



氧自由基型酞菁锌光敏剂的激发态释能机制及光动力治疗研究

姚卫云^{1,2}, 徐曼¹, 李洁¹, 胡文博^{1,2*}, 黄维^{1,2,3*}

1. 西北工业大学柔性电子研究院, 柔性电子前沿科学中心, 西安 710129

2. 西北工业大学宁波研究院, 浙江省柔性电子重点实验室, 宁波 315103

3. 南京邮电大学信息材料与纳米技术研究院, 有机电子与信息显示国家重点实验室, 南京 210023

*通讯作者, E-mail: iamwbhu@nwpu.edu.cn; iamwhuang@nwpu.edu.cn

收稿日期: 2022-03-30; 接受日期: 2022-05-23; 网络版发表日期: 2022-06-21

国家自然科学基金(编号: 62175201)和宁波市自然科学基金重点项目(编号: 2021J043)资助

摘要 光动力治疗是一种通过光敏剂在一定波长光照下, 产生具有高生物毒性的活性氧来实现癌症治疗的新技术. 根据活性氧类型的不同, 光敏剂分为Type I型(氧自由基)和Type II型(单线态氧). 与Type II型相比, Type I型对氧气依赖程度低, 在乏氧肿瘤治疗方面具有巨大应用前景. 目前Type I型光敏剂的种类较少, 且机制研究薄弱, 阻碍了其进一步发展. 本文通过光谱学方法证明了酞菁锌(ZnPc)具有极小的单/三线态能级差、超快的系间窜越速率($3.8 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$)以及较长的三线态寿命(327 ns), 这些性质促进了三线态光敏化过程, 从而产生了活性氧. 进一步研究表明, ZnPc产生的单线态氧可以忽略, 却产生了高效的超氧阴离子自由基和羟基自由基, 证明了其Type I的作用机制, 并初步研究了其光动力治疗效果.

关键词 酞菁锌, 超快光谱, 光动力治疗, 激发态, 自由基

1 引言

光动力治疗(photodynamic therapy, PDT)是一种临床批准的微创/无创治疗技术^[1]. 与传统癌症治疗的手术、放疗和化疗技术相比, PDT具有高选择性、低侵入性、低系统毒性以及可协同治疗等优点, 因此成为当前世界肿瘤防治科学中最活跃的研究领域之一^[2]. PDT的工作机理是在一定波长光照射下, 光敏剂发生单线态到三线态的系间窜越(intersystem crossing, ISC), 随后三线态能量与周围分子氧发生能量或电子

转移作用产生具有高细胞毒性的活性氧物质, 促进细胞坏死和凋亡, 最终达到治疗的目的^[3]. 根据所产生活性氧类型的不同, 光敏剂可以分为以产生氧自由基为主的Type I型和以产生单线态氧($^1\text{O}_2$)为主的Type II型^[4-6]. Type I型主要通过与其他生物底物发生电子转移产生羟基自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)以及过氧化氢(H_2O_2)等氧自由基^[5,7,8]; Type II型主要通过与其他分子氧($^3\text{O}_2$)发生能量传递产生 $^1\text{O}_2$ ^[9]. 目前, 氧气依赖的Type II型光敏剂在治疗恶性肿瘤和其他重大疾病方面取得了广泛的应用, 然而癌症乏氧微环境使得

引用格式: Yao W, Xu M, Li J, Hu W, Huang W. Revealing excited-state dynamics of type I zinc phthalocyanine photosensitizer for photodynamic therapy. *Sci Sin Chim*, 2022, 52: 1384–1392, doi: 10.1360/SSC-2022-0057

Type II型光敏剂在乏氧肿瘤治疗方面受到极大的限制. 相对Type II型光敏剂, Type I型光敏剂对氧气依赖较低, 使其在严重乏氧情况下依然可以高效地产生各种氧自由基, 实现高效的肿瘤治疗^[7,10-15]. 因此, 发展氧气依赖较小的Type I型光敏剂是当前最直接、最有效的乏氧肿瘤治疗方法. 然而, 目前Type I型光敏剂种类较少, 且相应机制研究薄弱, 严重阻碍了其发展.

