

文章编号:2095-0411(2017)02-0034-07

## 方酸菁染料在生物检测中的研究进展

周晓鹰<sup>1,2</sup>, 王晶晶<sup>2</sup>, 刘晓骞<sup>2</sup>

(1. 英国南安普顿大学 医学院, 南安普顿 SO16 6YD; 2. 常州大学 制药与生命科学学院, 江苏 常州 213164)

**摘要:**方酸菁是一种新型的近红外有机染料,由于其特殊的 D-A-D 结构,在可见-近红外区域有强烈的吸收和荧光发射,因而越来越多地被应用在生物检测中。综述了近年来方酸菁染料在生物检测技术中的发展和应用,也介绍了方酸菁探针的荧光成像技术在蛋白质标记和肿瘤标记与诊断中的应用,并展望了该领域的发展前景。

**关键词:**方酸菁染料;荧光成像;生物检测;医学诊断

中图分类号:R 943

文献标志码:A

doi:10.3969/j.issn.2095-0411.2017.02.007

## Research Progress on Squaraine Dyes in Bioassay Technology

ZHOU Xiaoying<sup>1,2</sup>, WANG Jingjing<sup>2</sup>, LIU Xiaoqian<sup>2</sup>

(1. The School of Medicine, University of Southampton, Southampton, SO16 6YD, UK; 2. School of Pharmaceutical Engineering and Life Science, Changzhou University, Changzhou 213164, China)

**Abstract:** Squarylium is a new near-infrared organic dye. Due to its special structure Donor-Acceptor-Donor, squaraine dyes in the visible-near infrared region have a strong absorption and fluorescence emission, which have been used increasingly in biological fluorescence imaging. This article discussed the development and application of squaraine dyes in biological fluorescence imaging. The squarylium probe fluorescence imaging as markers in protein and tumor was also introduced, as well as diagnosis drugs in tumor. Moreover, the further development prospect in this field is prospected.

**Key words:** squaraine dye; fluorescence imaging; bioassay; medical diagnostics

近红外(Near-infrared)染料光学成像技术已被广泛地应用于基本生物学和临床前诊断,但是具有好的生物相容性、低毒或无毒性和高荧光效率<sup>[1]</sup>的近红外荧光染料一直是近红外荧光成像研究的热点和难点。近红外区域生物体的一些组分的吸收和散射较低(如血红蛋白,细胞色素,黑色素,水,固有组织发色团),红外和近红外的荧光更容易透过生物组织,避开生物自荧光的干扰<sup>[2-3]</sup>。方酸菁染料在 20 世纪 90 年代开始被广泛地研究,包括它的合成和物理,化学的机制。一般情况下,它的吸收和发射波长在可见和近红外区域内,在荧光成像中,他们的波谱范围在生物基质自吸收和自荧光之外。由于其独特的 D- $\pi$ -A- $\pi$ -D 共轭结构,它在可见光和近红外区(NIR)有高的光吸收( $>10^5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )<sup>[4]</sup>,尖锐和敏感的荧光<sup>[5]</sup>和高量子点<sup>[6]</sup>,通常被应用于生物成像和生物标记<sup>[7-10]</sup>,pH 敏感探头<sup>[11]</sup>,金属离子探针<sup>[12]</sup>。

### 1 方酸菁染料的结构

它由一个缺电子的中心四元环和两端的给电子基团组成,容易形成刚性平面的稳定两性离子共振结构,

收稿日期:2016-05-28。

基金项目:常州科技局国际合作研究基金资助(KYJ1520305)。

作者简介:周晓鹰(1957—),女,博士,英籍,英国南安普顿大学客座教授。

图 1 所示就是方酸菁染料的典型结构<sup>[13]</sup>。方酸染料有 4 个潜在的结合部位,即取代基引入到芳环上或杂环分子的 N 原子上和中心四元环上的 2 个氧原子。这些配位点属于  $\pi$  共轭体系的一部分,当一个氮原子配位后,紫外吸收发生蓝移,而与中心四元环上氧原子配位后,吸收波长向长波长移动。

