偶氮苯衍生物探针在乏氧细胞成像中的应用

吴云雪 张衡益* 刘 育

(南开大学化学学院 天津 300071)

摘 要 细胞不受控制的生长增殖和异常的血管系统导致肿瘤部位氧气供应不足,氧气浓度低于正常组织。 细胞乏氧是大多数实体瘤的共同特征,可用作恶性组织和癌症进展的指标。准确的乏氧检测和成像对癌症 患者的诊断和临床治疗至关重要。荧光成像具有高灵敏度、无创、实时等优点,常被用于癌症检查。偶氮基 团由于其对荧光基团的荧光猝灭作用和还原断裂荧光恢复的特性,近年来被广泛用来构筑荧光探针,用于乏 氧细胞成像。本文按不同的构筑策略分类介绍偶氮苯衍生物探针,阐述它们的作用机理和成像能力,并对此 类探针的局限和未来发展进行总结和展望。

关键词 乏氧 偶氮苯衍生物 荧光探针 细胞成像 癌症 中图分类号: 0621.2; 0657.3; TP212.2 文献标识码: A 文章编号: 1005-281X(2021)03-0331-10

Application of Azobenzene Derivative Probes in Hypoxia Cell Imaging

Yunxue Wu, Hengyi Zhang*, Yu Liu(College of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract Tumor tissues have lower oxygen concentration compared to normal tissues, due to the inadequate oxygen supply caused by uncontrolled cell growth and proliferation, in addition to an abnormal vasculature. As a common feature of solid tumors, hypoxia can be an indicator of malignant tissues or cancer progression. Accurate hypoxia detection and imaging are essential for the diagnosis and clinical treatment of cancer patients. Fluorescence imaging has been used in cancer detection because of its high sensitivity, non-invasive and real-time characteristics. During recent years, azo groups have been widely used to construct fluorescent probes for hypoxia cell imaging, owing to the fluorescence quenching effect on fluorophores and their reductive cleavage resulting in fluorescence recovery. This review summarizes various azobenzene derivative probes according to different construction strategies, and explores their mechanism and application in imaging. The limitations and future development of these probes are also discussed.

Key words hypoxia; azobenzene derivative; fluorescent probes; cell imaging; cancer

Contents

- 1 Introduction
- 2 Azobenzene derivative probes based on covalent strategies
- 2.2 Azobenzene derivative probes linked to AIEgens
- 3 Azobenzene derivative probes based on noncovalent strategies
- 4 Conclusion and outlook
- 2.1 Azobenzene derivative probes linked to dyes

收稿: 2020年9月18日,收修改稿: 2020年10月14日,网络出版: 2020年12月22日 国家自然科学基金项目(No. 21772100)资助

The work was supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 21772100).

^{*} Corresponding author e-mail: hyzhang@nankai.edu.cn



1 引言

癌症是一种复杂的疾病。肿瘤部位不受控制的 细胞生长和异常细胞增殖导致癌症常伴有浸润、转 移等侵袭性表型^[1,2],且具有极高的发病率和死亡 率^[3]。2018年的统计报告显示,在针对 36 种癌症 的调查中,全球新诊断的癌症病人大约有 1810万, 死亡人数超过 900万^[4]。恐怖的是,癌症的发病率 仍然在持续增长^[5]。尽管如今的医疗技术在分子 成像、临床诊断和化学疗法等方面已经有了很大提 升,癌症依然是不可忽视的世界医学难题。对癌症 来说,早期发现和诊断能够提高病人的存活率甚至 治愈率^[6,7]。因此,探索新的癌症早期检测方法至 关重要。

相较于正常组织,肿瘤细胞的生命活动增加,需 氧量激增,而变异的肿瘤血管不能提供足够的氧 气^[8]。这种氧气供求量之间的不平衡导致肿瘤部 位的氧气浓度比正常组织中的氧气浓度低,可降至 4%以下,局部甚至可能降到 0%^[9-11]。病理性乏氧 存在于大多数实体瘤,是恶性肿瘤最重要的特 征^[12,13],可用作癌症进展的指标^[13,14]。乏氧的早期 检测不仅能支持建立临床治疗策略,还有助于制定 针对患者的个体治疗计划^[15-17]。

荧光成像因其高灵敏度、低毒性、良好的时空分 辨率、操作简单和无创实时^[18-20]等优点成为癌症检 查的首选方法。肿瘤部位的氧气含量偏低导致还原 性应激增加,各种还原酶(如 NTR(硝基还原酶)、 CyP450(细胞色素 P450)、醌类还原酶和 AzoR(偶氮 还原酶))的活性大大提高^[21],由此开发了基于还原 酶的乏氧荧光探针。出现较早、应用较广的是对 NTR 敏感的硝基或对硝基苄基探针^[22-26],此外还有可被 醌类还原酶还原的醌类探针^[27,28],而偶氮苯衍生物 探针也因其优良的性能近年来得到了广泛研究。

偶氮苯衍生物探针的作用方式是通过偶氮键还

	$R-N=N-R'$ $\stackrel{e^-}{\longrightarrow}$ $R-N-N-R'$ $\stackrel{e^-}{\longrightarrow}$
	Oxygen-Dependent Process
	$R-NH-HN-R' \xrightarrow{2e^-} R-NH_2 + H_2N-R'$
图1	偶氮苯衍生物逐步还原成苯胺衍生物[30]

Fig.1 Stepwise reduction of azobenzene derivatives to aniline derivatives^[30]. Copyright 2010, American Chemical Society