酞菁类化合物是第二代光敏剂的典型代表, 与第一代卟啉类光敏剂相比, 表现出显著红移的吸收波长和近两个数量级提高的摩尔消光系数^[16,17], 使其在深层组织疾病治疗方面表现出巨大潜力. 然而酞菁的刚性平面结构降低了其在水中的溶解性, 易形成聚集体, 抑制了活性氧的产生. 与传统纯有机酞菁相比, 金属酞菁可以降低聚集并进一步红移最大吸收波长, 且由于金属重原子效应, 金属酞菁通常表现更高效率的活性氧产生, 有利于深层组织的乏氧治疗^[18]. 例如, 酞菁锌(zinc phthalocyanine, ZnPc)是一种经典的金属酞菁, 其最大吸收范围位于生物透明窗口(650~800 nm), 具有低毒性和更高的活性氧产率, 被认为是一种极有希望的新型光敏剂材料^[18,19]. 尽管金属酞菁作为抗肿瘤的光敏剂已引起了广泛关注, 但仍处于初步阶段, 突出问题是其光物理作用机制研究有限, 无法形成有效的分子设计策略, 严重限制了高性能金属酞菁类光敏剂的开发与临床转化.

光敏剂的激发态释能机制及释能通道从根本上决定其光动力治疗性能, 也是光敏剂光物理作用机制研究中亟待解决的两个关键科学问题. 飞秒瞬态吸收(femtosecond transient absorption, fs-TA)光谱仪是当前研究光功能材料激发态动力学行为的关键设备. 目前, 使用fs-TA光谱仪研究光敏剂激发态动力学行为受到了广大学者的广泛关注, 本团队在光敏剂的激发态动力学行为方面做了大量探索工作^[20-25]. 然而, 目前ZnPc类光敏剂的激发态动力学行为及光物理作用机制的研究尚未见报道. 本文系统研究了ZnPc的激发态动力学行为及光动力治疗的作用机制, 证明了ZnPc具有极低的单/三线态能级差, 产生了高效的ISC动力学行为, 其ISC速率高达 $3.8 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$. 这些性质使得ZnPc产生了高效的 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 氧自由基, 阐明了其Type I型光动力治疗的作用机制, 最终实现了ZnPc的光动力治疗效果(图1).

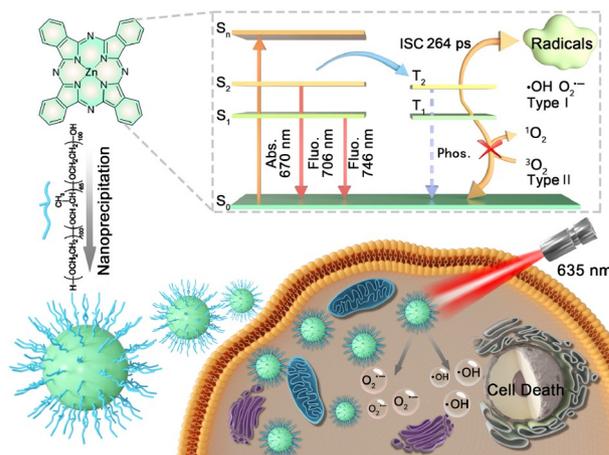


图1 Type-I型ZnPc的光动力治疗作用机制(网络版彩图)
Figure 1 The mechanism of Type-I ZnPc photodynamic therapy (color online).

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

ZnPc购自梯希爱化成工业发展(上海)有限公司; 1,3-二苯基异苯并咪唑(DPBF)、二氢乙锭(DHE)购自上海阿拉丁生化科技有限公司; 亚甲基蓝(MB)、氨基苯基荧光素(APF)、甲基四氢咪唑(Me-THF)、聚氧乙烯聚丙烯醚(F-127)由Sigma-Aldrich公司提供; 单线态氧荧光探针(SOSG)由赛默飞世尔科技(中国)有限公司提供; *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)购自百灵威科技有限公司; 二氯甲烷、甲醇、乙醇均由无锡市亚盛化工有限公司提供; 四氢咪唑(THF)、二甲基亚砜(DMSO)购自上海赛恩化工科技有限公司. 胎牛血清(FBS)、Dulbecco's Modified Eagle培养液(DMEM)、0.05%胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液(PBS)、CCK-8、活死染色试剂盒Calcein-AM/PI、活性氧检测试剂盒DCFH-DA、活性氧清除剂(NAC)和HeLa细胞均购自江苏凯基生物技术股份有限公司.