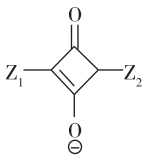


图 1 方酸菁染料的典型结构

方酸菁染料分为对称型方酸菁(部分结构见表 1)和不对称型方酸菁(部分结构见表 2)。 $Z_1 = Z_2$  为对称型的方酸菁染料,它的合成是一步反应,通常用正丁醇和甲苯以 1:1 的体积比例作溶剂,在碱催化下,由一倍当量的方酸和两倍当量的含富电子基团的物质,例如带有活性甲基的吡啶,取代吡啶的杂环季铵盐,酚类,吡咯和芳胺,在共沸回流条件下反应得到。对称型方酸菁的溶解性相对较差。 $Z_1 \neq Z_2$  是不对称方酸菁染料,不对称方酸菁染料通过方酸与等量的不同富电子基团缩合而成。其主要合成路径有两种,一种是方酸与等量的含氮杂环鎓盐或者芳胺缩合,另一种是,首先由方酸与等摩尔当量的亲核试剂反应形成半方酸中间体,然后与另一等摩尔当量的不同结构的季胺盐反应得到不对称方酸菁染料。摩尔吸收的系数与方酸菁染料结构的共轭程度有关,共轭越大,摩尔吸收系数越小,最大吸收波长红移。

表 1 部分对称型方酸菁的结构式<sup>[14]</sup>

染料	Z	染料	Z	染料	Z
1		4		7	
2		5		8	
3		6		9	

表 2 部分不对称方酸菁的结构式<sup>[14]</sup>

染料	Z <sub>1</sub>	Z <sub>2</sub>	染料	Z <sub>1</sub>	Z <sub>2</sub>
1			4		
2			5		
3			6		

2 方酸菁染料在生物检测中的应用研究

2.1 方酸菁染料在蛋白质标记成像中的应用

分子成像方法已迅速成为生物学研究、药物开发和临床诊断的有力工具。其中荧光成像方法具有灵敏度、选择性和易用性,并且可以用于可视化目标生物分子。然而,对于在体内的组织或细胞成像,荧光染料的吸收和发射最大值在近红外(NIR)650~900nm 区域是优选的,因为该波长区域生物分子干扰最小<sup>[15]</sup>,自发

荧光低<sup>[16]</sup>,并且良好的组织穿透力<sup>[17]</sup>,对细胞具有低光毒性。

Oswald 等人<sup>[18]</sup>合成的方酸菁染料与牛血清白蛋白结合后,最大吸收波长由原来在水中的 635nm 红移到 645nm。荧光强度增加了 2.5 倍。量子产率增加 0.4 左右,荧光寿命从 0.43ns 增加到 2.26ns,相比较而言,菁染料 Cy5 与蛋白质结合后,量子产率降低,荧光周期仅增加 0.31ns。方酸菁染料明显的降低了血液中蛋白质的检测限和延长了染料的周期。

尽管方酸菁染料具有许多的光学优点,但是作为发色团应用到生物成像研究中还是较少。这是因为方酸菁染料在水溶液中荧光量子产率低,容易发生聚集,为了解决这个问题,介孔二氧化硅纳米粒子包装的方酸菁染料得到发展,起到保护方酸菁染料和抑制聚集的作用。Zhang 等人合成了噻唑方酸菁和吡啶方酸菁与牛血清白蛋白(BSA)非共价结合表现出荧光增强<sup>[19]</sup>。一旦加入牛血清白蛋白,荧光强度增加了约 10 倍,荧光寿命也延长了 10 倍。所得的 BSA-SQ 纳米粒表现出增强的近红外荧光,并减少了方酸菁部分的聚集。血清蛋白能够加速纳米粒子进入细胞。根据文献报告 BSA 纳米粒子被细胞吸收进入溶酶体,在 BSA-SQ 纳米粒子被用于细胞培养和生物成像研究中发现 HCT116 细胞与 BSA-SQ 纳米粒子共同孵育的时候,见图 2,在细胞的溶酶体部分显示出了大量的荧光颗粒,这为研究体内追踪蛋白质的近红外蛋白标记试剂提供了手段。

