参赛队员姓名: 定浩宸,王佳萱,张智禹

中学: 南京外国语学校

省份: 江苏省

22

国家/地区: 中国/南部赛区

指导教师姓名: 陈韵聪,许亮亮

指导教师单位: 南京大学,南京外国语学校

论文题目: <u>硒代亚甲基蓝的合成及其 I/II 型</u>光动力治疗的应用

硒代亚甲基蓝的合成及其 I/II 型光动力治疗的应用

定浩宸,王佳萱,张智禹

南京外国语学校,江苏,210018

131

摘要: 光动力疗法 (PDT)由于其非侵入性、高选择性和低毒副作用等优 点,正在成为治疗肿瘤的重要手段,然而传统的光敏剂往往受限于治疗窗口 短、光漂白性严重、暗毒性大和依赖氧气等缺点,难以进一步应用。本研究将 商业化光敏剂亚甲基蓝 (MB)进行单原子改造设计,合成了新型光敏分子硒代 亚甲基蓝 (MBSe),并探究了其对癌细胞和拟肿瘤组织中的治疗效果。实验结 果表明硒原子的引入延长了亚甲基蓝光敏剂的最大吸收/发射波长,基于重原子 效应提高了光敏剂分子的单线态氧产率,还极大地增强了其1型光动力效应。 细胞实验结果表明 MBSe 光敏剂在常氧和乏氧条件下均能有效杀死肿瘤细胞, 这对于新型光敏剂研发以及 PDT 在肿瘤治疗中的应用具有重要意义。

关键词: 亚甲基蓝,光敏剂,光动力治疗,肿瘤微环境。

目录	
一 引言1	L
1.1 研究背景1	1
1.2 PDT 原理1	1
1.3 光源1	5
1.4 光敏剂1	
1.5 氧气	
1.6 研究目的及方法2	N
二 材料与方法	
2.1 药品与试剂	2
2.2 仪器	5
2.3 方法	í .
2.3.1 目标光敏剂分于(MBSe)的合成及结构表征	<i>•</i>
2.3.2 重原子效应理论计算	,
2.3.3 光学性质测定	ŀ
2.3.4 光敏剂细胞毒性测定	ŀ
2.3.5 细胞内 ROS 水平与超氧阴离子水平检测	,)
2.3.6 活死细胞检测	5
2.3.7 模拟肿瘤细胞球实验	1
三 结果与讨论	2
3.2 重原子效应理论计算	}
3.3 MBSe 的光学性质)
3.4 光敏剂细胞毒性测定10)
3.5 细胞内 ROS 水平与超氧阴离子水平检测	
5.0 值》印他初期。 3.7 模拟肿瘤细胞球实验	5
四 结论	;
参考文献	2
	,
20-	

一引言

1.1 研究背景

癌症是造成人类死亡的最主要原因之一。根据国际癌症研究中心(IRAC)的数据,2020年全世界因癌症而死亡的人数达到约970-1020万^[1]。目前癌症的主要治疗手段包括手术切除、放射治疗、化学治疗等。然而,传统癌症治疗手段一般不具有选择性且具有较大的毒副作用。具有细胞毒性的治疗药物在杀死癌细胞的同时也会攻击正常的组织细胞,导致身体组织坏死、消化和免疫系统紊乱等一系列问题^[2]。光动力治疗(PDT)作为新兴的抗肿瘤治疗方法,具有非侵入性、高选择性和低毒副作用等优点,有效克服了传统治疗方法的弊端^[3]。

1.2 PDT 原理

在 PDT 中, 富集在肿瘤部位光敏分子在特定波长的激光光照下激发后发生 一系列光化学反应,并与氧分子作用生成具有细胞毒性的活性氧物种(ROS), 从而杀死肿瘤细胞。其中光源、光敏剂与氧气是影响 PDT 疗效的三大要素。在 激光照射下,光敏剂分子吸收光子,被激发至单重激发态。单重态光敏剂分子可 以通过释放荧光的方式回归基态,也可以通过系间窜越的方式跨越到能量较低的 三重激发态,而处于三重态的光敏剂分子可以通过(1)通过转移电子或光子至 底物产生负离子或自由基,再与氧分子反应形成具有细胞毒性的超氧阴离子,并 进一步反应生成羟基自由基等 ROS(Type IPDT);或(2)直接向氧分子转移能 量形成活性单重态氧(Type II PDT)。ROS 进一步诱导肿瘤细胞凋亡或坏死^[4,5]。

1.3 光源

用于 PDT 的激光波长一般在 600-900 nm 之间。血红蛋白等人体内源分子在 600 nm 以下有较强的吸收,因此会干扰光敏剂在体内对 600 nm 以下激光的吸收。而波长大于 900 nm 的激光由于能量较低,单重态量子产率可能较低^[6]。