稳态吸收光谱由岛津UV-3600 PLUS紫外-可见-近红外(UV-vis-NIR)分光光度计(日本)获得; 光致发光光谱通过Fluorolgo-3荧光光谱仪检测; 时间分辨荧光光谱由爱丁堡FLS1000测试, 纳米级寿命使用640 nm的脉冲激发光激发(脉冲宽度: 57.3 ps, 重复频率: 10 MHz), 微秒级寿命使用微秒灯激发; fs-TA光谱由实验室搭建的测试系统; 细胞活力检测采用Power-Wave XS/XS2酶标板分光光度计(BioTek, Winooski,

VT, USA); 利用蔡司LSM 880 NLO Fast airscan共聚焦成像。

2.2 水溶性ZnPc纳米粒子制备

分别将ZnPc和F-127溶于四氢呋喃和纯净水中, 并分别调节浓度为0.1和1 mg/mL。取10 mL F-127在20 KHz的条件下超声, 同时用注射器迅速将1 mL ZnPc打入到F-127水溶液中, 继续超声1 min后放入磁力搅拌器搅拌24 h, 酞菁锌纳米粒子(ZnPc NPs)包覆完成。使用透射电子显微镜(TEM)以及动态光散射(DLS)仪测试包覆后的纳米粒子形貌以及粒径大小。

2.3 Type I和Type II类活性氧

活性氧指示剂1,3-二苯基异苯并呋喃(DPBF)标记溶液中ZnPc NPs产生活性氧的强弱, 亚甲基蓝(MB)作为标样。将少量DPBF溶于乙醇中, 并加入含有ZnPc NPs的水溶液中, 用氙灯(0.5 W/cm^2)进行照射(在光源前放置530 nm长通滤光片), 每次光照10 s, 紫外吸收光谱仪检测随光照时间增加指示剂DPBF在415 nm处吸光度的变化。为了进一步确定ZnPc NPs产生ROS类型, 在ZnPc NPs水溶液中分别加入 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 探针APF、DHE, 以及 O_2 探针SOSG, 同样光照时间和功率处理, 检测随光照时间增加各自特征荧光强度的变化。

2.4 体外荧光成像和细胞毒性

以HeLa细胞为细胞模型, 共聚焦成像检测ZnPc NPs是否能够进入细胞以及进入细胞的时间。通过CCK-8评价ZnPc NPs对细胞活力的影响。将HeLa细胞接种于96孔板中, 培养24 h后, 加入不同浓度的ZnPc NPs (0.1、1、5、10、20、30 $\mu\text{g/mL}$), 分为光照组和非光照组。继续培养孵育4 h后, 弃掉原有培养液, 加入无血清培养液, 其中光照组用635 nm激光(0.2 W/cm^2)照射5 min, 光照结束并调亡4 h后, 加入含有10% CCK-8的培养液, 37 $^\circ\text{C}$ 培养箱共同孵育1 h后, 使用酶标仪检测其吸光度。

2.5 体外光动力治疗效果

把准备好的培养皿分为ZnPc NPs组、单线态氧清除剂NAC的对照组和空白组, 共同孵育4 h后, 用PBS冲洗3次。随后, 将上述细胞用2,7-二氯二醋酸荧光素(DCFH-DA)培养10 min, 635 nm激光(0.2 W/cm^2)照射

3 min后, 共聚焦显微镜记录DCFH-DA在500~550 nm发射范围内的荧光图像。同样处理方法检测活死染色试剂Calcein-AM/PI在500~550 nm/550~650 nm处的荧光成像。

3 结果与讨论

3.1 基础光学表征

紫外吸收光谱表明ZnPc在DMF溶液中具有明显的B带(300~400 nm)和Q带(600~800 nm)吸收(图2a), 其最大吸收波长为670 nm, 摩尔消光系数为 $1.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (图S1, 网络版补充材料)。相比于临床批准的Photofrin光敏剂(最大吸收: 630 nm, 摩尔消光系数: $1.17 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)^[1], ZnPc表现出了明显的红移和更强的近红外吸收, 在深层组织光动力治疗方面表现出更好的应用前景。光致发光光谱显示ZnPc在DMF溶液中的最大发射波长在684 nm (图2a), 其绝对发光量子产率高达15.8%。激发发光光谱表明ZnPc在DMF中的吸收和发射范围分别集中在550~640 nm和600~770 nm范围(图2b)。室温(297 K)时间分辨发光光谱测到ZnPc在DMF中的发光寿命为3.4 ns (图2c), 表明了其荧光发光特性。