原性裂解来再生原始荧光团,进而还原荧光。AzoR 在乏氧细胞中过表达,通过电子的逐步转移将偶氮 苯类还原为苯胺类^[29],如图1所示。将偶氮基猝灭 基团与荧光团通过一定的方式组合后:在常氧环境 中,荧光团被光激发,猝灭基团对荧光的独特吸收或 者围绕偶氮键的快速构象翻转导致荧光猝灭;在乏 氧条件下,偶氮键断裂,猝灭过程消失,荧光随之恢 复。越来越多的文献表明,将偶氮键作为响应元件 构建荧光探针是一种很好的策略。偶氮苯衍生物探 针构筑了一种可控的关-开荧光开关,扩展了乏氧传 感器的潜在范围,可以实现动态监测氧气浓度变化。 本文拟将用于乏氧细胞成像的偶氮苯衍生物探针进 行归纳讨论,并对此类探针的局限和发展趋势进行 总结展望。

2 基于共价键构筑的偶氮苯衍生物探针

- 2.1 染料分子-偶氮苯衍生物探针
- 2.1.1 基于 FRET 机制的探针

2010年, Nagano 等^[30]首次将偶氮基团作为乏 氧响应因子构筑荧光探针。为了同时满足猝灭剂对 荧光团充分发挥作用和荧光团不对还原酶产生干 扰,他们把目光投向 FRET(荧光共振能量转移)机 制,将含有偶氮键的黑洞猝灭剂(BHQ)与花青染料 共价连接,得到 QCys 系列探针(图 2b)。探针通过 偶氮键的断裂改变 FRET 和猝灭效率,实现荧光强 度的变化(图 2a)。在正常环境中,花青染料荧光团 和 BHQ 之间发生 FRET 过程,花青染料的荧光猝 灭,探针几乎没有荧光发射;在乏氧条件下,AzoR 使 偶氮双键还原断裂,FRET 和荧光猝灭作用消失,荧 光得以恢复。QCys 探针开关率可达到 50~100 倍, 发射的是组织穿透力最强的近红外(NIR)荧光,荧 光反应迅速,在体外和体内均表现出优异的成像 性能。

2015年,Zhu 等基于罗丹明 B 和萘二甲酰亚胺 荧光团构筑了一种用于乏氧成像的荧光探针 HP^[31]。萘二甲酰亚胺具有高化学稳定性、高荧光



图 2 (a) QCys 的设计策略,(b) QCys 的化学结构^[30] Fig.2 (a) Design strategy of QCys.(b) Chemical structure of QCys^[30]. Copyright 2010, American Chemical Society

量子产率和多个化学修饰位点等优点,常被用于设 计荧光探针。1,8-萘二甲酰亚胺和偶氮键直接共价 连接,得到同时具有乏氧响应和荧光猝灭作用的 HPN,然后通过醚键与罗丹明 B 连接构筑得到探针 HP(图3)。由于从罗丹明 B 到 HPN 的 FRET 效应, 罗丹明 B 的荧光非常弱。在乏氧条件下,偶氮键断 裂导致 HPN 结构分解,FRET 过程和猝灭作用消 失,罗丹明 B 的荧光发射得以恢复(图3),581 nm 处的荧光显著增强。循环伏安法还原电势证明,探 针 HP 可以快速进行化学还原和 CyP450 酶促还原。 当与 HeLa 细胞(人宫颈癌细胞)共同培养时,HP 在 乏氧和常氧条件下的荧光开关比达到 9 倍,在各种 氧气浓度下荧光强度差异显著。

除了对乏氧刺激响应,同时对生物大分子敏感的探针近年来也备受关注。2018年,Zhu等报道了



图 3 HP 荧光探针的乏氧检测机理^[31]

Fig.3 Proposed mechanism of fluorescent probe HP for the detection of hypoxia^[31]. Copyright 2015, The Royal Society of Chemistry

_____ 综述与评论

一种 COX-2(环氧合酶 2)特异性乏氧响应型 NIR 荧 光探针 YZP1^[32]。COX-2 在肿瘤部位的浓度高于正 常组织,且乏氧环境会导致浓度更高。探针以近红 外荧光染料 Cy5.5 为荧光团,以吲哚美辛(IMC)为 靶向基团,以偶氮基团为猝灭剂。经过 FRET 过程 和偶氮的猝灭作用,YZP1 几乎没有荧光发射。在 乏氧条件下用 CyP450 还原后,YZP1 的偶氮键断 裂,Cy5.5 被释放并发出荧光,荧光量子产率从 0.0028 提高到 0.125。将 HeLa 细胞(COX-2 在其 中过表达)与 YZP1 在乏氧条件下共同培养可以观 察到明显的红色荧光,乏氧和常氧细胞的荧光强度 之比可达到 9 倍。用不同浓度的 COX-2 抑制剂处 理后,荧光会随着浓度的增大逐渐减弱,这证实了 YZP1 和 COX-2 的结合。使用小鼠炎症模型和肿瘤 异种移植模型进行体内成像实验,YZP1 表现良好。

