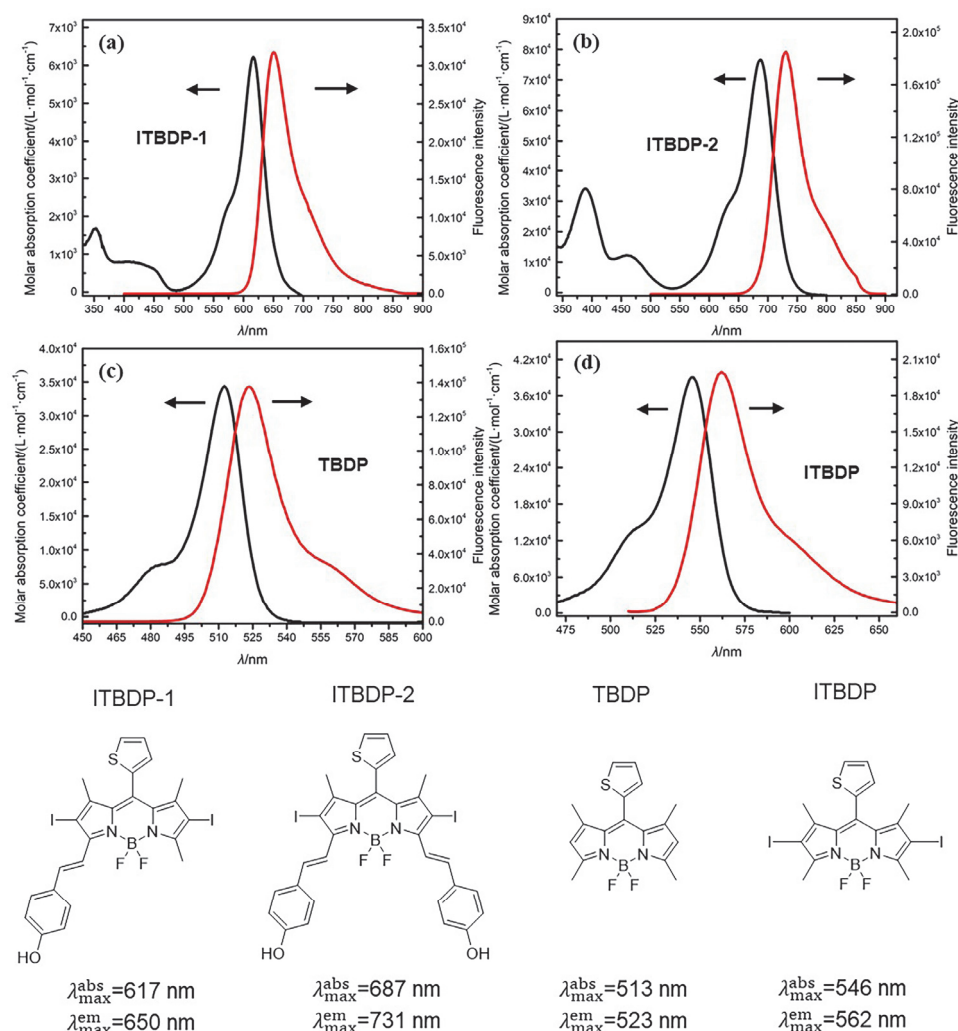


图 1 噻吩基 BODIPY 系列化合物在二氯甲烷中的吸收及发射光谱(浓度均为 $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$). (a) ITBDP-1 的紫外-可见吸收及荧光发射光谱; (b) ITBDP-2 的紫外-可见吸收及荧光发射光谱; (c) TBDP 的紫外-可见吸收及荧光发射光谱; (d) ITBDP 的紫外-可见吸收及荧光发射光谱

Figure 1 The absorption and emission spectra of thienyl-BODIPY compounds in dichloromethane (all concentrations are $10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$). (a) UV-Vis and fluorescence emission spectra of ITBDP-1 ($10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$); (b) UV-Vis and fluorescence emission spectra of ITBDP-2; (c) UV-Vis and fluorescence emission spectra of TBDP; (d) UV-Vis and fluorescence emission spectra of ITBDP

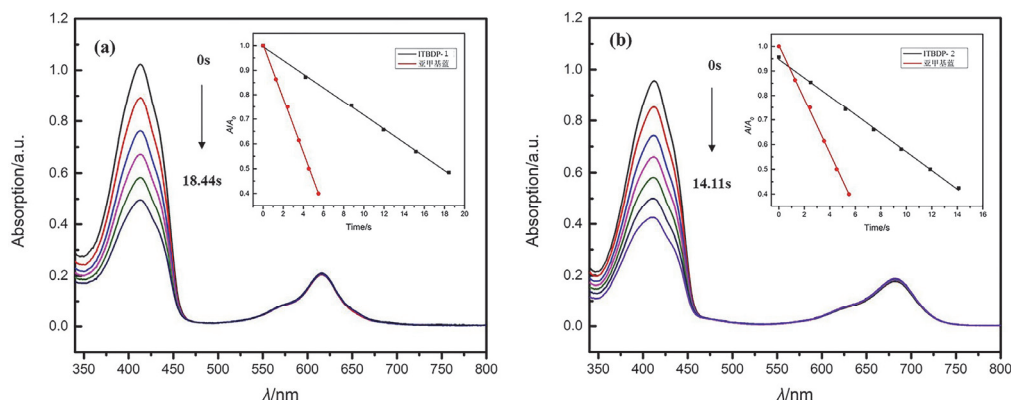


图2 (a) ITBDP-1 溶液中 DPBF 的紫外-可见吸收强度随时间下降示意图及 DPBF 在 ITBDP-1 溶液和亚甲基蓝溶液中 414 nm 处吸光度的(A/A_0)值随时间变化示意图; (b) ITBDP-2 溶液中 DPBF 的紫外-可见吸收强度随时间下降示意图及 DPBF 在 ITBDP-2 溶液和亚甲基蓝溶液中 414 nm 处吸光度的(A/A_0)值随时间变化示意图

Figure 2 (a) Time-dependent plot of UV-Vis intensity of DPBF in ITBDP-1 solution; time-dependent plot of (A/A_0) value of DPBF at 414 nm in ITBDP-1 solution and methylene blue solution; (b) time-dependent plot of UV-Vis intensity of DPBF in ITBDP-2 solution; time-dependent plot of (A/A_0) value of DPBF at 414 nm in ITBDP-2 solution and methylene blue solution

表1 噻吩基氟硼二吡咯系列化合物的光物理性质数据

Table 1 Photophysical properties of thienyl-BODIPY derivatives

Compound	$\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}} / \text{nm}$	$\epsilon_{\text{max}}^{\text{abs}} / (10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$	$\lambda_{\text{max}}^{\text{em}} / \text{nm}$	Φ_{Δ}	$\text{IC}_{50} / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$
ITBDP-1	617	0.62	650	0.51	2.22
ITBDP-2	687	7.60	731	0.24	2.86
TBDP	513	3.50	523	—	—
ITBDP	546	3.90	562	0.63	—

为了进一步阐明光敏剂结构对单线态氧产率的影响, 使用密度泛函理论对噻吩基氟硼二吡咯系列化合物进行了结构优化和激发态能量计算. 所有的计算均采用 Gaussian 09 软件包进行, 使用 DFT//cam-B3LYP/6-31G(d)和 DFT//B3LYP/6-31G(d)/LANL2DZ 对光敏剂分子结构进行优化, 使用 TD-DFT//cam-B3LYP/6-31G(d)或 TD-DFT//B3LYP/6-31G(d)/LANL2DZ 方法计算了不同分子的激发态能量, 结果列于表 S1(见支持信息)中.