3.2 系间窜越过程分析

单线态和三线态能级差低(ΔE_{ST})是光敏剂产生ISC过程的重要保证, 低温(77 K)延迟和非延迟发光光谱是确定光电材料 ΔE_{ST} 的最常用方法。77 K延迟光谱被认为是材料的低温磷光光谱, 反映了材料的三线态能级; 77 K非延迟光谱被认为是低温荧光和低温磷光的叠加。甲基四氢呋喃是目前普遍使用的77 K低温测试溶剂。如图2d所示, ZnPc的室温和低温荧光发光峰未出现较大位移, 但其低温荧光发发展现出精细的振动指纹峰(图S2)。值得注意的是, ZnPc的低温荧光和磷光的最大发光峰重叠, 且磷光发光在746 nm处的弱发光峰也与低温荧光在746 nm处的发光峰位置对齐。低温时间分辨光谱证明706和746 nm处发光既存在长寿命组分(9 μs , 图2e), 又存在短寿命组分(4.85 ns, 图2f), 说明这两处发光同时包含荧光和磷光发光。低温荧光和磷光峰位置的重叠说明ZnPc具有等能级的单线和三线激发态。也就是说ZnPc具有极低的 ΔE_{ST} , 促进了ISC过程。这两处发光可分别归属为第二和第一的

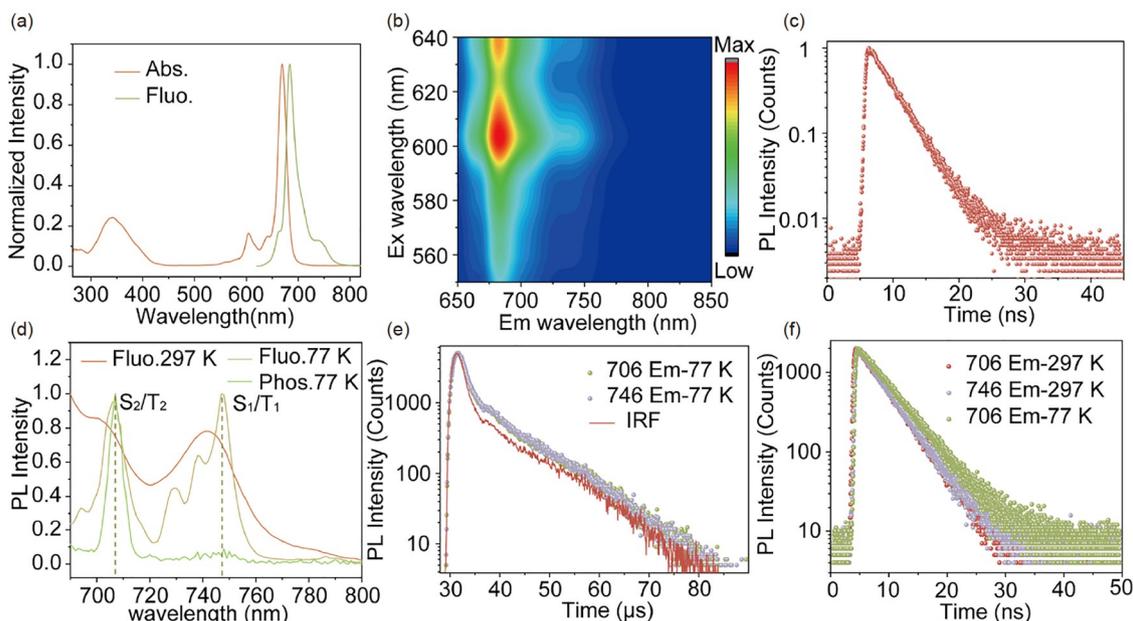


图 2 (a) ZnPc在DMF中的吸收和发射光谱. (b) ZnPc在DMF中的激发发光谱. (c) ZnPc在DMF中的发光寿命(Ex : 640 nm, EPL-640, 57.3 ps, 10 MHz). (d) ZnPc在甲基四氢呋喃中的室温/低温和低温延迟(2 ms)光致发光光谱. (e) ZnPc在低温下的706和746 nm处的长寿命测试(Ex : 640 nm, μ F2-Microsecond lamp, 1 μ s, 100 Hz). (f) ZnPc在77和297 K条件下的短寿命测试(Ex : 640 nm, EPL-640, 57.3 ps, 10 MHz) (网络版彩图)