此后,Zheng 等开发了一种对乏氧和 Cyt c(细 胞色素 c)同时响应的探针^[33]。细胞色素 c 是细胞 凋亡的重要因子之一,在乏氧的诱导下释放。探针 由金纳米粒子为核心,连接了 AZB-DNA-TAMRA, (AZB=偶氮苯, TAMRA=四甲基罗丹明)和嵌有 BHQ的Cyt c 靶向适配体。只有在乏氧和Cyt c 的 共同刺激下,偶氮键断裂,适配体脱离,TAMRA 才会 发射荧光。2019年, Zheng 等又构筑了一种对乏氧 和 VEGF(血管内皮生长因子) mRNA 响应的 AMOF (偶氮还原酶响应型金属-有机框架)基纳米荧光探 针^[34]。乏氧使得偶氮键断裂, AMOF 结构破坏, 内 部的 MB(分子信标)得以释放。而后 VEGF mRNA 与 MB 配对破坏了 MB 的茎环构造, MB 上的生色团 给体 TAMRA 和受体 Cv5 分离, 原本存在的 FRET 被抑制,荧光发射恢复。此外,Tan 等合成了连接有 PEG₅₀₀₀-Azo-NHS(NHS=N-羟基琥珀酰亚胺酯)和染 料分子 Cy5/FAM 的适配体^[35]。乏氧环境导致适配 体与外部包裹的 PEG 断开,从而实现受体识别和原 位荧光发射。以上四个工作均构筑了乏氧与生物大 分子双特异性探针,实现了乏氧条件下生物大分子 的识别成像,解决了乏氧导致的检测失效的问题,有 望应用于癌症的诊断和靶向治疗。

2.1.2 基于非 FRET 机制的探针

2013年,Hanaoka 等^[36]针对 QCys 系列探针的缺陷(只能 1% 以下氧浓度响应,猝灭剂 BHQ-3 无化学改性空间等),探索出了一条偶氮基探针的新道路。他们不再采用 BHQ 和 FRET 机制,而是直接将偶氮键与荧光团共价连接,利用偶氮键的光化学性质——围绕 N — W键的快速构象改变导致激发态能量迅速

消散,实现荧光猝灭。在没有 BHQ 的情况下,将荧光 团 2Me RG(2-甲基罗丹明绿)和 2Me SiR600(2-甲基 罗丹明 600)分别与偶氮键共价连接,得到 MAR(单偶 氮罗丹明)和 MASR(单偶氮硅罗丹明)探针(图 4a)。 光激发后,偶氮苯部分的超快速顺反异构变换使探针 几乎不显示荧光,这已通过量子化学计算进行了验 证。在乏氧条件下,AzoR 的参与使得偶氮键断 裂^[37],荧光团释放从而恢复荧光。在含有多种还原 酶的大鼠肝微粒体中检查乏氧反应性,MAR 和 MASR 表现出清晰的荧光恢复,开关比分别为 630 和 20 倍。 随后的体外实验进一步验证了探针对乏氧的反应性 (图 4b)。MAR 探针将乏氧阈值提高到了 5%,其简 单的化学结构更易化学改性,可以应用于一系列不同 氧浓度的乏氧检测与成像。



图 4 (a) MAR 和 MASR 探针的化学结构及检测机理 (b) MAR 和 MASR 在 A549 活体细胞(人上皮肺癌细胞)中的荧光显微图像^[36]

Fig. 4 (a) Structures and detection mechanism of fluorescent probes MAR and MASR. (b) Fluorescence confocal microscopy images of MAR or MASR in live A549 cells^[36]. Copyright 2013, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

2015年, Renard 等基于磺基罗丹明开发了一种 远红发射荧光探针 SR101-NaphtNH₂-Hyp-diMe^[38]。 通过衍生自磺基罗丹明 101 支架(SR101-NaphtNH₂)的荧光伯芳基胺与叔苯胺之间的简单偶 氮偶联反应制备得到该水溶性荧光探针。偶氮基团 直接连接到罗丹明荧光团的共轭体系上,阻断了荧 光团的荧光发射。其荧光猝灭主要基于两个过程: 氧杂蒽基被锁定在非共轭的螺内酯形式;光激发后 偶氮键 *E*/*Z* 异构的快速翻转。在乏氧条件下,探针 通过偶氮键的生物还原裂解来再生原始磺基罗丹明 SR101-NaphtNH₂,从而恢复强远红荧光(峰值在 625 nm 处),荧光开关比达到 94。使用 A549 细胞进行 体外成像测试,探针荧光强度变化显著。与同样发 射远红荧光的 MASR 探针相比,SR101-NaphtNH₂-Hyp-diMe 的合成方法更简单,其结构也更易修饰, 有较大的改造和应用空间。

2017年,Cui等合成了一种具有高选择性和长 波长的 NIR 荧光探针 AZO-DCM (Azo = 偶氮 基)^[39],可用于生物还原酶(在肿瘤细胞中过表达的 CyP450)和乏氧检测。偶氮键作为猝灭剂和乏氧响 应元件与稳定荧光团二氰基亚甲基-4H-吡喃染料 (DCM)共轭连接组成探针。探针表现出很强的抗 干扰能力,不会受生物硫醇、无机盐(包括亚硫酸 盐)和氨基酸等多种物质的干扰。使用 CyP450 和 NADH(还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)处理后,偶 氮键断裂,DCM 释放并发出荧光,强度增加了 150 倍以上,表现出对 CyP450 和乏氧环境良好的选择 性和敏感性。与 A549 细胞共同培养的显微图像表 明,AZO-DCM 的荧光强度随着氧气浓度的降低而增 强,细胞成像能力良好。

偶氮苯不只是荧光猝灭剂,也是氮芥类的灭活剂,可用于设计诊疗结合的乏氧响应探针。2017年, Kim 等将罗丹明类染料与靶向基团共价连接,而后通 过偶氮键与氮芥类药物相连,得到一种线粒体靶向荧 光探针^[40]。在乏氧细胞中,偶氮键断裂,荧光恢复且 药物作用于线粒体导致细胞凋亡。在细胞、组织和动 物层面的实验结果表明,探针有着良好的选择性、靶 向性和活化能力。未来,偶氮苯衍生物探针或许可以 用于治疗诊断学药物释放系统的建造。

