

水溶性苄叉环戊酮染料的双光子光动力性能研究

杨 威^{1,3} 邹千里^{1,3} 周 扬² 顾 瑛² 赵榆霞¹ 吴飞鹏¹

¹中国科学院理化技术研究所, 北京 100190
²中国人民解放军总医院激光医学科, 北京 100853
³中国科学院研究生院, 北京 100049

摘要 通过在苄叉环戊酮分子骨架外围引入不同数目羧酸钠基团, 合成了 4 种水溶性的苄叉环戊酮染料, 系统研究了它们的光物理和光化学性质。结果表明 4 种染料在修饰后水溶性都大幅提升。它们在近红外波段都具有较大的双光子吸收截面, 而且在可见光照射下均能快速产生单线态氧和超氧负离子两种活性氧物种。单光子光动力实验结果表明 4 种新染料的暗毒性都较低, 但只有 Y1 展现出强的光动力活性, 说明保持适度的脂溶性对光敏药物非常重要。进一步的细胞实验显示, 染料 Y1 对人直肠癌 1116 细胞产生了明显的双光子损伤效应。这表明 Y1 在双光子光动力治疗上有很大的应用潜力。

关键词 医用光学; 光动力治疗; 双光子激发; 苄叉环戊酮; 活性氧物种

中图分类号 O621; O644.1 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/AOS201131.s100118

Study on Water-Soluble Benzylidene Cyclopentanone Dyes for Two-Photon Induced Photodynamic Therapy

Yang Wei^{1,3} Zou Qianli^{1,3} Zhou Yang² Gu Ying² Zhao Yuxia¹ Wu Feipeng¹

¹ Technical Institute of Physics and Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China
² Department of Laser Medicine, Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100853, China
³ Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract Four water-soluble benzylidene cyclopentanone dyes are synthesized for photodynamic therapy (PDT) by introducing different numbers of carboxylate groups on their periphery. Their photophysical and photochemical properties are investigated systematically. The results show that the water solubility of these dyes is significantly enhanced after modification. All dyes exhibit large two-photon absorption (TPA) cross-section in near infrared (IR) range, which can generate both superoxide anion radical and singlet oxygen species under visible illumination. One-photon PDT experiments indicate that four novel dyes display low dark cytotoxicity. However, only the dye Y1 presents excellent photodynamic activity, which highlights the role of moderate lipophilicity for PDT dyes. Further cellular experiments reveals that Y1 had obvious two-photon induced cytotoxic effect on human rectal cancer 1116 cells. The result indicates that Y1 is a potential photosensitizer for two-photon induced PDT.

Key words medical optics; photodynamic therapy; two-photon excitation; benzylidene cyclopentanone; reactive oxygen species

OCIS codes 160.4330; 160.4890; 170.5180; 190.4400

1 引 言

光动力治疗(PDT)是指光敏药物经光照产生活

性氧物种(ROS), 活性氧物种继而与肿瘤细胞发生作用导致其死亡的过程^[1]。典型的 ROS 包括超氧

收稿日期: 2011-02-28; 收到修改稿日期: 2011-03-11

基金项目: 国家自然科学基金(60978057)资助课题。

作者简介: 杨 威(1986—), 男, 硕士研究生, 主要从事光敏染料的合成与性能等方面的研究。

E-mail: yangwei@mail.ipc.ac.cn

导师简介: 赵榆霞(1974—), 女, 博士, 副研究员, 主要从事新型高效双光子聚合材料和有机非线性材料, 全息用光致聚合物材料的研制及各种材料的应用等方面的研究。E-mail: yuxia.zhao@mail.ipc.ac.cn(通信联系人)

负离子(O_2^-)和单线态氧(1O_2)。不同波长的光对于生物组织的穿透力不同,波长越长,对生物组织的穿透性越大。光动力治疗所用的光源“医疗窗口”在650~900 nm 范围为宜。引入双光子激发(TPE)能将光敏剂的吸收波长移到“医疗窗口”。双光子激发指光敏剂吸收两个光子达到激发态的过程。TPE技术已在许多领域展现出应用潜力,如三维微加工^[2,3]、荧光成像^[4]。近年来,随着飞秒激光器的成熟,TPE在光动力治疗上的应用才逐渐引起关注。与单光子PDT相比,双光子光动力治疗具有良好的空间选择性。此外,TPE可采用穿透深度更大的长波长激光作为光源,扩大光动力治疗的适用范围。双光子吸收截面(TPA Cross-Section)用于表征化合物双光子吸收的性质。目前临床用的光敏剂大多数为卟啉衍生物^[5],而单体卟啉由于双光子吸收截面(σ)太低难以用于双光子光动力治疗。例如,Verteporfin在900 nm处的 σ 值为51 GM(1 GM= $10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s} \cdot \text{molecule}^{-1} \cdot \text{photon}^{-1}$)^[6]。开发具有大 σ 值的光敏剂成为双光子光动力治疗的突破点。光敏剂被细胞摄取的过程涉及其在血液中运输和扩散通过磷脂双分子层,这就要求光敏剂必需兼有水溶性和脂溶性。脂水分配比(PC)常被用于评估药物的两亲性,它是指光敏剂在正辛醇与磷酸缓冲液(PBS)中浓度比。