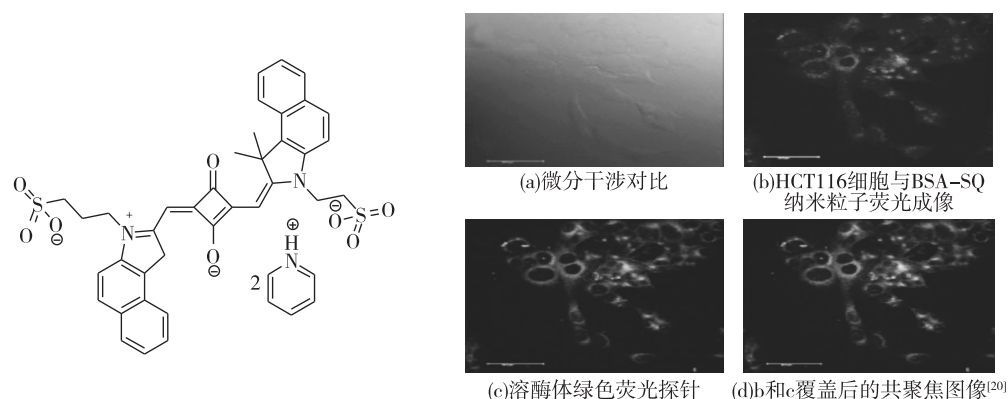


图 2 HCT116 细胞与 BSA-SQ 纳米粒子及 LysoSensor 绿荧光探针的共同孵育的共聚焦成像

对强亲核试剂化学性质稳定的方酸菁染料适用于监测配体受体的相互作用和用于跟踪受体被融入。Karpenko 等人合成的方酸菁染料 SQ-COOH 在非极性溶剂中的荧光强度是水中的 6~21 倍,然而菁染料虽然荧光强度很大,但受环境影响的荧光强度变化不大,方酸菁的荧光亮度可达  $157\,000\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ,达到了荧光亮度的最大限度。G 蛋白偶联受体,属于膜的催产素受体(ORT)。Karpenko 等人利用 OTR 肽配体卡贝缩宫素(CBT)设计合成了一种选择性识别方酸菁衍生的 G 蛋白偶联受体的探针 SQ-PEG-CBT。该探针在染料和肽之间引入极性的聚乙二醇-8,以提高探针的溶解度,并降低与血清蛋白和脂质膜的非特异性相互作用。对表达野生型 OTR 的 HEK293 细胞与 SQ-PEG-CBT 孵育 5min 后就能检测到在细胞膜上有明显的荧光,见图 3。荧光发射波长由 635nm 红移至 642nm,在 655nm 出的荧光强度比在缓冲溶液中的增加 4 倍。

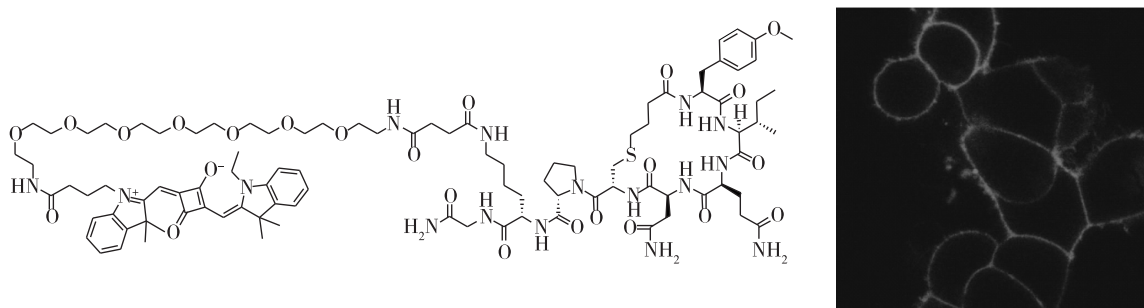


图 3 SQ-PEG-CBT 的结构和与 Hek293 细胞加入 SQ-PEG-CBT 后的共聚焦成像<sup>[21]</sup>

$\beta$ -半乳糖苷酶是在酶联免疫吸附测定法,原位杂交和基因表达测定法中最广泛使用的标记酶,通过方酸菁上的吡啶环上接有  $\beta$ -D 半乳糖的基团合成探针 6SqGal。将探针 6SqGal 应用到通过尾静脉注射靶向肝脏的  $\beta$ -D 半乳糖包埋的质粒中。24h 后,将小鼠麻醉,并做了一个中间腹部切口暴露肝脏。然后将小鼠静脉注射 6SqGal,如图 4 中所示,在 30min 内  $\beta$ -半乳糖苷酶表达的动物的肝脏中随着时间的变化荧光强度大大增加。