Figure 2 (a) Absorption and emission spectra of ZnPc in DMF. (b) Excitation-emission mapping of ZnPc in DMF. (c) Fluorescence lifetime of ZnPc in DMF (Ex : 640 nm, EPL-640, 57.3 ps, 10 MHz). (d) Low temperature delayed and non-delayed photoluminescence spectra of ZnPc in Me-THF (Delay time: 2 ms). (e) Lifetime profiles of emission bands at 706 and 746 nm for ZnPc in Me-THF at 77 K (Ex : 640 nm, μ F2-Microsecond lamp, 1 μ s, 100 Hz). (f) Lifetime profiles of emission bands at 706 and 746 nm for ZnPc in Me-THF at 77 K (Ex : 640 nm, EPL-640, 57.3 ps, 10 MHz) (color online).

单/三重激发态发光(S_2/T_2 , 706 nm; S_1/T_1 , 746 nm). 670 nm激发下, 磷光以高能级的 T_2 发光为主, 而来源于 S_2 和 S_1 的荧光发光强度相当. 相应能级图及激发态动力学行为如图1所示.

3.3 激发动力学研究

为了验证ZnPc的ISC过程, 我们测试了ZnPc在DMF中的飞秒(图3a)和亚纳秒(图3b)瞬态吸收光谱. 如图3a, b所示, 在440~600 nm和610~650 nm范围都出现明显的正吸收信号, 归属为激发态吸收(excited state absorption, ESA), 是指样品吸收泵浦光后跃迁到激发态. 处于激发态的粒子能够吸收一些原本基态不能吸收的光而跃迁至更高的激发态, 使得探测器探测到一个正吸收信号^[25]. 605和740 nm附近为负信号区域, 分别归属为基态漂白(ground state bleaching, GSB)和受激发光(stimulated emission, SE)信号. GSB是样品吸收泵浦光后跃迁至激发态, 使得处于基态的粒子数目减少. 处于激发态样品的基态吸收比没有被激发样品的

基态吸收少, 探测到一个负吸收信号. SE是激发态的样品处于非稳定状态, 由于受激辐射或自发辐射作用会回到基态, 在这一过程中, 样品会产生荧光, 导致进入探测器的光强增大, 产生一个负吸收信号^[25]. 飞秒瞬态吸收曲线表明, 在大约523 fs的延迟时间(图3c), 所有的ESA和GSB信号强度达到最大值, 之后ESA信号开始整体衰减, 但激发态组寿命超出了本实验室飞秒瞬态吸收光谱仪的测试范围(>8 ns), 很难区分出单重态和三重态的ESA. 因此我们测试亚纳秒瞬态吸收光谱, 如图3d所示, 在延迟时间为8 ns时, 596 nm处的正信号ESA衰减至0, 随后变为负值. 在同样8 ns的延迟时间, 489 nm附近的ESA依然为正值, 且直至延迟时间增加到4 μ s, 其信号才衰减至0. 这些数据说明489 nm附近的ESA明显高于625 nm附近的ESA寿命, 这一现象在亚纳秒瞬态吸收光谱中可以清晰看到.