本课题组前期对卞叉环戊酮类染料进行了广泛的研究^[7,8],发现其同时具有高的三线态量子产率和大的双光子吸收截面。但这些光敏剂由于缺乏水溶性导致给药困难。因此在卞叉环戊酮分子骨架外围引入羧酸钠基团,合成了4种具有不同水溶性的卞叉环戊酮染料。本文将测试这4种光敏剂的光动力活性,从中选出适合用于光动力治疗的新型光敏剂。

2 实 验

2.1 材料与仪器

羧酸盐类卞叉环戊酮染料 Y1~Y4 由本实验室合成,其分子结构式如图1所示。5,5-二甲基-1-吡咯啉-N-氧化物(DMPO),2,2,6,6-四甲基-4-哌啶酮(TEMP)购自 Sigma-Aldrich 公司,9,10-二甲基蒽(DMA)、二甲亚砜(DMSO,分析纯)、甲醇(分析纯)购于北京化工厂。

紫外-可见光谱、电子顺磁共振波谱(EPR)分别使用 Hitachi-U3900 型紫外-可见光谱仪和 Bruker ESP-300E 顺磁共振仪测试。光敏剂的 1O_2 量子产

率(Φ_Δ)通过 DMA 漂白法测定^[9],532 nm 波长的二极管激光器作为光源,采用孟加拉红二钠盐 Rose Bengal(RB, $\Phi_\Delta=0.156$)作为参比样品。双光子吸收截面采用上转换荧光法测量^[10],罗丹明 B 作为参比样品(浓度为 $1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$,溶剂为甲醇),所用激发光源为光谱物理公司 Ti:Sapphire 飞秒激光器(Tsunami mode-locked,80 MHz,小于130 fs),光纤光谱仪(Ocean Optics USB2000 CCD)记录光谱。脂水分配比测试参照文献^[11]完成。

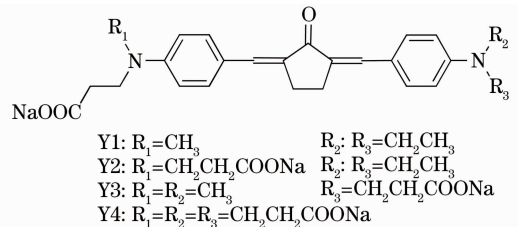


图1 Y1~Y4的分子结构式

Fig. 1 Molecular structures of Y1~Y4

2.2 体外细胞实验

将培养的人直肠癌1116细胞调整细胞密度为每毫升 1×10^5 个。接种在96孔板后,置于37℃含体积分数5%CO₂的孵育箱中培养24 h。加入光敏剂,调整最终给药质量浓度为5 μg/mL。暗毒性测试实验中,细胞孵育24 h后采用CCK-8法^[12]测量细胞存活率(Cellviability)。光毒性测试实验中,细胞继续孵育4 h后,用532 nm 二极管激光器(功率密度为20 mW/cm²)照射20 min,继续培养24 h后以CCK-8法测量存活率。

双光子光动力实验中,细胞与质量浓度为2 μg/mL的光敏剂一起孵育4 h。将其置于显微镜下,经800 nm波长的飞秒激光(小于130 fs,20mW)照射1 min后观察细胞的变化。对照组中不加光敏剂且光照时间为10 min,其它条件相同。

3 结果与讨论

3.1 光物理性质与两亲性

光敏剂 Y1~Y4 在 PBS 中归一化的紫外-可见光谱如图2(a)所示。由于四种化合物具有相同的分子骨架,它们的紫外光谱波形非常相似。Y1~Y4的最大吸收波长分别是511,516,507和513 nm。在接下来的单光子光动力实验中,采用的激发光波长为532 nm,保证4种光敏剂都能有较大的吸收。四种染料在甲醇中的双光子激发光谱如图2(b)所示,Y1~Y4的双光子吸收峰出现在820~860 nm范围内,处于“医疗窗口”内。此外,它们最大双光子