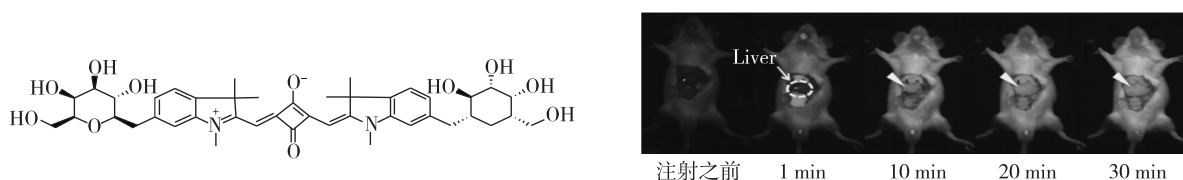


图 4 6SqGal 的结构和老鼠接种了 6SqGal 后肝脏内荧光强度的变化<sup>[22]</sup>

## 2.2 方酸菁染料在肿瘤标记诊断和治疗中的应用

在肿瘤病灶的荧光成像的检测中,可以将近红外荧光染料修饰到识别肿瘤细胞的特异性的受体的靶标分子上。当应用于肿瘤的诊断和治疗时,修饰过的近红外探针进入体内会靶向性的选择肿瘤所在的组织或者细胞。常见的靶向分子有抗体,叶酸和一些多肽分子等。凭借它的特异性,大大提高了荧光检测的灵敏度。

叶酸(FA)在数种癌症(包括乳腺癌,肺癌,子宫颈癌,卵巢癌,结肠直肠癌,肾癌,和鼻咽癌)中过度表达,然而在正常组织中表达很低,已经被证明可以用于核磁共振,核成像,和后期的临床试验中。Gao 等人将 FA 连接到方酸菁探针上面合成了 SQ-BSA-FA 化合物,靶向癌症细胞中过度表达的 FA 受体(FR),静脉注射到异种接种人口腔表皮样癌细胞(KB)的雌性 BALB/c 裸鼠内,4h 之后,SQ-BSA-FA 在肿瘤的和肿瘤的外周积累。6h 注射后才出现荧光信号减弱的情况,见图 5。因此 SQ-BSA-FA 用于最佳成像和光热治疗窗口的时间是 6 个 h,可以选择性结合人类癌症中过度表达的 FR。

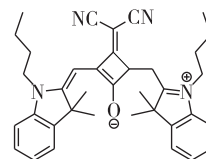


图 5 方酸菁(SQ)染料的结构式<sup>[23]</sup>

溶血磷脂酸(LPA)为早期卵巢癌的有效生物标志物<sup>[24-27]</sup>。LPA 是一种脂质介体,诱导细胞增殖,迁移和存活,广泛分布于癌细胞和组织中<sup>[28]</sup>。LPA 选择性探针的发展是早期临床诊断的关键。Yao 等人合成了一种靶向 LPA 的方酸菁的探针 G4RGDSq2,它是基于极性敏感的方酸菁染料,在水溶液中发生构象限制,分子内 4 个鸟嘌呤形成分子内氢键,导致荧光的淬灭,一旦与 LPA 结合后,结构展开,破坏了氢键,恢复近红外荧光。将探针注射到含有人卵巢癌细胞(SKOV-3)的异种移植的老鼠中,体内近红外荧光成像中显示在 0~24h 内 720nm 处探针逐渐累积到肿瘤部位,见图 6。这种“智能”生物探针对于未来肿瘤的诊断提供了巨大潜力。

如果能够在癌症的早期就可以检测出癌细胞,将是非常有利于治疗。然而能够从正常细胞中辨识出癌细胞并有选择地杀死癌细胞,仍然是目前科学技术发展的主要目标<sup>[29]</sup>。一些方酸菁染料已被证实可以作为 PDT (Photodynamic Therapy)的光敏剂<sup>[30]</sup>。PDT 是利用光动力效应进行疾病诊断和治疗的一种新技术。基本原理是在一个敏化剂的激发下产生毒性物质和活性氧的产生。其过程是,在特定波长的激发光的照射下使组织吸收的光敏剂受到激发,而光敏剂又把能量传递给周围的氧,生成活性很强的单态氧,单态氧和相邻的生物大分子发生氧化反应,产生细胞毒性作用,从而破坏细胞的正常功能并引起细胞死亡。方酸染料作为光敏剂有如下的优点<sup>[31]</sup>:①增加吸收的性质;②改良敏化剂三重激发态的量子产率和单线态氧的产生;③方酸菁染料可以表现出双光子吸收<sup>[32]</sup>;④方酸菁提高细胞药代动力学。方酸菁染料的光动力窗(600~850nm)具有强的吸收,使这些染料非常适合致敏剂。方酸在生物上面的应用的主要限制是亲核试剂攻击四圆环会使其方酸的光物理特性损失<sup>[33]</sup>。在水性环境中方酸染料的聚合也是一个严重的问题。这些问题