2018年,Li等使用染料 IR-780设计了一种组 合探针^[41],分别是偶氮苯衍生物探针 AXNN 和硝基 探针 AXNO₂。探针对 NTR+CyP450 组合酶表现出 高特异性,且可以通过荧光信号区分 HepG2(人肝 癌细胞)和 4T1(乳腺癌细胞),其安全性、体内分 布、累积和代谢情况均表现良好。组合探针在多种 指标的表现上优于单一探针,未来或许能在癌症诊 断方面发挥出巨大的潜力。

2.2 AIE 分子-偶氮苯衍生物探针 聚集诱导发光(AIE)是一种光物理现象,最早





是由唐本忠等于 2001 年提出的^[42]。与常规荧光团 的聚集荧光猝灭(ACQ)效应相反,AIE 分子在分散 状态下显示出弱荧光,在聚集状态下发出强荧 光^[42,43]。这种独特现象引起了众多科学研究者的 关注。在目前的探索中,AIE 分子的荧光覆盖了整 个可见光区域,在生物传感和光学设备中有着广泛 应用^[44,45]。由于其高荧光亮度、抗光漂白性以及能 长期细胞跟踪成像的特点,AIE 分子对于荧光成像 具有重要意义^[46]。近年来,基于偶氮、硝基和 N⁺-O⁻构筑的多种 AIE 分子已被用于设计乏氧响应性 荧光探针^[47,48]。

经典 AIE 单元 TPE(四苯乙烯)易于合成和修 饰,常被用于设计合成结构相对复杂的具有特定 功能的 AIE 衍生物^[49]。2018 年,He 等成功制备 了一种含 TPE 和偶氮苯的乏氧响应型聚合物(图 5)^[50]。通过水溶液中的偶氮偶联反应,制备得到 以 TPE-Azo 为核心、以生物相容性 PEG(聚乙二 醇)为壳的均匀纳米颗粒。由于 FRET 过程和偶氮 发色团的典型吸收,聚合物表现出极弱的荧光发 射。用酶 NQO 1(人类醌氧化还原酶)和辅酶 NADPH(还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸)处



图6 PEG-Azo-TPE 探针与 A549 细胞分别在乏氧 (1%)和常氧(20%)共同培养后的显微图像^[52]

Fig.6 Microscopy images of adherent A549 cells treated with PEG-Azo-TPE probes under normoxia($20\% O_2$) and hypoxia($1\% O_2$)^[52]. Copyright 2019, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

理后,由于偶氮键的减少和疏水性 TPE 的聚集, TPE 的荧光恢复很明显(图 5)。这项工作不但提 供了一种制备含偶氮苯的聚合物的新方法,而且 为研究人员基于 TPE 和偶氮苯构筑乏氧响应纳米 探针提供了启发。

2019年, Zhou 等报道了一种新型乏氧响应 AIE 探针 PCL-TPE-Azo-PEG(PCL = 聚己内 酯)^[51]。TPE-Azo 作为中间部分分别与亲水性 PEG 链和疏水性 PCL 链连接,组成两亲嵌段共聚 物。由于偶氮基团对 TPE 的荧光具有猝灭作用, 聚合物在磷酸盐缓冲溶液中自组装成不发荧光的 棒状胶束。用连二亚硫酸钠或 AzoR 处理后,偶氮 键还原断裂,组装体碎裂为 PEG 和 PCL 链段。疏 水链段 PCL-TPE 的荧光恢复并表现出 AIE 效应, 引起 500 nm 波长附近的荧光强度显著增加。这 意味着该探针在肿瘤乏氧条件下的生物传感和成 像方面有潜在的应用价值。

研究证明,将亲水性 PEG 链和疏水性偶氮苯 部分通过偶氮偶联反应同时引入到一个小分子 中,是一种合成两亲性二嵌段共聚物的有效方法。 基于以上策略,He 等成功构筑了可用于细胞成像 的两亲性 PEG-Azo-TPE 乏氧响应 AIE 探针^[52]。 由于具有两亲结构,该探针可在水溶液中形成胶 束,产生稳定的可激活 AIE 位点,FRET 和偶氮的 存在使得偶氮苯笼中的 AIE 荧光团的荧光猝灭。 用 365 nm 的光激发和 AzoR 处理后,偶氮键被还 原,TPE 的荧光得以恢复,荧光开关比为 25。与 A549 细胞分别在乏氧和常氧条件下共同培养后的

·335·

显微镜图像(图 6)表明该探针对肿瘤乏氧微环境 响应良好。此外,由于 AIE 聚合物的双光子吸收 截面,除了紫外光,探针还可以用 760 nm 光激发, 可用于双光子成像。而且激发波长在 NIR 区域, 提供了深组织成像的可能性。

3 基于非共价键构筑的偶氮苯衍生物探针

超分子化学是一门主要研究非共价相互作用以 及通过非共价键缔结的具有特定结构和功能的超分 子组装体的新兴化学。这一概念由法国化学家 Jean-Marie Lehn 在 1978 年首次提出^[53]。常见的非 共价相互作用包括:氢键、静电相互作用、π-π 堆积、 疏水性效应、范德华力等^[54~56]。超分子组装体不是 简单的分子叠加,它具有超出主客体分子的功能,可 用于药物负载、染料吸附、相转移催化等领域^[57,58]。 超分子化学为材料、生物、医药等诸多领域提供了非 共价构筑体系的新思路^[59,60]。近年来,偶氮苯衍生 物因其光异构特性及可与大环主体形成稳定包合物 的性质,被广泛用于构筑超分子组装体,应用于诸多 领域^[61]。