吸收截面(σ_{\max})均超过 1000 GM(波长 840 nm 处), 其中 Y4 甚至达到 1401 GM。与 Verteporfin 相比, 4 种羧酸钠盐类卟啉环戊酮染料的 σ_{\max} 值都达到其最大值的 20~28 倍, 这意味着它们在双光子动力治疗上存在巨大的应用潜力。

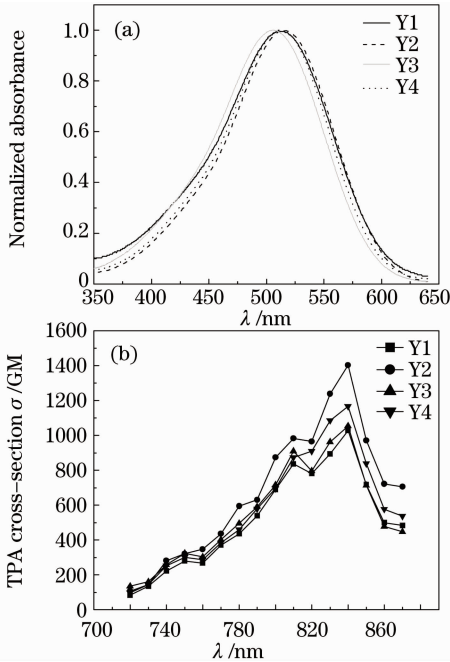


图 2 (a) Y1~Y4 在 PBS 中的紫外-可见光谱, (b) Y1~Y4 的双光子激发谱

Fig. 2 (a) UV-vis spectra of Y1~Y4 in PBS, (b) two-photon excitation spectra of Y1~Y4

表 1 中列出了 4 种光敏剂的脂水分配及在 PBS 中的溶解度。卟啉环戊酮外围引入羧酸钠基团后, 水溶性都得到了提高。表中可看出, 染料的水溶性随羧酸钠基团数目的增加而急剧上升。Y1 在 PBS 中的溶解度为 0.8 mg/mL, Y2~Y4 均超过 5 mg/mL。染料 Y1 的 PC 值的对数 $\lg f_{PC} = 2.92$, 说明其仍保持较高的亲脂性。Y2~Y4 在大多数有机溶剂中的溶解度都较差, 仅有 Y1 表现为两亲性分子。

表 1 Y1~Y4 的脂水分配及在 PBS 中的溶解度

Table 1 Solubility in PBS and octanol-water partition coefficient (f_{PC}) of Y1~Y4

Compound	Solubility in PBS (mg/mL)	$\lg f_{PC}$
Y1	0.8	2.92
Y2	>5	0.25
Y3	>5	-0.65
Y4	>5	-0.79

3.2 活性氧物种的产生

活性氧物种的产生通过电子顺磁共振自旋捕获

技术检测。5, 5-二甲基-1-吡咯啉-N-氧化物 (DMPO) 为超氧负离子捕获剂, 单线态氧捕获剂为 2, 2, 6, 6-四甲基-4-哌啶酮 (TEMP), 样品浓度为 5×10^{-6} mol/L。图 3 为 532 nm 波长的激光照射 Y1 与捕获剂的 DMSO 溶液产生的 EPR 信号。图 3(a) 为典型的 DMPO- $O_2^{\cdot-}$ 复合物信号 ($\alpha_N = 12.7$ G, $\alpha_{\beta}^H = 10.3$ G, $\alpha_{\gamma}^H = 1.3$ G)。图 3(b) 中高等的三重峰为 TEMP- 1O_2 复合物信号 ($\alpha_N = 15.9$ G)^[13]。其余 3 种光敏剂也检测到了相同的信号, 说明羧酸钠修饰后的卟啉环戊酮仍具有较高的敏化能力。4 种化合物均能敏化产生光动力治疗所需的活性氧物种。

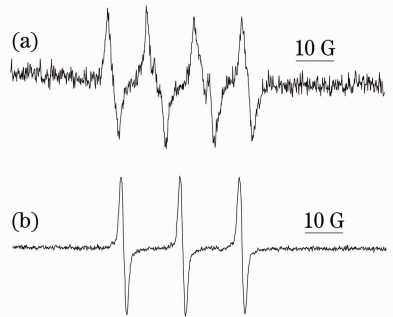


图 3 EPR 谱。(a) DMPO- $O_2^{\cdot-}$ 复合物信号, (b) TEMP- 1O_2 复合物信号

Fig. 3 EPR spectra. (a) DMPO- $O_2^{\cdot-}$ EPR signal, (b) TEMP- 1O_2 EPR signal