图4a展示了813 nm的动力学曲线, 拟合得到单一的3.9 ns短寿命组分, 与时间分辨荧光光谱所测的荧光

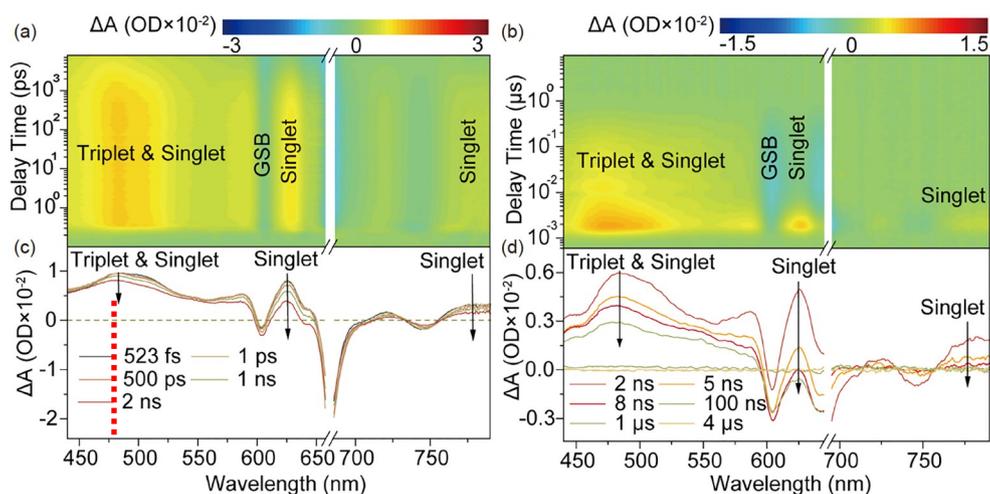


图3 (a, b) ZnPc在DMF中的飞秒和亚纳秒瞬态吸收光谱. (c, d) ZnPc在DMF中不同延迟时间的飞秒和亚纳秒瞬态吸收曲线(网络版彩图)

Figure 3 (a, b) Femtosecond and subnanosecond transient absorption mapping of ZnPc in DMF. (c, d) Femtosecond and subnanosecond transient absorption plots of ZnPc in DMF at different delay time (color online).

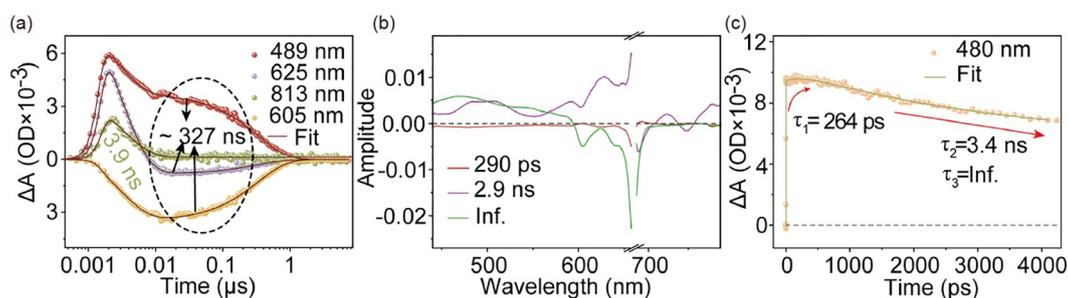


图4 (a) ZnPc在不同波长处的动力学曲线. (b) 衰减相关差分谱. (c) 三重激发态吸收动力学曲线(网络版彩图)

Figure 4 (a) Kinetic curve of ZnPc at different wavelengths. (b) Species associated difference spectra of ZnPc in DMF. (c) Representative kinetic curve of ZnPc in DMF within triplet excited state absorption region (color online).

寿命一致(图2c), 因此将813 nm附近信号归属为单重激发态吸收. 489和625 nm处的动力学曲线符合双指数衰减模型, 同时包含短寿命(~ 3 ns)和长寿命(~ 300 ns)组分. 短寿命组分与荧光寿命一致, 归属为单重激发态吸收, 长寿命组分归属为三重激发态吸收. 基态漂白区域的动力学曲线(605 nm)拟合获得2.9 ns的短寿命和 ~ 327 ns的长寿命组分, 与ESA区域的动力学结果一致, 进一步验证了上述组分归属. 值得注意的是, 625 nm附近的ESA信号与GSB信号叠加在一区, 这一现象在亚纳秒瞬态吸收光谱中更为明显, 且ESA区域的动力学曲线拟合也表明单重激发态吸收和三重激发态吸收也叠加在一起. 这些数据虽然证明ZnPc的确

发生了ISC的过程, 却无法获得具体的ISC动力学参数. 基于上述难题, 我们用奇异值分解和全局拟合的方法对飞秒瞬态吸收光谱进行了分析, 得到了如图4b所示的衰减相关差分谱, 光谱演化过程中的光谱成分为290 ps, 2.9 ns和长寿命(infinite, 缩写为Inf.), 每个光谱成分代表相应寿命组分的贡献. 寿命为290 ps的光谱成分在440~600 nm波段存在明显负的幅值, 对应三重激发态吸收. 因此, 寿命为290 ps的光谱成分对应于ZnPc的ISC过程, 这一归属进一步被三重激发态吸收波段的动力学曲线拟合结果所验证. 如图4c所示, 480 nm处的动力学曲线拟合存在一个增加的264 ps寿命, 增加的264 ps寿命反映了三重激发态形成的过程,

