

过氧化氢激活型近红外氟硼二吡咯光敏剂的设计、合成及光动力治疗研究

吕鑫 吴仪 张勃然 郭炜*

(山西大学 化学化工学院 太原 030000)

摘要 基于传统的氟硼二吡咯(BODIPY)荧光染料,设计合成了一种过氧化氢(H_2O_2)激活型近红外光敏剂中位-N-(4-硼酸苄基)吡啶鎓盐取代的碘化双苯乙烯基氟硼二吡咯(FP-IBDP)。FP-IBDP在乙腈中的吸收和发射波长均达到近红外区,最大吸收和发射波长分别为681 nm和740 nm,对应的荧光量子效率和单线态氧效率分别为0.01和0.09。在被 H_2O_2 激活后,FP-IBDP转变为IBDP,其在乙腈中的最大吸收和发射波长分别为661 nm和701 nm。与FP-IBDP相比,IBDP的荧光量子效率和单线态氧效率大幅提升,分别达到0.11和0.48。细胞水平的荧光影像实验表明FP-IBDP对癌细胞内的 H_2O_2 具有灵敏的响应,并能通过明显的荧光增强变化实现癌细胞与正常细胞的有效区分。活性氧检测实验证明FP-IBDP能够被癌细胞内过表达的 H_2O_2 激活,并能在660 nm光照射下在癌细胞内产生单线态氧。噻唑蓝(MTT)比色法测试表明了FP-IBDP具有低的细胞暗毒性和好的生物相容性。细胞光毒性测试及活/死细胞染色标记实验则表明FP-IBDP对癌细胞具有更高的光毒性,而对正常细胞具有低的光损伤。细胞划痕实验进一步表明FP-IBDP在光照下能够有效抑制癌细胞增殖。此外,荧光共定位及溶酶体完整性检测实验表明FP-IBDP主要作用于细胞溶酶体,光照下产生的单线态氧通过破坏溶酶体导致溶酶体相关的细胞死亡。上述结果为氟硼二吡咯光敏剂FP-IBDP实现近红外光激发下荧光成像指导的光动力学治疗奠定了基础。

关键词 激活型光敏剂; 近红外光; 氟硼二吡咯光敏剂; 光动力治疗; 荧光成像

Design, Synthesis and Photodynamic Therapy of a H_2O_2 -Activatable Near Infrared Borondipyrromethene (BODIPY) Photosensitizer

Lv, Xin Wu, Yi Zhang, Boran Guo, Wei*

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030000, China)

Abstract In this work, a borondipyrromethene (BODIPY)-based activatable photosensitizer FP-IBDP was designed and synthesized, which has absorption and emission wavelengths in the near infrared (NIR) region. The maximum absorption and emission of FP-IBDP are 681 nm and 740 nm in acetonitrile. The fluorescence quantum yield and singlet oxygen yield of FP-IBDP is 0.01 and 0.09, respectively. After activated by H_2O_2 , FP-IBDP was transformed to photosensitizer IBDP, which has maximum absorption and emission peak at 661 nm and 701 nm in acetonitrile. Compared with FP-IBDP, the fluorescence quantum yield and singlet oxygen yield of IBDP are much increased, up to 0.11 and 0.48 respectively. It is demonstrated that FP-IBDP can respond H_2O_2 sensitively in cancer cells and has the ability to distinguish cancer cells from normal cells by a fluorescence enhancement way. Reactive oxygen species (ROS) detection indicated that FP-IBDP could be activated by the endogenous H_2O_2 in cancer cells and produce highly toxic singlet oxygen under 660 nm light excitation with dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) as ROS indicator. Tetrazolium (MTT) assay indicated that FP-IBDP has good biocompatibility and low dark toxicity to both cancer cells and normal cells, while phototoxicity test and living/dead cell double staining experiment proved that FP-IBDP has higher phototoxicity to cancer cells than to normal cells. Besides, wounding healing assay confirmed its good ability to inhibit cancer cell proliferation. Fluorescence localization and lysosome disruption assays further indicated that FP-IBDP was specifically located in lysosomes of living cells and the produced singlet oxygen could induce cancer cell death in a lysosome disruption associated pathway. These features are expected to lay good foundation for the application of FP-IBDP in imaging guided photodynamic therapy under NIR excitation.

Keywords activatable photosensitizer; near infrared light; borondipyrromethene (BODIPY) photosensitizer; photodynamic therapy; fluorescence imaging

* E-mail: guow@sxu.edu.cn

Received December 4, 2022; published March 9, 2023.

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 (Nos. 21778036, 21877077).

项目受国家自然科学基金(Nos. 21778036, 21877077)资助。

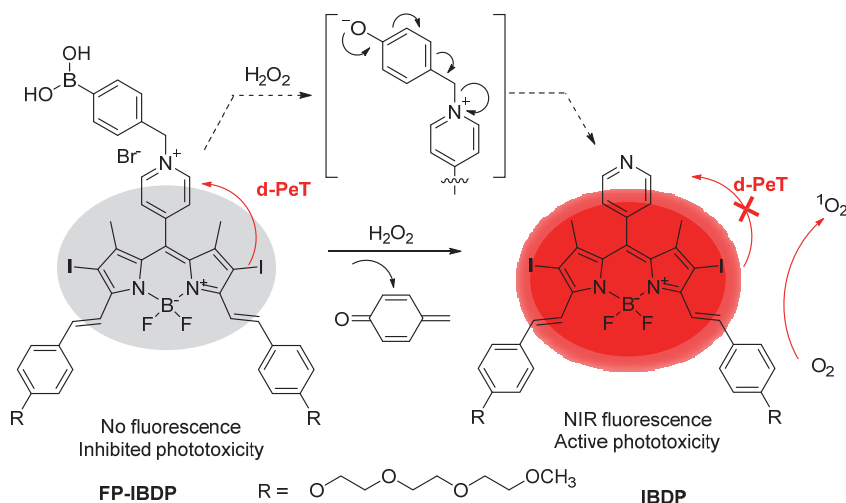
1 引言

作为一种新型的具有广阔发展前景的癌症治疗方式,光动力疗法(PDT)由于具有无创性、低毒性、低耐药性、可重复治疗等优点,一直受到科学界的广泛关注^[1-5].在光动力治疗中,光敏剂扮演着重要角色.在特定波长的光照射下,处于激发三重态的光敏剂与环境中的氧分子发生作用,通过能量转移或者电子转移方式将其转化为单线态氧或者超氧阴离子,二者通过氧化细胞内的蛋白质、核酸、脂质体等生物分子进而破坏细胞和生物组织,最终导致癌细胞凋亡或坏死^[6-9].目前,基于各种传统荧光染料的光敏剂已被大量开发并用于活体水平的光动力治疗模型研究,然而光动力疗法却仍然未能广泛用于癌症的临床治疗^[10-13],主要原因在于传统的光敏剂对肿瘤细胞的选择性较差,在进入肿瘤细胞的同时还会进入正常组织细胞,引起对正常组织细胞的光损伤^[14-16].相比之下,激活型光敏剂能够显著克服上述缺点,通过将特异性识别肿瘤细胞的靶向基团引入到光敏剂中开发出的激活型光敏剂,能够被特定外界刺激所激活,进而表现出光动力治疗活性,在显著提高光敏剂对癌细胞靶向性的同时极大地降低了对正常组织细胞的损伤^[17-20].此外,近红外光(NIR)具有生物组织损伤小、背景干扰低、穿透性强等优点,是光动力治疗的理想光源^[21-23].与可见光相比,近红外光能够更有效地透过深层组织到达病灶进而提升光疗效果,因此,激活型近红外光敏剂的设计与开发受到科学家的广泛关注.

氟硼二吡咯(BODIPY)染料具有窄的吸收和发射谱带、高的荧光量子效率、良好的光稳定性等优良的光物理性质,同时还具备优良的生物相容性,被广泛用于发光材料及光敏试剂的开发^[24-26].自2005年,Nagano课题组^[27]报道了碘化氟硼二吡咯光敏剂之后,Akkaya^[28],You^[29]以及O'Shea^[30]等课题组陆续开发了系列具有长波吸收的BODIPY光敏剂并应用于抗肿瘤和抗菌研究.

2020年,Yoon等^[31]将吩噻嗪基团与BODIPY共价连接,合成了具有扭曲“供体-受体”(D-A)结构的无重原子光敏剂,展现出较高的单线态氧效率和光动力治疗活性.赵建章课题组^[32]基于自旋轨道电荷转移系间窜越机理开发了具有扭曲 π -共轭体系的BODIPY光敏剂,将该光敏剂制备成纳米粒子与免疫药物联用,具有增强免疫治疗效果、协同治疗转移肿瘤的功能.此外,为了增强光敏剂对肿瘤细胞的杀伤效果,针对线粒体,溶酶体等特定细胞器的BODIPY光敏剂也陆续被开发^[33-35].这些已报道的BODIPY光敏剂具有良好的光动力治疗效果和荧光影像能力,然而其中只有少数兼具近红外吸收与可激活特性,如张晓斌课题组^[35]报道的基于pH响应激活的近红外BODIPY光敏剂以及杨清正课题组^[36]基于BODIPY染料开发的pH和谷胱甘肽(GSH)双激活型纳米诊疗体系,前者能够被肿瘤细胞的溶酶体酸性环境所激活,体现光动力和光热的协同治疗,后者则能够有效区分肿瘤细胞和正常细胞,体现高效的光动力治疗效果.鉴于激活型近红外光敏剂的独特优势以及氟硼二吡咯染料良好的光物理性质,设计开发激活型近红外氟硼二吡咯光敏剂具有重要的理论意义和研究价值.