ITBDP-1 和 ITBDP-2 的激发态能量计算结果如图 3 所示. 在 ITBDP-1 中, S_1 和 T_1 激发态由 $\text{HOMO} \rightarrow \text{LUMO}$ 跃迁主导, T_3 态由 $\text{HOMO-3} \rightarrow \text{LUMO}$ 主导, S_1 态能量 (2.72 eV) 远高于 T_1 态 (0.98 eV) 而略高于 T_3 态 (2.59 eV) 能量, S_1 和 T_3 态间的 ΔE_{ST} 为 0.13 eV. 系间窜越可以在 S_1 和 T_3 态之间产生, T_3 态通过内转换至 T_1 态后产生单线态氧. 在 ITBDP-2 中, S_1 和 T_1 态为 $\text{HOMO} \rightarrow \text{LUMO}$ 跃迁主导, T_3 态由 $\text{HOMO-1} \rightarrow \text{LUMO}$ 主导, S_1 和 T_3 态间的 ΔE_{ST} 为 0.49 eV, 同样可以发生系间窜越.

噻吩基氟硼二吡咯系列化合物的详细计算数据如表 S1 所示. 结合上述结果可以证明, 重原子碘的引入会引起激发态能级的改变, 使得单重态和三重态间的 ΔE_{ST} 大大减小, 从而促进系间窜越的发生. 随着共轭体系的离域程度增大, 光敏剂的吸收波长出现红移的同时,

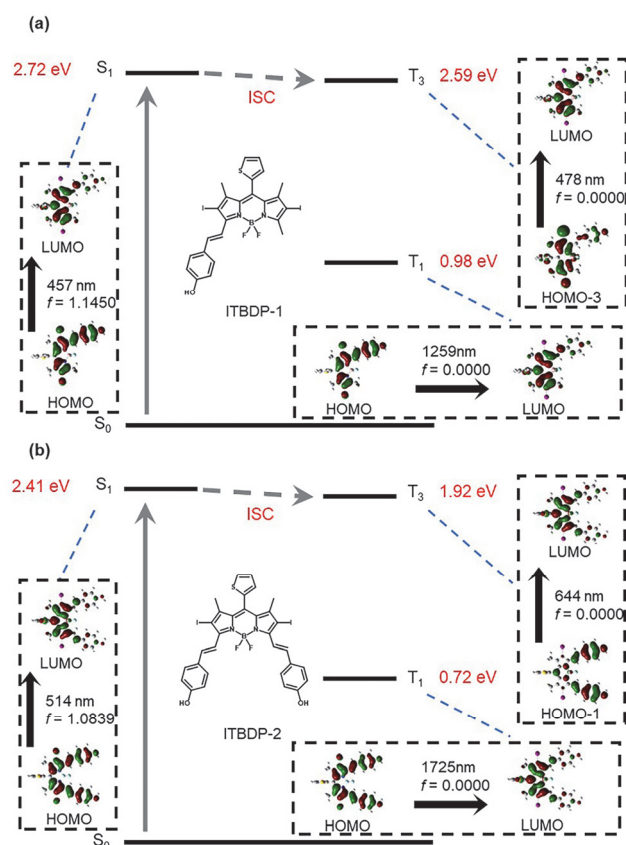


图3 基于 DFT//B3LYP/6-31G(d)和 DFT//B3LYP/6-31G(d)/LANL2DZ 的基态结构优化结果以及基于 TD-DFT//cam-B3LYP/6-31G(d)和 TD-DFT//cam-B3LYP/6-31G(d)/LANL2DZ 计算得到的(a) ITBDP-1 和 (b) ITBDP-2 的激发态能量及前线轨道图

Figure 3 Ground state structure optimization based on DFT//B3LYP/6-31G(d) and DFT//B3LYP/6-31G(d)/LANL2DZ. (a) calculated excited state energy and frontier orbital diagram of ITBDP-1; (b) calculated excited state energy and frontier orbital diagram of ITBDP-2 based on TD-DFT//cam-B3LYP/6-31G(d) and TD-DFT//cam-B3LYP/6-31G(d)/LANL2DZ

ΔE_{ST} 逐渐增大, 这可能是由于激发态下对羟基苯乙烯基和 BPDIPY 母核间存在电荷转移作用, 而电荷转移会在一定程度上抑制系间窜越过程^[10]. 此外, 随着吸收波长红移, 光敏剂的激发态能量下降, 经过系间窜越和内转换后的 T_1 态能量随之降低, 从而使得单线态氧产率下降. 综上, 3,5 位连接对羟基苯乙烯基会在使光敏剂吸收波长红移的同时增大 ΔE_{ST} , 从而降低单线态氧产率.

2.3 噻吩基氟硼二吡咯近红外光敏染料用于肿瘤细胞和斑马鱼体内的荧光成像

双光子荧光成像技术具有穿透深度大、背景荧光低等优点, 这种方法可以实现深层组织中生物分子的动态可视化成像, 减少对生物体的损害, 提高检测的灵敏度^[37-41]. 相比单光子荧光成像, 双光子成像中使用的长波激发光能够更好地穿透样本, 并且长波激发会减少背景荧光, 提供更为清晰的成像和更高的分辨率. 在斑马鱼体内进行了 ITBDP-1 的双光子荧光成像实验. 将浓度为 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ITBDP-1 与斑马鱼共同培养 2 h 后, 使用双光子共聚焦显微镜在 900 nm 波长的激光激发下观察, 图 4a~4c 分别为斑马鱼头部、身体中段和尾部的双

光子荧光成像, 与 ITBDP-1 共同培养 2 h 后的斑马鱼体内显示出了明亮清晰的红色荧光, 并且均匀地分布在斑马鱼体内各部位. 这一结果表明斑马鱼对 ITBDP-1 的摄取处于相对较高的水平, 并且 ITBDP-1 在生物体内表现出了良好的双光子荧光成像性能. 斑马鱼对 ITBDP-2 的摄取水平较低, 将斑马鱼和 ITBDP-2 共孵育 4 h 后仅有少量染料进入鱼体内, 并且双光子成像所使用的光源波长为 900 nm, 而 ITBDP-2 自身的吸收波长为 687 nm, 在 900 nm 波长激发下的双光子吸收较弱, 上述因素导致了 ITBDP-2 在斑马鱼体内的双光子成像效果不佳.

对 ITBDP-1 和 ITBDP-2 进行了 A549 细胞荧光成像实验, 结果如图 5 所示. 将浓度为 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的光敏染料与 A549 细胞共同孵育 3 h, 随后使用荧光共聚焦显微镜进行观察. 可以观察到细胞呈现出了清晰的红色荧光, 并且在细胞毒性测试中, 黑暗条件下使用光敏剂处理后的细胞存活率能够维持在 80% 以上, 上述结果证明了光敏剂 ITBDP-1 和 ITBDP-2 具有良好的生物相容性, 能够较快速地进入细胞, 同时具有较低的暗毒性, 尽可能减少非光照条件下对细胞的损害.