计算错误, 应为 $3.8 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$

也就是ISC过程, 其ISC速率为 $3.8 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$. 同时, 全局拟合中存在一个寿命为3.4 ns的光谱成分, 表现为全波段正的幅值, 对应单重激发态衰减过程, 即ZnPc的荧光过程. 然而, 该3.4 ns的光谱成分在三重激发态吸收波段同样表现为正的幅值, 进一步说明480 nm附近的三重激发态吸收与单重激发态吸收重叠在一起. 最后, 全局拟合中存在一个长寿命Inf.的光谱成分(超出了飞秒瞬态吸收光谱的测量范围), 对应着三重激发态吸收和基态漂白波段, 可归属为三重激发态的衰减. 而且, 基态漂白(605 nm)和三重激发态吸收(489 nm)波段的动力学曲线具有高度一致的衰减趋势(图4a), 这进一步说明三重激发态的衰减和基态漂白来源于ZnPc的三重态. 结合489 nm波长的动力学曲线, ZnPc的三重激发态的衰减寿命为332 ns.

结合上述数据, ZnPc的激发态动力学行为如图1所示, 当670 nm波长的光将从基态激发到单重激发态(S_n)后, 经过振动弛豫, 部分单重激发态能量发生 $S_2 \rightarrow S_0$ (706 nm)和 $S_1 \rightarrow S_0$ (746 nm)的荧光, 还有部分单重激发态能量发生寿命为264 ps的 $S_2 \rightarrow T_2/T_1$ 的ISC

过程, 之后三重激发态能量发生电子转移, 产生活性氧自由基.

3.4 ZnPc纳米包覆及活性氧产生效果

为了进一步研究ZnPc的光动力治疗效果, 我们对非水溶的ZnPc进行了纳米工程化的处理, 制备了水溶性的ZnPc纳米粒子(ZnPc NPs). 透射电子显微镜(TEM)以及动态光散射(DLS)数据说明了ZnPc NPs具有均匀尺寸, 粒径约为100 nm (图5a, b).

1,3-二苯基异苯并呋喃(DPBF)是一种常用的检测溶液中活性氧的化学探针, 其在420 nm处特征吸光度的下降与活性氧的生成速率成正比. 相比经典光敏剂亚甲基蓝(MB), ZnPc NPs使DPBF的特征吸光度下降得更为明显(图5c), 说明ZnPc NPs相比MB具有更强的活性氧产生能力. 我们进一步使用高选择性的 $\cdot\text{OH}$ 探针氨基苯基荧光素(APF)、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 探针二氢乙锭(DHE)和 $^1\text{O}_2$ 探针SOSG来确定ZnPc NPs所产生活性氧的类型. 研究发现, 加入ZnPc NPs后, 随着光照时间增加, APF和DHE的特征荧光强度显著增强(图5d, e; 图

