

绿光光控释放和荧光增强响应的 CO 给体设计、合成及应用

邢皖晋^{*,a,b} 张逸蓉^a 陈军伟^a 励扬^a
徐 缓^b 王 卫^{*,a} 楼开炎^{*,a}
(^a 华东理工大学药学院 上海 200237)
(^b 安徽理工大学公共卫生学院 合肥 232001)

摘要 一氧化碳(CO)不仅是一种有毒气体,同时也是重要的气体信号传递分子,在多种生理和病理过程中发挥重要的调节作用,包括神经传递、血管扩张、减缓炎症反应、抗癌等。发展可控释放并能产生荧光信号定量示踪的 CO 给体分子对于研究其信号传导和量效关系尤为重要。以 3-羟基黄酮醇(HF)为光控释放 CO 基团,通过在 B 环 4'位以双键共轭连接方式引入氟硼二吡咯(BODIPY)荧光团,设计合成了一种新型绿光光解和荧光示踪的光控 CO 给体分子 **BODIPY-Fla-1**。它能在绿色发光二极管(LED)光源照射的有氧条件下光解生成 CO,同时在 562 nm 处产生绿色荧光增强响应,可通过荧光成像对其在细胞内的光控释放 CO 进行示踪,也在细胞氧化应激模型中,验证了 **BODIPY-Fla-1** 光控释放 CO 可有效降低细胞内超氧自由基水平,缓解氧化应激。这种以双键共轭的方式连接荧光团的策略为进一步开发光解波长更长可荧光示踪的 3-黄酮醇光控 CO 给体分子提供了新的分子设计思路。

关键词 一氧化碳; CO 给体; 光控释放; 氧化应激; 绿色荧光

Design, Synthesis and Application of CO Donor with Green Light Controlled Release and Fluorescence Enhancement Response

Xing, Wanjin^{*,a,b} Zhang, Yirong^a Chen, Junwei^a Li, Yang^a
Xu, Huan^b Wang, Wei^{*,a} Lou, Kaiyan^{*,a}
(^a School of Pharmacy, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237)
(^b School of Public Health, Anhui University of Science and Technology, Hefei 232001)

Abstract Carbon monoxide (CO) is not only a toxic gas, but also an important gas signaling molecule that plays crucial regulatory roles in various physiological and pathological processes, which include neurotransmission, vasodilation, mitigation of inflammatory response, and anti-cancer activities. Therefore, development of CO donors for controlled release of CO with simultaneous fluorescence signal generation for quantification and tracking purpose is particularly useful for CO signal transduction and quantity-activity relationship studies. Herein, a novel photo-controlled CO donor **BODIPY-Fla-1** was designed and synthesized using 3-hydroxyflavone (HF) as the photo-triggered CO-releasing moiety, which is conjugated to a boron-dipyrromethene (BODIPY) fluorophore at its 4' position of B ring via a double-bond linkage. It can achieve photo-triggered CO release under green light-emitting diode (LED) light irradiation and aerobic condition with simultaneous fluorescence turn-on responses at 562 nm for convenient tracking CO release via fluorescence imaging at green channel in live cell studies. It was also verified that the CO released by photolysis of **BODIPY-Fla-1** can effectively reduce the level of intracellular superoxide radical and alleviate oxidative stress. This incorporation of a conjugated fluorophore moiety via a double bond linkage provides a new design strategy for development of HF-based CO donors with longer photolysis light and fluorescence response wavelength.

Keywords carbon monoxide; CO donor; photo-triggered release; oxidative stress; green fluorescence

一氧化碳(carbon monoxide, CO)是重要的气体信号传递分子之一,在多种生理和病理过程中发挥重要的调

节作用,对维持生物体内平衡至关重要^[1-2]。人体中的内源性 CO 主要通过血红素加氧酶催化血红素降解产生^[3],

* Corresponding authors. E-mail: 859118500@qq.com; wwang@pharmacy.arizona.edu; kylou@ecust.edu.cn

Received July 10, 2024; revised October 12, 2024; published online November 20, 2024.

Project supported by the Shanghai Natural Science Fund (No. 20ZR1414700) and the National Natural Science Foundation of China (No. 42177417).

上海市自然科学基金(No. 20ZR1414700)和国家自然科学基金(No. 42177417)资助项目。

通过与蛋白质中的低价过渡金属中心配位表现出对细胞信号通路和离子通道等^[4-5]调控作用,以及心肌保护^[6]、抗炎^[7]、抗凋亡^[8]和抗肿瘤^[9]等多种生物活性。近年来,CO作为一种潜在的可治疗多种疾病的药物分子受到了极大的关注^[10]。目前,几项涉及吸入性CO作为治疗炎症和血管疾病的药物已经完成或正在处于临床研究中^[10-11]。

然而,CO作为药物治疗分子包括其生理病理调控机制的研究还需要克服一些难题。首先,CO具有毒性,其毒性主要来源于CO可以与氧气竞争性结合血液中红细胞的血红蛋白,阻碍氧气的正常运输,从而导致生物体缺氧窒息^[12]。其次,由于CO作为气体分子,具有易扩散性,难以在疾病的病理组织或者特定的细胞中的富集^[13]。此外,CO在不同疾病条件下生物活性的量效关系还不是很清楚。为解决这些难题,研究者们发展了能在生理条件下释放CO的一氧化碳释放分子(CO releasing molecules, CORMs)或者CO给体(CO donors),主要可分为过渡金属羰基配合物^[14-17]和有机小分子CO给体两大类^[18]。从CO的可控释放方式上可分为光控释放^[19]、酶促释放^[20]以及点击化学释放^[21]等。有机小分子CO给体分子如 α,α -双烷基醛、三烷基硅酸、碳酸硼盐、黄酮醇等,它们具有生物相容性好、方便结构修饰改造等优点,与光控释放相结合,更容易实现CO的时空可控释放^[22]。其中,以3-羟基黄酮醇(3-hydroxyflavonol, HF)为CO光控释放结构单元的有机小分子CO给体,由于该结构来源于天然产物,受到了广泛的关注^[13,23]。机理研究表明它可能通过不同的光反应路径与氧气反应生成CO。在光照条件下,HF的三线态质子转移激发态与基态的氧气分子反应能生成CO,基态的HF也能与染料分子敏化生成的单线态氧反应释放CO。这种多反应路径使得HF能在氧气的存在下,几乎定量光解释放CO^[24]。此外,由于HF分子本身具有荧光,而光解后C环开裂生成的缩酚酸产物荧光消失,可方便地通过荧光信号的减弱或消失指示CO的释放,这对研究CO的量效关系尤为重要。另外,由于3位的羟基对CO的光控释放是必不可少的,可方便地通过对3位羟基的保护实现多一层可控释放或靶向释放。HF作为光控释放CO给体仍有一些缺点,限制了它作为CO给体的应用。首先,它的吸收主要在紫外区,需要用紫外光或蓝光光解,光解波长短,光毒性大,并且在生物学应用时的组织穿透性低^[25]。其次,它在CO光控释放时产生的荧光响应是荧光淬灭(On-Off)型,对通过荧光成像来监测CO的释放是不利的。