本课题组^[37]前期基于BODIPY荧光染料,结合光诱导电子转移机理开发了近红外过氧化氢(H_2O_2)荧光探针,实现了生物细胞及活体水平上 H_2O_2 的荧光检测与影像.鉴于 H_2O_2 是癌细胞内最主要的活性氧物质,且 H_2O_2 已被证实是一种有效的激活因子用于激活型光敏剂的设计与开发^[38-41],本论文设计并合成了图式1所示的 H_2O_2 激活型近红外氟硼二吡咯光敏剂FP-IBDP,并将其应用于光动力治疗研究.FP-IBDP由近红外光敏剂IBDP与 H_2O_2 识别单元硼酸基团通过苯基共价连接构成.由于存在从BODIPY母核到季胺化吡啶单元的光诱导电子转移作用(d-PeT),FP-IBDP的荧光被猝灭,同时体现出低的单线态氧效率.与 H_2O_2 作用后,FP-IBDP通



图式1 氟硼二吡咯光敏剂FP-IBDP的结构及其激活机理

Scheme 1 The chemical structure of photosensitizer FP-IBDP and the proposed activation mechanism

过氧化-自消除反应转变为光敏剂 **IBDP**, 后者显示明显的近红外荧光, 同时具有高的单线态氧效率. 细胞水平上的荧光成像及光动力实验表明 **FP-IBDP** 能够被癌细胞内的 H_2O_2 激活, 在“点亮”癌细胞的同时展现出良好的光动力治疗活性, 而对正常细胞体现出低的光动力损伤. 光敏剂 **FP-IBDP** 为其他激活型光敏剂的设计开发提供了借鉴, 并在荧光成像指导的光动力治疗方面具有较大的应用潜力.

2 结果与讨论

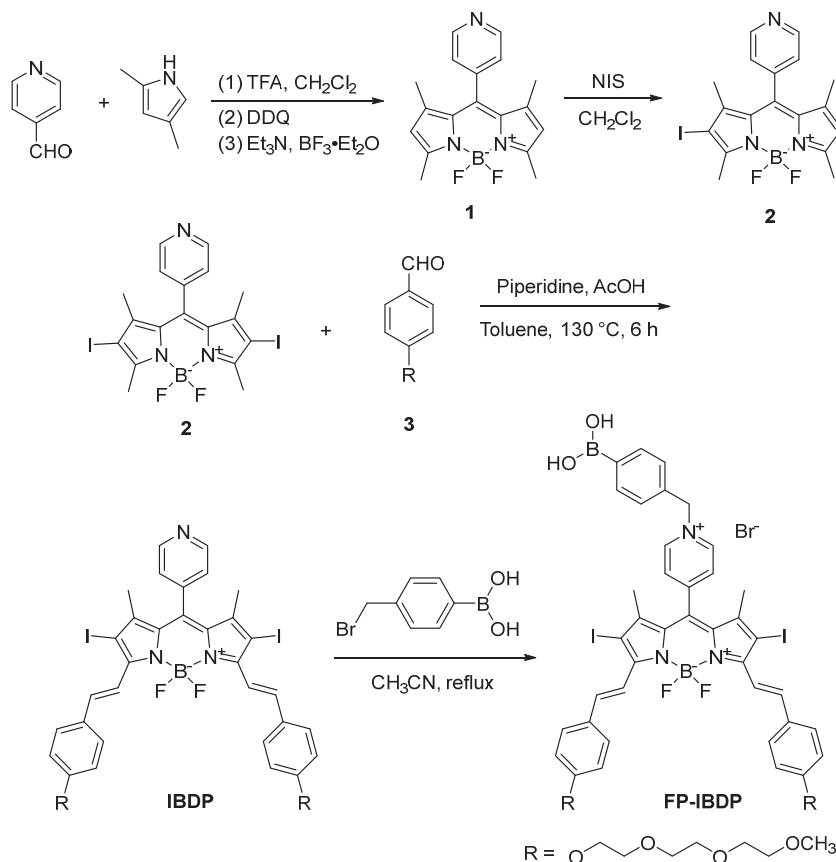
2.1 近红外氟硼二吡咯光敏剂 FP-IBDP 的设计与合成

由于快速增殖和转移的特点,肿瘤细胞或组织形成了不同于正常细胞或组织的微环境,比如微酸性、乏氧、高的活性氧水平、过表达或特异性表达的酶^[42]。基于肿瘤细胞内微环境来开发激活型光敏剂已经成为光敏剂的发展趋势,近年来,以肿瘤细胞内标志性的活性氧 H_2O_2 作为激活因子设计开发激活型光敏剂已经引起科研工作者的广泛关注,具有广阔的发展空间^[38-41]。结合课题组前期的研究工作,我们首先以 4-醛基吡啶和 2,4-二甲基吡咯为原料,按照文献报道的方法合成了母体染料 8-(4-吡啶基)氟硼二吡咯(化合物 **1**),并以 *N*-碘代丁二酰亚胺(NIS)为碘化试剂,在 2,6 位引入碘原子,得到化

合物 **2**. 然后, 以甲苯为溶剂, 乙酸/哌啶为催化剂, 通过 Knoevenagel 缩合在化合物 **2** 的 3, 5 位引入三乙二醇单甲醚取代的苯乙烯基, 得到 **IBDP**. 碘原子的重原子效应能够有效促进系间窜越, 赋予 **IBDP** 高的单线态氧效率. 三乙二醇单甲醚取代的苯乙烯基的引入不仅能够扩大光敏剂的 π -共轭结构使其吸收和发射谱带红移至近红外区, 还能增强光敏剂的细胞渗透性和癌细胞富集能力^[43-45]. 最后, 将 **IBDP** 与 4-(溴甲基)苯硼酸在乙腈中回流, 得到季胺化反应产物 **FP-IBDP**. 季胺化吡啶单元在增进光敏剂水溶性的同时还作为荧光淬灭基团, 通过光诱导电子转移机理, 实现对荧光和光敏活性的调控^[38]. 光敏剂 **FP-IBDP** 的合成路线如图式 2 所示, **FP-IBDP** 及 **IBDP** 的结构均通过核磁共振谱和高分辨质谱的表征(支持信息).

2.2 近红外氟硼二吡咯光敏剂的光物理性质

首先测试了 **IBDP** 和 **FP-IBDP** 在乙腈中的紫外-可见吸收光谱和荧光发射光谱. 如图 1 所示, **IBDP** 的特征吸收谱带位于 550~750 nm, 最大吸收波长为 661 nm, 对应的最大发射波长为 701 nm. 相比之下, **FP-IBDP** 的吸收谱带发生约 20 nm 红移, 最大吸收波长为 681 nm, 对应的最大发射波长为 740 nm. 此外, **IBDP** 和 **FP-IBDP** 均具有高的摩尔消光系数($\approx 1 \times 10^5$), 表明



图式 2 氟硼二吡咯光敏剂 **FP-IBDP** 的合成路线

Scheme 2 The synthetic routes of photosensitizer **FP-IBDP**

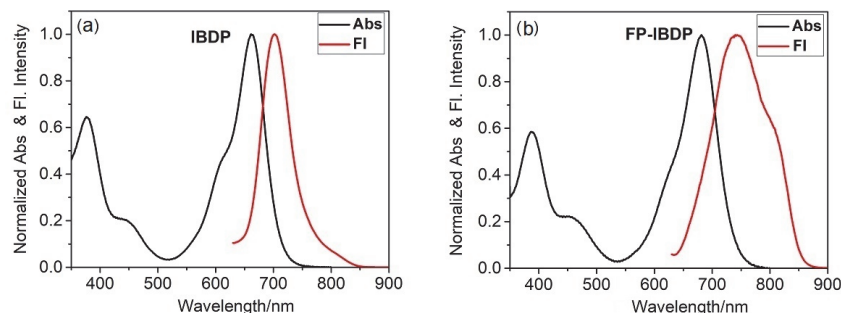


图1 (a) IBDP (2 $\mu\text{mol/L}$) 在乙腈溶液中的归一化紫外-可见吸收光谱和荧光发射光谱. (b) FP-IBDP (2 $\mu\text{mol/L}$) 在乙腈溶液中的归一化紫外-可见吸收光谱和荧光发射光谱. 激发波长 630 nm

Figure 1 (a) Normalized absorption and fluorescence emission spectra of IBDP (2 $\mu\text{mol/L}$) in CH_3CN . (b) Normalized absorption and fluorescence emission spectra of FP-IBDP (2 $\mu\text{mol/L}$) in CH_3CN . λ_{ex} : 630 nm

二者具有强的近红外吸收性能. 值得注意的是, 尽管碘原子的重原子效应大幅度降低了光敏剂的荧光量子效率, 然而 IBDP 的荧光量子效率却依旧是 FP-IBDP 的 10 倍以上(表 1).

表1 光敏剂 IBDP 和 FP-IBDP 在乙腈溶液中的光物理性质数据
Table 1 Photophysical properties of IBDP and FP-IBDP in CH_3CN

Photosensitizer	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	$\epsilon_{\text{max}}/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1})$	Φ_{f}^a	Φ_{Δ}^b
IBDP	661	701	1.01×10^5	0.11	0.48
FP-IBDP	681	740	0.91×10^5	0.01	0.09

^a Relative fluorescence quantum yield determined using Cy5.5 as standard ($\Phi_{\text{f}}=0.23$ in phosphate buffer saline (PBS) at pH 7.4). ^b Relative singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) quantum yield using methylene blue (MB) as standard ($\Phi_{\Delta}=0.52$ in CH_3CN).

为了进一步说明光敏剂的结构对荧光量子效率的影响, 我们使用含时密度泛函理论对氟硼二吡咯光敏剂 IBDP 和 FP-IBDP 进行了激发态结构优化并计算了前线分子轨道能级. 所有的计算均使用 Gaussian 09 软件包进行. 由于含有 I 原子, 我们选用了混合基组在 B3LYP 方法下进行相关计算, 其中对 C、O、N、H、B 和 F 原子使用 6-31G* 基组, 对 I 原子使用 LANL2DZ 基组. 如图 S1(支持信息)所示, IBDP 的 HOMO 轨道和 LUMO 轨道均分布在完整的 BODIPY 骨架中, 说明 IBDP 能够通过辐射跃迁产生荧光. 然而, FP-IBDP 的 HOMO 轨道主要分布在完整的 BODIPY 骨架上, 而 LUMO 轨道则主要集中于季胺化吡啶基团, 表明 FP-IBDP 受到激发后产生了从富电子的 BODIPY 基团到缺电子的季胺化吡啶基团的光诱导电子转移(d-PeT), 该过程导致的非辐射跃迁使得 FP-IBDP 几乎不产生荧光. 上述理论计算结果与实验结果相一致, 证实了光诱导电子转移机理对于荧光调控的合理性.