1.4 光敏剂

理想的 PDT 光敏剂需要具有靶向肿瘤细胞的能力,同时应该在组织透光区 有着较强烈的吸收,并拥有较高的三重态量子产率。为防止在治疗过程中杀伤正 常细胞,光敏剂分子应在具有较强光毒性的同时保持较低的暗毒性^[7]。用于 PDT 的第一代光敏剂以卟啉化合物及其衍生物为主。第一代光敏剂虽已被多国批准用 于临床治疗^[8],但此类光敏剂仍存在激发波长过短、低选择性、高毒副作用等缺 点。第二代光敏剂以卟吩衍生物、酞菁和萘酞菁化合物、非卟啉类吩噻嗪染料和 稠环醌类化合物等为主,其相比第一代光敏剂有着较大的吸收波长与较高的细胞 毒性物种量子产率等优势^[9]。本文所关注的 MB 属于第二代吩噻嗪类光敏剂。MB 作为一种被广泛应用的商业染料,是最早用于临床抗菌研究的光敏剂之一^[10]。实 验表明,其在红光照射下对结肠肿瘤等病变细胞的生长具有比较明显的抑制作用 ^[11]。 1.5 氧气

对于肿瘤治疗而言,虽然 Type II PDT 由于生成单重态氧所需能量较少而可 能具有更高的 ROS 产率^[12],但肿瘤内极度乏氧的环境限制了单重态氧的生成^[13]。 而在 Type I PDT 中,三重激发态光敏分子与底物作用生成的负离子和自由基等 物种与低浓度氧气反应生成超氧阴离子,并可以通过 Fenton 反应与 Haber-Weiss 反应等生成羟基自由基等 ROS^[14],因此在肿瘤内的乏氧条件下也能保持较高的 ROS 生成速率。

Wards.

Haber-Weiss 反应: 0_2 ^{·-} + H₂ 0_2 → 0H⁻ + 0_2 + OH Fenton 反应^[3]: 0_2 ^{·-} + Fe³⁺ → 0_2 + Fe²⁺

1.6 研究目的及方法

PDT 非侵入性、高选择性和低毒副作用等优点在肿瘤治疗中具有较大应用 潜力,而传统光敏剂 ROS 产率较低、对氧气依赖程度较重的问题,为我们设计 新型光敏剂提供了思路。我们在商业染料 MB 的基础上用硒原子取代硫原子设 计了新型光敏分子硒代亚甲基蓝。硫原子的高核电荷增强了光敏剂分子的自旋-轨道耦合作用,从而提高了单重态与三重态之间的系间窜越速率,进而提高了光 敏剂的活性氧产生效率,使其具有更强的抗肿瘤性能^[15]。本课题合成了 MBSe, 对其光学性能、常氧/乏氧条件下的光/暗细胞毒性、ROS 产率等进行了检测,并 与 MB 进行了对比实验,证明了 MBSe 在抗肿瘤治疗领域具有较大的应用潜力。



. 材料与方法

2.1 药品与试剂

商业染料 MB 以及用于 MBSe 制备的所有试剂均为分析级,并从 Energy Chemistry 和 J&K Chemical 购买。检测 ROS 与超氧阴离子浓度的 DCFH-DA 探 针与 DHE 探针以及检测活死细胞的 Calcein AM 与 PI 试剂盒均购自 Beyotime Biotechnology。

2.2 仪器

我们使用 Horiba FluoroMax-4 荧光分光光度计(日本堀场公司)检测荧光量 子产率;使用 Perkin Elmer E35 紫外分光光度计(美国铂金埃尔默公司)记录吸 收光谱并检测摩尔吸光系数;使用 Zeiss LSM710 荧光显微镜(德国蔡司集团) 进行细胞共聚焦成像。

Stofe

2.3 方法

2.3.1 目标光敏剂分子(MBSe)的合成及结构表征

将 3 g (6.6 mmol) 双-(3-N, N-二乙氨基苯基)二硒溶解于 60 mL 1 M 盐酸中,置于冰水浴中。将 0.91 g (13.2 mmol) NaNO₂溶于 15 mL 水中,缓慢滴入冰水浴中反应体系,不断搅拌,反应 10 min 得到砖红色产物。用二氯甲烷(2*100 mL)萃取反应液,合并有机相并用无水硫酸钠干燥,抽滤,取砖红色滤液,于旋转蒸发仪中蒸干。加入 3.2 g (21.5 mmol) N,N-二乙基-苯胺,用三氟乙醇溶解,加热至 90 摄氏度,搅拌,反应 1 h 得深蓝色溶液。溶液在旋蒸仪中蒸干溶剂后由二氯甲烷/乙醇(v : v=19 : 1) 做洗脱剂过硅胶柱,得蓝黑色产物。对所得产物进行 ¹H NMR 图谱和 ¹³C NMR 图谱结构表征。表征结果如下: ¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.96 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 7.62 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.38 (dd, J = 9.6, 2.8 Hz, 1H), 3.75 (q, J = 7.2 Hz, 4H), 1.37 (t, J = 7.2 Hz, 6H). ¹³C NMR (101 MHz, MeOD) δ 153.78, 141.64, 138.32, 136.48, 119.41, 110.76, 47.46, 13.23.