近年来,针对HF分子的结构改造,以获得光解波长更长,荧光响应为荧光增强(Off-On)型或者比率型荧

光响应的光控释放CO给体分子取得了一些进展。其中,大多数的结构改造聚焦于在A环引入取代基、将苯环替换为萘环或者融合菁染料结构,或者通过在B环上引入取代基或者替换为简单的杂环等。2019年,Feng等^[26]通过将黄酮醇的B环替换为香豆素荧光团,得到了第一个在可见光照射(460 nm)下实现光控释放CO的CO给体分子 **Cou-Flavone**(图 1b),同时产生比率型荧光响应,可在细胞和动物体内实现CO的释放和荧光成像监测。2020年,Šťacková等^[27]将黄酮醇与近红外菁染料结构相融合,发展了可在近红外光控释放CO给体分子 **Cyanine-Flavonol Hybrids**(图 1b),但未对其荧光变化进行研究。2023年,Li等^[28]通过在黄酮醇的A环和B环上同时扩展 π 共轭,得到吸收峰和发射峰均发生较大红移的光控释放CO给体分子 **Nbp-flaH**(图 1b)。尽管目前研究者们已经开发了多个基于黄酮醇的CORMs,但它们大都需要用紫外光或蓝光进行光解,组织穿透性低,光毒性大。另外,现有的研究中,在黄酮醇结构中引入荧光团的分子设计的普适性还不强,荧光信号生成的波段也有限。因此,进一步发展在黄酮醇结构中引入荧光团的通用性分子设计,开发可在其它可见光波段光解或者荧光响应的黄酮醇类似物作为光控释放CO给体用于CO的可控释放和荧光定量跟踪,仍然具有重要意义。

在本研究中,由于氟化硼二吡咯(BODIPY)荧光团具有光稳定性好,摩尔消光系数大,可方便地通过结构衍生拓展吸收和荧光发射等优点^[29],我们设想在黄酮醇B环的4'位以双键共轭连接的方式通过Knoevenagel反应引入氟硼二吡咯(BODIPY)荧光团,设计并合成了探针 **BODIPY-Fla-1**(图 1c)。该分子可以在绿光LED灯照射下,在含氧环境中释放CO,并产生绿色荧光增强信号。通过细胞实验,验证了 **BODIPY-Fla-1** 可通过荧光信号对CO的光控释放进行示踪和定量,有助于CO释放的量效关系研究。

1 结果与讨论

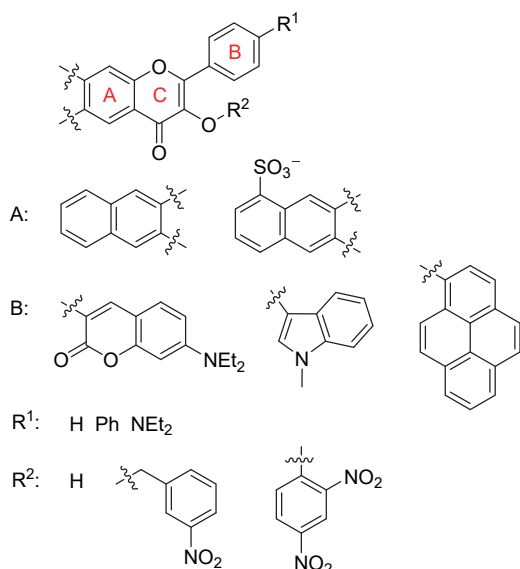
1.1 探针 **BODIPY-Fla-1** 的合成

探针 **BODIPY-Fla-1** 的合成路线如 Scheme 1 所示,其中化合物 **1**^[30]和 **2**^[31]按照已报道的方法进行制备。随后,化合物 **1** 和 **2** 在微波反应器中经Knoevenagel缩合反应得到目标化合物 **BODIPY-Fla-1**。其结构通过高分辨质谱(HRMS)、核磁共振氢谱(¹H NMR)、核磁共振碳谱(¹³C NMR)确证,详细合成方法与表征数据见实验部分。

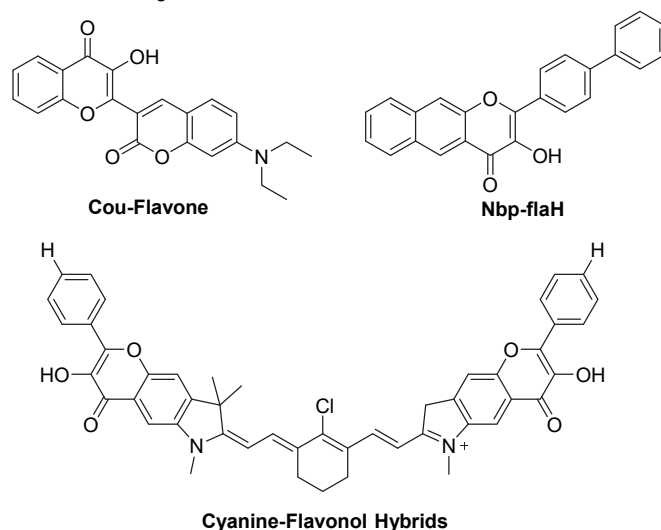
1.2 **BODIPY-Fla-1** 光解反应紫外-可见吸收光谱的变化

BODIPY-Fla-1 在磷酸盐缓冲溶液(PBS, 10 mmol/L,

(a) Reported 3-HF derivatives for photo-controlled CO release



(b) Representative 3-HF derivatives with photolysis wavelength in visible or near-infrared region



(c) This work: Incorporation of a boron-dipyrromethene (BODIPY) fluorophore conjugated to the 4' position of 3-hydroxyflavone (HF) via a double-bond linkage

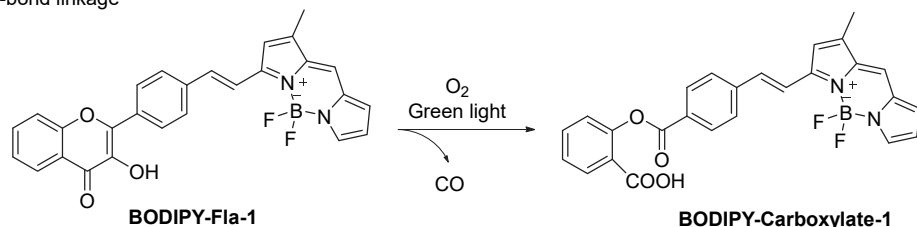
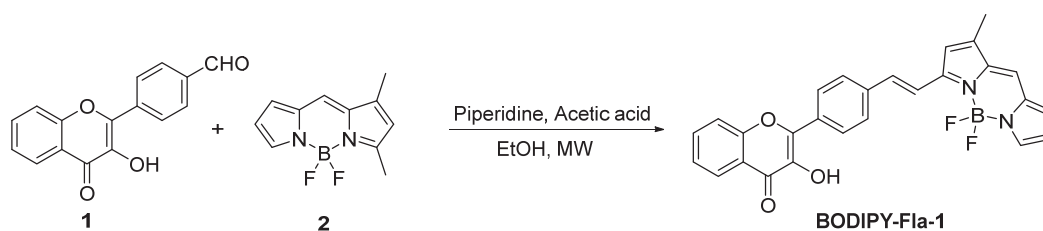