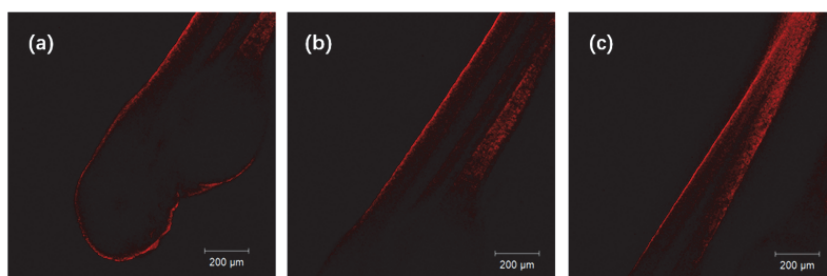


图 4 ITBDP-1 ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex}}=900 \text{ nm}$) 与斑马鱼共同孵育 2 h 后的双光子荧光成像图: (a) 斑马鱼头部成像; (b) 斑马鱼身体中段成像; (c) 斑马鱼尾部成像

Figure 4 Two-photon fluorescence imaging of ITBDP-1 ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex}}=900 \text{ nm}$) incubated with zebrafish for 2 h: (a) head imaging of zebrafish; (b) body imaging of zebrafish; (c) tail imaging of zebrafish

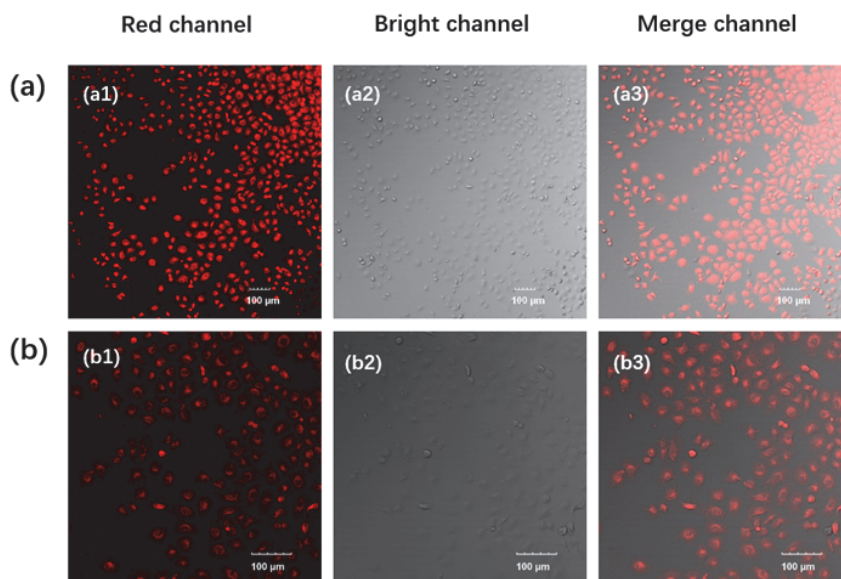


图 5 (a1~a3) ITBDP-1 ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 在 A549 细胞中的荧光成像; (b1~b3) ITBDP-2 ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 在 A549 细胞中的荧光成像

Figure 5 (a1~a3) Fluorescence imaging of ITBDP-1 ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in A549 cells; (b1~b3) fluorescence imaging of ITBDP-2 ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in A549 cells

2.4 噻吩基氟硼二吡咯近红外光敏染料在 A549 细胞中的光动力学治疗研究

采用 MTT 法检测了两种近红外光敏剂的细胞毒性, 所使用的光源功率为 12 W. 将一系列浓度梯度的 ITBDP-1 和 ITBDP-2 加入 A549 细胞培养液中(光敏剂浓度从 $0.25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 到 $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). 然后比较在黑暗和光照(660 nm , $4 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$)条件下的细胞存活率, 结果如图 6 所示. 在黑暗中进行孵育的细胞能够保持相对高的存活率, 在光敏剂加入 24 h 后存活率可达 80% 以上; 相同条件下经 660 nm 光照 15 min 处理的细胞则表现出了较低的存活率, 在光敏染料浓度为 $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 光照 15 min 条件下, A549 细胞存活率均低于 50%, 其中 ITBDP-1 在 $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下与细胞共同孵育并光照后, 细胞存活率为 34%; ITBDP-2 在 $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下与细胞共同孵育并光照后的细胞存活率为 46%. 图 7 为 A549 细胞分别与两种光敏染料共孵育下经光照后的生长曲线, 相同条件下 ITBDP-1 的光毒性明显大于 ITBDP-2. 经测定, ITBDP-1 的 IC_{50} 值为 $2.22 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, ITBDP-2 的 IC_{50} 值为 $2.86 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. 上述结果证实了两种近红外光敏剂均具有相对较低的暗毒性和较高的光毒性, 能够在光照

条件下产生单线态氧, 有效促进肿瘤细胞的凋亡.

在 A549 细胞中进行了 ITBDP-1 的单线态氧成像实验, 结果如图 8 所示. 使用二氯二氢荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) 作为活性氧 (ROS) 探针. DCFH-DA 在进入细胞后被水解生成二氯二氢荧光素 (DCFH), DCFH 本身并不显示荧光, 在被细胞内活性氧氧化为二氯荧光素 (DCF) 后, 会发出绿色荧光. 将 A549 细胞与 DCFH-DA 和 ITBDP-1 在黑暗条件下一同孵育 3 h 后, 细胞荧光成像图中并没有绿色荧光, 只能观察到染料自身的红色荧光; 而将 A549 细胞与 DCFH-DA 和 ITBDP-1 在相同条件下孵育并用 660 nm 光照射 10 min 后, 细胞在绿色通道显示出了单线态氧作用下 DCF 的荧光, 证明 ITBDP-1 在 660 nm 光激发下能够在肿瘤细胞中产生单线态氧. 在相同条件下将 A549 细胞与 DCFH-DA 和 ITBDP-2 共孵育 3 h 后, 使用 660 nm 光照射 10 min, 观察到细胞中仅有图 9 所示的微弱绿色荧光, 将光照时间延长至 30 min 后, 绿色荧光显著增强, 证明了 ITBDP-2 在细胞中的单线态氧产生能力弱于 ITBDP-1, 这与两种染料在溶液中测得的单线态氧产率差异是一致的.

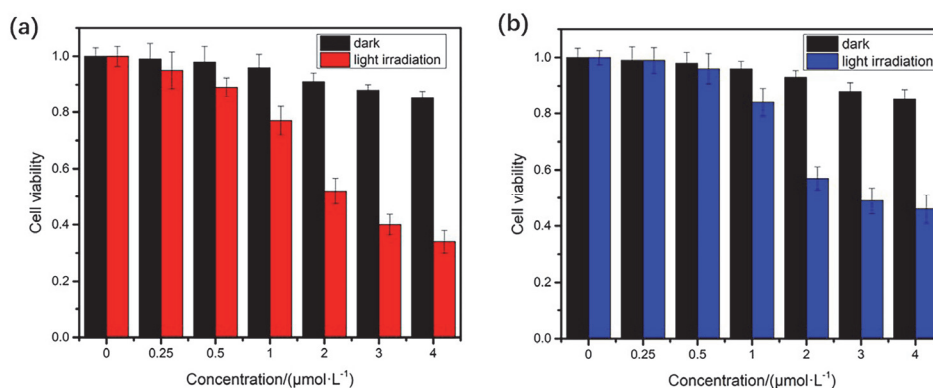


图 6 (a) 光照 15 min (660 nm , $4 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$) 和黑暗条件下与 ITBDP-1 共孵育的 A549 细胞存活率; (b) 光照 15 min (660 nm , $4 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$) 和黑暗条件下与 ITBDP-2 共孵育的 A549 细胞存活率

Figure 6 (a) Cell viability of A549 cells treated with ITBDP-1 under light irradiation for 15 min (660 nm , $4 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$) and dark conditions; (b) cell viability of A549 cells treated with ITBDP-2 under light irradiation for 15 min (660 nm , $4 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$) and dark conditions

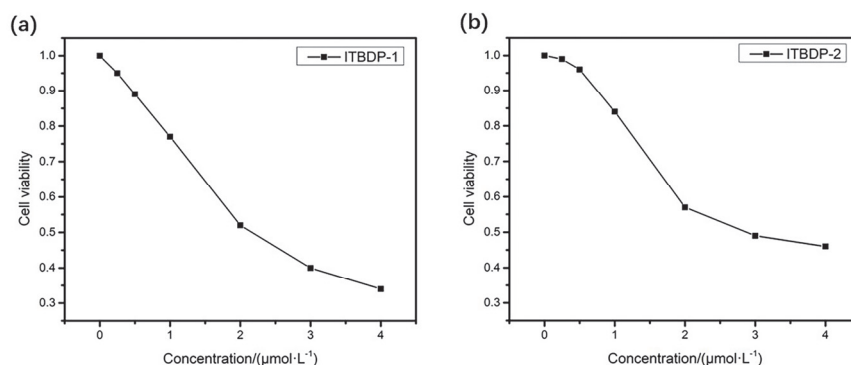


图 7 光照 15 min 条件下(660 nm , $4 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$)与 ITBDP-1 共孵育的 A549 细胞生长曲线; (b) 光照 15 min (660 nm , $4 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$)条件下与 ITBDP-2 共孵育的 A549 细胞生长曲线