2.3.2 重原子效应理论计算

对于分子系间窜越速率有如下公式:

 $SOC = \langle S_n | H_{SO} | T_m \rangle$

 $K_{ISC} \propto [\langle S_n | H_{SO} | T_m \rangle / \Delta E_{SnTm}]^2$

通过高斯密度泛函理论计算(DFT),我们求得以下数据:

	Energy	MB	MBSe	$\langleS_n H_{SO} T_m\rangle$	MB	MBSe	
	(eV)			(cm^{-1})			
	S_1	2.320	2.319	$S_1 \leftrightarrow T_1$	0.050	0.308	
	T 1	1.137	1.131	$S_1 \leftrightarrow T_2$	0.363	2.066	
	T ₂	1.755	1.662	$S_1 \leftrightarrow T_3$	0.233	0.905	
	T_3	2.600	2.575	$S_1 \leftrightarrow T_4$	1.150	9.387	
	T ₄	2.659	2.571				
	ΔE_{S1T1}	1.183	1.188				
SV	ΔE_{S1T2}	0.565	0.657				
	ΔE_{S1T3}	-0.280	-0.256				
V	ΔE_{S1T4}	-0.339	-0.252				

Table 2.3.2.1. MB 和 MBSe 的单重态与三重态能隙以及自旋-轨道耦合常数

Table 2.3.2.2. MB 和 MBSe 的[(S_n|H_{SO}|T_m)/ΔE_{SnTm}]² 计算结果

		21 (1) (1)	
[< S	$_{n} H_{SO} T_{m}\rangle$ / ΔE_{SnTm}] ² (×10 ⁶)	MB	MBSe
	$S_1 \leftrightarrow T_1$	0.00	0.010
	$S_1 \leftrightarrow T_2$	0.064	1.527
	$S_1 \leftrightarrow T_3$	0.107	1.930
	$S_1 \leftrightarrow T_4$	1.776	214.179
	Sum	1.947	217.646

($[\langle S_n | H_{SO} | T_m \rangle / \Delta E_{SnTm}]^2$ 计算结果无单位)

2.3.3 光学性质测定

以甲醇为溶剂,将 MB 与 MBSe 分别配成 1*10⁻⁵ M 待测液。用紫外-可见光 分光光度计及荧光分光光度计测定吸收光谱及荧光光谱(光栅-3,狭缝宽度=4 nm,电压中等)。以耐尔蓝为荧光量子产率的参比物,测定 MB 与 MBSe 的荧光 量子产率。

荧光量子产率(QY)根据以下等式测定:

 $\phi_{sample} = \phi_{ICG} \times \frac{I^{sample}A^{ICG}}{I^{ICG}A^{sample}} \times [\frac{\eta^{sample}}{\eta^{ICG}}]^2$

摩尔吸光系数根据以下等式测定:

$$\varepsilon = \frac{A}{b \times c}$$

选用波长匹配的亚甲基蓝(MB)作为标准单线态氧参照物(ΦΔ=0.52), DPBF 作为单线态氧捕获剂,用紫外分光光度法测试 MBSe 单重态氧产率。以甲醇为溶 剂,将 MB 与 MBSe 分别配成 1*10⁻⁵ mol/L 待测液,加入 DPBF 后用 2 mW/cm², 635 nm 激光器光照 10 s。用紫外分光光度计测定光谱。单重态氧产率根据如下 公式测定:

$$\phi_{\Delta}({}^{1}O_{2})^{MBSe} = \phi_{\Delta}({}^{1}O_{2})^{RB} \frac{S^{MBSe}F^{MB}}{S^{MB}F^{MBSe}}$$

以甲醇为溶剂,将 MB 与 MBSe 分别配成 1*10⁻⁵ M 待测液。加入 1*10⁻⁵ M DHR-1,2,3,用 10 mW/cm²,660 nm 激光器光照 30 s,用紫外分光光度计测定光 谱。

2.3.4 光敏剂细胞毒性测定

4T1 小鼠乳腺癌细胞(以下称"4T1 癌细胞")复苏后,加入含有 10%胎牛 血清(FBS; Gibco)和谷氨酰胺(2 mM)的改良 Eagle 培养基(DMEM, Gibco), 置于 5% CO₂、饱和湿度及 37 ℃的培养箱中培养 72 h。取对数生长期的上述细 胞接种于 96 孔板中,最外圈孔用 FBS 血清填充,内部 6*10 孔接种细胞,培养 24 h 至每孔约 4500-5000 个细胞。制得的 MBSe 用配制成 10 mM 浓储液。取 1.2 μL MBSe 浓储液,加入 DMEM 不完全高糖培养基配成 6 mL 2 μM MBSe 溶液。 在接种细胞的孔中从右至左分别加入 200 μL 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0313, 0.0156, 0.0078, 0.0039 μM MBSe 溶液。最右侧为 2 μM,从右向左等比 递减,公比为 0.5。分别稀释,加入配好的药物溶液。避光培养 24 h。每孔中加 入 40 μL 2.5 mg/mL MTT 溶液。避光培养 3-4 h。用 15 mW/cm², 635 nm 激光器 照射 5 min。光照后小心吸出培养基,每孔中加入 100 μL DMSO 溶解蓝色结晶。 用酶联免疫检测仪测定溶液吸光度。重复实验。实验获得的 3 组吸光度数据分别 以未加药组吸光度为 1 计算加药组吸光度百分比平均值以及标准偏差。计算 MBSe IC₅₀ 值。