进一步使用 1,3-二苯基异丙基并咪唑(DPBF)作为单线态氧捕获剂, 测定了 FP-IBDP 和 IBDP 在 660 nm 光照下的单线态氧效率 Φ_{Δ} . 如图 2 所示, 在含有 IBDP 的乙腈溶液中, DPBF 在 415 nm 的吸光度在 25 s 照射时间内由 0.58 降低至 0.23, 而在含有 FP-IBDP 的乙腈溶

液中, DPBF 在 415 nm 的吸光度仅由 0.60 降低至 0.53, 说明光照下 IBDP 能够更显著地产生单线态氧. 以亚甲基蓝(MB)为参比光敏剂(乙腈中的单线态氧效率 $\Phi_{\Delta}=0.52$), 进一步测得 IBDP 与 FP-IBDP 的单线态氧效率分别为 0.48 和 0.09. 以上结果表明吡啶基团的季胺化能够有效促进光诱导电子转移过程, 在猝灭荧光的同时有效抑制系间窜越, 导致单线态氧效率的降低. 此外, 在光照过程中, IBDP 与 FP-IBDP 自身的吸收峰几乎不发生改变, 表明二者具有良好的光稳定性. IBDP 和 FP-IBDP 在乙腈中的光物理性质数据总结在表 1 中.

2.3 近红外氟硼二吡咯光敏剂 FP-IBDP 对 H_2O_2 的光谱响应

FP-IBDP 与 H_2O_2 混合后时间依赖的荧光光谱变化如图 3a 所示. 在含有 50% 体积分数乙腈的磷酸盐缓冲溶液(PBS)中, 激发波长为 630 nm 时, FP-IBDP 在 725 nm 处产生微弱的荧光发射. 向溶液中加入 H_2O_2 后, 荧光发射光谱逐渐蓝移, 且在 701 nm 处的荧光强度随反应时间逐渐增强, 反应 60 min 后, 观测到近 30 倍的荧光增强变化. FP-IBDP 与 H_2O_2 的反应同样引起明显的吸收光谱变化. 如图 3b 所示, FP-IBDP 的最大吸收峰位于 685 nm, 与 H_2O_2 反应后, 吸收峰蓝移至 662 nm. 此外, FP-IBDP 与 H_2O_2 反应后的吸收光谱与 IBDP 的吸收光谱高度吻合, 暗示了反应产物 IBDP 的形成, 这一论断进一步通过液相色谱分析加以证实(支持信息, 图 S2).

图 4a 为 FP-IBDP 对 H_2O_2 浓度依赖的荧光光谱. 在 H_2O_2 浓度为 0~100 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, FP-IBDP 在 701 nm 处的荧光强度随着 H_2O_2 浓度增大而逐渐增强, 并且呈现良好的线性关系(图 4b, 线性方程 $Y=3.178X+14.295$, $R^2=0.999$). 基于三倍信噪比条件($S/N=3$), 计算得到 FP-IBDP 对 H_2O_2 的检出限为 0.51 $\mu\text{mol/L}$, 暗示了 FP-IBDP 具有足够的灵敏性来响应癌细胞内的 H_2O_2 ^[46-47]. 此外, FP-IBDP 对常见生物相关的阳离子、阴离子及生物硫醇均不产生明显的荧光响应. 对于生物相关的活性氧物质, 除 H_2O_2 引起约 30 倍的荧光增强外, 只有过氧亚硝酸根阴离子(ONOO^-)引起约 5 倍的荧光增

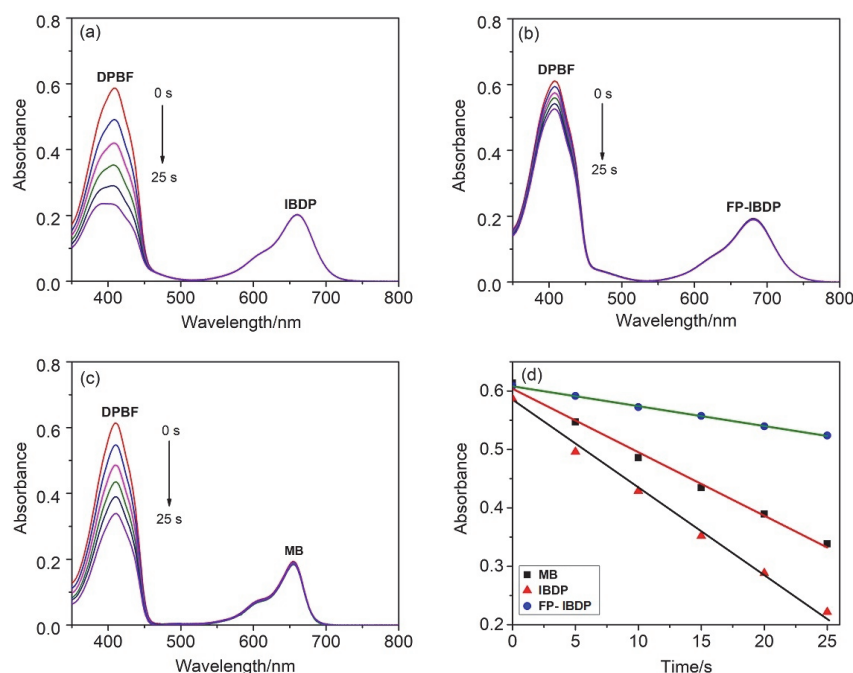


图2 (a) IBDP (2 $\mu\text{mol/L}$) 溶液中 DPBF 的紫外-可见吸收光谱随光照时间变化示意图; (b) FP-IBDP (2 $\mu\text{mol/L}$) 溶液中 DPBF 的紫外-可见吸收光谱随光照时间变化示意图; (c) MB (2 $\mu\text{mol/L}$) 溶液中 DPBF 的紫外-可见吸收光谱随光照时间变化示意图; (d) DPBF 在 IBDP, FP-IBDP 和 MB 溶液中 415 nm 处的吸光度随光照时间变化示意图

Figure 2 (a) Time-dependent absorption spectral changes of DPBF in the presence of IBDP (2 $\mu\text{mol/L}$); (b) time-dependent absorption spectral changes of DPBF in the presence of FP-IBDP (2 $\mu\text{mol/L}$); (c) time-dependent absorption spectral changes of DPBF in the presence of MB (2 $\mu\text{mol/L}$); (d) time-dependent plot of absorbance of DPBF at 415 nm in IBDP solution, FP-IBDP solution and MB solution respectively

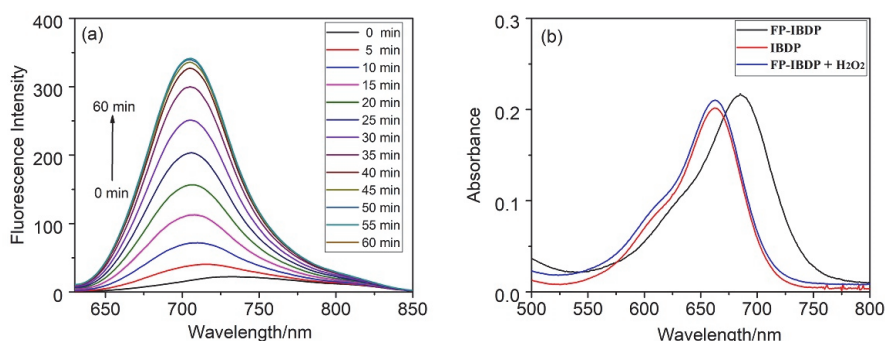


图3 (a) FP-IBDP (2 $\mu\text{mol/L}$) 与 H_2O_2 (100 $\mu\text{mol/L}$) 在 PBS 溶液 (10 mmol/L, pH=7.4, 含 50% 体积分数的 CH_3CN) 中的荧光光谱随反应时间变化图; (b) FP-IBDP (2 $\mu\text{mol/L}$) 与 H_2O_2 (100 $\mu\text{mol/L}$) 作用前后的紫外-可见吸收光谱与 IBDP 的吸收光谱对比

Figure 3 (a) Fluorescence spectra changes of FP-IBDP (2 $\mu\text{mol/L}$) in PBS (10 mmol/L, pH=7.4, containing 50% CH_3CN) upon addition of H_2O_2 (100 $\mu\text{mol/L}$) for varying time intervals (0~60 min); (b) absorption spectra of FP-IBDP (2 $\mu\text{mol/L}$) before and after reaction with H_2O_2 (100 $\mu\text{mol/L}$), and the absorption spectra of IBDP

强, 而羟基自由基($\cdot\text{OH}$), 次氯酸(HClO)以及超氧阴离子(O_2^-)均不引起 FP-IBDP 产生显著的荧光变化(支持信息, 图 S3), 说明 FP-IBDP 对 H_2O_2 具有最优的选择性。

采用商业化单线态氧荧光探针 Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG) 检测了 FP-IBDP 与 H_2O_2 作用前后单线态氧的产生。如图 5a 所示, 在光照条件下(660 nm, 0.5 mW/cm^2), H_2O_2 处理后的 FP-IBDP 引起 SOSG 在 530 nm 处的特征荧光随照射时间增加而显著增强。相比之下, 光照 FP-IBDP 只引起 SOSG 在 530 nm 处的荧光产

生较弱的增强(图 5b)。上述结果表明 H_2O_2 处理后的光敏剂 FP-IBDP 能够显著地产生单线态氧, 证实了 FP-IBDP 具有可被 H_2O_2 激活的光敏活性。

2.4 近红外氟硼二吡咯光敏剂 FP-IBDP 用于癌细胞内 H_2O_2 的荧光影像

在开展细胞实验之前, 首先采用噻唑蓝(MTT)比色法检测了 FP-IBDP 对实验所用 HeLa 宫颈癌细胞、HCT116 结肠癌细胞、HepG2 肝癌细胞、HL-7702 正常肝细胞以及 COS-7 正常肾细胞的细胞毒性。将一系列