Figure 7 (a) Cell growth curve of A549 cells treated with ITBDP-1 under light irradiation for 15 min (660 nm , $4 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$); (b) cell growth curve of A549 cells treated with ITBDP-2 under light irradiation for 15 min (660 nm , $4 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$)

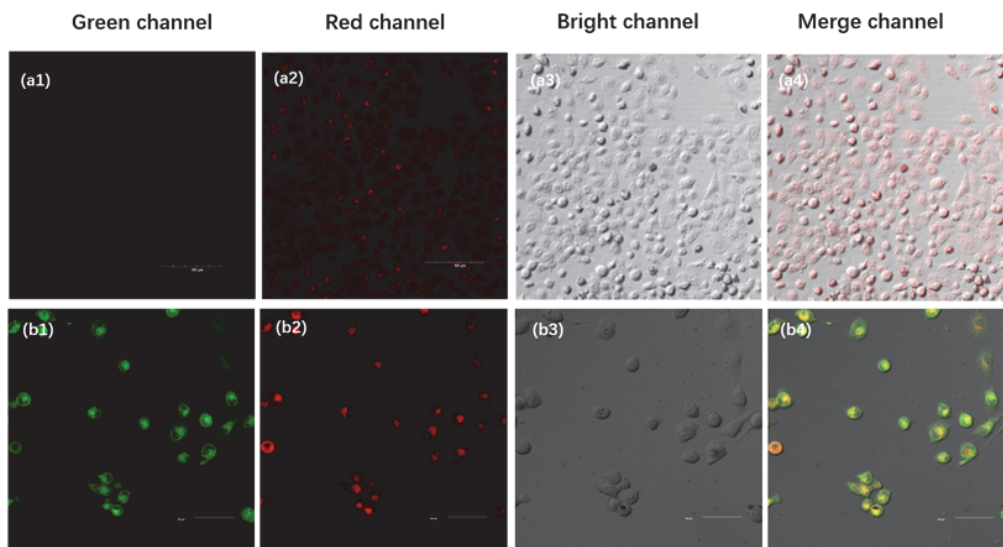


图 8 ITBDP-1 在 A549 细胞内的 ROS 成像. (a1~a4) A549 细胞在 DCFH-DA 和 ITBDP-1 存在下于黑暗中孵化 3 h 成像; (b1~b4) A549 细胞在 DCFH-DA 和 ITBDP-1 存在下于黑暗中孵化 3 h 后, 光照(660 nm, 4 mW·cm⁻²) 10 min 成像

Figure 8 ROS imaging of ITBDP-1 in A549 cells. (a1~a4) A549 cells incubated in dark for 3 h in the presence of DCFH-DA and ITBDP-1; (b1~b4) A549 cells incubated in dark for 3 h in the presence of DCFH-DA and ITBDP-1, then irradiated under light (660 nm, 4 mW·cm⁻²) for 10 min

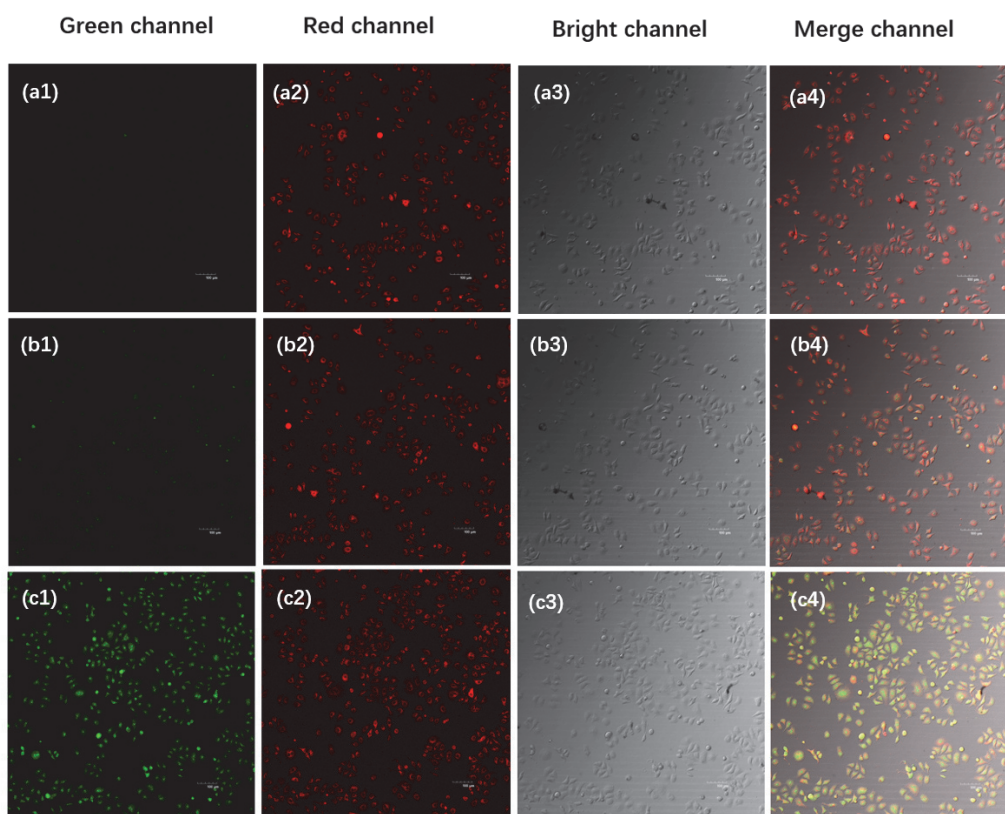


图 9 ITBDP-2 在 A549 细胞内的 ROS 成像. (a1~a4) A549 细胞在 DCFH-DA 和 ITBDP-1 存在下于黑暗中孵化 3 h 成像; (b1~b4) A549 细胞在 DCFH-DA 和 ITBDP-2 存在下于黑暗中孵化 3 h 后, 光照(660 nm, 4 mW·cm⁻²) 10 min 成像; (c1~c4) A549 细胞在 DCFH-DA 和 ITBDP-2 存在下于黑暗中孵化 3 h 后, 光照(660 nm, 4 mW·cm⁻²) 30 min 成像

Figure 9 ROS imaging of ITBDP-2 in A549 cells. (a1~a4) A549 cells incubated in dark for 3 h in the presence of DCFH-DA and ITBDP-2; (b1~b4) A549 cells incubated in dark for 3 h in the presence of DCFH-DA and ITBDP-2, then irradiated under light (660 nm, 4 mW·cm⁻²) for 10 min; (c1~c4) A549 cells incubated in dark for 3 h in the presence of DCFH-DA and ITBDP-2, then irradiated under light (660 nm, 4 mW·cm⁻²) for 30 min

在细胞内单线态氧成像的基础上, 使用 DCFH-DA 作为单线态氧探针进行了斑马鱼体内的单线态氧荧光成像实验, 结果如图 10 所示. 将斑马鱼与 ITBDP-1 ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 在黑暗条件下孵育 1 h, 绿色通道没有显示出荧光, 证明没有单线态氧产生. 在对相同条件下孵育的斑马鱼进行 15 min 的光照处理(660 nm , $4 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$)后, 可以观察到, 除了染料自身的红色荧光外, 绿色通道显示出了明亮的绿色荧光, 证明在 660 nm 波长的光激发下, ITBDP-1 在斑马鱼体内显示出了较好的单线态氧产率. 上述结果证明 ITBDP-1 在生物组织内可以产生单线

态氧, 在生物体内的光动力治疗中具有较好的应用潜力.