	Ei	le <u>E</u> dit <u>V</u> iew <u>Γ</u>	Data Plot C	olumn Wor <u>l</u> alma: 4. 7 %	sheet F <u>o</u> rma	at <u>A</u> nalysis S. + ⊕ • ‡ 3	Statistics Im	age <u>T</u> ools ≅∕∕·∕•≴	Preferences	Connectivity \ × Y Z I ™™ ∰ ∰ I I I I I IIII	, de
: P											
	r	: 1 i i i i i i i i i i i i i i i i i i		••••							
Pro			A (X)	B (Y)	C (Y)	D (Y)	E (Y)	F (Y)	G (Y)	H(yEr±)	
jec		Long Name							Mean	Standard D	
÷		Units									X
Explorer		Comments	浓度为X轴			三组实验数 据		-1	数据(平均 值)为Y轴	scale bar	*
		F(x)=						-///			
<u> </u>		1	0		100	100	100		100	0	
		2	0.00781		72. 20848	77. 93403	82.44218		78.74996	4. 84846	
Me		3	0.01563			71. 80556	79. 9055		73. 2626	6.04749	
sse	୍	4	0. 03125		52. 06993	45. 41667	52. 67346		51. 39885	4. 24871	
age	-8 +c	5	0.0625		31.04074	26. 64931	28. 77394		29. 0373	1.8444	
ŝ	*	6	0.125		21.17763	16.92708	8. 953		14. 72615	5.28886	
0 g	8	7	0.25		14. 9266	15.97222	7. 78413		12. 50231	3.46476	
		8	0.5		8. 54363	6. 26736	8. 18204		7. 88181	1.08937	
		9	1		6.15207	5. 78125	10. 4949		6. 73766	0.99081	
Sma		10	2		5. 64077	5, 41667	8. 00796		6. 45658	1. 12373	
rt	- 14	11									

图 2.3.4.1 吸光度数据处理

另取一板,加药后装入乏氧袋并放入 anaeropouch 安宁片1片,模拟乏氧环境。其他操作相同。

暗毒性检测时无需光照,取 76.8 uL 10 mM MBSe 浓储液加入不完全高糖培养基配成 6 mL 128 μM MBSe 溶液备用。在 96 孔板中从右至左分别加入 200μL 128,64,32,16,8,4,2,1,0.5,0.25 μM MBSe。其他操作相同。

选用 MB 做对比试验,操作相同。用酶联免疫检测仪分别测 490/570 nm 溶 液吸光度,处理数据。计算 MB IC₅₀ 值。其他操作相同。

2.3.5 细胞内 ROS 水平与超氧阴离子水平检测

4T1 癌细胞复苏后,加入含有 10%胎牛血清(FBS; Gibco)和谷氨酰胺(2 mM)的改良 Eagle 培养基(DMEM, Gibco),置于 5% CO₂、饱和湿度及 37 ℃ 的培养箱中培养 72 h。取对数生长期的上述细胞接种于 30 mm 四格共聚焦皿内, 培养至皿底有一层细胞。四格内分别加入 500 μL 培养液,其中包含: 1 uM MB + 5 μM DCFH-DA; 1 μM MB + 5 μM DHE; 1 μM MBSe + 5 μM DCFH-DA; 1 μM MBSe + 5 μM DHE。培养 1 h 后,用 PBS 洗涤 3 次细胞,并用 15 mW/cm², 635 nm 激光器光照 5 min。光照后用荧光显微镜 40 倍镜观察,488 nm 激发,检测 498-580 nm 波段 DCF 的荧光效应;用荧光显微镜 63 倍油镜观察,488 nm 激发, 检测 550-680 nm 波段 DHE 的荧光效应。

另取一四格共聚焦皿做避光对照组,检测暗环境下细胞内 ROS 水平与超氧 阴离子水平。无需光照,其他操作相同。

另取两个四格共聚焦皿做乏氧对照组,检测乏氧条件下细胞内 ROS 水平与 超氧阴离子水平。接种细胞及药物后装入乏氧袋并放入 anaeropouch 安宁片1片, 模拟乏氧环境。其他操作相同。

2.3.6 活死细胞检测

4T1 癌细胞复苏后,加入含有 10%胎牛血清(FBS; Gibco)和谷氨酰胺(2 mM)的改良 Eagle 培养基(DMEM, Gibco),置于 5% CO₂、饱和湿度及 37 ℃的培养箱中培养 72 h。取对数生长期的上述细胞接种于两只 30 mm 培养皿中,培养至皿底有一层细胞。两培养皿中分别加入 1.5 mL 0.5 μM MB 和 1.5 mL 0.5 μM MBSe 带药培养液,培养约 1 h。用 15 mW/cm², 635 nm 激光器光照 20 min。取 Calcein AM 10 μL, PI 7 uL, 配成 7 mL 带药培养基。吸出原培养基,加入带药培养基,染色 30 min。用荧光显微镜 40 倍镜观察,490 nm 激发,检测 545 nm 波长处细胞内的荧光强度。

另取两只 30 mm 培养皿做乏氧对照组,进行乏氧条件下活死细胞检测。接种细胞及药物后装入乏氧袋并放入 anaeropouch 安宁片1片,模拟乏氧环境。其他操作相同。