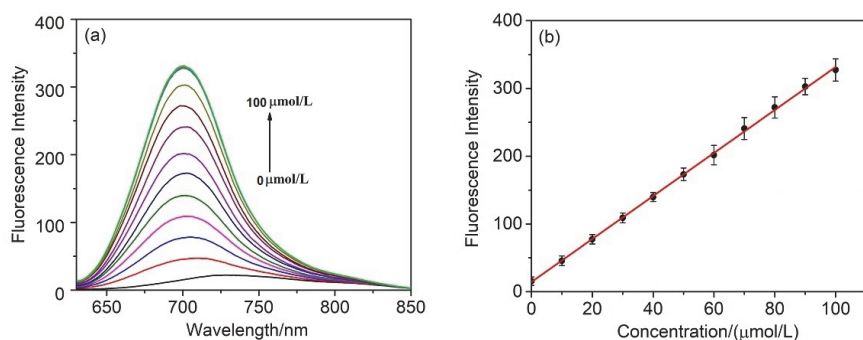


图4 (a) PBS 溶液中(10 mmol/L, pH=7.4, 含 50% 体积分数的 CH_3CN), **FP-IBDP** (2 $\mu\text{mol/L}$) 与不同浓度 H_2O_2 (0~100 $\mu\text{mol/L}$) 反应后的荧光光谱, 反应时间为 60 min; (b) **FP-IBDP** 在 701 nm 处的荧光强度随 H_2O_2 浓度变化的线性关系

Figure 4 (a) Fluorescence spectra changes of **FP-IBDP** (2 $\mu\text{mol/L}$) in PBS (10 mmol/L, pH=7.4, containing 50% CH_3CN) upon addition of H_2O_2 (0~100 $\mu\text{mol/L}$) with a reaction time of 60 min; (b) the linear relationship between fluorescence intensity of **FP-IBDP** at 701 nm and H_2O_2 concentration

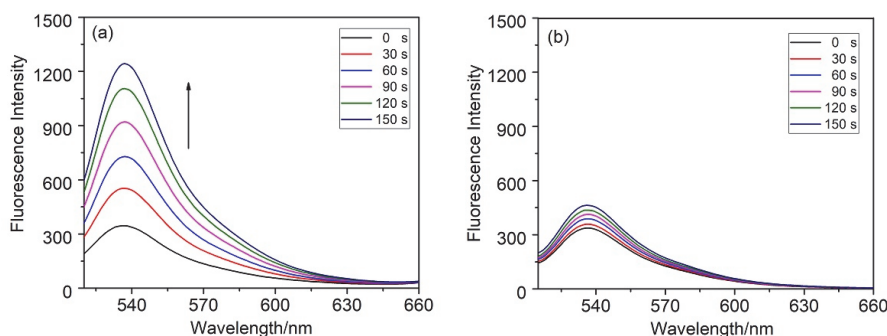


图5 (a) 在 H_2O_2 处理后的 **FP-IBDP** (2 $\mu\text{mol/L}$) 溶液中, 荧光探针 SOSG (10 $\mu\text{mol/L}$) 的荧光发射光谱随光照时间(0~150 s)变化示意图; (b) 在 **FP-IBDP** (2 $\mu\text{mol/L}$) 溶液中, 荧光探针 SOSG (10 $\mu\text{mol/L}$) 的荧光发射光谱随光照时间(0~150 s)变化示意图

Figure 5 (a) Time-dependent fluorescence spectra changes of SOSG (10 $\mu\text{mol/L}$) in the presence of H_2O_2 treated **FP-IBDP** (2 $\mu\text{mol/L}$) under light irradiation for 0~150 s; (b) time-dependent fluorescence spectra changes of SOSG (10 $\mu\text{mol/L}$) in the presence of **FP-IBDP** (2 $\mu\text{mol/L}$) under light irradiation for 0~150 s

浓度梯度的 **FP-IBDP** (0, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10 $\mu\text{mol/L}$) 与上述各种细胞在黑暗条件下孵育 12 h 后, 上述细胞的存活率都能够维持在 80% 以上(支持信息, 图 S4), 表明 **FP-IBDP** 具有较低的细胞暗毒性。此外, **FP-IBDP** 在胎牛血清(FBS)溶液中的紫外-可见吸收光谱在 24 h 内几乎不发生明显变化(支持信息, 图 S5), 表明 **FP-IBDP** 具有良好的生物稳定性。

为了验证 **FP-IBDP** 在活细胞内的可激活性, 首先借助激光共聚焦显微镜进行了细胞水平上 H_2O_2 的荧光成像实验, 结果如图 6 所示。将浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 的 **FP-IBDP** 与 HeLa 细胞共同孵育 2 h 后, 用 633 nm 的光进行激发, 发现 HeLa 细胞内呈现微弱的红色荧光。相反, 将 HeLa 细胞先用 H_2O_2 处理 1 h, 然后再与 **FP-IBDP** 共同孵育 2 h, 可观察到细胞内的红色荧光显著增强。将 HeLa 细胞用佛波酯(PMA)刺激 12 h, 随后再与 **FP-IBDP** 共同孵育 2 h, 可同样观测到细胞内的红色荧光显著增强。当用活性氧抑制剂 *N*-乙酰半胱氨酸(NAC)处理 PMA 刺激过的 HeLa 细胞 1 h, 然后再与 **FP-IBDP** 共同孵育 2 h, 发现细胞内的红色荧光信号显著降低。上述结果表明 **FP-IBDP** 能够作为一种荧光“关-开”型探针用于细胞内源性和外源性 H_2O_2 的荧光检测。

基于肿瘤细胞与正常细胞内 H_2O_2 水平的显著差异, 采用 H_2O_2 荧光探针来区分肿瘤细胞和正常细胞已被证明是一种可行的策略^[38-40]。**FP-IBDP** 被进一步尝试用于荧光影像以及区分癌细胞和正常细胞。将浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 的 **FP-IBDP** 分别与 HeLa 细胞、HCT116 细胞、HepG2 细胞、HL-7702 细胞以及 COS-7 细胞在培养基中孵育 2 h, 用 PBS 清洗 3 次之后加入新的培养基并继续孵育, 每间隔 1 h, 用激光共聚焦显微镜进行一次拍摄, 记录时间点 2 h, 3 h, 4 h 和 5 h 时的荧光图像, 结果如图 7 所示。随着孵育时间的延长, HeLa 细胞, HCT116 细胞以及 HepG2 细胞内的红色荧光逐渐增强, 孵育 5 h 后对应细胞内的荧光强度分别增强约 2.8 倍、3.1 倍、4.0 倍。相比之下, HL-7702 细胞和 COS-7 细胞内的荧光几乎没有显著变化。以上结果表明光敏剂 **FP-IBDP** 能够被癌细胞内过表达的 H_2O_2 激活, 并能通过荧光增强变化区分癌细胞和正常细胞。

2.5 近红外氟硼二吡咯光敏剂 **FP-IBDP** 在癌细胞中的光动力治疗研究

为了验证光敏剂 **FP-IBDP** 在活细胞水平上的光动力治疗活性, 首先采用商业化活性氧荧光探针二氯二氢

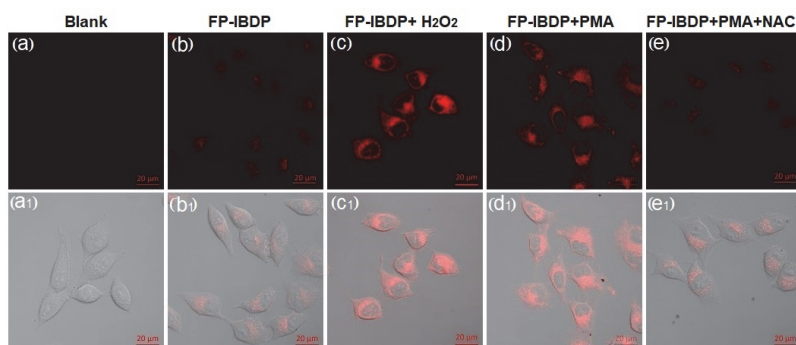


图 6 HeLa 细胞在不同处理条件下的共聚焦荧光图像: (a) HeLa 细胞; (b) **FP-IBDP** (2 $\mu\text{mol/L}$) 与 HeLa 细胞共孵育 2 h; (c) H_2O_2 (100 $\mu\text{mol/L}$) 处理 HeLa 细胞 1 h 后再与 **FP-IBDP** (2 $\mu\text{mol/L}$) 共孵育 2 h; (d) PMA (2 $\mu\text{g/mL}$) 处理 HeLa 细胞 12 h 后再与 **FP-IBDP** (2 $\mu\text{mol/L}$) 共孵育 2 h; (e) PMA (2 $\mu\text{g/mL}$) 处理 HeLa 细胞 12 h 后用 NAC (2 mmol/L) 处理 1 h, 再与 **FP-IBDP** (2 $\mu\text{mol/L}$) 共孵育 2 h; (a₁~e₁) 荧光图像(a)~(e)对应的明场图像. 激发波长为 633 nm, 收集范围为 650~750 nm. 标尺: 20 μm

Figure 6 Confocal fluorescence images of HeLa cells under different treatments. (a) Blank HeLa cells; (b) HeLa cells incubated with **FP-IBDP** (2 $\mu\text{mol/L}$) for 2 h; (c) HeLa cells treated with H_2O_2 (100 $\mu\text{mol/L}$) for 1 h and then incubated with **FP-IBDP** (2 $\mu\text{mol/L}$) for 2 h; (d) HeLa cells treated with PMA (2 $\mu\text{g/mL}$) for 12 h and then incubated with **FP-IBDP** (2 $\mu\text{mol/L}$) for 2 h; (e) HeLa cells treated with PMA (2 $\mu\text{g/mL}$) for 12 h and then treated with NAC (2 mmol/L) for 1 h, further incubated with **FP-IBDP** (2 $\mu\text{mol/L}$) for 2 h; (a₁~e₁) the corresponding bright field of images (a)~(e). The emission was collected at 650~750 nm with excitation at 633 nm. Scale bar: 20 μm