图1 (a)已报道的基于3-羟基黄酮醇结构衍生的光控CO给体;(b)光解波长在可见区或近红外区的3-羟基黄酮醇衍生物的代表性结构;(c)本工作:3-羟基黄酮醇(HF)通过在B环4'位以双键共轭的连接方式与氟硼二吡咯(BODIPY)荧光团连接

Figure 1 (a) Reported 3-HF derivatives for photo-controlled CO donors; (b) Representative structures of 3-HF derivatives with photolysis wavelength at visible or near-infrared region; (c) This work: incorporation of a boron-dipyrromethene (BODIPY) fluorophore conjugated to 4' position of 3-hydroxyflavone (HF) via a double-bond linkage



图式1 探针 BODIPY-Fla-1 的合成路线

Scheme 1 Synthesis route of probe BODIPY-Fla-1

pH=7.4)中的紫外-可见吸收谱图有三个吸收峰,分别在390、554和606 nm(图2a)。它在绿光波段(550 nm左右)有明显的吸收。以15 W绿色LED灯为光解光源,每光照5 min后测一次紫外-可见吸收光谱。结果显示,随着光照时间的增加,390和606 nm处的吸收峰强度逐渐降低,而504 nm处的吸收峰逐渐升高。光照60 min后变化趋于平缓,显示光解反应达到终点。

1.3 BODIPY-Fla-1 光解反应荧光光谱变化

光照前 BODIPY-Fla-1 的荧光很弱,推测是由于其

疏水性和平面结构,在水溶液中容易发生聚集,而平面结构在分子聚集时容易发生分子间 π 轨道堆积作用产生聚集荧光淬灭(aggregation-caused quenching, ACQ)现象(参见1.6)。用15 W绿光LED光源照射后,562 nm处荧光发射峰逐渐增强(图2b),60 min后达到最大值,显示光解反应达到终点。荧光激发光谱显示其最大激发波长位于552 nm处。由于BODIPY-Fla-1的Stokes位移较小,因此,选取520 nm作为后续荧光信号检测光解释放CO的激发波长。

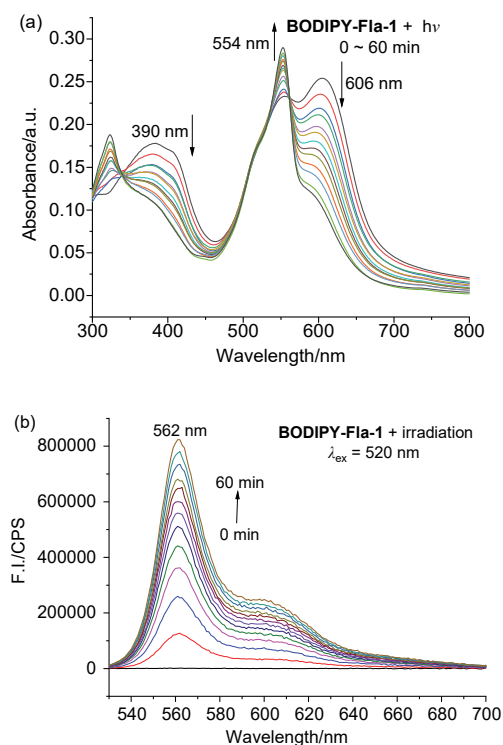


图2 (a) **BODIPY-Fla-1** (10 $\mu\text{mol/L}$)随光解时间变化的紫外吸收光谱; (b) **BODIPY-Fla-1** (10 $\mu\text{mol/L}$)随光解时间变化的荧光发射光谱图($\lambda_{\text{ex}}=520\text{ nm}$)

Figure 2 (a) Time-dependent UV absorption spectra of **BODIPY-Fla-1** (10 $\mu\text{mol/L}$) upon photolysis; (b) Time-dependent fluorescence emission spectrum of **BODIPY-Fla-1** (10 $\mu\text{mol/L}$, $\lambda_{\text{ex}}=520\text{ nm}$) upon photolysis

All measurements were performed in 10 mmol/L pH=7.4 PBS buffer. Photolysis reactions were performed under a 15 W green LED light.

1.4 **BODIPY-Fla-1** 的光控释放 CO 的确认

采用了两种不同的方法来验证 **BODIPY-Fla-1** 光解后释放 CO。首先,利用 CO 荧光探针 **NF-APC**^[32]来检测 **BODIPY-Fla-1** 光解后产生的 CO。CO 通过快速还原 Pd(II)为 Pd(0),催化荧光探针 **NF-FPC** 脱去烯丙基碳酸酯,产生 688 nm 的特征荧光发射峰($\lambda_{\text{ex}}=620\text{ nm}$)。如图 3a 所示,10 $\mu\text{mol/L}$ 的 **BODIPY-Fla-1** 在绿色 LED 灯下光照 15 min 后加入探针 **NF-APC** (10 $\mu\text{mol/L}$)和 Na_2PdCl_4 (60 $\mu\text{mol/L}$)后,确实能观察到 688 nm 处的荧光随放置时间不断增强,证明了 **BODIPY-Fla-1** 在光照下能够释放 CO。进一步利用血红蛋白捕获光解产生的 CO,通过紫外-可见吸收光谱的变化验证光解释放 CO。当 **BODIPY-Fla-1** 与血红蛋白(hemoglobin, Hb)的混合溶液光照后,每 10 min 测一次吸收光谱,血红蛋白由于结合 CO 转化为碳氧血红蛋白(carboxyhemoglobin, HbCO),其在 427 nm 处的最大吸收峰逐渐蓝移至 407 nm 左右(图 3b)^[33],从而可以确证 **BODIPY-Fla-1** 在绿光 LED 的照射下释放了 CO。