上述实验已经证明了两种近红外光敏剂均可在光照下在细胞内产生单线态氧, 从而实现光诱导肿瘤细胞凋亡. 为了进一步检测光敏剂在肿瘤细胞内的光动力治疗效果, 通过 AO/EB 双染实验研究了 ITBDP-1 诱导细胞凋亡的能力. 在活细胞中, 吖啶橙(AO)可以穿透核膜, 对 DNA 进行染色, 发出绿色荧光, 而溴化乙锭(EB)只会对凋亡细胞进行染色, 发出红色荧光. 如图 11 所示, 将 A549 细胞与 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ITBDP-1 在黑暗中共

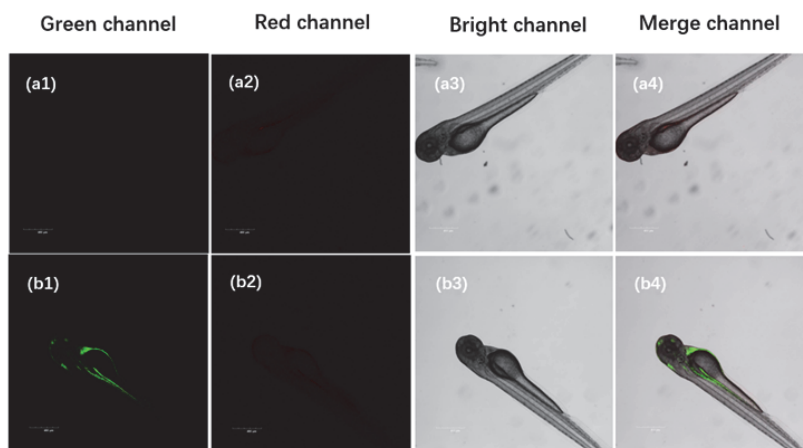


图 10 ITBDP-1 在斑马鱼内的 ROS 成像. (a1~a4)斑马鱼在 DCFH-DA 和 ITBDP-1 存在下于黑暗中孵化 1 h 后成像; (b1~b4)斑马鱼在 DCFH-DA 和 ITBDP-1 存在下于黑暗中孵化 1 h 后, 光照(激发波长 660 nm , $4 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$) 15 min 后成像

Figure 10 ROS imaging of ITBDP-1 in zebrafish. (a1~a4) imaging of zebrafish incubated in the dark for 1 h in the presence of DCFH-DA and ITBDP-1; (b1~b4) imaging of zebrafish incubated in dark for 1 h in the presence of DCFH-DA and ITBDP-1, and then irradiated (660 nm , $4 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$) for 15 min

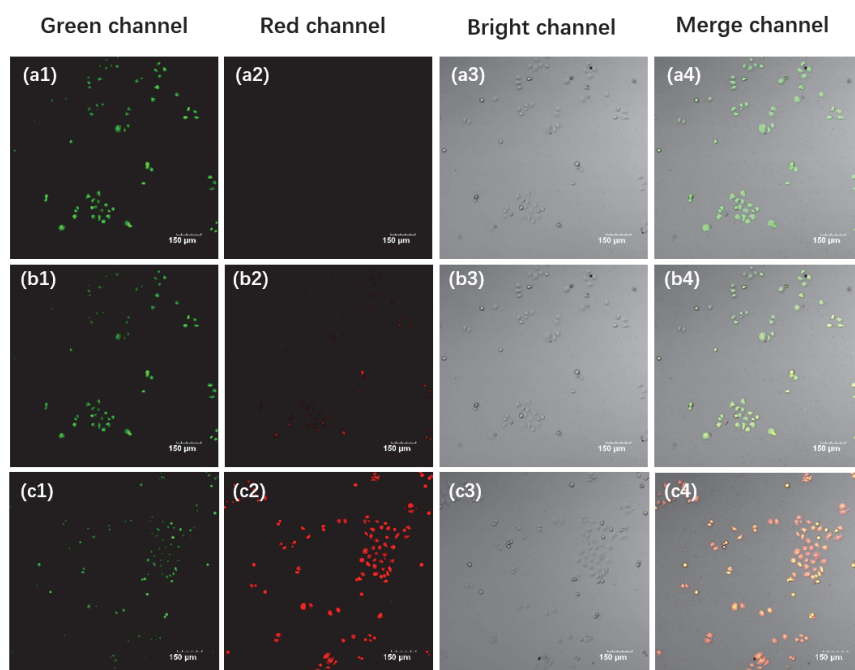


图 11 (a1~a4)无光照条件下 ITBDP-1 与 A549 细胞共孵育后的 AO/EB 成像; (b1~b4)光照 5 min 条件下 ITBDP-1 与 A549 细胞共孵育后的 AO/EB 成像; (c1~c4)光照 15 min 条件下 ITBDP-1 与 A549 细胞共孵育后的 AO/EB 成像(激发波长为 660 nm , $4 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$)

Figure 11 (a1~a4) AO/EB imaging of A549 cells incubated with ITBDP-1 in dark; (b1~b4) AO/EB imaging of A549 cells incubated with ITBDP-1 under light irradiation for 5 min; (c1~c4) AO/EB imaging of A549 cells incubated with ITBDP-1 under light irradiation for 15 min (excitation wavelength 660 nm , $4 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$)

同孵育 30 min, 细胞仅显示 AO 的绿色荧光, 表明细胞几乎没有凋亡. 当相同条件下与 ITBDP-1 共孵育的细胞在 660 nm 光源下分别照射 5 min 和 15 min 时, 观察到 EB 的红色荧光逐渐增加, AO 的绿色荧光减少, 证明了 ITBDP-1 在 660 nm 光照射下会引起细胞凋亡. ITBDP-2 在 AO/EB 双染实验中同样表现出了较好的诱导肿瘤细胞凋亡能力. 将 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ITBDP-2 与 A549 细胞共孵育 2 h 后, 如图 12 所示, 细胞也仅显示了 AO 的绿色荧光. 使用 660 nm 光照射 15 min 后部分细胞中显示出 EB 的红色荧光, 光照 30 min 后细胞中几乎没有绿色荧光, 证明细胞几乎全部凋亡. 上述结果证明两种光敏染料均可以在光照条件下于 30 min 内诱导肿瘤细胞大量凋亡, 其中 ITBDP-1 由于较高的单线态氧产率, 相较于 ITBDP-2 具有更高的光毒性.

最后, 进行了细胞划痕实验来研究光敏剂对肿瘤细胞生长的抑制效果, 结果如图 13 所示. 在细胞划痕实验中, 设置了两组平行实验. 将 A549 细胞在六孔板中种板, 当细胞均匀密集地分布在六孔板中后, 在实验组和对照组中各划一条位置平行的划痕, 在两组细胞中均加入 ITBDP-1 ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)后, 实验组的细胞使用 660 nm 波长的光照射 15 min, 然后继续培养, 在 12 h 和 24 h 时分别观察细胞生长情况. 如图 13(a)所示, 在 660 nm 光照射下, 实验组的细胞在经过 24 h 后, 细胞几乎没有生长, 并且观察到大部分细胞形态已经接近凋亡状态. 而对照组的细胞在 24 h 后可以重新长满, 证明在没有光照

的情况下, 光敏剂对细胞的毒性很小, 几乎不会影响肿瘤细胞的正常生长.