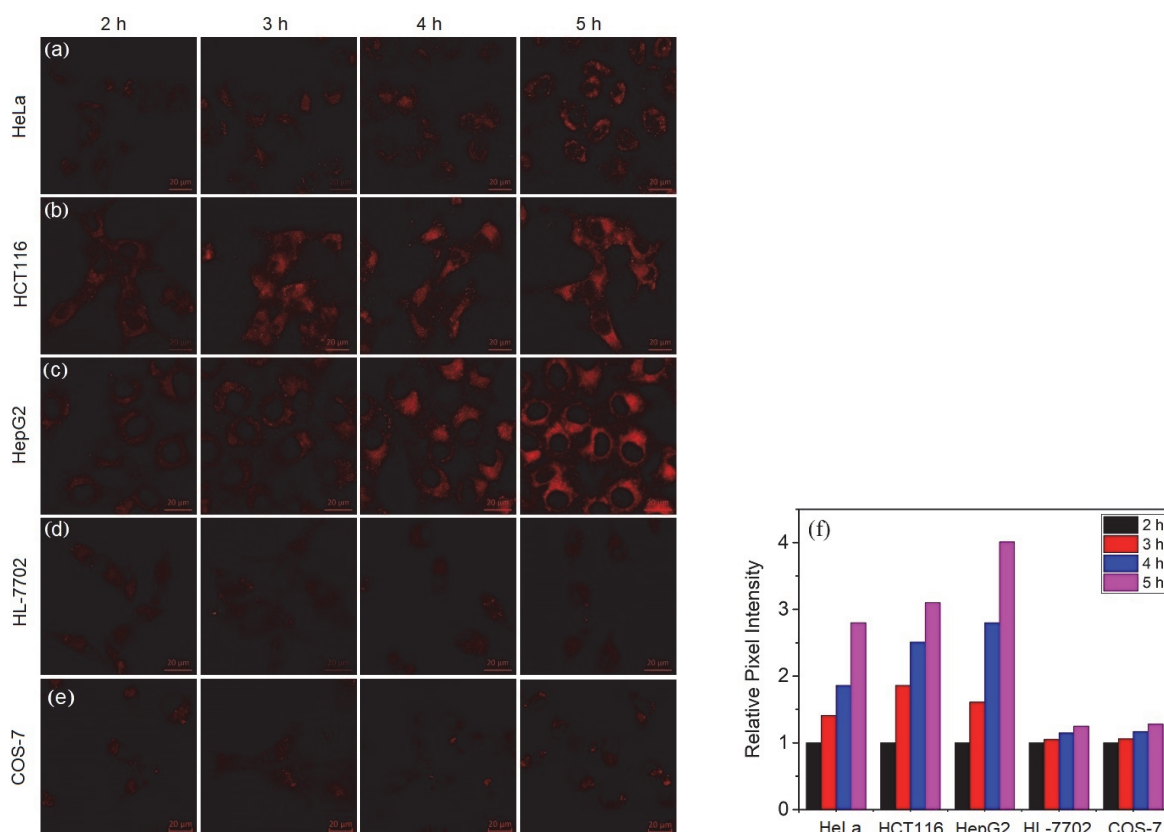


图 7 (a~e) 光敏剂 **FP-IBDP** (2 $\mu\text{mol/L}$) 分别与 HeLa, HCT116, HepG2, HL-7702 以及 COS-7 五种细胞孵育 2 h、3 h、4 h、5 h 后的荧光图像; (f) 荧光图像(a)~(e)内的相对荧光强度. 激发波长为 633 nm, 收集范围为 650~750 nm. 标尺: 20 μm

Figure 7 (a~e) Confocal fluorescence images of HeLa cells, HCT116 cells, HepG2 cells, HL-7702 cells and COS-7 cells after incubation with **FP-IBDP** (2 $\mu\text{mol/L}$) for 2 h, 3 h, 4 h and 5 h, respectively; (f) relative pixel intensity from images (a)~(e). The emission was collected at 650~750 nm with excitation at 633 nm. Scale bar: 20 μm

荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)进行了细胞内单线态氧的成像实验. DCFH-DA 自身并不显示荧光, 在进入细胞后被水解生成二氯二氢荧光素(DCFH), 后者能被细胞内的活性氧氧化为二氯荧光素(DCF), 释放出绿色荧光.

如图 8 所示, 将 HeLa 细胞与 **FP-IBDP** 在黑暗条件下共同孵育 5 h 后再与 DCFH-DA 共孵育 20 min, 在共聚焦显微镜的红色通道下观察到来自光敏剂的红色荧光, 而绿色荧光通道几乎不显示荧光; 而在相同处理条件下,

用 660 nm 光(10 mW/cm^2)照射孵育有 **FP-IBDP** 和 DCFH-DA 的 HeLa 细胞 5 min, 在绿色荧光通道可观测到来自 DCF 的特征绿色荧光, 表明 **FP-IBDP** 在 660 nm 光激发下能够在癌细胞内产生单线态氧. 此外, 在显微镜下还可观测到光照后的 HeLa 细胞表面产生了明显的泡囊, 暗示了细胞凋亡的产生.

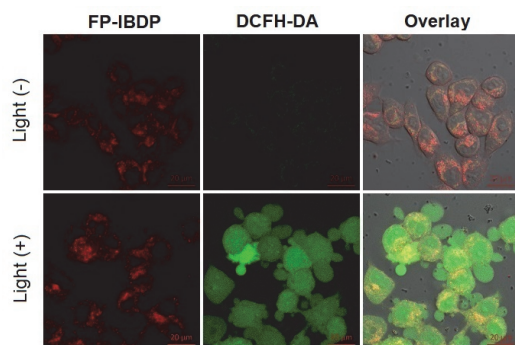


图 8 孵育有 **FP-IBDP** ($2 \mu\text{mol/L}$) 和 DCFH-DA ($10 \mu\text{mol/L}$) 的 HeLa 细胞在 660 nm 光照射前后的荧光图像; **FP-IBDP** 对应的激发波长为 633 nm, 收集范围为 650~750 nm; DCFH-DA 对应的激发波长为 488 nm, 收集范围为 500~550 nm. 标尺: $20 \mu\text{m}$

Figure 8 Fluorescence images of **FP-IBDP** ($2 \mu\text{mol/L}$) and DCFH-DA ($10 \mu\text{mol/L}$) co-incubated HeLa cells before and after 660 nm light irradiation. The emission was collected at 650~750 nm for **FP-IBDP** under excitation at 633 nm and 500~550 nm for DCFH-DA under excitation at 488 nm. Scale bar: $20 \mu\text{m}$

进一步采用 MTT 比色法测试了 **FP-IBDP** 对 HeLa 细胞的光毒性, 将一系列浓度梯度的 **FP-IBDP** (0, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, $10 \mu\text{mol/L}$) 加入到 HeLa 细胞培养液中, 孵育 5 h 后用 660 nm 光(10 mW/cm^2)照射 5 min, 进一步孵育 12 h 后测定细胞存活率. 如图 S6(支持信息)所示, 在 660 nm 光照 5 min 处理条件下, HeLa 细胞在 12 h 内的存活率随着 **FP-IBDP** 孵育浓度的增加而显著降低, 当孵育浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 时, HeLa 细胞的存活率降低至 15%. 光照条件下 **FP-IBDP** 引起的细胞凋亡能通过活/死细胞染色标记实验证实. 钙黄绿素(Calcein-AM)只能染色活细胞, 在胞质内发出绿色荧光, 而碘化丙啶(PI)只能染色死细胞的细胞核, 发出红色荧光. 如图 9 所示,

孵育有 **FP-IBDP** 的 HeLa 细胞在未经光照时几乎全部被 Calcein-AM 染色, 发出明显的绿色荧光, 而经过光照后的 HeLa 细胞大部分能被 PI 染色, 发出特征红色荧光. 以上实验说明 **FP-IBDP** 在 660 nm 光照射下能够在 HeLa 细胞内产生单线态氧, 并有效促进癌细胞凋亡.

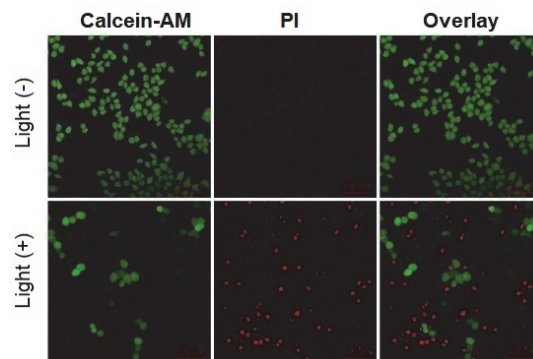


图 9 孵育有 **FP-IBDP** ($2 \mu\text{mol/L}$) 的 HeLa 细胞在 660 nm 光 (10 mW/cm^2) 照射前后的 Calcein-AM/PI ($10 \mu\text{mol/L}$) 染色图像; Calcein-AM 对应的收集范围为 500~550 nm, PI 对应的收集范围为 600~650 nm, 激发波长为 488 nm. 标尺: $100 \mu\text{m}$

Figure 9 Calcein-AM/PI ($10 \mu\text{mol/L}$) staining images of **FP-IBDP** ($2 \mu\text{mol/L}$) treated HeLa cells before and after light irradiation (660 nm, 10 mW/cm^2). The emission was collected at 500~550 nm for Calcein-AM and 600~650 nm for PI under excitation at 488 nm. Scale bar: $100 \mu\text{m}$

同样测试了 **FP-IBDP** 对 HepG2 肝癌细胞和 HL-7702 正常肝细胞的光毒性, 结果如图 10 所示. 在光照条件下, HepG2 细胞和 HL-7702 细胞的存活率都随着 **FP-IBDP** 孵育浓度的增加而降低. 然而, 在相同的光照及孵育浓度下, HepG2 细胞的存活率明显低于 HL-7702 细胞. 例如, 在 **FP-IBDP** 的孵育浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$, 光照 5 min 处理条件下, HepG2 细胞的存活率接近 20%, 相比之下, HL-7702 细胞的存活率仍旧保持在 80% 左右. 以上结果表明, 光敏剂 **FP-IBDP** 对于 HepG2 肝癌细胞具有更高的光毒性, 而对正常 HL-7702 肝细胞具有较低的光毒性. 上述结论进一步通过活/死细胞染色实验得到验证(支持信息, 图 S7).