2.3.7 模拟肿瘤细胞球实验

4T1 癌细胞复苏后,加入含有 10%胎牛血清(FBS; Gibco)和谷氨酰胺(2 mM)的改良 Eagle 培养基(DMEM, Gibco),置于 5% CO₂、饱和湿度及 37℃的培养箱中培养 72 h。取对数生长期的上述细胞接种于 96 孔超低吸附板中,边缘孔用无菌 PBS 填充,每孔细胞数约 5000 个。培养 24 h 至细胞铺满板底部且呈球状。将内部 6*10 孔分成从左至右共 10 组 3*2 孔,标号 1~10。如图 2.3.7.1 所示。



图 2.3.7.1 培养细胞球的 96 孔超低吸附板

对每组分别做如下处理: 1: 加药 2 μM MBSe; 2: 不加药; 3: 加药 1 μM MBSe; 4: 加药 2 μM MBSe; 5: 加药 4 μM MBSe; 6: 加药 2 μM MB; 7: 不加 药; 8: 加药 1 μM MB; 9: 加药 2 μM MB; 10: 加药 4 μM MB。避光培养 24 h 后, 2、3、4、5、7、8、9、10 组分别用 15 mW/cm², 635 nm 激光器光照 5 min,

用荧光显微镜进行共聚焦成像。再次避光培养 24 h 并进行共聚焦成像。

三 结果与讨论

3.1 MBSe 的结构表征



在 MBSe 的¹H NMR 波谱中,在 7.38-7.97 ppm 出现了 6 个质子化学位移, 对应于吖啶环上的六个质子; 3.75-3.78 ppm 出现了 8 个质子化学位移, 对应于 4 个亚甲基上的 8 个质子; 1.36-1.39 ppm 出现了 12 个质子化学位移, 对应于 4 个 甲基上的 12 个质子。在 MBSe 的 ¹³C NMR 波谱中,在-110.76~-155.78 ppm 出现 了吖啶环碳的信号; 在-13.23~-47.46 ppm 出现了甲基与亚甲基碳的信号。上述结 构表征说明成功合成得到目标 MBSe 分子。

3.2 重原子效应理论计算



图 3.2.1 MB 与 MBSe 系间窜越速率对比

通过理论计算,我们发现用重原子硒代替硫后,MBSe的 SOC 常数明显增 加,单重态与三重态能隙(ΔEst)有些微变化,导致系间窜越速率(ISC)常数 K (~ $[\langle S_n | H_{SO} | T_m \rangle / \Delta E_{SnTm}]^2$) 显著增大(见 Table 2.3.2.1~2.3.2.2)。根据震荡强度(fosc) 我们发现从 S1 状态到 T2 状态的是三重态形成的主要贡献者(fosc=0.8788)。经 计算可知 MBSe 的常数 KISC 大约是 MB 的 24 倍, 即光敏性能可能更加优异。以 上结果说明 Se 原子的引入赋予了 MBSe 作为光敏试剂的极大潜力。

3.3 MBSe 的光学性质

我们用紫外-可见光分光光度计及荧光分光光度计测定了 MB 与 MBSe 的吸 收光谱及荧光光谱;以耐尔蓝为荧光量子产率的参比物,测定了 MB 与 MBSe 的 荧光量子产率;我们以 DPBF 作为单重态氧捕获剂,MB 作为参比测定了 MBSe 的单重态氧产率;以 DHR-1,2,3 作为超氧阴离子的捕获剂,测定了 MB 和 MBSe 的超氧阴离子的相对产率。DPBF 在 410 nm 激光激发下有着最大波长为 455 nm 的荧光效应,且极易与单重态氧发生反应生成在 410 nm 处吸光度较小且没有荧光效应的氧化产物。通过检测溶液在 410 nm 处的吸光度变化,可以测定生成单重态氧的产率^[17];DHR-1,2,3 本身不具有荧光效应,进入细胞后可以被超氧阴离子物种氧化为 R-1,2,3。R-1,2,3 会富集于细胞内线粒体且具有绿色荧光。通过检测细胞内荧光强度变化,可以测定超氧阴离子产率^[18]。

Stor.

光谱实验结果如下图所示。





	Compound	λ _{abs} / nm	ε/10 ⁴ M ⁻¹ cm ⁻¹	λ _{em} /n m	Stokes Shifts (nm)	Φ _f	Φ_{Δ}
	MB	652	8.34	680	28	0.23	0.52
X	MBSe	662	12.26	695	33	0.03	0.81

图 3.3.2 MB, MBSe 光谱分析数据

单重态氧与超氧阴离子产率检测结果如下图所示:



图 3.3.4 DHR-1,2,3 探针测定超氧阴离子相对产率紫外光谱(10 mW/cm², 30s)