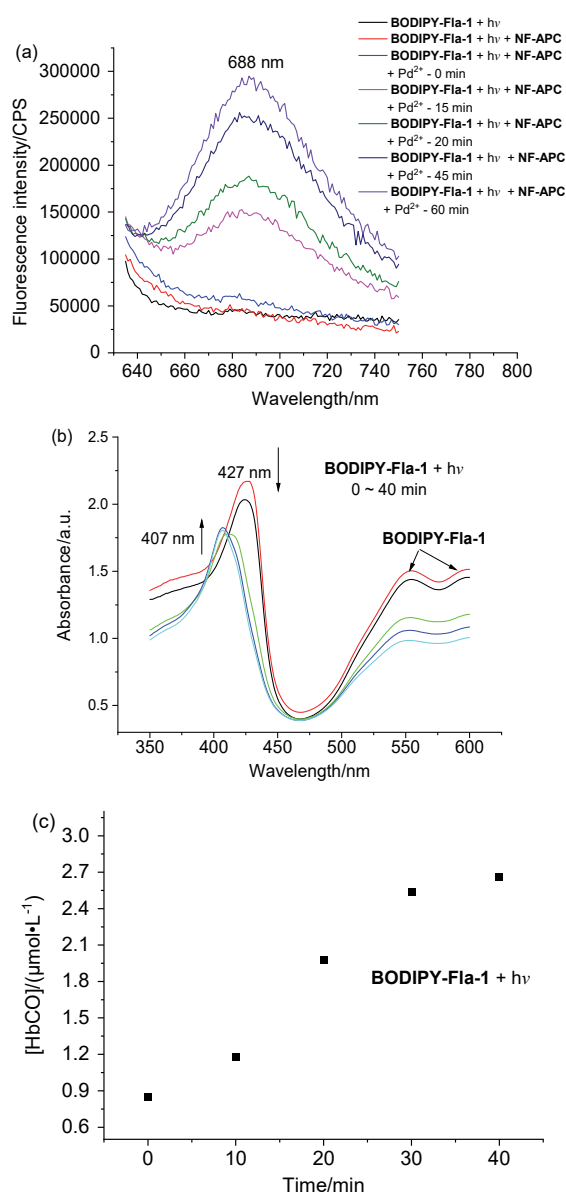


图3 (a) **BODIPY-Fla-1** (10 $\mu\text{mol/L}$)绿光照射 15 min 后加入探针 **NF-APC** (10 $\mu\text{mol/L}$)与 Na_2PdCl_4 (60 $\mu\text{mol/L}$)后荧光发射谱图随时间的变化($\lambda_{\text{ex}}=620\text{ nm}$); (b)探针 **BODIPY-Fla-1** (50 $\mu\text{mol/L}$)与血红蛋白(4.2 $\mu\text{mol/L}$)共孵育条件下的紫外吸收光谱随绿光照射时间的变化(每 10 min 测一次); (c)相应生成的碳氧血红蛋白浓度计算值随光照时间的变化

Figure 3 (a) Time-dependent fluorescence emission spectra of 10 $\mu\text{mol/L}$ **BODIPY-Fla-1** preirradiated with green LED light for 15 min incubated with **NF-APC** (10 $\mu\text{mol/L}$) and Na_2PdCl_4 (60 $\mu\text{mol/L}$) ($\lambda_{\text{ex}}=620\text{ nm}$); (b) Time-dependent absorption spectra of the probe **BODIPY-Fla-1** (50 $\mu\text{mol/L}$) coincubated with Hb (4.2 $\mu\text{mol/L}$) upon irradiated with green LED light; (c) Corresponding time-dependent calculated COHb concentration upon photoirradiation

All measurements were performed in 10 mmol/L pH=7.4 PBS buffer, the light source is green LED, 15 W

进一步参考 He 等^[33]基于血红蛋白捕获 CO 前后紫外-可见吸收光谱变化推导的与 CO 结合的碳氧血红蛋白

白的浓度计算公式 $C_{\text{HbCO}} = [(528.6 \times A_{410} - 304.0 \times A_{430}) / (216.5 \times A_{410} - 442.4 \times A_{430})] C_{\text{Hb}}$ 来计算被捕获的 CO 浓度, 其中 A_{410} 和 A_{430} 分别代表和 410 和 430 nm 的吸光度, 即在实验中实测血红蛋白和碳氧血红蛋白最大吸收波长处的吸光度, 而 C_{Hb} 为血红蛋白的起始浓度. 由于实测的血红蛋白和碳氧血红蛋白的最大吸收波长分别位于 427 和 407 nm 处, 以这两处的吸光度代替公式中 430 和 410 nm 处的吸光度, 粗略计算 HbCO 的浓度, 即所捕获的 CO 浓度. 如图 3c 所示, 血红蛋白捕获的 CO 的浓度随着 **BODIPY-Fla-1** 光解照射时间的增加而增加. 光照 40 min 后计算 HbCO 的浓度为 2.7 $\mu\text{mol/L}$, 由此计算 10 $\mu\text{mol/L}$ **BODIPY-Fla-1** 在 15 W 绿色 LED 灯光照下释放 CO 的产率至少为 5.4%.

1.5 BODIPY-Fla-1 光解生成的荧光产物的结构确证研究

对 **BODIPY-Fla-1** 光解反应(图 4)的主要产物 **BODIPY-Carboxylate-1** 进行了分离提纯, 通过核磁共振氢谱和 HRMS 对其结构进行了确认, 并对 **BODIPY-Carboxylate-1** 和光解溶液的归一化荧光光谱进行了比较, 确认了它就是荧光产物.

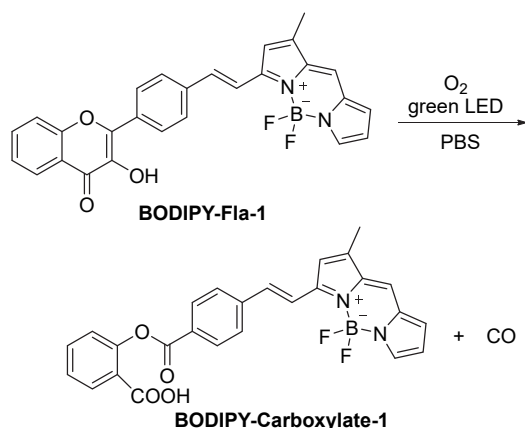


图 4 **BODIPY-Fla-1** 光解释放 CO 的反应式

Figure 4 Reaction scheme of CO release from photolysis of **BODIPY-Fla-1**

此外, 也对不同照射时间的 **BODIPY-Fla-1** 的 PBS 缓冲溶液进行高效液相色谱法(HPLC)分析, 随着光照时间的增加, 可以观察原料峰(**BODIPY-Fla-1**, 保留时间为 16.8 min)的下降和主要产物峰(**BODIPY-Carboxylate-1**, 保留时间 7.8 min)的增加, 进一步确认了光解反应的产物为 **BODIPY-Carboxylate-1**.

1.6 BODIPY-Fla-1 光解前后溶液聚集粒径变化研究

为验证 **BODIPY-Fla-1** 的聚集荧光淬灭机制, 通过动态光散射分析技术对测试条件下即 **BODIPY-Fla-1** (10 $\mu\text{mol/L}$) 于细胞完全培养基中绿光照射前后聚集粒

径的变化进行测量. 结果显示, 光照前测得的粒径为 343.9 nm, 而光照 60 min 后降低为 284.2 nm, 说明光解后聚集粒径降低. 推测其原因, 一方面, 光解产物 **BODIPY-Carboxylate-1** 具有亲水性基团羧基, 亲水性增加. 另一方面, 由于黄酮醇基团 C 环的裂解, 导致分子的平面性减弱, ACQ 效应减弱, 由此在 562 nm 处产生由于荧光产物 **BODIPY-Carboxylate-1** 溶解产生的荧光增强信号.