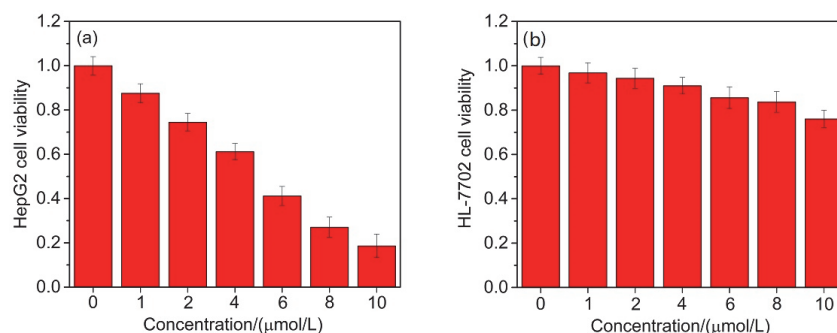


图 10 (a) 不同浓度 **FP-IBDP** 孵育的 HepG2 细胞在 660 nm 光(10 mW/cm^2)照射 5 min 后的细胞存活率; (b) 不同浓度 **FP-IBDP** 孵育的 HL-7702 细胞在 660 nm 光(10 mW/cm^2)照射 5 min 后的细胞存活率

Figure 10 (a) Viability of HepG2 cells treated with different concentrations of **FP-IBDP** under 660 nm light irradiation (10 mW/cm^2) for 5 min; (b) viability of HL-7702 cells treated with different concentrations of **FP-IBDP** under 660 nm light irradiation (10 mW/cm^2) for 5 min

最后,通过细胞划痕实验检验了光敏剂 **FP-IBDP** 对癌细胞增殖的抑制效果,结果如图 11 所示. 孵育有 **FP-IBDP** 但是未经光照的 HeLa 细胞随孵育时间逐渐增长,在孵育 24 h 后几乎可以重新长满划痕,说明在无光照射下光敏剂对细胞的毒性很小,几乎不会影响癌细胞增殖. 相反,孵育有 **FP-IBDP** 的 HeLa 细胞在经过 660 nm 光照射后,增殖能力明显减弱,经过 24 h 后,细胞数量明显减少并且大部分处于凋亡状态,说明光照射下 **FP-IBDP** 能够有效抑制癌细胞增殖.

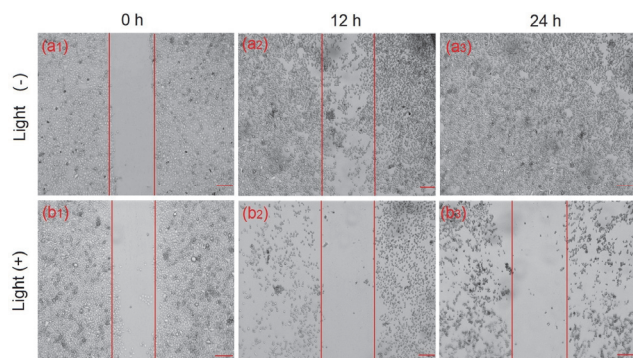


图 11 (a) **FP-IBDP** (2 $\mu\text{mol/L}$)存在时,无光照情况下 24 h 内的划痕状态; (b) **FP-IBDP** (2 $\mu\text{mol/L}$)存在时,用 660 nm 光(10 mW/cm^2)照射 5 min 后 24 h 内的划痕状态. 标尺: 200 μm

Figure 11 (a) Scratch state within 24 h without illumination in the presence of **FP-IBDP** (2 $\mu\text{mol/L}$); (b) scratch state within 24 h after illumination with 660 nm light (10 mW/cm^2) for 5 min in the presence of **FP-IBDP** (2 $\mu\text{mol/L}$). Scale bar: 200 μm

2.6 近红外氟硼二吡咯光敏剂 **FP-IBDP** 的亚细胞定位及光动力作用机制

为了揭示光敏剂 **FP-IBDP** 在亚细胞水平上的光动力治疗机制,首先采用荧光共定位实验检测了 **FP-IBDP** 在细胞内的分布,将 **FP-IBDP** 与 HeLa 细胞在黑暗条件下共同孵育 5 h,然后分别与商业化线粒体荧光染料 Mito Tracker Green FM 和溶酶体荧光染料 Lyso

Tracker Green DND-26 共孵育 20 min. 如图 12 所示,经过 5 h 孵育后,在红色荧光通道内产生了明显的红色荧光,表明光敏剂 **FP-IBDP** 被有效激活. 同时,该通道内的红色荧光与溶酶体染料的绿色荧光几乎全部重合,对应的皮尔森相关系数达到 0.88;相反,该通道内的红色荧光与线粒体染料的绿色荧光只有少量重叠,皮尔森相关系数仅为 0.32. 以上结果表明激活后的光敏剂主要富集于细胞溶酶体中.

溶酶体具有重要的生理功能,当溶酶体通透性增加或者溶酶体膜破裂时,它会释放各种水解酶到细胞质,引起溶酶体相关的细胞死亡^[48-49]. 为了阐明光照下 **FP-IBDP** 诱导的细胞死亡与溶酶体破裂相关,采用吖啶橙(AO)荧光染料检测了光动力治疗过程中溶酶体膜的完整性. 通常, AO 在胞质中显示绿色荧光,而在溶酶体酸性环境中显示红色荧光,若溶酶体膜破裂则仅显示绿色荧光^[41,50]. 如图 13 所示,光照仅孵育有 AO 的 HeLa 细胞或者将 AO 与 **FP-IBDP** 共孵育,在荧光显微镜下观测到细胞内呈现绿色荧光,同时伴随着局部红色荧光,表明溶酶体的完好性;将孵育有 AO 与 **FP-IBDP** 的细胞进行光照后,细胞内的红色荧光几乎全部消失,仅观测到绿色荧光,表明 **FP-IBDP** 诱导产生的单线态氧能够破坏细胞溶酶体并导致溶酶体相关的细胞死亡.

3 结论

本工作构建了一种新的激活型近红外氟硼二吡咯光敏剂 **FP-IBDP**,并将其应用于细胞水平上的光动力治疗研究. **FP-IBDP** 具有近红外区的吸收和发射波长,在乙腈中分别为 681 nm 和 740 nm,荧光量子效率为 0.01,单线态氧效率为 0.09. 体外实验表明 **FP-IBDP** 能够被 H_2O_2 选择性激活,生成光敏剂 **IBDP**,其在乙腈中的最大吸收波长为 661 nm,最大发射波长为 701 nm,对应的荧光量子效率为 0.11,单线态氧效率为 0.48. 活细

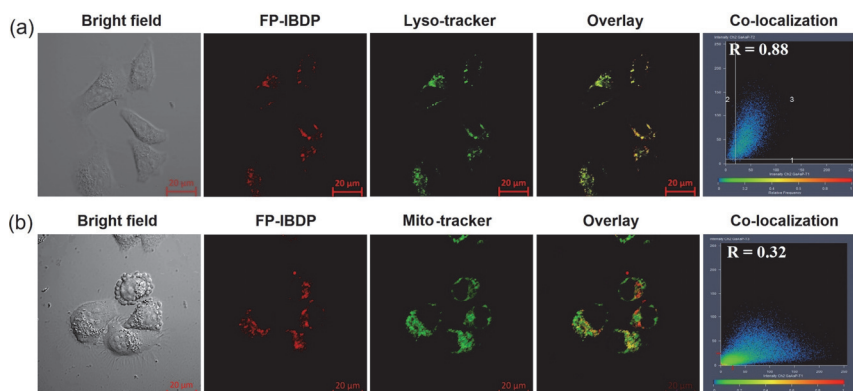


图 12 (a) **FP-IBDP** (2.0 $\mu\text{mol/L}$)与溶酶体染料 Lyso Tracker Green DND-26 (1.0 $\mu\text{mol/L}$)共孵育 HeLa 细胞的荧光图像; (b) **FP-IBDP** (2.0 $\mu\text{mol/L}$)与线粒体染料 Mito Tracker Green FM (1.0 $\mu\text{mol/L}$)共孵育 HeLa 细胞的荧光图像; **FP-IBDP** 对应的激发波长为 633 nm,收集范围为 650~750 nm; 线粒体染料和溶酶体染料对应的激发波长为 488 nm,收集范围为 500~550 nm. 标尺: 20 μm

Figure 12 (a) Fluorescence images of HeLa cells co-stained with **FP-IBDP** (2.0 $\mu\text{mol/L}$) and Lyso Tracker Green DND-26 (1.0 $\mu\text{mol/L}$); (b) fluorescence images of HeLa cells co-stained with **FP-IBDP** (2.0 $\mu\text{mol/L}$) and Mito Tracker Green FM (1.0 $\mu\text{mol/L}$). The emission was collected at 650~750 nm for **FP-IBDP** under excitation at 633 nm and 500~550 nm for Mito Tracker and Lyso Tracker under excitation at 488 nm. Scale bar: 20 μm

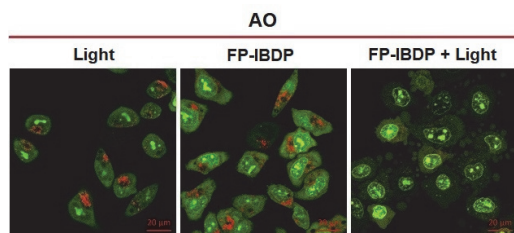


图13 孵育有吖啶橙(AO)荧光染料(10 $\mu\text{mol/L}$)的HeLa细胞在不同处理条件下的荧光图像。红色荧光通道的收集范围为600~650 nm, 绿色荧光通道收集范围为500~550 nm, 激发波长为488 nm。标尺: 20 μm

Figure 13 Confocal fluorescence images of AO (10 $\mu\text{mol/L}$) treated HeLa cells under different treatment conditions. The emission was collected at 600~650 nm for red channel and 500~550 nm for green channel under excitation at 488 nm. Scale bar: 20 μm