单线态氧是光动力治疗中最重要的活性氧物种之一, 采用 DMA 漂白法测得 Y1~Y4 在 DMSO 中的单线态氧量子产率分别为 0.0670、0.0556、0.0582 和 0.0526。结果表明, 在 DMSO 中 Y1 产生单线态氧的能力比其他 3 种光敏剂更大。

3.3 单光子光动力实验

单光子光/暗毒实验结果如图 4 所示。暗毒性是用于表征在治疗前光敏剂对细胞的毒性。可以看出, 4 种光敏剂的暗毒性都很低, 在给药质量浓度为 $5 \mu\text{g/mL}$ 时, 细胞存活率都在 85% 以上。光毒性则

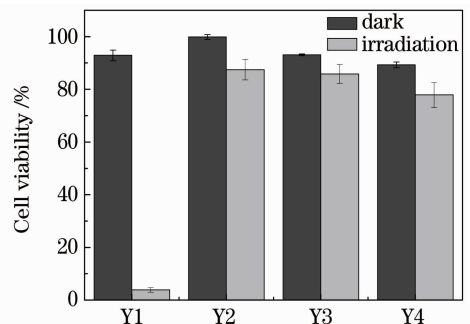


图 4 光/暗毒性实验

Fig. 4 Dark cytotoxicity and photocytotoxicity test

是用于表征治疗中光敏剂对肿瘤细胞的杀伤效应。图中可知, Y2~Y4 对细胞的杀伤效应较弱, 细胞存活率均在 75% 以上。相比之下, Y1 显示出极高的光毒性, 实验中仅有 3.9% 的细胞能够存活。

虽然四种光敏剂都能敏化产生光动力治疗所需的活性氧物种, 但在细胞杀伤效应上呈现出很大的差异。Y1 优良的光动力活性可归因于两个方面; 1) Y1 的单线态氧量子产率比其它三种光敏剂高; 2) Y1 具有更合理的脂水分配比。四种化合物都有较好的水溶性, 但 Y1 更倾向于聚集在脂中。这种特性更有利于其透过细胞膜而被吸收。Y2~Y4 由于缺少脂溶性很容易被代谢出细胞而无法发挥敏化作用。单光子光动力实验中 Y1 表现出合适的脂水两亲性和优良的光动力活性, 是一种很有前景的光敏剂。

3.4 双光子光动力实验

图 5 中接受双光子照射的细胞用圆形标出。图 5(a)~5(c) 为实验组细胞照片, 所用光敏药物为 Y1。图 5(b) 和图 5(c) 分别为照射后和照射结束 10 min 后细胞的图片。对比照射前细胞的图片 [图 5(a)] 可以看出, 接受双光子处理的细胞出现了明显的水肿, 细胞形态也发生破损。目标细胞周围没有接受双光子照射的细胞没有发生变化。这些都证明了光损伤的产生。对照组照片中 [图 5(d)~5(f)], 未与光敏剂孵育的细胞在光照前 [图 5(d)] 与光照后 [图 5(e)] 无明显变化, 照射结束 10 min 后 [图 5(f)] 细胞形态仍然完整。以上实验现象说明光敏剂 Y1 具有双光子光损伤效应。此外, 激光与光敏剂都是产生光损伤的必要条件。Y2~Y4 也能产生相同的现象(图片未列出)。