目前,文献报道的乏氧响应荧光探针大都是偶 氮基与染料分子共价连接,然后通过共价键的断裂 实现荧光恢复(图 7a)。这种构筑方式有着不可忽 略的缺点,例如复杂的分子设计,耗时耗费的合成过 程,共价连接引起的活性改变,引入外源性基团带来 的潜在毒性等。而超分子化学能够提供一种更易实 施的非共价构筑方法:利用偶氮基大环主体分子与 染料分子之间的主客体相互作用,建立偶氮基与染 料分子的非共价连接,构筑超分子组装体探针。要 实现以上非共价策略,需要找到合适的主客体分子。 偶氮苯衍生物大环主体应具备以下条件:(1)能与 染料客体建立紧密连接;(2)正常环境中实现最大 程度的荧光猝灭,以达到较小的成像背景;(3)有良 好的乏氧响应性,乏氧条件下能释放染料分子,恢复 荧光^[62]。

Guo 等报道了一种用于乏氧细胞成像的超分子 组装体探针 CAC4A-Rho123^[62]。为了满足上述主体 条件,他们合成了一种羧基修饰的偶氮杯芳烃 CAC4A,将染料分子 Rho123(罗丹明 123)包结在 CAC4A 空腔中(图 7b)。CAC4A 与 Rho123 之间的 紧密结合来自于几种非共价相互作用的协同,分别 是 N—H···O 和 C—H···O 氢键、富电子 CAC4A 与缺 电子 Rho123 的静电力和两分子之间的 π-π 堆积。 不同于大多数共价连接的偶氮衍生物探针,CAC4A- Rho123 的荧光猝灭为 PET 机制:光激发后,电子从 供体 CAC4A 转移到受体 Rho123,导致 Rho123 的荧 光强度大大减弱。用还原剂连二亚硫酸钠处理后, 四个偶氮键全部还原断裂,染料分子被释放出来并 恢复荧光,荧光增强 8 倍。将探针分别置于含有各 种生物学物种(三磷酸腺苷、金属离子、氨基酸、葡 萄糖、尿素、肌酐和牛血清白蛋白)的环境中,发现 荧光强度没有明显变化,证明该超分子组合体可以 在复杂的生物学环境中稳定存在。使用 A549 细胞 进行常氧(20% O₂)和乏氧(低于 0.1% O₂)条件下 的荧光检测,常氧下探针的荧光几乎不可见,乏氧时



图 7 (a) 基于共价键构筑的传统乏氧响应探针;(b) CAC4A-Rho123 荧光探针的乏氧检测机理;(c) A549 细 胞与 CAC4A-Rho123 探针分别在乏氧(0.1% 以下)和常 氧(20%)共同培养 8 h 后的显微图像^[62]

Fig. 7 (a) Schematic illustration of the conventional covalent hypoxia-responsive probes. (b) Hypoxia detection mechanism of fluorescent probe CAC4A-Rho123. (c) Confocal laser scanning microscopy images of A549 cells incubated with CAC4A-Rho123 under hypoxic (less than 0.1% O_2) or normoxic (20% O_2) conditions for 8 h^[62]. Copyright 2019, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

荧光显著增强(图 7c)。CAC4A-Rho123 探针首次 实现非共价策略构筑偶氮衍生物探针,不仅为构筑 乏氧荧光成像探针开辟了一条新道路,还因其非共 价的连接方式和易修饰的大环主体,为药物负载和 癌症治疗提供了新思路。

Tang 等^[63]报道了一种用于抗癌药物负载的乏 氧响应型纳米凝胶。利用 PLG-g-mPEG/Azo 和 PLG-g-mPEG/β-CD(PLG-g-mPEG =(L-谷氨酸)-接 枝-聚(乙二醇)甲基醚, β-CD = β-环糊精)之间的 主客体相互作用制备得到纳米凝胶,负载抗癌药物 RNase(核糖核酸酶 A)。Azo 被包结在 β-CD 中形 成交联点,使用 NTR 和 NADPH 处理后,偶氮键的 断裂导致交联点被破坏, RNase 得以释放。体外释 放实验中,纳米凝胶在乏氧条件下 72 h 内释放了 75.0%的 RNase, 而在常氧条件下仅释放了 19.7%, 证明此纳米凝胶能够实现乏氧刺激下释放药物。这 表明,Guo 等构筑的乏氧响应型偶氮基超分子组装 体探针并非个例,利用主客体相互作用构筑此类超 分子组装体是一种可行的方法。由于没有复杂的合 成,能实现高保真度的释放,搭建了一个易修饰的通 用平台,这一非共价构筑策略在乏氧成像、抗癌药物 负载方面有潜在的应用空间。

要负载药物或染料分子,除了包结在大环主体中,还可以封装在囊泡或胶束里。2016年,Mallik等合成了一种二嵌段共聚物PLA₈₀-(AZB)-PEG₄₇(PLA = 聚乳酸),可以在水介质中自组装形成囊泡,封装羧基荧光素^[64]。乏氧条件下,囊泡因偶氮键的断裂而解体,50min释放了90%的染料分子,荧光强度大大增加(图8)。囊泡的荧光猝灭来自于染料分子的ACQ(聚集荧光猝灭)现象,其背景荧光强度比传统探针高,但为乏氧响应型囊泡提供了一个范例。



图8 乏氧条件下囊泡释放染料/药物示意图^[64]

Fig. 8 Schematic illustration of polymersomes releasing dyes/drugs under hypoxia^[64]. Copyright 2016, American Chemical Society