上述结果表明, 近红外光敏染料 ITBDP-1 和 ITBDP-2 作为一种结构新颖的近红外光敏剂, 在细胞及斑马鱼中表现出了较好的生物相容性和单线态氧产生能力, 并且具有较高的光毒性和较低暗毒性. 两种光敏剂均能够在 660 nm 波长光激发下能够实现肿瘤细胞内荧光成像指导的光动力治疗, 其中 ITBDP-1 由于具有较高的单线态氧产率, 在细胞毒性实验中显示出了更低的 IC_{50} 值, 并且在 AO/EB 双染实验中展现出了优于 ITBDP-2 的光动力治疗效果, 且 ITBDP-1 在 900 nm 激光激发下能够在斑马鱼中实现双光子荧光成像, 这为噻吩基氟硼二吡咯光敏剂在长波激发下的双光子光动力治疗应用打下了基础. 在后续的研究中, 可以进一步拓展噻吩基氟硼二吡咯近红外光敏剂在双光子荧光成像及双光子光动力方面的研究与应用, 并针对光敏剂 ITBDP-1 和 ITBDP-2 的结构进行进一步修饰, 如引入肿瘤细胞靶向基团或细胞器定位基等.

3 结论

本文构建了两种新型的噻吩基氟硼二吡咯近红外光敏染料 ITBDP-1 和 ITBDP-2. 合成了 8 位噻吩取代的 BODIPY, 并在 2,6 位引入重原子碘来促进光敏染料的系间窜越, 使其具有较高的单线态氧产率, 并通过

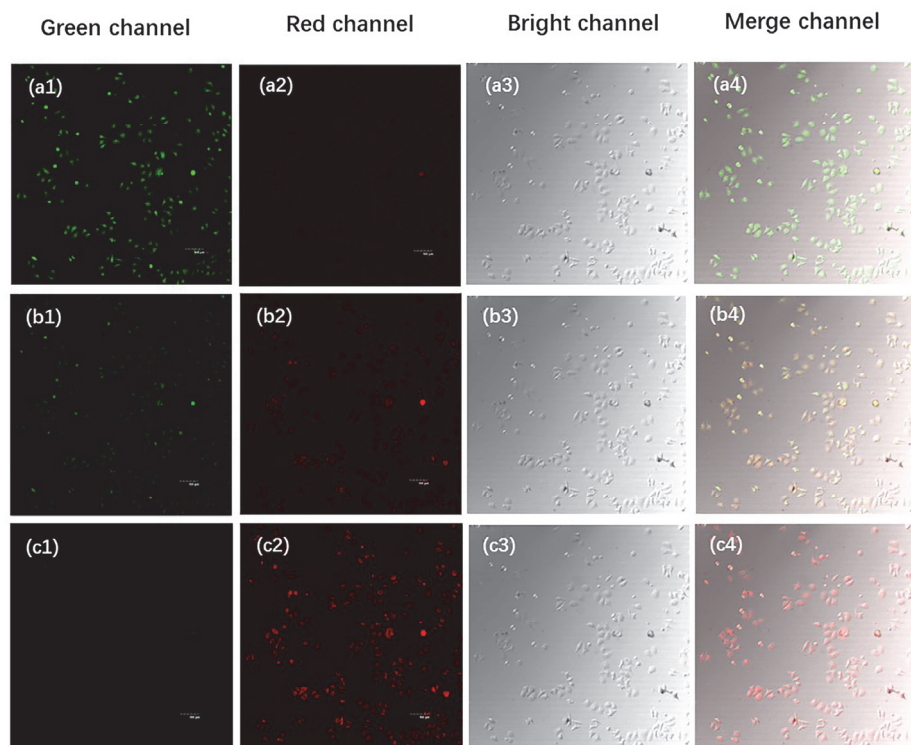


图 12 (a1~a4)无光照条件下 ITBDP-2 与 A549 细胞共孵育后成像; (b1~b4)光照 15 min 条件下 ITBDP-2 与 A549 细胞共孵育后的 AO/EB 成像; (c1~c4)光照 30 min 条件下 ITBDP-2 与 A549 细胞共孵育后的 AO/EB 成像(激发波长为 660 nm, $4 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$)

Figure 12 (a1~a4) imaging of A549 cells incubated with ITBDP-2 in dark; (b1~b4) imaging of A549 cells incubated with ITBDP-2 under light irradiation for 15 min; (c1~c4) imaging of A549 cells incubated with ITBDP-2 under light irradiation for 30 min (excitation wavelength 660 nm, $4 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$)

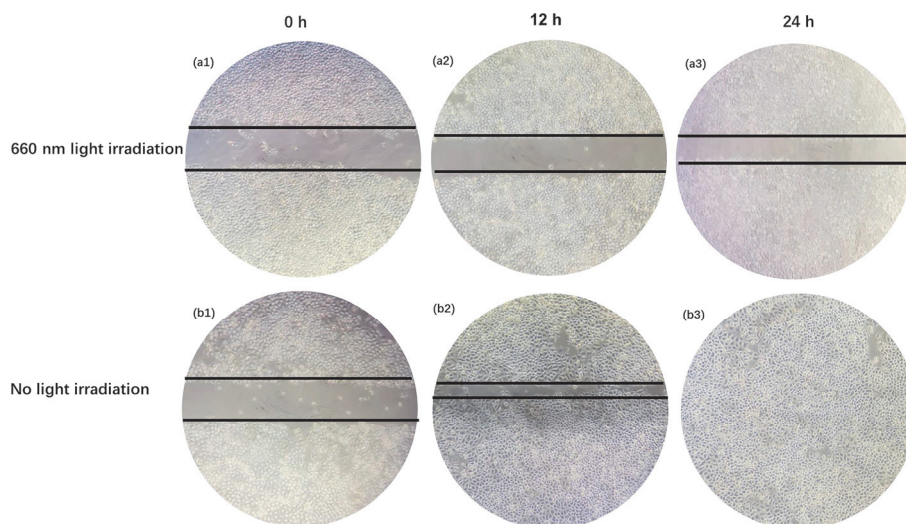


图 13 (a) ITBDP-1 ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)存在下光照 15 min (660 nm , $4 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$)后 24 h 内划痕状态; (b) ITBDP-1 ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)存在下无光照 24 h 后划痕状态

Figure 13 (a) Scratch state within 24 h after illumination for 15 min (660 nm , $4 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$) in the presence of ITBDP-1 ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); (b) scratch state within 24 h in dark in the presence of ITBDP-1 ($2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

Knoevenagel 缩合反应延长了分子的共轭结构, 使光敏染料的吸收和发射波长扩展至近红外区. ITBDP-1 的最大吸收波长为 617 nm , 最大发射波长为 650 nm ; ITBDP-2 的最大吸收波长达到 687 nm , 最大发射波长达到 731 nm , 两种光敏染料的吸收和发射波长均到达近红外区. 单线态氧产率测定实验中, ITBDP-1 的单线态氧产率测定结果为 51% , ITBDP-2 的单线态氧产率为 24% . DFT 计算表明, 碘原子的引入会显著减小分子的单重态-三重态能隙 ΔE_{ST} , 并且随着分子共轭体系的增大, 在吸收波长红移的同时, 光敏染料的 ΔE_{ST} 随之增大, 从而引起单线态氧产率的降低. 在生物实验中, ITBDP-1 和 ITBDP-2 均展现了较好的生物相容性, 能够在 A549 细胞中实现荧光成像指导的光动力治疗, 并且在双光子荧光成像实验中, 观察到 ITBDP-1 在 900 nm 激光激发下在斑马鱼体内显示出了清晰的双光子荧光. 此外还测定了两种光敏染料的细胞毒性, 将 A549 细胞与 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的光敏染料分别共同孵育 30 min , 两种光敏染料均表现出了较低的暗毒性和较高的光毒性, 测定得到 ITBDP-1 和 ITBDP-2 的 IC_{50} 值分别为 $2.22 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $2.86 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. AO/EB 双染实验和细胞划痕实验证明了近红外光敏剂可以在光激发下有效地引起细胞凋亡. 上述结果表明, ITBDP-1 和 ITBDP-2 可以作为潜在的双光子光敏染料, 在生物体内实现成像指导的光动力学治疗, 并且在双光子光动力治疗方面也有较大的研究价值和应用潜力.