1.7 BODIPY-Fla-1 绿光可控光解和荧光监测性能的循环测试验证

为进一步验证 **BODIPY-Fla-1** 在绿光照射下可控光解释放 CO 并产生荧光信号, 对 **BODIPY-Fla-1** (10 $\mu\text{mol/L}$) 的 PBS 缓冲溶液, 进行了绿光照射和荧光检测 ($\lambda_{\text{ex/em}} = 520/562$ nm) 循环测试, 每照射 15 min 用荧光仪监测 5 min. 从荧光强度增加的阶梯图(图 5)可以看出, **BODIPY-Fla-1** 的 PBS 溶液每照射 15 min 后荧光均有不同程度的增强, 在避光条件下溶液荧光保持平稳不变. 从荧光产物的生成量可以反推 CO 的释放量也近似相等. 因此, 可以通过光照的时间和地点调控以实现精准的时间和空间控制的 CO 的释放.

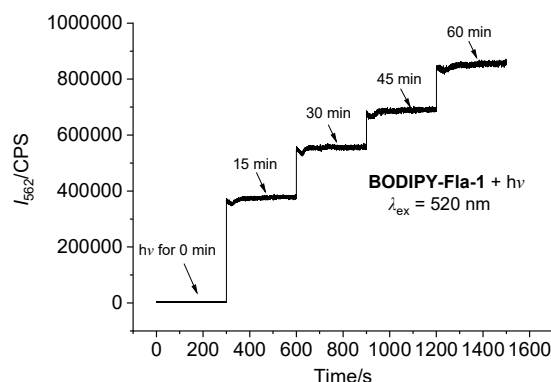


图 5 探针 **BODIPY-Fla-1** (10 $\mu\text{mol/L}$) 在 PBS 缓冲液(10 mmol/L, pH=7.4)中每隔 15 min 周期性照射(15 W, 绿色 LED 灯)后在 562 nm 处($\lambda_{\text{ex}} = 520$ nm)的荧光强度随时间变化

Figure 5 Time-dependent of fluorescent intensity changes of probe **BODIPY-Fla-1** (10 $\mu\text{mol/L}$) at 562 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 520$ nm) in PBS buffer (10 mmol/L, pH=7.4) after the periodic irradiation with green LED (15 W) in every 15 min

1.8 BODIPY-Fla-1 的光控 CO 释放的荧光跟踪成像和生物功能验证

1.8.1 细胞毒性实验

首先在 HeLa 细胞和 RAW264.7 细胞中考察了 CO 光控释放给体分子 **BODIPY-Fla-1** 的细胞毒性(图 6). 在非光照的条件下 **BODIPY-Fla-1** 在浓度达到 100 $\mu\text{mol/L}$ 时仍未表现出明显的细胞毒性.

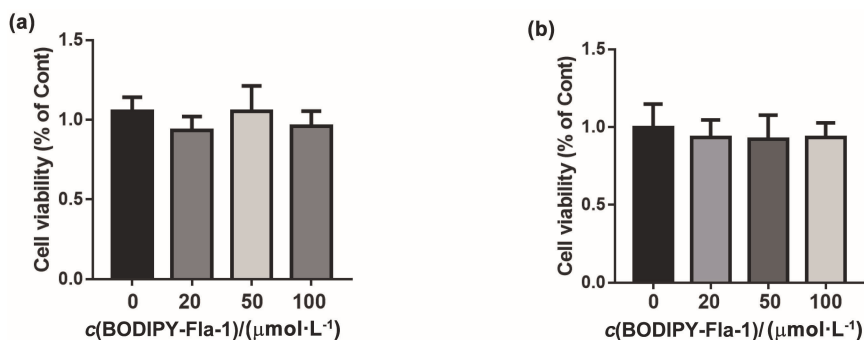


图6 (a)不同浓度的 **BODIPY-Fla-1** 作用于 HeLa 细胞 8 h 后的细胞存活率; (b)不同浓度的 **BODIPY-Fla-1** 作用于 RAW264.7 细胞 8 h 后的细胞存活率

Figure 6 (a) Percentage of viable HeLa cells after treated with different concentrations of **BODIPY-Fla-1** for 8 h; (b) Percentage of viable RAW264.7 cells after treated with different concentrations of **BODIPY-Fla-1** for 8 h

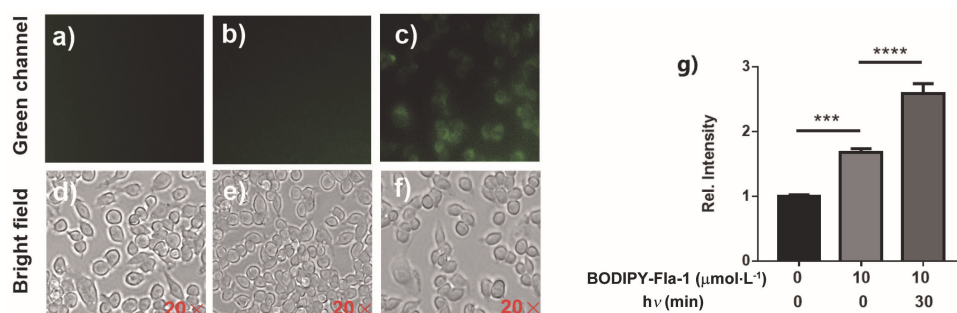


图7 探针 **BODIPY-Fla-1** (10 μmol/L)在 RAW 264.7 细胞中的 CO 释放荧光成像图: (a)细胞在正常培养基中孵育; (b)探针 **BODIPY-Fla-1** (10 μmol/L)孵育 10 min 后的细胞荧光图像; (c)探针 **BODIPY-Fla-1** (10 μmol/L)孵育 10 min 后再光照 30 min 后的细胞荧光图像; (d~f)相应的明场图像; (g)不同细胞组中荧光图像的相对荧光强度(于 $\lambda_{ex}=340\sim380$ nm, $\lambda_{em}>425$ nm 处采集荧光图像, 光解所用光源为 15 W 绿色 LED 灯, 误差棒表示三个重复的标准偏差, **** $P\leq 0.0001$, *** $P\leq 0.001$)

Figure 7 Fluorescence imaging of CO-release with probe **BODIPY-Fla-1** in living RAW 264.7 cells. (a) Cells were incubated in normal media; (b) Fluorescence image of cells incubated in 10 μmol/L probe **BODIPY-Fla-1** for 10 min; (c) Fluorescence image of cells incubated in 10 μmol/L probe **BODIPY-Fla-1** for 10 min followed by 30 min of irradiation; (d~f) Corresponding bright-field images; (g) Relative fluorescence intensities of fluorescence images in different cell groups (Fluorescence images were captured with $\lambda_{ex}=340\sim380$ nm and $\lambda_{em}>425$ nm; irradiation light source: green LED, 15 W. The error bar represents the standard deviation of three repetitions, **** $P\leq 0.0001$, *** $P\leq 0.001$)