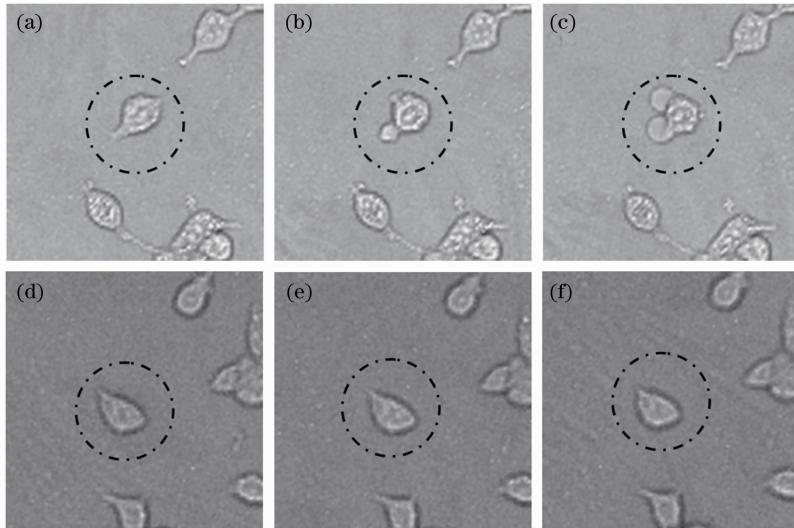


图 5 双光子光损伤效应
Fig. 5 Two-photon induced cytotoxic effect

4 结 论

引入羧酸钠基团后 4 种卟啉环戊酮染料的水溶性得到提升, 但仅有单羧酸钠修饰的 Y1 仍保持较高的亲脂性。EPR 谱证实了 4 种化合物都能有效产生超氧负离子和单线态氧。4 种光敏剂在甲醇中的最大双光子吸收截面都超过 1000 GM, 在双光子光动力治疗中也产生了明显的杀伤效果。暗毒性实验中, 4 种光敏剂孵育的细胞存活率均超过 85%, 而 Y1 的光毒性表现非常突出, 细胞存活率仅 3.9%。Y1 展示出优良的单光子和双光子光动力活性, 值得进行更深入的研究。

参 考 文 献

- 1 I. J. MacDonald, T. J. Dougherty. Basic principles of photodynamic therapy [J]. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2001, **5**(2): 105~129
- 2 Di Jianke, Zhou Ming, Yang Haifeng *et al.*. Manufacturing micro-biological device and scaffold research with two-photon femtosecond laser technology [J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(1): 249~254
狄建科, 周 明, 杨海峰 等. 飞秒激光双光子制造生物微器件微支架[J]. *中国激光*, 2009, **36**(1): 249~254
- 3 Guo Fuquan, Hu Zhiyuan, Fu Xinjian *et al.*. Photopolymerization behaviors of novel two-photon absorption initiators and fabrication of microdevices [J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(6): 1528~1534
郭福全, 胡治元, 付新建 等. 新型双光子引发剂光聚合行为及微器件制备[J]. *中国激光*, 2009, **36**(6): 1528~1534

- 4 Li Zuanfang, Huang Zufang, Chen Rong *et al.*. Two-photon fluorescence imaging of thyroid tissue[J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(3): 765~768
李钻芳, 黄祖芳, 陈 荣等. 甲状腺组织的双光子荧光成像[J]. *中国激光*, 2009, **36**(3): 765~768
- 5 M. Atif, P. E. Dyer, T. A. Paget *et al.*. Two-photon excitation studies of m-THPC photosensitizer and photodynamic activity in an epithelial cell line[J]. *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 2007, **4**(2): 106~111
- 6 M. Khurana, H. A. Collins, A. Karotki *et al.*. Quantitative in vitro demonstration of two-photon photodynamic therapy using Photofrin and Visudyne [J]. *Photochem. Photobiol.*, 2007, **83**(6): 1441~1448
- 7 J. Wu, Y. X. Zhao, X. Li *et al.*. Multibranched benzylidene cyclopentanone dyes with large two-photon absorption cross-sections[J]. *New J. Chem.*, 2006, **30**(6): 1098~1103
- 8 J. Q. Xue, Y. X. Zhao, J. Wu *et al.*. Novel benzylidene cyclopentanone dyes for two-photon photopolymerization[J]. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 2008, **195**(2): 261~266
- 9 Z. J. Diwu, J. W. Lown. Photosensitization by anticancer agents 12. Perylene Quinonoid pigments, a novel type of singlet oxygen sensitizer [J]. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 1992, **64**(3): 273~287
- 10 C. Xu, W. W. Webb. Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm[J]. *J. Opt. Soc. Am. B*, 1996, **13**(3): 481~491
- 11 J. De Bruijn, F. Busser, W. Seinen. Determination of octanol/water partition coefficients for hydrophobic organic chemicals with the 'slow-stirring' method[J]. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1989, **8**(6): 499~512
- 12 Y. H. Kim, J. H. Park, M. Lee *et al.*. Polyethylenimine with acid-labile linkages as a biodegradable gene carrier [J]. *J. Control. Release*, 2005, **103**(1): 209~219
- 13 Y. Z. Hu, L. J. Jiang. Generation of semiquinone radical anion and reactive oxygen ($^1\text{O}_2$, O_2^- and $\cdot\text{OH}$) during the photosensitization of a water-soluble perylenequinone derivative [J]. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 1996, **33**(1): 51~59