2019年,Zheng等开发了一种用于线粒体自噬的乏氧成像荧光探针 MCM@TATp^[65]。含有偶氮苯基团的两亲聚合物自组装形成胶束,封装 Mito-rHP

(一种对线粒体有靶向性、对 pH 敏感的罗丹明衍生物)。乏氧条件下,偶氮键断裂,Mito-rHP 得以释放并进入线粒体中,线粒体自噬造成的酸性环境导致荧光发射。MCM@TATp 的成功构筑表明,以胶束负载染料用于乏氧成像是一种可行的方法。

2020年,He 等另辟蹊径,开发了一种原位自组装 AIE 探针^[66]。探针包括以氨基甲酸酯连接的 Azo 共聚物 WS-AC 和磺酸基修饰的带有负电的 AIE 分子 AWS-TPE。两部分在水溶液中的溶解度很高,



图 9 水溶液中活化 AIE 聚合物自组装的过程^[66] Fig.9 Fabrication of activatable polymeric AIE aggregates via selfassembly in an aqueous solution^[66]. Copyright 2020, The Royal Society of Chemistry

可深入渗透到深层组织中,同时分散状态下的 AWS-TPE荧光发射微弱。在乏氧条件下,WS-AC 的偶氮键断裂,氨基甲酸酯发生1,6自消去级联反 应,得到带正电的质子化伯胺。在静电相互作用下 WS-AC 与 AWS-TPE 自组装成纳米颗粒,AWS-TPE 被封装其中,分子聚集使得荧光强度显著增强(图 9)。使用宫颈癌多细胞球体进行的体外实验,证明 了原位自组装探针的可行性。这种原位自组装的方 式有望同时实现探针在肿瘤部位的高渗透性和较长 的滞留时间。

4 结论与展望

偶氮苯衍生物探针因其良好的灵敏度、特异性 等优势,近年来得到了广泛开发,被用于乏氧细胞成 像,有助于实现癌症的早期诊断。偶氮键既能对乏 氧响应而断裂还原,又能对邻近荧光团的荧光强度 产生影响,这是开发偶氮苯衍生物探针的基础和灵 感来源。本文着眼于以偶氮键作为乏氧响应开关的 偶氮苯衍生物探针,按照不同的构筑策略对探针进 行了分类和详细介绍,并探究它们的作用机理和在 乏氧细胞成像中的应用能力。

偶氮苯衍生物探针的构筑策略主要分为两种: 第一种是偶氮苯基团与强荧光发色团共价连接,在 乏氧条件下偶氮键断裂,荧光团恢复荧光发射从而 实现成像,是目前大多数乏氧细胞成像探针的构筑 方法;第二种是通过非共价的方式构筑超分子组装 体,乏氧条件下偶氮键断裂,组装体解体,染料分子 释放,荧光得以恢复。通过共价键构筑乏氧细胞成 像探针已经得到了长足的发展,在乏氧成像上更加 成熟、灵敏;非共价键构筑策略具有合成简单、安全 的优点,且可使用不同的染料分子,具有很大的发展 潜力。

然而,目前已经报道的偶氮苯衍生物探针还仅 仅停留在实验室体外和体内成像测试阶段,尚未有 探针达到临床标准。一方面,要进入临床阶段,探针 的各种性质如毒性、光稳定性、生物相容性、生物降 解性、组织分布情况、药代动力学行为等都需要进行 严格深入的测试。另一方面,探针在成像性能方面 还存在着缺陷,还需要进一步的改造。大多数探针 的荧光发射波长在短波区,不仅容易对细胞组织造 成损伤,且无法进行深层组织成像,故而开发 NIR 区域荧光成像的探针十分必要。另外,探针的荧光 发射强度和组织的氧气浓度未能建立线性关系,只 能定性判断组织乏氧和粗略展现乏氧程度,无法定 量描述乏氧情况。因此,优化探针性能、发掘探针的 多样性对偶氮苯衍生物探针的临床应用与未来发展 至关重要。

作为一个刚满十年的新领域,用于乏氧细胞成像的偶氮苯衍生物探针有着巨大的发展空间。新的 AIE发光和非共价构筑策略的出现,不仅优化了性能并简化了合成,还拓宽了该领域的发展方向。而 乏氧响应的分子识别、光疗化疗、药物递送^[67~76]等 也在不断发展,乏氧成像与之结合的复合型探针为 创造新式癌症诊疗手段和发展协同疗法提供了灵 感。开发偶氮苯衍生物乏氧成像探针对于癌症的监 测与诊断具有重大意义,值得我们进行更深入的 研究。