1.8.2 活细胞中 CO 光控释放和荧光成像实验

对不同浓度的 **BODIPY-Fla-1** 在 RAW 264.7 巨噬细胞中 CO 光控释放进行了荧光成像实验. 未经 **BODIPY-Fla-1** 处理的细胞没有明显的荧光(图 7a), 然后使用 10 μmol/L 的 **BODIPY-Fla-1** 处理细胞, 其中图 7a~7b 是未经光照处理的细胞荧光成像图, 图 7c 是使用绿光照 30 min 后的细胞影响成像图. 从图 7 可知, 用 10 μmol/L 浓度探针 **BODIPY-Fla-1** 处理的细胞在光照前后荧光有明显的差异, 光照前几乎没有荧光, 光照后荧光显著增强. 因此, 在活细胞中的荧光成像实验表明探针 **BODIPY-Fla-1** 可以在活细胞中实现光控 CO 释放, 同时可以通过荧光强度的增强实现对 CO 释放位置追踪.

1.8.3 活细胞中的 CO 光控释放对氧化应激的影响

为了进一步考察 **BODIPY-Fla-1** 光照释放的 CO 具有生物功能, 以 10 μmol/L 过氧化氢处理后的 A549 细胞

为细胞氧化应激模型, 考察不同浓度的 **BODIPY-Fla-1** 孵育和光解释放 CO 后对细胞的超氧自由基水平的影响. 采用二氢乙锭(Dihydroethidium, DHE)作为超氧自由基荧光探针^[34], 其与超氧自由基反应前的激发和发射波长为 370 和 420 nm, 反应后的激发和发射波长为 535 和 610 nm. 由于 610 nm 处的发射和 **BODIPY-Fla-1** 在光照后产生的荧光有一定的重合, 因此, 将 420 nm 处的荧光强度变化来衡量细胞内超氧自由基的水平变化. 为了排除光解产物 **BODIPY-Carboxylate-1** 可能的影响, 将 50 μmol/L 的 **BODIPY-Carboxylate-1** 处理的细胞也作为参照. 如图 8 所示, 用 10 和 50 μmol/L **BODIPY-Fla-1** 处理后未进行光照的细胞内超氧自由基水平表现出一定水平的下降, 说明该类黄酮醇衍生物本身就具有一定的抗氧化活性. 用 10 μmol/L **BODIPY-Fla-1** 处理细胞后, 绿光照 30 min, 细胞内的超氧自由基水平没

有明显降低,可能与光照释放的 CO 的量不够有关.而当 **BODIPY-Fla-1** 浓度提高至 50 $\mu\text{mol/L}$ 时,可以观察到比未光照更为显著的荧光强度的降低.而 50 $\mu\text{mol/L}$ 的光解荧光产物 **BODIPY-Carboxylate-1** 并未表现出明显的荧光强度降低.说明在该条件下光控释放的 CO 而不是荧光产物,能显著地缓解和改善 A549 细胞的氧化应激水平.

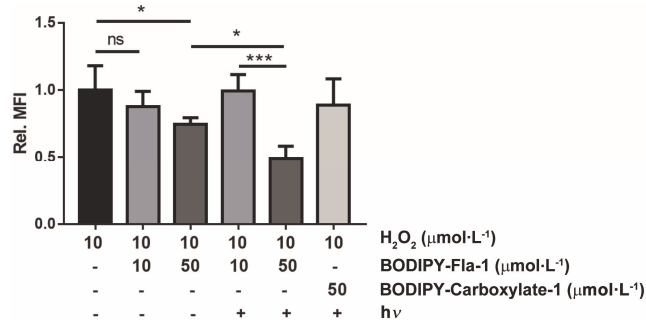


图8 不同浓度的 **BODIPY-Fla-1** 在绿光照射或黑暗条件下对 A549 细胞的抗氧化应激作用

Figure 8 Anti-oxidative stress effect of different concentrations of **BODIPY-Fla-1** on A549 cells in dark or under green light irradiation

Error bars represent standard deviations of three replicate images in the same group, *** $P \leq 0.001$, * $P \leq 0.1$, ns: no significant difference.

2 结论

以 3-羟基黄酮醇为光控释放 CO 基团,通过在黄酮醇的 B 环 4'位以双键的方式引入 BODIPY 荧光团,设计合成了一种可在绿光照射下释放 CO 的新型光控释放 CO 给体分子 **BODIPY-Fla-1**. 它在水溶液中由于聚集产生 ACQ 效应引起荧光淬灭,绿光照射后释放 CO,生成的荧光产物的水溶性增大,ACQ 效应消失,产生 562 nm 的荧光发射峰.通过荧光成像对 CO 给体 **BODIPY-Fla-1** 在 RAW 264.7 巨噬细胞中的光照释放 CO 进行了研究. RAW 264.7 巨噬细胞在用 50 $\mu\text{mol/L}$ CO 给体 **BODIPY-Fla-1** 孵育后,在绿色 LED 灯照射后通过荧光成像可观察到显著的光照依赖性荧光增强,验证了其能在复杂的生物体系中实现光控释放 CO,并可通过产生的荧光增强信号跟踪 CO 的释放.此外,为验证光控释放 CO 给体 **BODIPY-Fla-1** 光照产生的 CO 具有生物功能,以过氧化氢预处理的 A549 细胞为细胞氧化应激模型, **BODIPY-Fla-1** 孵育后在绿光照射下释放 CO,有效地降低了细胞超氧自由基水平,并具有浓度的依赖性,说明该 CO 给体通过光控释放 CO 能降低细胞的氧化应激水平.相比于 3-羟基黄酮醇母核需要在 400 nm 左右的蓝光照射下才能释放 CO, **BODIPY-Fla-1** 在 550 nm 的绿光照射下即可释放 CO,长波长的绿光照射具有更低的光毒性

和更深的组织穿透性.这种通过在 3-羟基黄酮醇 B 环引入共轭双键连接荧光团的设计具有通用性,为进一步开发光解波长更长、可荧光跟踪 CO 释放的光控 CO 给体分子的设计提供了新的设计思路.

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

核磁共振氢谱和碳谱数据由 Bruker Avance 400 NMR 型核磁共振仪和 Bruker Avance 600 NMR 型核磁共振仪测定.质谱所用仪器为 Micromass GCTM.所用紫外分光光度计型号为 Shimadzu UV-1800.所用 pH 计为 METTLER TOLEDO 公司生产的便携式 pH 计,型号为 Seven2go.文中所使用的所有溶剂和试剂除有特殊说明,均为 AR 级.