可以通过使用合适的基于载体的药物递送系统,其不仅提高了敏化剂的生物利用度,也提供了必要的保护。在 2008 年,方酸菁染料作为光敏剂被用在老鼠模型中用于治疗皮肤癌。Rekha 等人利用取代的方酸菁染料充当 PDT 一种新型的光敏剂<sup>[34]</sup>。雄性瑞士白化小鼠使用 7,12-二甲基苯并[a]蒽(DMBA)诱导皮肤癌,PDT 治疗后的 2 周内小鼠显示肿瘤体积明显减少,见图 7。

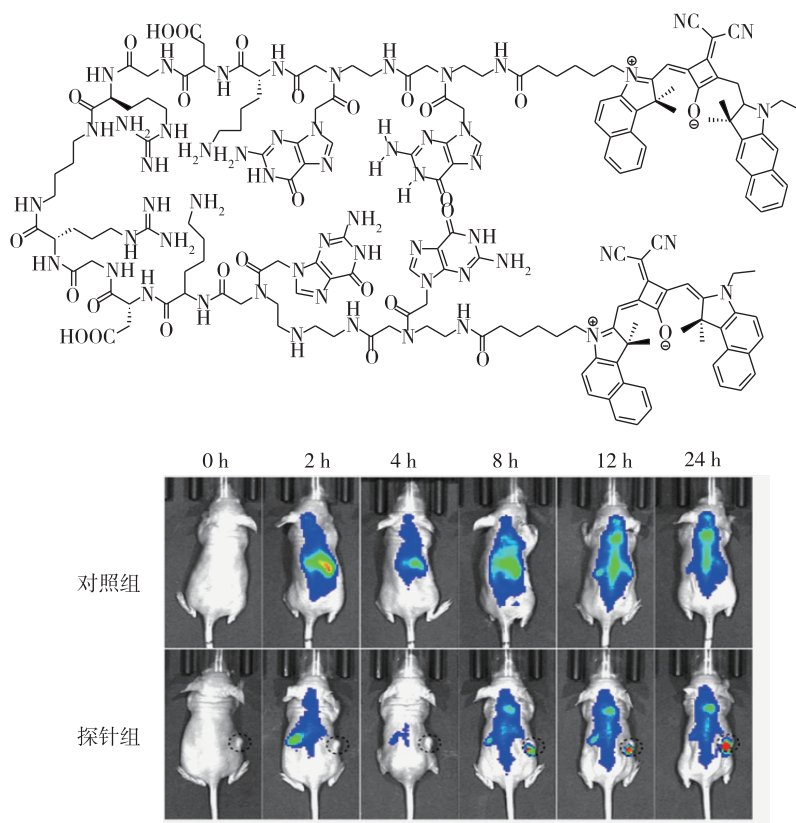


图 6 G4RGDSq2 的结构及其在正常小鼠和异种移植肿瘤小鼠体内的荧光成像

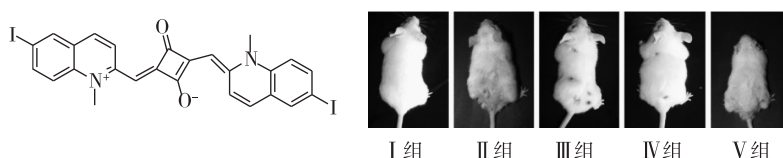


图 7 1C 的结构和 I 组至 IV 组 2 周 PDT 治疗后的动物的状态图及其 90d PDT 治疗后的 V 组状态图<sup>[35]</sup>

### 3 总结与展望

理想的近红外生物荧光成像,所用荧光染料应该具有近红外的吸收和发射峰,大的斯托克斯位移,稳定的光性能,在生理条件下稳定,良好的水溶性,低的生物毒性,并具有一定的反应性官能团便于进一步高性能和多功能的修饰。方酸菁染料大的共轭体系可以产生近红外荧光,刚性平面的芳烃提高了染料的量子效率和稳定性。不对称方酸菁染料具有更大的空间修饰,例如引入羧基,磺酸基,羟基,氨基等亲水性基团能改善其水溶性,而且这些基团也可以作为反应性基团与生物分子相连,改善方酸菁的生物相容性和靶向性。基于方酸菁良好的吸收和发射性质,以及结构容易修饰等优点,在生物体内检测有广泛的应用前景,如蛋白质特异性的识别,肿瘤的早期诊断和作为光敏剂应用到肿瘤微创治疗等方面。但是肿瘤是一个低氧细胞微环境,这可能会严重损害 PDT 效能,所以方酸菁在肿瘤标记检测的应用研究中将会涉及到对肿瘤部位提供并存储活性的氧。因此研究开发新的具有低背景、良好的光稳定性、与生物分子结合后荧光量子产率高的方酸菁染料,解决在生物活体内应用中的问题,将会有力地促进生物分析技术的发展。

## 参考文献:

- [1] WHITE A G, FU N, LEEVY W M, et al. Optical imaging of bacterial infection in living mice using deep-red fluorescent squaraine rotaxane probes[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2010, 21(7):1297-1304.
- [2] 王晓驰, 常刚, 曹瑞军, 等. 近红外荧光染料的结构、性质及生物荧光成像应用[J]. *化学进展*, 2015(7):794-805.
- [3] HOFFMANN K, BEHNKE T, DRESCHER D, et al. Near-infrared-emitting nanoparticles for lifetime-based multiplexed analysis and imaging of living cells[J]. *Acs Nano*, 2013, 7(8):6674-6684.
- [4] ZHANG D, ZHAO Y X, QIAO Z Y, et al. Nano-confined squaraine dye assemblies: new photoacoustic and near-infrared fluorescence dual-modular imaging probes in vivo[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2014, 25(11):2021-2029.
- [5] LIU X D, SUN R, GE J F, et al. A squaraine-based red emission off-on chemosensor for biothiols and its application in living cells imaging[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2013, 11(25):4258-4264.
- [6] PANSARE V, HEJAZI S, FAENZA W, et al. Review of long-wavelength optical and NIR imaging materials: Contrast agents, fluorophores, and multifunctional nano carriers[J]. *Chemistry of Materials*, 2012, 24(5):812-827.
- [7] JAMES R, FU N, ARUNKUMAR E P, et al. Squaraine rotaxanes: Superior substitutes for Cy-5 in molecular probes for near-infrared fluorescence cell imaging[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007, 46(29):5528-5531.
- [8] GASSENSMITH J J, ARUNKUMAR E, BARR L, et al. Self-assembly of fluorescent inclusion complexes in competitive media including the interior of living cells[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129(48):15054-15059.
- [9] THOMAS J, SHERMAN D B, AMISS T J, et al. Synthesis and biosensor performance of a near-IR thiol-reactive fluorophore based on benzothiazolium squaraine[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2007, 18(6):1841-1846.