胞水平上的荧光成像表明 **FP-IBDP** 对癌细胞内的 H_2O_2 具有灵敏的响应, 并能够通过明显的荧光增强变化实现癌细胞与正常细胞的区分。细胞水平上的光动力治疗研究进一步表明 **FP-IBDP** 能够被癌细胞内过表达的 H_2O_2 激活, 在近红外光照射下, 产生的单线态氧通过破坏癌细胞的溶酶体导致溶酶体相关的细胞死亡, 而对正常细胞具有低的光动力损伤。作为一种新的激活型近红外光敏剂, **FP-IBDP** 在荧光成像指导的光动力治疗方面具有较大的应用潜力和研究价值, 进一步研究仍在继续当中。

4 实验部分

4.1 激活型光敏剂 **FP-IBDP** 的合成

化合物 **1**、**2** 和 **3** 为已知化合物, 按照文献报道的方法合成^[34,38]。

化合物 **IBDP** 的合成: 将化合物 **2** (577 mg, 1.00 mmol) 和化合物 **3** (1.07 g, 4.00 mmol) 溶解于 50 mL 干燥甲苯中, 然后加入冰醋酸(1.0 mL), 吡啶(1.0 mL), 混合物在氮气氛围下用 Dean-Stark 装置回流反应 6 h, 然后减压脱除溶剂。将剩余物溶解于 100 mL 二氯甲烷中, 用氯化钠水溶液洗涤三次, 收集有机相, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋蒸除去溶剂。粗产品以二氯甲烷/甲醇(体积比为 50:1)为流动相进行柱层析纯化得到深绿色固体化合物 **IBDP** (388 mg, 产率 36%)。 ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) δ : 8.84 (d, $J=6.0$ Hz, 2H), 8.18 (d, $J=16.8$ Hz, 2H), 7.61~7.57 (m, 6H), 7.41 (d, $J=4.2$ Hz, 2H), 6.98 (d, $J=8.4$ Hz, 4H), 4.20 (t, $J=4.2$ Hz, 4H), 3.90 (t, $J=4.2$ Hz, 4H), 3.77 (dd, $J_1=4.2$ Hz, $J_2=3.0$ Hz, 4H), 3.71 (dd, $J_1=4.2$ Hz, $J_2=3.0$ Hz, 4H), 3.67 (dd, $J_1=4.8$ Hz, $J_2=3.0$ Hz, 4H), 3.57 (dd, $J_1=3.0$ Hz, $J_2=4.2$ Hz, 4H), 3.39 (s, 6H), 1.47 (s, 6H)。 ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) δ : 160.26, 151.31, 150.21, 144.86, 139.97, 131.71, 129.60, 124.08, 116.56, 115.10, 71.98, 70.92, 70.69, 70.60, 69.69, 67.65, 59.01, 17.81。HRMS: m/z calcd for $\text{C}_{46}\text{H}_{52}\text{BF}_2\text{I}_2\text{N}_3\text{O}_8$ [M+

$\text{H}]^+$ 1078.1978, found 1078.1991.

化合物 **FP-IBDP** 的合成: 将化合物 **IBDP** (216 mg, 0.20 mmol) 和 4-(溴甲基)苯硼酸 (160 mg, 0.75 mmol) 溶解在 30 mL 乙腈溶液中, 加热回流 24 h。待反应混合物冷却至室温后, 过滤, 滤饼用乙酸乙酯洗涤几次。收集滤饼, 进行真空干燥, 得到深绿色的固体化合物 **FP-IBDP** (232 mg, 产率 90%)。 ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz) δ : 9.43 (d, $J=5.4$ Hz, 2H), 8.53 (d, $J=4.2$ Hz, 2H), 8.19~8.13 (m, 4H), 7.89 (d, $J=7.2$ Hz, 2H), 7.61 (d, $J=7.8$ Hz, 4H), 7.47 (d, $J=15.6$ Hz, 4H), 7.09 (d, $J=7.8$ Hz, 4H), 5.99 (s, 2H), 4.18 (s, 4H), 3.77 (s, 4H), 3.60 (s, 4H), 3.54~3.52 (m, 8H), 3.43 (s, 4H), 3.23 (s, 6H), 1.44 (s, 6H); ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 150 MHz) δ : 160.77, 151.51, 146.84, 140.36, 136.35, 135.36, 131.40, 129.84, 129.67, 128.95, 127.72, 116.27, 116.24, 115.92, 71.76, 70.46, 70.28, 70.09, 69.32, 67.98, 58.52, 18.45。HRMS: m/z calcd for $\text{C}_{53}\text{H}_{60}\text{B}_2\text{F}_2\text{I}_2\text{N}_3\text{O}_{10}$ [M] $^+$ 1212.2517, found 1212.2544.

4.2 细胞培养及荧光影像

实验所用的 HeLa 细胞, HepG2 细胞, HCT116 细胞, HL-7702 细胞以及 COS-7 细胞均源自 ATCC 细胞库, 并采用含有 10% 胎牛血清的杜氏改良培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)进行孵育。实验时, 将细胞置于含有 5% CO_2 的培养箱中于 37 $^\circ\text{C}$ 下孵育, 待细胞生长 24 h 后, 将细胞接种在共聚焦培养皿中, 并在培养箱中继续培养 12 h。

含有 **FP-IBDP** 的细胞培养液的配置及使用: 在进行细胞成像时首先将 **FP-IBDP** 超声溶解在乙腈溶剂中配置成浓度为 2 mmol/L 的母液, 然后取 2 μL 母液加入到 2 mL DMEM 培养基中, 震荡摇匀之后用以孵育细胞。

FP-IBDP 影像细胞外源性 H_2O_2 实验: 将 HeLa 细胞与 H_2O_2 (100 $\mu\text{mol/L}$) 在 37 $^\circ\text{C}$ 下孵育 1 h。用 PBS 缓冲溶液(10 mmol/L, pH=7.4), 洗涤细胞 3 次后, 将上述细胞用含有 2 $\mu\text{mol/L}$ **FP-IBDP** 的培养基继续孵育 2 h。弃去培养基后, 用 PBS 缓冲溶液洗涤细胞 3 次, 然后在共聚焦显微镜下进行拍摄, 观测细胞内荧光变化情况。

FP-IBDP 影像细胞内源性 H_2O_2 实验: 将 HeLa 细胞与佛波酯(2 $\mu\text{g/mL}$) 在 37 $^\circ\text{C}$ 下孵育 12 h。用 PBS 缓冲溶液洗涤细胞 3 次后, 将上述细胞用含有 2 $\mu\text{mol/L}$ **FP-IBDP** 的培养基继续孵育 2 h。弃去培养基后, 用 PBS 缓冲溶液洗涤细胞 3 次, 然后在共聚焦显微镜下进行拍摄, 观测细胞内荧光变化情况。

细胞内源性 H_2O_2 清除实验: 将 HeLa 细胞与佛波酯(2 $\mu\text{g/mL}$) 在 37 $^\circ\text{C}$ 下孵育 12 h, 更换新的培养基后用 2 mmol/L 的 *N*-乙酰基半胱氨酸继续孵育 1 h。用 PBS 缓冲溶液洗涤细胞 3 次后, 将上述细胞用含有 2 $\mu\text{mol/L}$ **FP-IBDP** 的培养基继续孵育 2 h。弃去培养基后, 用 PBS 缓冲溶液洗涤细胞 3 次, 然后在共聚焦显微镜下进行拍摄, 观测细胞内荧光变化情况。

FP-IBDP 用于区分癌细胞和正常细胞实验: 将实验所用的细胞用含有 $2\ \mu\text{mol/L}$ **FP-IBDP** 的培养基孵育 2 h. 弃去培养基后, 用 PBS 缓冲溶液洗涤细胞 3 次, 然后加入新的 DMEM 培养基继续孵育, 在时间点为 2 h, 3 h, 4 h 和 5 h 时分别对细胞进行共聚焦荧光成像, 观测细胞内红色荧光变化情况.

活性氧检测试剂 DCFH-DA 检测细胞内活性氧实验: 将实验所用的 HeLa 细胞用含有 $2\ \mu\text{mol/L}$ **FP-IBDP** 的培养基于黑暗环境下孵育 5 h. 弃去培养基后, 用 PBS 缓冲溶液清洗细胞 3 次, 然后向培养皿中加入 $10\ \mu\text{mol/L}$ 的 DCFH-DA 指示剂, 继续孵育 20 min. 取上述一组细胞用 PBS 缓冲溶液清洗 3 次, 然后置于波长为 660 nm, 光强度为 $10\ \text{mW/cm}^2$ 的 LED 光源下照射 5 min. 以经过同样孵育条件但未经光照的另外一组 HeLa 细胞作为对照. 将上述细胞置于共聚焦显微镜下进行拍摄, 观测绿色通道内荧光变化.

活/死细胞染色实验: 用含有 $2\ \mu\text{mol/L}$ **FP-IBDP** 的培养基于黑暗环境下孵育实验所需细胞 5 h, 弃去培养基后用 PBS 缓冲溶液清洗细胞 3 次. 将实验组细胞置于波长为 660 nm, 光强度为 $10\ \text{mW/cm}^2$ 的 LED 光源下照射 5 min. 将经过同样孵育条件但未经光照的对照组细胞置于黑暗环境放置. 统一向对照组和实验组中加入浓度均为 $10\ \mu\text{mol/L}$ 的 Calcein-AM 和 PI, 于 $37\ ^\circ\text{C}$ 继续孵育 20 min. 用 PBS 缓冲溶液清洗细胞 3 次后, 置于激光共聚焦显微镜下进行拍摄, 观测红色和绿色通道内荧光变化.

细胞划痕实验: 将 HeLa 细胞种于细胞培养皿中, 当细胞均匀密集地分布后, 用移液器的枪头在实验组和对照组中各划一条位置平行的划痕, 然后向两组细胞中均加入 **FP-IBDP** ($2\ \mu\text{mol/L}$), 并于黑暗环境下孵育 5 h. 将实验组的细胞用 660 nm 波长的光照射 5 min, 对照组的细胞不做处理, 然后将两组细胞置于培养箱中继续培养, 以光照后时间为起点, 在孵育 12 h 和 24 h 时采用 EVOS FL Auto 荧光显微镜拍摄细胞生长情况.