由图 3.3.2 可见, MB 的最大吸收波长在 652 nm, 荧光发射波长为 680 nm, 摩尔吸光系数为 8.34 *10⁴ M⁻¹cm⁻¹; MBSe 的最大吸收波长在 662 nm, 荧光发射 波长为 695 nm, 摩尔吸光系数为 12.26 *10⁴ M⁻¹cm⁻¹, 以上数据表明 MBSe 的吸 收光波长向近红外区域红移, 并在生物组织内具有更好的光吸收效率。由图 3.3.3 可以看出, MB 与材料 MBSe 在光照后皆能产生单重态氧, 410 nm 的 DPBF 吸 收峰快速下降。根据公式我们可以算出材料 MBSe 在甲醇中的单重态氧产率达 到 0.81,高于商业染料 MB 的单重态氧量子产率 0.52。这说明 MBSe 相较于 MB 具有更为优异的 II 型 PDT 光敏剂效果,其主要原因是硒原子的重原子效应促进 了系间窜越。如此高的单重态氧产率能够保证 MBSe 可以用于光动力治疗。由图 3.3.4 可见, DHR-1,2,3 的荧光强度变化检测结果表明 MBSe 产生超氧阴离子的能 力也要大于 MB。其优异的 I 型 PDT 性能使其能更好地适应肿瘤内乏氧环境。综 上,相较于 MB 而言, MBSe 在体外同时具有更好的 I/II 型 PDT 光敏剂效果,其性质值得我们进一步的探究。

3.4 光敏剂细胞毒性测定

我们使用甲基噻唑四唑(MTT)测定了 MB 与 MBSe 对 4T1 细胞的暗毒性与光毒性作用。只存在于活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶(SDH)可以将 MTT 还原为蓝紫色甲臜晶体。将还原得到的蓝紫色晶体溶解于 DMSO 中,溶液的光吸收值即反应了原活细胞数量。根据未加药对照组的光吸收值可以计算光敏剂半致死浓度 IC₅₀,从而反应光敏剂的细胞毒性。实验结果见下图。



如图 3.4.1 所示,常氧情况下,在15 mW/cm²,635 nm 激光器照射 5 min 后 2 μM MB 培养的细胞存活率近 90%。而经相同强度光辐射后 2 μM MBSe 培 养的细胞存活率已不足 10%。这体现了 MBSe 在常氧条件下具有更高的光毒 性。这可能是由硒原子取代硫原子带来的重原子效应导致的。在乏氧情况下, 64 μ M MB 培养的细胞在 15 mW/cm², 635 nm 激光器照射 5 min 后存活率仍超 过 80%。这说明 MB 在乏氧条件下光毒性受到限制。而在相同强度光辐射下, 乏氧条件下 1 μ M MBSe 培养的细胞存活率已不足 10%。这说明 MBSe 在乏氧 条件下仍具有较强的光毒性,能较好地适应肿瘤内部的乏氧环境。如图 3.4.2, 比较两者半致死浓度 IC₅₀。在光照条件下,MB 的 IC₅₀ 值在常氧(IC₅₀,38.66 μ M)和乏氧(IC₅₀,>64 μ M)条件下均较大,远超 MBSe。而 MBSe 的 IC₅₀ 值 则很小(IC₅₀,常氧 0.033 μ M,乏氧 0.087 μ M)。这说明 MBSe 相较于 MB 具 有更强的光毒性和更好的抗肿瘤能力。如图 3.4.1 所示,在黑暗条件下,MB 与 MBSe 在浓度小于 16 μ M 时都未表现出明显的暗毒性,而此剂量已远远超过一 般治疗中会使用到的剂量。比较两者半致死浓度 IC₅₀,可见 MB 与 MBSe 在黑 暗条件下 IC₅₀ 值均较大。这说明二者作为光敏剂都具有低毒副作用的特征。

3.5 细胞内 ROS 水平与超氧阴离子水平检测

我们利用 DCFH-DA 探针检测细胞内 ROS 水平。DCFH-DA 探针本身没有 荧光效应,进入细胞后被细胞内的酯酶水解生成无法透过细胞膜的 DCFH。 DCFH 会被生成的 ROS 氧化至有亮绿色荧光的 DCF^[18],因此我们可以通过检 测到的荧光强度反应细胞内 ROS 水平。我们用 DHE 探针检测了超氧阴离子水 平。DHE 探针进入细胞后会被生成的超氧阴离子氧化生成乙锭产物。产物与细 胞核内的 DNA 或 RNA 结合会产生红色荧光^[19,20],因此我们可以通过检测到的 荧光强度反应超氧阴离子水平。





图 3.5.2 MB, MBSe 细胞内 ROS 水平检测共聚焦成像

由图 3.5.2 可见, 1 µM MB 与 1 µM MBSe 培养的细胞在不光照条件下均未呈 现明显的荧光效应,说明黑暗条件下细胞内 ROS 水平较低, MB 与 MBSe 均无 明显暗毒性。经 15 mW/cm², 635 nm 激光器光照 5 min 后, 1 μM MB 培养的细 胞仍不呈现明显荧光,而1μM MBSe 培养的细胞则在常氧和乏氧条件下均呈现 出较明显的绿色荧光效应。这说明 MBSe 培养的细胞经光照后细胞内 DCF 浓度 更高,其相比于 MB 在光照条件下具有更强的产生 ROS 的能力,具有更强的光 毒性与抗肿瘤疗效。MBSe 在乏氧条件下仍能保持较高的 ROS 产率,说明其对 肿瘤内部乏氧环境具有更强的适应能力。