参考文献

- Gilkes D M, Semenza G L, Wirtz D. Nat. Rev. Cancer, 2014, 14
 (6): 430.
- [2] Vaupel P. Oncol., 2008, 13(S3): 21.
- [3] Valastyan S, Weinberg R A. Cell, 2011, 147(2): 275.
- [4] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel R L, Torre L A, Jemal A. CA: A Cancer J. Clin., 2018, 68(6): 394.
- [5] Torre L A, Bray F, Siegel R L, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. CA: A Cancer J. Clin., 2015, 65(2): 87.
- [6] Bach P B, Cramer L D, Warren J L, Begg C B. N Engl J. Med.,
 1999, 341(16): 1198.
- [7] Zhang Z, Bast R C, Yu Y H, Li J N, Sokoll L J, Rai A J, Rosenzweig J M, Cameron B, Wang Y Y, Meng X Y, Berchuck A, van Haaften-Day C, Hacker N F, de Bruijn H W A, van der Zee A G J, Jacobs I J, Fung E T, Chan D W. *Cancer Res.*, 2004, 64(16): 5882.
- [8] Brown J M, Wilson W R. Nat. Rev. Cancer, 2004, 4(6): 437.
- [9] Muller M, Padberg W, Schindler E, Sticher J, Osmer C, Friemann S, Hempelmann G. Anesth. Analg., 1998, 87(2): 474.
- [10] Cervós-Navarro J, Diemer N H. Crit. Rev. Neurobiol., 1991, 6: 149.
- [11] Vaupel P, Schlenger K, Knoop C, Hçckel M. Cancer Res., 1991, 51: 3316.
- [12] Parks S K, Cormerais Y, Pouysségur J. J. Physiol., 2017, 595
 (8): 2439.
- [13] Schito L, Semenza G L. Trends Cancer, 2016, 2(12): 758.
- [14] Eltzschig H K, Carmeliet P. N Engl J. Med., 2011, 364(7): 656.
- [15] Minn H, Gronroos T, Komar G, Eskola O, Lehtio K, Tuomela J, Seppanen M, Solin O. Curr. Pharm. Des., 2008, 14(28): 2932.
- [16] Jubb A M, Buffa F M, Harris A L. J. Cell. Mol. Med., 2010, 14

(1/2): 18.

- [17] Rajendran J G, Hendrickson K R G, Spence A M, Muzi M, Krohn K A, Mankoff D A. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging, 2006, 33(S1): 44.
- [18] Chan J, Dodani S C, Chang C J. Nat. Chem., 2012, 4(12): 973.
- [19] Zipfel W R, Williams R M, Webb W W. Nat. Biotechnol., 2003, 21(11): 1369.
- [20] Stephens D J. Science, 2003, 300(5616): 82.
- [21] Liu J N, Bu W B, Shi J L. Chem. Rev., 2017, 117(9): 6160.
- [22] Cui L, Zhong Y, Zhu W P, Xu Y F, Du Q S, Wang X, Qian X
 H, Xiao Y. Org. Lett., 2011, 13(5): 928.
- [23] Guo T, Cui L, Shen J N, Zhu W P, Xu Y F, Qian X H. Chem. Commun., 2013, 49(92): 10820.
- [24] Li Z, He X, Wang Z, Yang R, Shi W, Ma H. Biosens. Bioelectron., 2015, 63; 112.
- [25] Zhang J, Liu H W, Hu X X, Li J, Liang L H, Zhang X B, Tan W H. Anal. Chem., 2015, 87(23): 11832.
- [26] Zhou J, Shi W, Li L H, Gong Q Y, Wu X F, Li X H, Ma H M. Chem. Asian J., 2016, 11(19): 2719.
- [27] Zhang P Y, Huang H Y, Chen Y, Wang J Q, Ji L N, Chao H. Biomaterials, 2015, 53: 522.
- [28] Komatsu H, Shindo Y, Oka K, Hill J P, Ariga K. Angew. Chem. Int. Ed., 2014, 53(15): 3993.
- [29] Zbaida S, Levine W G. Chem. Res. Toxicol., 1991, 4(1): 82.
- [30] Kiyose K, Hanaoka K, Oushiki D, Nakamura T, Kajimura M, Suematsu M, Nishimatsu H, Yamane T, Terai T, Hirata Y, Nagano T. J. Am. Chem. Soc., 2010, 132(45): 15846.
- [31] Cai Q, Yu T, Zhu W P, Xu Y F, Qian X H. Chem. Commun., 2015, 51(79): 14739.
- [32] Ti Y Z, Yu L, Tang Y, Jin T X, Yang M, Wang R, Xu Y F, Zhu W P. Sensor Actuat. B: Chem., 2018, 265: 582.
- [33] Tang J R, Huang C X, Shu J Y, Zheng J, Ma D D, Li J S, Yang R H. Anal. Chem., 2018, 90(9): 5865.
- [34] Liu N, Zou Z, Liu J, Zhu C, Zheng J, Yang R H. Anal., 2019, 144(21): 6254.
- [35] Zhou F, Fu T, Huang Q, Kuai H L, Mo L T, Liu H L, Wang Q Q, Peng Y B, Han D M, Zhao Z L, Fang X H, Tan W H. J. Am. Chem. Soc., 2019, 141(46): 18421.
- [36] Piao W, Nagano T, Hanaoka K. Angew. Chem. Int. Ed., 2013, 52: 13028.
- [37] Shin N, Hanaoka K, Piao W, Miyakawa T, Fujisawa T, Takeuchi S, Takahashi S, Komatsu T, Ueno T, Terai T, Tahara T, Tanokura M, Nagano T, Urano Y. ACS Chem. Biol., 2017, 12(2): 558.
- [38] Chevalier A, Piao W, Hanaoka K, Nagano T, Renard P Y, Romieu A. Methods Appl. Fluoresc., 2015, 3(4): 044004.
- [39] Cui L, Shi Y P, Zhang S P, Yan L L, Zhang H, Tian Z R, Gu Y Y, Guo T, Huang J H. Dye. Pigment., 2017, 139: 587.
- [40] Verwilst P, Han J Y, Lee J, Mun S, Kang H G, Kim J S.

化学进展, 2021, 33(3): 331~340

Biomaterials, 2017, 115: 104.