荧光共定位实验: 将 HeLa 细胞用含有 $2\ \mu\text{mol/L}$ **FP-IBDP** 的 DMEM 培养基于黑暗环境下孵育 5 h, 弃去培养基, 然后用 PBS 洗涤细胞 3 次. 培养皿中加入新的培养基, 然后加入线粒体标记染料 Mito Tracker Green FM ($1\ \mu\text{mol/L}$) 或溶酶体标记染料 Lyso Tracker Green DND-26 ($1\ \mu\text{mol/L}$), 置于培养箱中继续培养 20 min. 用 PBS 缓冲溶液清洗细胞 3 次后, 置于激光共聚焦显微镜下进行拍摄.

溶酶体膜完整性检测实验: 将实验组的 HeLa 细胞用含有 $2\ \mu\text{mol/L}$ **FP-IBDP** 的 DMEM 培养基于黑暗环境下孵育 5 h, 弃去培养基, 然后用 PBS 缓冲溶液清洗细胞 3 次, 接着加入 $10\ \mu\text{mol/L}$ 的 AO 指示剂, 于 $37\ ^\circ\text{C}$ 继续孵育 20 min. 将上述细胞用 PBS 缓冲溶液清洗 3 次, 然后将其置于波长为 660 nm, 光强度为 $10\ \text{mW/cm}^2$ 的 LED 光源下照射 5 min. 同时, 以孵育有 **FP-IBDP** 和 AO

染料但未经光照的 HeLa 细胞以及只孵育有 AO 的 HeLa 细胞作为对照. 将实验组与对照组细胞先后置于激光共聚焦显微镜下进行拍摄, 观测红色荧光通道和绿色荧光通道内荧光变化.

References

- [1] Li, X.; Lee, S.; Yoon, J. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47*, 1174.
- [2] Luby, B.; Walsh, C.; Zheng, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 2558.
- [3] Pham, T.; Nguyen, V.; Choi, Y.; Lee, S.; Yoon, J. *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 13454.
- [4] Zhou, L.; Lv, F.; Liu, L.; Wang, S. *Acc. Chem. Res.* **2019**, *52*, 3211.
- [5] Yan, T.; Liu, Z.-H.; Song, X.-Y.; Zhang, S.-S. *Acta Chim. Sinica* **2020**, *78*, 657 (in Chinese). (闫涛, 刘振华, 宋昕玥, 张书圣, 化学学报, **2020**, *78*, 657.)
- [6] Bu, Y.; Zhu, X.; Wang, H.; Zhang, J.; Wang, L.; Yu, Z.; Tian, Y.; Zhou, H.; Xie, Y. *Anal. Chem.* **2021**, *93*, 12059.
- [7] Chen, D.; Wang, Z.; Dai, H.; Lv, X.-Y.; Ma, Q.; Yang, D.; Shao, J.; Xu, Z.; Dong, X. *Small Methods* **2020**, 2000013.
- [8] Chen, L.; Yang, Y.; Zhang, P.; Wang, S.; Xu, J. F.; Zhang, X. *ACS Appl. Bio Mater.* **2019**, *2*, 2920.
- [9] Feng, L.; Betzer, O.; Tao, D.; Sadan, T.; Popovtzer, R.; Liu, Z. *CCS Chem.* **2019**, *1*, 239.
- [10] Triesscheijn, M.; Baas, P.; Schellens, J. M.; Stewart, F. A. *Oncology* **2006**, *11*, 1034.
- [11] Gross, S.; Gilead, A.; Scherz, A.; Neeman, M.; Salomon, Y. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 1327.
- [12] Master, A.; Livingston, M.; Sen, A. *J. Control. Release* **2013**, *168*, 88.
- [13] Cao, H.; Wang, L.; Yang, Y.; Li, J.; Qi, Y.; Li, Y.; Wang, H.; Li, J.-B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 7759.
- [14] Wang, S.-B.; Han, K.; Lei, Q.; Zhu, J.-Y.; Zhang, X.-Z. *ACS Nano* **2015**, *9*, 10268.
- [15] Zhai, W.-H.; Zhang, Y.-K.; Liu, M.; Zhang, H.; Zhang, J.-P.; Li, C.-H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, *58*, 16601.
- [16] Tian, J.; Ding, L.; Xu, H.; Shen, Z.; Ju, H.; Jia, L.; Bao, L.; Yu, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 18850.
- [17] Ling, D.; Park, W.; Park, S. j.; Lu, Y.; Kim, K.; Hackett, M.; Kim, B.; Yim, H.; Jeon, Y.; Na, K.; Hyeon, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 5647.
- [18] Tian, J.; Ding, L.; Ju, H.; Yang, Y.; Li, X.; Shen, Z.; Zhu, Z.; Yu, J.; Yang, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 9544.
- [19] Zhang, Y.; Li, X.; Huang, L.; Kim, H.; An, J.; Lan, M.; Cao, Q.; Kim, J. *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 10317.
- [20] Xu, F.; Li, H.; Yao, Q.; Ge, H.; Fan, J.; Sun, W.; Wang, J.; Peng, X. *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 10586.
- [21] Guo, Z.; Park, S.; Yoon, J.; Shin, I. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 16.
- [22] Chen, X.; Lee, D.; Yu, S.; Kim, G.; Lee, S.; Cho, Y.; Jeong, H.; Nam, K.; Yoon, J. *Biomaterials* **2017**, *122*, 130.
- [23] Tian, R.; Sun, W.; Li, M.; Long, S.; Li, M.; Fan, J.; Guo, L.; Peng, X. *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 10106.
- [24] Awuah, S.; You, Y. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 11169.
- [25] Bessette, A.; Hanan, G. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 3342.
- [26] Liu, B.-D.; Wang, C.-J.; Qian, Y. *Acta Chim. Sinica* **2022**, *80*, 1071 (in Chinese). (刘巴蒂, 王承俊, 钱鹰, 化学学报, **2022**, *80*, 1071.)
- [27] Yogo, T.; Urano, Y.; Ishitsuka, Y.; Maniwa, F.; Nagano, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12162.
- [28] Atilgan, S.; Ekmekci, Z.; Dogan, A. L.; Guc, D.; Akkaya, E. *Chem. Commun.* **2006**, 4398.
- [29] Awuah, S. G.; Polreis, J.; Biradar, V.; You, Y. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 3884.
- [30] Batat, P.; Cantuel, M.; Jonusauskas, G.; Scarpantonio, L.; Palma, A.; O'Shea, D.; McClenaghan, N. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 14034.
- [31] Nguyen, V.; Yim, Y.; Kim, S.; Ryu, B.; Swamy, K.; Kim, G.; Kwon, N.; Kim, C.; Park, S.; Yoon, J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 8957.
- [32] Dong, Y.; Dick, B.; Zhao, J. Z. *Org. Lett.* **2020**, *22*, 5535.
- [33] Raza, M.; Gautam, S.; Howlader, P.; Bhattacharyya, A.; Kondiah, P.; Chakravarty, A. *Inorg. Chem.* **2018**, *57*, 14374.
- [34] Li, M.; Tian, R.; Fan, J.; Du, J.; Long, S.; Peng, X. *Dyes and Pigments* **2017**, *147*, 99.
- [35] Liu, Y.; Xu, C.; Teng, L.; Liu, H.; Ren, T.; Xu, S.; Lou, X.; Guo, H.;

- Yuan, L.; Zhang, X. *Chem. Commun.* **2020**, 56, 1956.
- [36] Teng, K.; Niu, L.; Kang, Y.; Yang, Q. *Chem. Sci.* **2020**, 11, 9703.
- [37] Lv, X.; Han, T.; Wu, Y.; Zhang, B.; Guo, W. *Chem. Commun.* **2021**, 57, 9744.
- [38] Yuan, B.; Wang, H.; Xu, J.; Zhang, X. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, 12, 26982.
- [39] Zeng, Q.; Zhang, R.; Zhang, T.; Xing, D. *Biomaterials* **2019**, 207, 39.
- [40] Liu, H.; Hu, X.; Li, K.; Liu, Y.; Rong, Q.; Zhu, L.; Yuan, L.; Qu, F.; Zhang, X.; Tan, W. *Chem. Sci.* **2017**, 8, 7689.
- [41] Chen, H.; Tian, J.; He, W.; Guo, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 1539.
- [42] Abouelmagd, S. A.; Hyun, H.; Yeo, Y. *Expert Opin. Drug Del.* **2014**, 11, 1601.
- [43] Hamblin, M. R.; Miller, J. L.; Rizvi, I.; Ortel, B.; Maytin, E. V.; Hansan, T. *Cancer Res.* **2001**, 61, 7155.
- [44] Sahoo, S. K.; Sawa, T.; Fang, J.; Tanaka, S.; Miyamoto, Y.; Akaike, T.; Maeda, H. *Bioconjugate Chem.* **2002**, 13, 1031.
- [45] Rapozzi, V.; Zacchigna, M.; Biffi, S.; Garrovo, C.; Cateni, F.; Stebel, M.; Zorzet, S.; Bonora, G. M.; Drioli, S.; Xodo, L. *Cancer Biol. Ther.* **2010**, 10, 471.
- [46] Narayanaswamy, N.; Narra, S.; Nair, R.; Saini, D.; Kondaiah, P.; Govindaraju, T. *Chem. Sci.* **2016**, 7, 2832.
- [47] Reja, S.; Gupta, M.; Gupta, N.; Bhalla, V.; Ohri, P.; Kaur, G.; Kumar, M. *Chem. Commun.* **2017**, 53, 3701.
- [48] Guicciardi, M.; Leist, M.; Gores, G. *Oncogene* **2004**, 23, 2881.
- [49] Kroemer, G.; Jaattela, M. *Nat. Rev. Cancer* **2005**, 5, 886.
- [50] Chen, H.; Xiao, L.; Anraku, Y.; Mi, P.; Liu, X.; Cabral, H.; Inoue, A.; Nomoto, T.; Kishimura, A.; Nishiyama, N.; Kataoka, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 157.

(Cheng, B.)