3.2 实验方法

3.2.1 探针 **BODIPY-Fla-1** 的合成及表征

取大小合适的微波反应管,将化合物 **1** (44 mg, 0.2 mmol)和化合物 **2** (64 mg, 0.2 mmol)混悬于 5 mL 无水乙醇中,向其中依次加入哌啶(81 μL , 2.0 mmol)和乙酸(81 μL , 2.0 mmol),加料完毕后盖上瓶塞,将反应管置于微波反应器中,设置微波反应温度为 120 $^{\circ}\text{C}$,反应功率为 80 W,反应时间为 30 min.反应完毕后降至室温,过滤,滤饼用冰乙醇洗涤,粗产物经快速柱层析得到目标化合物 **BODIPY-Fla-1** 36 mg,产率 39%,紫色固体. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 9.93 (s, 1H), 8.36 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 8.13 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.90~7.75 (m, 7H), 7.55 (d, $J=16.3$ Hz, 1H), 7.49 (t, $J=7.3$ Hz, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.15 (d, $J=4.0$ Hz, 1H), 6.56 (dd, $J=3.9, 2.1$ Hz, 1H), 2.36 (s, 3H); ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 173.0, 157.5, 154.6, 145.4, 139.8, 139.5, 139.4, 137.4, 136.7, 133.9, 133.9, 133.3, 132.5, 128.3, 127.7, 127.3, 125.4, 124.8, 124.6, 124.6, 121.3, 118.6, 118.4, 117.9, 117.0, 11.3; EI-HRMS calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{19}\text{BF}_2\text{N}_2\text{O}_3$ 468.1457, found 468.1462.

3.2.2 探针 **BODIPY-Carboxylate-1** 的合成及表征

将 **BODIPY-Fla-1** (20 mg, 0.04 mmol)溶于 1 mL 二甲基亚砜(DMSO)中,将溶解的化合物母液加入至 20 mL 的 PBS 中,在绿色 LED 灯的照射下搅拌反应 6 h.反应完毕后,使用二氯甲烷(DCM)萃取(20 mL $\times$ 3),合并有机相,无水硫酸钠干燥、过滤并浓缩,粗产物经快速柱层析纯化得目标产物 **BODIPY-Carboxylate-1** 5 mg,产率 25%,紫色固体. ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 13.05 (br, 1H), 8.20 (d, $J=8.4$ Hz, 2H), 7.99 (dd, $J=7.8, 1.6$ Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.90 (d, $J=16.5$ Hz, 1H), 7.85~

7.81 (m, 3H), 7.71 (td, $J=7.9, 1.5$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J=16.4$ Hz, 1H), 7.45 (t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.39 (d, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.21~7.18 (m, 2H), 6.58 (dd, $J=3.9, 2.0$ Hz, 1H), 2.37 (s, 3H); ESI-HRMS calcd for $C_{26}H_{20}BF_2N_2O_4$ 471.1333, found 471.1318.

3.2.3 探针 BODIPY-Fla-1 的光谱测试

荧光光谱数据由 HoribaScientific 公司生产的型号为 Fluoromax-4 的荧光仪测得. 吸收光谱由岛津公司生产的型号为 UV-1800 型紫外分光光度器测得. 将 CO 给体分子 BODIPY-Fla-1 溶于 DMSO 中, 制备浓度为 10 mmol/L 的母液备用. CO 给体分子荧光测试所用溶剂均为 PBS 缓冲液(10 mmol/L, pH=7.4), CORMs 的浓度为 10 μ mol/L, 狭缝宽度设置为 1 nm.

3.2.4 通过血红蛋白法测定探针 BODIPY-Fla-1 释放 CO

通过紫外分光光度计测试 PBS 中 Hb 到 HbCO 的转化率以确定 CO 的释放量. 首先将牛红细胞血红蛋白完全溶解于 PBS (10 mmol/L, pH=7.4)中, 最终浓度为 4.2 μ mol/L, 然后在 N_2 氛围下中加入连二亚硫酸钠还原血红蛋白. 在比色皿中加入配置好的 Hb 的 PBS 溶液和不同的 CO 给体分子母液, 使其最终浓度为 50 μ mol/L, 将比色皿密封, 然后使用不同的光源照射以诱导 CO 释放并测试其紫外吸收, 根据特征吸收峰判断 CO 的释放或对释放的 CO 进行定量.

3.2.5 探针 BODIPY-Fla-1 释放 CO 的光激发条件

探针 BODIPY-Fla-1 的体外测试使用的光反应器为自制的绿光 LED 反应器, 使用时控制功率为 15 W, 比色皿置于光反应器中间位置. 在进行细胞实验时, 使用的 JAXMAN 公司生产的型号为 E2L 的绿光 LED 手电筒, 照射功率为 7 W, 光源在距离细胞培养液 12 cm 的位置进行照射.

3.2.6 探针 BODIPY-Fla-1 的细胞毒性实验

将 HeLa 细胞接种在含体积分数为 10%胎牛血清和体积分数为 1%谷氨酰胺的含酚红的 T-25 细胞培养瓶中, 于 37 $^{\circ}$ C 下培养至对数生长期后, 在 96 孔板中接种细胞悬液(100 μ L/孔), 并将培养板放在培养箱中预培养过夜. 而后将预稀释至相应浓度的给体分子加到实验孔中, 使其终浓度分别为 20、50、100 μ mol/L, 每个浓度重复六组实验孔. 将孔板于 37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5% CO_2 孵育 8 h 后, 向每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 将培养板在培养箱内孵育 8 h, 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度. 细胞存活率的计算公式为: Cell viability (% of control) = $(OD_{EG} - OD_{ZG}) / (OD_{CG} - OD_{ZG}) \times 100\%$.

3.2.7 探针 BODIPY-Fla-1 的细胞荧光成像实验

将 Raw 264.7 细胞接种于含体积分数为 10%胎牛血清和体积分数为 1%谷氨酰胺的含酚红的 T-25 细胞培养瓶中, 在 37 $^{\circ}$ C 下培养 48 h, 实验前一天将细胞转移到 6 孔板(ThermoScience)上, 使细胞贴壁. 将 BODIPY-Fla-1 配制成 100 mmol/L 的储备液, 稀释后加到每实验孔中使其终浓度为 10 或 50 μ mol/L, 实验孔与对照孔均于 37 $^{\circ}$ C、避光孵育 10 min, 随后光照组使用绿光照射 30 min, 而后所有组弃去原培养基, 并用 PBS 缓冲液洗涤两次, 加入新鲜培养基, 在 NikonEclipseTi-S 显微镜(Ex515-560)上以 20 倍物镜在 500 ms 曝光时间下拍摄图像.

3.2.8 探针 BODIPY-Fla-1 释放 CO 对氧化应激的影响

将处于对数生长期的 A549 细胞接种于六孔板中, 在 37 $^{\circ}$ C、体积分数为 5% CO_2 的细胞培养箱中培养过夜, 而后将 10 μ mol/L 的 H_2O_2 及预稀释至相应浓度的 BODIPY-Fla-1 或 BODIPY-Carboxylate-1 加到实验孔中, 使其终浓度分别为 10 或 50 μ mol/L. 随后实验组光照 30 min, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 4 h 后, 去除原培养基, 向每孔加入 PBS 稀释的 5 μ mol/L 探针 DHE, 将培养板在培养箱内孵育 30 min, 用 PBS (2 mL $\times$ 3)洗涤细胞, 以充分去除未进入细胞内的 DHE, 随后用 PBS 吹打重悬各组细胞至黑色 96 孔板中. 由于 DHE 与活性氧(ROS)反应脱氢后的发射与给体释放 CO 后的荧光有重叠, 故测定 DHE 脱氢前的荧光强度(激发: 370 nm, 发射: 420 nm), 计算时用 5 μ mol/L DHE 本底荧光强度减去各组荧光强度, 相应差值即视为对应各组细胞内 ROS 含量.