- [41] Tian X W, Li Z, Sun Y, Wang P, Ma H M. Anal. Chem., 2018, 90(22): 13759.
- [42] Luo J D, Xie Z L, Lam J W Y, Cheng L, Tang B Z, Chen H Y, Qiu C F, Kwok H S, Zhan X W, Liu Y Q, Zhu D B. Chem. Commun., 2001, (18): 1740.
- [43] Hong Y N, Lam J W Y, Tang B Z. Chem. Commun., 2009, (29): 4332.
- [44] Li K T, Lin Y J, Lu C. Chem. Asian J., 2019, 14(6): 715.
- [45] Zhan R Y, Pan Y T, Manghnani P N, Liu B. Macromol. Biosci., 2017, 17(5): 1600433.
- [46] Feng G X, Liu B. Acc. Chem. Res., 2018, 51(6): 1404.
- [47] Xu G P, Tang Y H, Ma Y Y, Xu A, Lin W Y. Spectrochimica Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc., 2018, 188: 197.
- [48] Xu C H, Zou H, Zhao Z, Zhang P F, Kwok R T K, Lam J W Y, Sung H H Y, Williams I D, Tang B Z. Adv. Funct. Mater., 2019, 29(34): 1903278.
- [49] Yang B, Zhang X Y, Zhang X Q, Huang Z F, Wei Y, Tao L. Mater. Today, 2016, 19(5): 284.
- [50] Li S, Wang J L, Shen J J, Wu B, He Y N. ACS Macro Lett., 2018, 7(4): 437.
- [51] Yuan X J, Wang Z, Li L S, Yu J W, Wang Y Q, Li H K, Zhang J D, Zhang Z B, Zhou N C, Zhu X L. Mater. Chem. Front., 2019, 3(6): 1097.
- [52] Xue T H, Jia X Q, Wang J L, Xiang J Y, Wang W, Du J J, He Y N. Chem. Eur. J., 2019, 25(41): 9634.
- [53] Lehn J M. Pure Appl. Chem., **1978**, 50(9/10): 871.
- [54] Ma J C, Dougherty D A. Chem. Rev., 1997, 97(5): 1303.
- [55] Smithrud D B, Sanford E M, Chao I, Ferguson S B, Carcanague D R, Evanseck J D, Houk K N, Diederich F. Pure Appl. Chem., 1990, 62(12): 2227.
- [56] Hancock R D. J. Chem. Educ., 1992, 69(8): 615.
- [57] Tian R, Wang H M, Niu R F, Ding D. J. Colloid Interface Sci., 2015, 453: 15.
- [58] Chen X M, Zhang Y M, Liu Y. Supramol. Chem., 2016, 28(9/10): 817.
- [59] Vögtle F. Supramoleculare Chemie. Teubner, Stuttgart, 1991.
- [60] Lehn J M. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1988, 27(1): 89.
- [61] Liu Y H, Liu Y. Progress in Chemistry, 2019, 31(11): 1528.
 (刘耀华, 刘育. 化学进展, 2019, 31(11): 1528.).
- [62] Geng W C, Jia S R, Zheng Z, Li Z H, Ding D, Guo D S. Angew. Chem. Int. Ed., 2019, 58(8): 2377.
- [63] Si X H, Ma S, Xu Y D, Zhang D W, Shen N, Yu H Y, Zhang Y, Song W T, Tang Z H, Chen X S. J. Control. Release, 2020, 320: 83.
- [64] Kulkarni P, Haldar M K, You S, Choi Y, Mallik S. Biomacromolecules, 2016, 17(8): 2507.
- [65] Ma D D, Huang C X, Zheng J, Zhou W, Tang J R, Chen W J, Li J S, Yang R H. Anal. Chem., 2019, 91(2): 1360.
- [66] Xue T H, Shao K C, Xiang J Y, Pan X Y, Zhu Z X, He Y N.

Review

Nanoscale, 2020, 12(14): 7509.

- [67] Wang W L, Lin L, Ma X J, Wang B, Liu S R, Yan X X, Li S R, Tian H Y, Yu X F. ACS Appl. Mater. Interfaces, 2018, 10 (23): 19398.
- [68] Zhang X L, Wu M, Li J, Lan S Y, Zeng Y Y, Liu X L, Liu J
 F. ACS Appl. Mater. Interfaces, 2018, 10: 21909.
- [69] Yan Q, Guo X L, Huang X L, Meng X, Liu F, Dai P P, Wang Z, Zhao Y J. ACS Appl. Mater. Interfaces, 2019, 11 (27): 24377.
- [70] Yang G B, Phua S Z F, Lim W Q, Zhang R, Feng L Z, Liu G
 F, Wu H W, Bindra A K, Jana D, Liu Z, Zhao Y L. Adv.
 Mater., 2019, 31(25): 1901513.
- [71] Xu Z T, Pan C, Yuan W Z. Biomater. Sci., 2020, 8: 3348.

- [72] Ihsanullah K M, Kumar B N, Zhao Y Y, Muhammad H, Liu Y, Wang L, Liu H, Jiang W. *Biomaterials*, **2020**, 245: 119982.
- [73] Lee J, Oh E T, Yoon H, Woo Kim C, Han Y J, Song J, Jang H, Joo Park H, Kim C. Nanoscale, 2017, 9(20): 6901.
- Li J J, Meng X, Deng J, Lu D, Zhang X, Chen Y R, Zhu J D,
 Fan A P, Ding D, Kong D L, Wang Z, Zhao Y J. ACS Appl.
 Mater. Interfaces, 2018, 10(20): 17117.
- [75] Li S Y, Jiang X Y, Zheng R R, Zuo S J, Zhao L P, Fan G L, Fan J H, Liao Y H, Yu X Y, Cheng H. Chem. Commun., 2018, 54(57): 7983.
- [76] Huang C X, Tan W L, Zheng J, Zhu C, Huo J, Yang R H. ACS Appl. Mater. Interfaces, 2019, 11(29): 25740.