- [10] ROSLIS J V, GARCIA B, JIMENEZ D, et al. Squaraines as fluoro-chromogenic probes for thiol-containing compounds and their application to the detection of biorelevant thiols[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(13):4064-4065.
- [11] Preston T S, SOMERS R C, NAIR G, et al. A ratiometric CdSe/ZnS nanocrystal pH sensor[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2006, 128(41):13320-13321.
- [12] ARUNKUMAR E, CHITHRA P, AJAYAGHOSH A. A controlled supramolecular approach toward cation-specific chemosensors: alkaline earth metal ion-driven exciton signaling in squaraine tethered podands[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(21):6590-6598.
- [13] VOLKOVA K D, KOVALSKA V B, TATARETS A L, et al. Spectroscopic study of squaraines as protein-sensitive fluorescent dyes[J]. *Dyes & Pigments*, 2007, 72(3):285-292.
- [14] 张东玖, 楚增勇, 邢欣, 等. 方酸菁染料近红外吸收性能研究[J]. *材料导报*, 2010, 24(21):74-78.
- [15] WEISSELEDER R. A clearer vision for in vivo imaging[J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19(4):316-317.
- [16] XU T, LUO S, WANG D, et al. A NIR heptamethine dye with intrinsic cancer targeting, imaging and photosensitizing properties[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(7):2230-2239.
- [17] BASHKATOV A N, GENINA E A, KOCHUBEY V I, et al. Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2 000nm[J]. *Journal of Physics D Applied Physics*, 2005, 38(38):2543-2555.
- [18] OSWALD B, PATSENKER L, DUSCHI J, et al. Synthesis, spectral properties, and detection limits of reactive squaraine dyes, a new class of diode laser compatible fluorescent protein labels[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 1999, 10(6):3723-3733.
- [19] ZHANG Y, YUE X, KIM B, et al. Bovine serum albumin nanoparticles with fluorogenic near-IR-emitting squaraine dyes[J]. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2013, 5(17):8710-8717.
- [20] XU Y, LI Z, MALKOVSKIY A, et al. Aggregation control of squaraines and their use as near-infrared fluorescent sensors for protein[J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2010, 114(25):8574-8580.
- [21] KARPENKO I A, KLYMCHENKO A S, GIORIA S, et al. Squaraine as a bright, stable and environment-sensitive far-red label for receptor-specific cellular imaging[J]. *Chemical Communications*, 2015, 51(14):2960-2963.
- [22] OUSHIKI D, KOJIMA H, TAKAHASHI Y, et al. Near-infrared fluorescence probes for enzymes based on binding affinity modulation of squarylium dye scaffold[J]. *Analytical Chemistry*, 2012, 84(10):4404-4410.
- [23] GAO F P, LIN Y X, LI L L, et al. Supramolecular adducts of squaraine and protein for noninvasive tumor imaging and