图 3.5.4 乏氧条件下光照后 MBSe 培养细胞 DHE 荧光探针检测共聚焦成像

由图 3.5.3 可见, 1 µM MB 与 1 µM MBSe 培养的细胞在黑暗条件下均未呈现明显的荧光效应,说明黑暗条件下细胞内超氧阴离子水平较低, MB 与 MBSe 均无明显的暗毒性。而经 15 mW/cm², 635 nm 激光器光照 5 min 后, 1 µM MB 培养的细胞只呈现极弱的红色荧光效应,而 1 µM MBSe 培养的细胞则在常氧和 乏氧条件下均呈现出较明显的红色荧光效应。这说明 MBSe 培养的细胞经光照 后细胞内 DHE 氧化产物浓度更高,其相比于 MB 在光照条件下具有更强的生成 超氧阴离子的能力。这体现了 MBSe 具有更好的 I 型 PDT 性能,在肿瘤治疗中 能更好地适应肿瘤内部环境。图 3.5.4 中细胞中心部分区域的荧光强度要远远超 过细胞边缘区域,这是因为 DHE 被超氧阴离子氧化脱氢后生成的乙锭物种与细胞核内的 DNA/RNA 结合而发出荧光导致细胞核区域荧光强度较大。

3.6 活死细胞检测





Marde



我们用 Calcein AM/PI 探针进行活死细胞检测。Calcein AM 可以穿透活细胞 膜,并在细胞内被酯酶水解生成带有强绿色荧光的 Calcein 而无法再离开细胞。 而 PI (碘化丙啶)无法穿过活细胞膜,只可与死细胞的细胞核中 DNA 结合发出 强红色荧光。检测结果如下:



由图 3.6.2 可见, 经 15 mW/cm2 635 nm 激光器光照 20 min 后, 0.5 μM MB 培养的细胞在常氧和乏氧条件下均呈现明显的绿色荧光而未呈现红色荧光。 而 0.5 μM MBSe 培养的细胞则在相同强度光辐射后,在常氧和乏氧条件下均呈现出明显的红色荧光。这表明 MBSe 培养的细胞存活率低, MBSe 具有更强的光毒性。黑暗条件下, MB 与 MBSe 培养的细胞均呈现明显的绿色荧光而不呈现 红色荧光,这说明二者暗毒性皆较弱,作为光敏剂有着光选择性治疗能力与低毒 副作用。

3.7 模拟肿瘤细胞球实验

我们通过培养带药的 4T1 细胞三维细胞球来模拟肿瘤环境并检测 MB 与 MBSe 在肿瘤内环境下的细胞毒性^[21]。



图 3.7.1 4T1 细胞球不同条件下培养 24 h,48 h 时共聚焦成像

由图 3.7.1 可见,对照组中,细胞培养 48 h 后无明显变化。2 μM MB 培养的细胞球在不光照或光照情况下培养 48 h 后都无明显裂解现象,说明 MB 在肿瘤内部的低透光度和乏氧条件下不能很好地生成 ROS 物种杀死肿瘤细胞。而 2 μM MBSe 培养的细胞球在不光照条件下无明显裂解,而经 15 mW/cm²,635 nm 激光器光照 5 min 后细胞球明显裂解且失去清晰细胞轮廓。这说明 MBSe 在黑暗条件下无明显毒副作用,且能很好地适应肿瘤内部环境。这可能与其较强的通过

四 结论

综上所述,我们基于重原子效应的原理,通过在传统商业化染料 MB 中引入 硒原子设计合成了具有 I 型和 II 型 PDT 效果的光敏剂分子 MBSe,并通过一系 列光谱分析与细胞实验检测了 MBSe 的光物理性质与肿瘤细胞毒性,并与 MB 进 行对比实验。通过测定 MB 与 MBSe 的吸收发射波长范围、单线态氧量子产率与 超氧阴离子产率,我们证明了 MBSe 相比 MB 具有更加优异的体外 I 型和II型光 动力效果。通过分析 MTT 实验以及 4T1 细胞内小分子荧光探针检测的结果,我 们发现 MBSe 在拥有较低暗毒性的同时,相比 MB 具有更强的产生 ROS 的能力。 通过培养三维细胞球模拟肿瘤环境,我们发现 MBSe 能更好地克服肿瘤内部的 乏氧微环境,在光照下杀死肿瘤细胞。通过以上结果,我们证实了基于重原子效 应设计新型光敏剂的可能性,并成功设计出了具有更强抗肿瘤性能的新型光敏剂。 传统光敏剂 MB 已被多国用于临床医疗,这表明我们的设计在抗肿瘤治疗中具 有广阔的应用前景。

st think

参考文献

[1] Ferlay J, Ervik M, Lam F, et al. Global cancer observatory: cancer today. Int. Agency Res[J]. Cancer, 2020.

[2] W. Fan, B. Yung, P. Huang, X. Chen, Chem. Rev. 2017, 117, 13566.

[3] Chen D, Xu Q, Wang W, et al. Type I photosensitizers revitalizing photodynamic oncotherapy[J]. Small, 2021, 17(31): 2006742.

[4] Foote C S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation[J]. Photochemistry and photobiology, 1991, 54(5): 659-659.

Nardi

[5] Ding H.: Photodynamic therapy: basic principles and applications[M].

Chemical Industry Press, 2014.

[6] Photodynamic therapy[M]. Royal Society of Chemistry, 2003.

[7] Robertson C A, Evans D H, Abrahamse H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2009, 96(1): 1-8.