辅助材料(Supporting Information) 探针分子 BODIPY-Fla-1 的荧光激发发射谱图, 探针分子 BODIPY-Fla-1 光解 60 min 后与产物 BODIPY-Carboxylate-1 的荧光归一化谱图, 探针分子 BODIPY-Fla-1 在不同照射时间下的 LC-MS 谱图, 探针分子 BODIPY-Fla-1 在光照前后的动态散射分析图, 以及探针分子 BODIPY-Fla-1 结构表征的 1H NMR、 ^{13}C NMR 和质谱图. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Owens, E. O. *Clin. Biochem.* **2010**, *43*, 1183.
- [2] Morse, D.; Sethi, J. *Antioxid. Redox Signaling* **2002**, *4*, 331.
- [3] Sjöstrand, T. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **1949**, *1*, 201.
- [4] Walewska, A.; Szewczyk, A.; Koprowski, P. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3227.
- [5] Motterlini, R.; Foresti, R. *Am. J. Physiol.: Cell Physiol.* **2017**, *312*, C302.
- [6] Otterbein, L. E.; Foresti, R.; Motterlini, R. *Circ. Res.* **2016**, *118*, 1940.

- [7] Ryter, S. W. *Arch. Biochem. Biophys.* **2019**, 678, 108186.
- [8] Goebel, U.; Wollborn, J. *Intens. Care Med. Exp.* **2020**, 8, 2.
- [9] Zhou, Y.; Yu, W.; Cao, J.; Gao, H. *Biomaterials* **2020**, 255, 120193.
- [10] Popova, M.; Soboleva, T.; Arif, A. M.; Berreau, L. M. *RSC Adv.* **2017**, 7, 21997.
- [11] Christopher, P.; Hopper, L. M.; Christoph, S.; Leo, E. O. *Curr. Pharm. Des.* **2018**, 24, 2264.
- [12] Fagone, P.; Mangano, K.; Coco, M.; Perciavalle, V.; Garotta, G.; Romao, C. C.; Nicoletti, F. *Clin. Exp. Immunol.* **2012**, 167, 179.
- [13] Anderson, S. N.; Richards, J. M.; Esquer, H. J.; Benninghoff, A. D.; Arif, A. M.; Berreau, L. M. *ChemistryOpen* **2015**, 4, 590.
- [14] Gonzalez, M. A.; Fry, N. L.; Burt, R.; Davda, R.; Hobbs, A.; Mascharak, P. K. *Inorg. Chem.* **2011**, 50, 3127.
- [15] Fujita, K.; Tanaka, Y.; Sho, T.; Ozeki, S.; Abe, S.; Hikage, T.; Kuchimaru, T.; Kondoh, S. K.; Ueno, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 16902.
- [16] Margarita, A.; Gonzalez, N. L. F.; Richard, B.; Riddhi, D.; Adrian, H.; Pradip, K. M. *Inorg. Chem.* **2011**, 50, 3127.
- [17] Wang, P.; Liu, H.; Zhao, Q.; Chen, Y. L.; Liu, B.; Zhang, B. P.; Zheng, Q. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 74, 199.
- [18] Min, Q.; Ji, X. *Chem. Med. Chem.* **2023**, 18, e202200500.
- [19] Palao, E.; Slanina, T.; Muchová, L.; Šolomek, T.; Vitek, L.; Klán, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 126.
- [20] Sitnikov, N. S.; Li, Y.; Zhang, D.; Yard, B.; Schmalz, H. G. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2015**, 54, 12314.
- [21] Ji, X.; Zhou, C.; Ji, K.; Aghoghovbia, R. E.; Pan, Z. X.; Chittavong, V.; Ke, B. W.; Wang, B. H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, 55, 15846.
- [22] Romão, C. C.; Blättler, W. A.; Seixas, J. D.; Bernardes, G. J. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 3571.
- [23] Perez, Vizcaino, F.; Duarte, J. *Mol. Aspects Med.* **2010**, 31, 478.
- [24] Zenkevich, I. G.; Eshchenko, A. Y.; Makarova, S. V.; Vitenberg, A. G.; Dobryakov, Y. G.; Utsal, V. A. *Molecules* **2007**, 12, 654.
- [25] Zhao, X.; Li X.; Liang, S.; Dong, X. W.; Zhang, Z. *RSC Adv.* **2021**, 11, 28851.
- [26] Feng, W.; Feng, S.; Feng, G. *Chem. Commun.* **2019**, 55, 8987.
- [27] Šťacková, L.; Russo, M.; Muchová, L.; Orel, V.; Vitek, L.; Šťacko, P.; Klán, P. *Chem.-Eur. J.* **2020**, 26, 13184.
- [28] Zhang, Y.; Sun, Y. J.; Yu, C.; Li, Y. Q. *Org. Biomol. Chem.* **2023**, 21, 4297.
- [29] Ulrich, G.; Ziesel, R.; Harriman, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, 47, 1184.
- [30] Wang, H.; Xu, Y.; Rao, L.; Yang, C. T.; Yuan, H.; Gao, T. J.; Chen, X.; Sun, H. Y.; Xian, M.; Liu, C. R.; Liu, C. L. *Anal. Chem.* **2019**, 91, 5646.
- [31] Kim, B.; Fukuda, M.; Lee, J. Y.; Su, D. D.; Sanu, S.; Silvin, A.; Khoo, A. T.; Kwon, T.; Liu, X.; Chi, W. J.; Liu, X. G.; Choi, S.; Wan, D. S.; Park, S. J.; Kim, J. S.; Ginhoux, F.; Je, H. S.; Chang, Y. T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2019**, 58, 7972.
- [32] Yan, J. W.; Zhu, J. Y.; Tan, Q. F.; Zhou, L. F.; Yao, P. F.; Lu, Y. T.; Tan, J. H.; Zhang, L. *RSC Adv.* **2016**, 6, 65373.
- [33] He, Q.; Kieseewetter, D. O.; Qu, Y.; Fu, X.; Fan, J.; Huang, P.; Liu, Y. J.; Zhu, G. Z.; Liu, Y.; Qian, Z. Y.; Chen, X. Y. *Adv. Mater.* **2015**, 27, 6741.
- [34] Zhao, H. T.; Zhang, H.; Joseph, J.; Nithipatikom, K. *Free Radical Biol. Med.* **2003**, 34, 1359.

(Cheng, F.)