4 实验部分

4.1 近红外光敏染料 ITBDP-1 和 ITBDP-2 的合成

ITBDP-1 和 ITBDP-2 的结构都已经通过了 ^1H NMR 和高分辨率质谱表征, 所有的谱图均可以在支持信息中

得到.

ITBDP-1 的合成: 将对羟基苯甲醛(0.031 g , 0.25 mmol)加入到 TBDP (0.057 g , 0.10 mmol)的甲苯溶液, 加入哌啶($30 \mu\text{L}$)和乙酸($15 \mu\text{L}$)作为催化剂. 然后将混合物在氮气保护下回流 4 h , 用薄层色谱监测反应进程. 待溶液冷却至室温后, 通过旋转蒸发器除去过量的溶剂, 粗产物通过柱色谱纯化, 得到深绿色固体 ITBDP-1(产率 26%). ^1H NMR (600 MHz , CDCl_3) δ : 9.87 (s, 1H), 8.14 (d, $J=15.6 \text{ Hz}$, 1H), 7.80 (d, $J=8.5 \text{ Hz}$, 2H), $7.59\sim 7.54$ (m, 1H), 7.53 (d, $J=8 \text{ Hz}$, 1H), 7.35 (d, $J=18.0 \text{ Hz}$, 1H), 6.95 (d, $J=8.5 \text{ Hz}$, 2H), 6.89 (d, $J=8.4 \text{ Hz}$, 1H), 2.01 (s, 3H), 1.59 (s, 3H), 1.26 (s, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz , CDCl_3) δ : 190.99 , 176.25 , 163.34 , 132.30 , 129.91 , 129.49 , 128.94 , 124.53 , 124.37 , 123.98 , 123.47 , 119.02 , 118.86 , 116.09 , 46.45 , 19.77 , 8.68 . HRMS: m/z calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{BF}_2\text{I}_2\text{N}_2\text{OS}$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$ 708.9261 ; found: 708.9283 .

ITBDP-2 的合成: 将对羟基苯甲醛(0.041 g , 0.32 mmol)加入 TBDP (0.046 g , 0.08 mmol)的甲苯溶液中, 加入哌啶($50 \mu\text{L}$)和乙酸($25 \mu\text{L}$)作为催化剂. 混合物在氮气保护下回流 6 h . 用薄层色谱监测反应进程. 反应结束后待溶液冷却至室温, 通过旋转蒸发器除去过量的溶剂, 粗产物通过柱色谱纯化, 得到呈深绿色固体的 ITBDP-2(产率 28%). ^1H NMR (600 MHz , DMSO) δ : 10.08 (s, 2H), 8.09 (d, $J=15.9 \text{ Hz}$, 2H), 7.94 (s, 1H), 7.50 (s, 4H), 7.38 (d, $J=16.5 \text{ Hz}$, 2H), $7.27\sim 7.30$ (m, 2H), 6.90 (s, 4H), 1.60 (s, 6H). ^{13}C NMR (151 MHz , DMSO) δ : 191.41 , 163.78 , 160.01 , 150.64 , 145.86 , 140.15 , 134.31 , 133.80 , 132.57 , 130.73 , 129.76 , 128.84 , 127.51 , 116.74 , 116.31 , 115.41 , 85.12 , 16.78 . HRMS: m/z calcd for

$C_{31}H_{23}BF_2I_2N_2O_2S [M+Na]^+$ 812.9523; found: 812.9545.

4.2 ITBDP-1 和 ITBDP-2 的细胞成像及斑马鱼双光子成像实验

实验所用的 A549 细胞采用含 10% 体积分数胎牛血清的 1640 培养基培养. 将细胞置于含 5% CO_2 的孵箱中培养, 在 37 °C 下孵育 24 h. 待细胞生长 24 h 后, 将细胞接种在培养皿中, 并在孵箱中继续培养 24 h. 拍摄荧光共聚焦成像图片时, 将细胞取出并换液, 并加入 2 μL 浓度为 2 $mmol \cdot L^{-1}$ 的 ITBDP-1 和 ITBDP-2 溶液, 放入孵箱中孵育 3 h. 取出细胞, 先用磷酸缓冲盐溶液(PBS)清洗三次培养皿, 再加入 2 mL PBS 缓冲液, 在共聚焦激光显微镜下拍照. 斑马鱼双光子成像实验中, 在含有斑马鱼的培养液中加入 ITBDP-1, 控制其浓度为 2 $\mu mol \cdot L^{-1}$, 加入光敏剂约 2 h 后使用双光子共聚焦显微镜下拍摄.

4.3 A549 细胞和斑马鱼内的 ROS 成像实验

ITBDP-1 的 A549 细胞内 ROS 成像实验: 将培养好的含有 2 $\mu mol \cdot L^{-1}$ ITBDP-1 的细胞接种在培养皿中, 在 660 nm 波长光源下照射 0 min 和 10 min, 放入孵箱孵育 3 h, 取出培养皿后加入 DCFH-DA, 继续孵育 1 h, 取出培养皿, 用 PBS 缓冲液清洗三次, 在共聚焦显微镜下进行拍摄.

ITBDP-2 的 A549 细胞内 ROS 成像实验: 将培养好的含有 2 $\mu mol \cdot L^{-1}$ ITBDP-2 的细胞接种在培养皿中, 在 660 nm 波长光源下照射 0 min、10 min 和 30 min, 放入孵箱孵育 3 h, 取出培养皿后加入 DCFH-DA, 继续孵育 1 h, 取出培养皿, 用 PBS 缓冲液清洗三次, 在共聚焦显微镜下进行拍摄.

斑马鱼内 ROS 成像实验: 将含有 2 $\mu mol \cdot L^{-1}$ ITBDP-1 的斑马鱼培养液在暗处放置 1 h, 分别用 660 nm 波长的光源照射 0 min 和 15 min, 随后加入 DCFH-DA, 30 min 后在共聚焦显微镜下拍摄成像图片.

4.4 噻唑蓝(MTT)比色法实验

种板: 在 96 孔板中加入 A549 细胞悬液(5000 cells/well), 在孵箱中孵育 24 h. 随后取出细胞, 更换新的培养基, 将按照一定浓度梯度配制的光敏剂 ITBDP-1 和 ITBDP-2 (0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4 $\mu mol \cdot L^{-1}$) 分别加入 96 孔板中, 继续进行孵育 24 h.

暗毒性测定: 在黑暗条件下, 向 96 孔板中加入 5 $mg \cdot mL^{-1}$ 的 MTT 溶液(100 μL /well), 并继续在孵箱中孵育 4 h. 然后向每孔中加入 100 μL 的二甲基亚砜(DMSO)溶液, 孵育 2.5 h, 将 96 孔板置于摇床上, 振摇 5 min 后通过酶标仪测试细胞液的吸光度, 并根据吸光度值计算细胞存活率.

光毒性测定: 将含有细胞悬液的 96 孔板在 660 nm 光源下照射 15 min 后, 孵育 12 h. 向 96 孔板中加入 5 $mg \cdot mL^{-1}$ 的 MTT 溶液(100 μL /well), 并继续在孵箱中孵

育 4 h. 然后向每孔中加入 100 μL 的 DMSO 溶液, 孵育 2.5 h, 将 96 孔板置于摇床上, 振摇 5 min 后通过酶标仪测试细胞液的吸光度, 并根据吸光度值计算细胞存活率.

4.5 AO/EB 双染实验

ITBDP-1: 将 A549 细胞接种在培养皿中, 与 2 $\mu mol \cdot L^{-1}$ ITBDP-1 共同孵育后, 使用 660 nm 波长光源分别照射 0 min、5 min 和 15 min, 放入孵箱孵育 1 h. 取出培养皿后, 加入 AO/EB 染色剂, 继续孵育 30 min, 取出培养皿, 用 PBS 缓冲液清洗三次, 在共聚焦显微镜下进行拍摄.