[8] Macdonald I J, Dougherty T J. Basic principles of photodynamic therapy[J]. Journal of Porphyrins and Phthalocyanines, 2001, 5(02): 105-129.

[9] Tu Y, Xia W, Wu X, et al. A lysosome-targeted near-infrared photosensitizer for photodynamic therapy and two-photon fluorescence imaging[J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2021, 19.

[10] Dai T, Fuchs B B, Coleman J J, et al. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform[J]. Frontiers in microbiology, 2012, 3: 120.

[11] Orth K, Russ D, Beck G, et al. Photochemotherapy of experimental colonic tumours with intratumorally applied methylene blue[J]. Langenbeck's archives of surgery, 1998, 383(3): 276-281.

[12] Mattila H, Khorobrykh S, Havurinne V, et al. Reactive oxygen species: Reactions and detection from photosynthetic tissues[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2015, 152: 176-214.

[13] Li X, Lee D, Huang J D, et al. Phthalocyanine-assembled nanodots as photosensitizers for highly efficient type I photoreactions in photodynamic therapy[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2018, 57(31): 9885-9890.

[14] Li M, Xia J, Tian R, et al. Near-infrared light-initiated molecular superoxide radical generator: rejuvenating photodynamic therapy against hypoxic tumors[J]. Journal of the American Chemical Society, 2018, 140(44): 14851-14859.

[15] Foley J W, Song X, Demidova T N, et al. Synthesis and properties of benzo [a] phenoxazinium chalcogen analogues as novel broad-spectrum antimicrobial photosensitizers[J]. Journal of medicinal chemistry, 2006, 49(17): 5291-5299.

[16] Carloni P, Damiani E, Greci L, et al. On the use of 1, 3-diphenylisobenzofuran (DPBF). Reactions with carbon and oxygen centered radicals in model and natural systems[J]. Research on chemical intermediates, 1993, 19(5): 395-405.

[17] LeBel C P, Ischiropoulos H, Bondy S C. Evaluation of the probe 2', 7'-dichlorofluorescin as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress[J]. Chemical research in toxicology, 1992, 5(2): 227-231.

[18] Kiani-Esfahani A, Tavalaee M, Deemeh M R, et al. DHR123: an alternative probe for assessment of ROS in human spermatozoa[J]. Systems biology in reproductive medicine, 2012,

58(3): 168-174.

[19] Jiang X J, Lo P C, Yeung S L, et al. A pH-responsive fluorescence probe and photosensitiser based on a tetraamino silicon (IV) phthalocyanine[J]. Chemical communications, 2010, 46(18): 3188-3190.

[20] Zhao H, Joseph J, Fales H M, et al. Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005, 102(16): 5727-5732.

[21] Qi F, Yuan H, Chen Y, et al. Type I Photoreaction and Photoinduced Ferroptosis by a Ru (II) Complex to Overcome Tumor Hypoxia in Photodynamic Therapy[J]. CCS Chemistry, 2022: 1-9.

121

致谢

我们是三位对化学有着浓厚兴趣的高中生,很荣幸能有机会得到老师们的指导,完成抗肿瘤治疗的研究并参加到了丘成桐中学科学奖的比赛中。这一路走来,我们迷茫过,困惑过,但随着一道道谜题的解开,我们成功合成了理想中的光敏分子,顺利完成了科研课题,收获良多。

值此成文之际,我们首先向导师陈韵聪教授致以最诚挚的敬意和衷心的感谢。 就职于南京大学的陈韵聪教授为我们的科研提供了选题,实验设计,实验操作等 多方面的悉心指导。陈老师具有丰富的肿瘤诊疗试剂开发与应用的研究经验和敏 锐的学术洞察力,尤其在科研攻坚中的韧性与勇于探索的创新精神是我们学习的 榜样。在课题研究过程中,就职于南京外国语学校的许亮亮老师在理论研究方面 给予了我们莫大的帮助和的指导。许亮亮老师学识广博、思维敏捷,对学术前沿 具有深刻的认识,待人诚恳,亦师亦友。二位导师对我们的学校、科研和生活产 生了深刻的影响,在此表示真挚的谢意!在学习和科研期间,我们得到了姚善昆 学长的无私帮助和指导。在他的引导下,我们对光动力治疗的原理有了更深入的 理解,同时对所涉及到的生物化学实验也更加熟练,有了更丰富的实验室经验。 姚学长在我们论文写作与修改的过程中也非常耐心地提供了指导。我们在此向他 表达最诚挚的谢意!

我们三位队员分工明确,定浩宸负责文献资料收集和整理、参与设计实验方 案,负责合成光敏剂分子及光物理性质测定;王佳萱负责活死细胞检测和模拟肿 瘤细胞球实验,分析检测方案可行性;张智禹负责光敏剂细胞毒性测定、细胞内 活性氧水平与超氧阴离子水平检测。在指导老师与师兄的指导下,我们共同完成 了重原子效应理论计算与化合物结构表征等实验内容。定浩宸负责论文初稿撰写 工作,王佳萱负责数据整理和作图,张智禹负责文献整理。我们三人共同参与了 文章修改工作。

JEERY

WHIT You HIDE School Science March Marche