- photothermal therapy *in vivo*[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(3):1004-1014.
- [24]MILLS G B, MOOLENAAR W H. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(8):582-591.
- [25]BAST R C, HENNESSY B, MILLS G B. The biology of ovarian cancer: New opportunities for translation[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(6): 415-428.
- [26]ZHANG H, FAN J, WANG J, et al. An off-on COX-2-specific fluorescent probe: Targeting the golgi apparatus of cancer cells[J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 11663-11669.
- [27]YIN J, KWON Y, KIM D, et al. Cyanine-based fluorescent probe for highly selective detection of glutathione in cell cultures and live mouse tissues[J]. *J Am Chem Soc*, 2014, 136(4): 5351-5358.
- [28]HOUBEN A J S, MOOLENAAR W H. Autotaxin and LPA receptor signaling in cancer[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2011, 30(2): 557-565.
- [29]YAO D, LIN Z, WU J. Near-infrared fluorogenic probes with polarity-sensitive emission for *in vivo* imaging of an ovarian cancer biomarker[J]. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8(9):5847-5856.
- [30]AN F F, DENG Z J, YE J, et al. Aggregation-induced near-infrared absorption of squaraine dye in an albumin nanocomplex for photoacoustic tomography *in vivo*[J]. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2014, 6(20):17985-17992.
- [31]FERREIRA D P, CONCEIÇÃO D S, FERNANDES F, et al. Characterization of a squaraine/chitosan system for photodynamic therapy of cancer[J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2016, 120(7):1212-1220.
- [32]BEVERINA L, CRIPPA M, LANDENNA M, et al. Assessment of water-soluble  $\pi$ -extended squaraines as one-and two-photon singlet oxygen photosensitizers: design, synthesis, and characterization[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(6):1894-1902.
- [33]WHITE A G, FU N, LEEVY W M, et al. Optical imaging of bacterial infection in living mice using deep-red fluorescent squaraine rotaxane probes[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2010, 21(7):1297-1304.
- [34]AVIRAH R, JAYARAM D T, ADARSH N, et al. ChemInform abstract: Squaraine dyes in PDT: From basic design to *in vivo* demonstration[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2012, 43(19):911-920.
- [35]SREEJITH S, MA X, ZHAO Y. Graphene oxide wrapping on squaraine-loaded mesoporous silica nanoparticles for bioimaging[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(42):17346-17349.

(责任编辑:殷丽莉)