ITBDP-2: 将 A549 细胞接种在培养皿中, 与 2 $\mu mol \cdot L^{-1}$ ITBDP-2 共同孵育后, 使用 660 nm 波长光源分别照射 0 min、15 min 和 30 min, 放入孵箱孵育 1 h. 取出培养皿后, 加入 AO/EB 染色剂, 继续孵育 30 min, 取出培养皿, 用 PBS 缓冲液清洗三次, 在共聚焦显微镜下进行拍摄.

References

- [1] Pham, T. C.; Nguyen, V.; Choi, Y.; Lee, S.; Yoon, J. *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 13454.
- [2] Celli, J. P.; Spring, B. Q.; Rizvi, I.; Evans, C. L.; Samkoe, K. S.; Verma, S.; Pogue, B. W.; Hasan, T. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2795.
- [3] Chinna Ayya Swamy, P.; Sivaraman, G.; Priyanka, R. N.; Raja, S. O.; Ponnuvel, K.; Shanmugpriya, J.; Gulyani, A. *Coord. Chem. Rev.* **2020**, *411*, 213233.
- [4] Xu, F.; Li, H.; Yao, Q.; Ge, H.; Fan, J.; Sun, W.; Wang, J.; Peng, X. *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 10586.
- [5] Zheng, J.; Liu, Y.; Song, F.; Jiao, L.; Wu, Y.; Peng, X. *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 5819.
- [6] Dong, Y.; Kumar, P.; Maity, P.; Kurganskii, I.; Li, S.; Elmali, A.; Zhao, J.; Escudero, D.; Wu, H.; Karatay, A.; Mohammed, O. F.; Fedin, M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2021**, *23*, 8641.
- [7] Hu, W.; Zhang, X.; Liu, M. *J. Phys. Chem. C* **2021**, *125*, 5233.
- [8] Turksoy, A.; Yildiz, D.; Akkaya, E. U. *Coord. Chem. Rev.* **2019**, *379*, 47.
- [9] Liu, M.; Wang, C.; Qian, Y. *New J. Chem.* **2021**, *45*, 18082.
- [10] Wang, C.; Qian, Y. *Biomaterials* **2020**, *8*, 830.
- [11] Lee, J. M.; Kang, S.; Hwang, T. G.; Kim, H. M.; Lee, W. S.; Kim, D.; Kim, J. P. *Dyes Pigm.* **2021**, *187*, 109051.
- [12] Wang, L.; Qian, Y. *Dyes Pigm.* **2021**, *195*, 109711.
- [13] Tian, R.; Sun, W.; Li, M.; Long, S.; Li, M.; Fan, J.; Guo, L.; Peng, X. *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 10106.
- [14] Xiang, W.-H.; Zhang, L.; Zhi, X.; Qian, Y. *Chin. J. Org. Chem.* **2021**, *41*, 3578 (in Chinese) (项雯晖, 张磊, 支旭, 钱鹰, 有机化学, **2021**, *41*, 3578.)
- [15] Zhi, X.; Xiang, W.; Qian, Y. *J. Lumin.* **2021**, *240*, 118424.
- [16] Dong, Y.; Dick, B.; Zhao, J. *Org. Lett.* **2020**, *22*, 5535.
- [17] Dong, Y.; Taddei, M.; Doria, S.; Bussotti, L.; Zhao, J.; Mazzone, G.; Di Donato, M. *J. Phys. Chem. B* **2021**, *125*, 4779.
- [18] Nguyen, V.; Yan, Y.; Zhao, J.; Yoon, J. *Acc. Chem. Res.* **2022**, *55*, 207.
- [19] Qi, S.; Kwon, N.; Yim, Y.; Nguyen, V.; Yoon, J. *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 6479.
- [20] Lin, G.; Hu, M.; Zhang, R.; Zhu, Y.; Gu, K.; Bai, J.; Li, J.; Dong, X.; Zhao, W. *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 18143.
- [21] Bassan, E.; Gualandi, A.; Cozzi, P. G.; Ceroni, P. *Chem. Sci.* **2021**, *12*, 6607.
- [22] Dartar, S.; Ucuncu, M.; Karakus, E.; Hou, Y.; Zhao, J.; Emrullahoglu, M. *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 639.
- [23] Wen, H.; Wu, Q.; Li, C.; Sun, T.; Xie, Z. *ACS Appl. Nano Mater.* **2022**, *5*, 1500.
- [24] Yuan, P.; Ruan, Z.; Yan, L. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2020**, *6*, 1043.
- [25] Jiang, G.; Li, M.; Wen, Y.; Zeng, W.; Zhao, Q.; Chen, C.; Yuan, H.;

- Liu, C.; Liu, C. *ACS Sensors* **2019**, *4*, 434.
- [26] Guo, Z.; Park, S.; Yoon, J.; Shin, I. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 16.
- [27] Pandith, A.; Siddappa, R. G.; Seo, Y. J. *J. Photochem. Photobiol. C* **2019**, *40*, 81.
- [28] Chin, J.; Kim, H. *Coord. Chem. Rev.* **2018**, *354*, 169.
- [29] Yuan, L.; Lin, W.; Zheng, K.; He, L.; Huang, W. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 622.
- [30] Bai, J.; Zhang, L.; Qian, Y. *Spectrochim. Acta A* **2021**, *252*, 119512.
- [31] Ren, A.; Feng, J.; Guo, J.; Zhang, S.; Cheng, H. *Acta Chim. Sinica* **2001**, *59*, 2126 (in Chinese) (任爱民, 封继康, 郭景富, 张锁秦, 程红, 化学学报, **2001**, *59*, 2126.)
- [32] Ji, L. *Ph.D. Dissertation*, Shandong University, Jinan, **2011** (in Chinese). (纪雷, 博士论文, 山东大学, 济南, **2011**.)
- [33] Xia, G.-M. *Ph.D. Dissertation*, Shandong University, Jinan, **2003** (in Chinese). (夏光明, 博士论文, 山东大学, 济南, **2003**.)
- [34] Xia, G.-M.; Fang, Q.; Xu, X.-G.; Xu, G.-B.; Liu, Z.-Q. *Acta Chim. Sinica* **2003**, *61*, 976 (in Chinese) (夏光明, 方奇, 许心光, 许贵宝, 刘志强, 化学学报, **2003**, *61*, 976.)
- [35] Wang, F. *M.S. Thesis*, Nanjing University of Posts and Telecommunications, Nanjing, **2020** (in Chinese). (王飞, 硕士论文, 南京邮电大学, 南京, **2020**.)
- [36] Redmond, R. W.; Gamlin, J. N. *Photochem. Photobiol.* **1999**, *70*, 391.
- [37] Wu, Z.; Liu, M.; Liu, Z.; Tian, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 7532.
- [38] Fang, H.; Zhang, H.; Li, L.; Ni, Y.; Shi, R.; Li, Z.; Yang, X.; Ma, B.; Zhang, C.; Wu, Q.; Yu, C.; Yang, N.; Yao, S. Q.; Huang, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 7536.
- [39] Wu, L.; Ishigaki, Y.; Hu, Y.; Sugimoto, K.; Zeng, W.; Harimoto, T.; Sun, Y.; He, J.; Suzuki, T.; Jiang, X.; Chen, H.; Ye, D. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1.
- [40] Fan, N.; Li, P.; Zhou, Y.; Wu, C.; Wang, X.; Liu, Z.; Tang, B. *ACS Sensors* **2021**, *7*, 71.
- [41] Liu, H.-W.; Zhu, L.-M.; Lou, X.-F.; Yuan, L.; Zhang, X.-B. *Acta Chim. Sinica* **2020**, *78*, 1240 (in Chinese) (刘红文, 朱隆民, 娄霄峰, 袁林, 张晓兵, 化学学报, **2020**, *78*, 1240.)

(Cheng, B.)