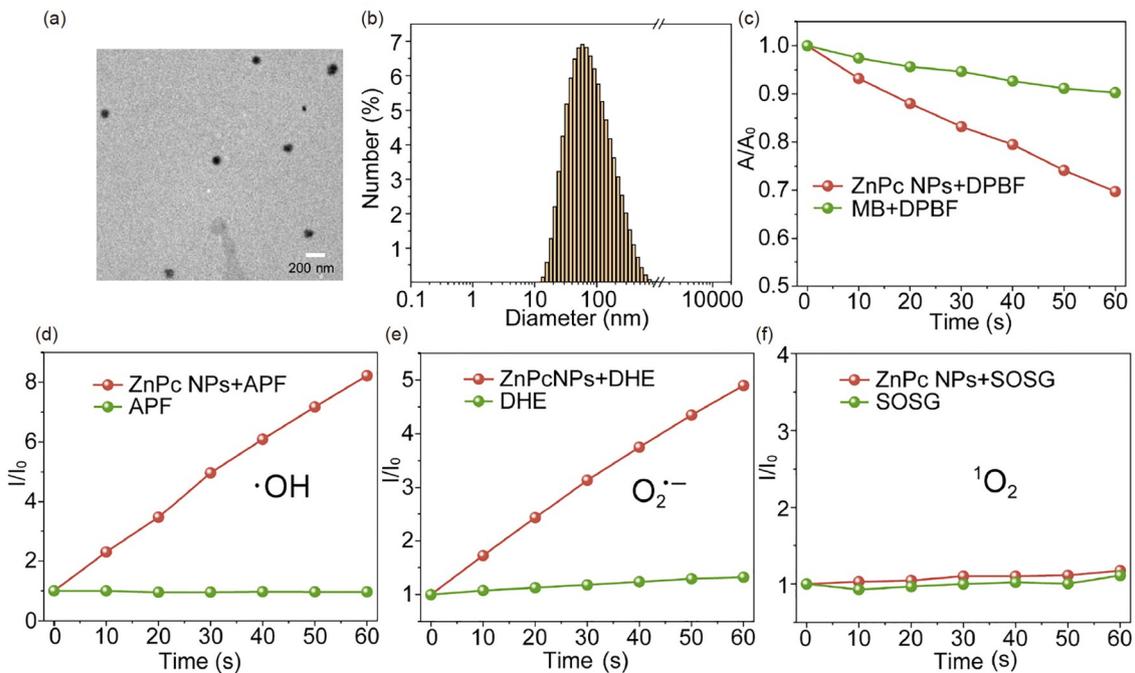


图5 (a, b) ZnPc纳米粒子TEM和DLS图. (c) DPBF的消耗比值. APF (d), DHE (e), SOSG (f)的荧光增加比值. A_0 和 A 表示DPBF光照前后在420 nm处吸光度; I_0 和 I 表示光照前后APF、DHE和SOSG在515、600、526 nm处的荧光强度. 上述测试都在白光照射下(50 mW cm^{-2})测试(网络版彩图)

Figure 5 (a, b) TEM and DLS of ZnPc NPs. (c) The consumption of DPBF by ZnPc NPs and MB under white light irradiation (50 mW cm^{-2}). The fluorescence enhancement of APF (d), DHE (e), and SOSG (f) mediated by ZnPc NPs under white light irradiation (50 mW cm^{-2}) (color online).

S3a~d). 这些现象说明ZnPc NPs可以同时产生 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$, 是Type I型光敏剂. 而图5f中SOSG的特征荧光未出现明显增强, 说明ZnPc NPs不能有效产生 $^1\text{O}_2$ (图S3e, f). 这些数据表明ZnPc NPs是Type I型光敏剂, 因此在乏氧肿瘤治疗领域具有巨大应用前景.

3.5 体外荧光成像及光动力效果

共聚焦成像实验发现在给药4 h后可观察到HeLa细胞中的红色荧光信号(图6a), 说明ZnPc NPs可以轻松进入HeLa细胞. 随后, CCK-8检测被用来评价ZnPc NPs的细胞暗毒性和光毒性. 对于非光照组, 在 $30\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 以内ZnPc NPs对HeLa细胞无毒性; 而对于光照组, 同样浓度下, ZnPc NPs显著抑制细胞生长(图6b).

为了进一步验证ZnPc NPs的细胞内活性氧产生效果, 我们使用了细胞内活性氧探针2,7-二氯二醋酸荧光素(DCFH-DA). DCFH-DA本身没有荧光, 与活性氧反应后会生成绿色荧光的2,7-二氯荧光素(DCF), 其荧光强度与细胞内活性氧水平成正比. 如图6c所示, 光照ZnPc NPs孵育的HeLa细胞可以产生明显的绿色荧光, 表明细胞内生成了活性氧. 加入活性氧清除剂(NAC)后, 发现DCF的绿色荧光得到显著抑制. 这些数据充

分说明ZnPc NPs可以在细胞内产生活性氧. 最后, 细胞活死染色试剂盒被用来验证ZnPc NPs的光动力治疗效果. 活细胞被染成绿色, 死细胞被染成红色. 研究发现, 活性氧清除剂NAC的对照组和空白组都只出现了绿色荧光, 而ZnPc NPs组出现了部分的红色荧光(图6d). 以上结果均说明了ZnPc NPs能抑制HeLa细胞的生长, 具有良好的光动力效果.

4 结论

本文系统研究了ZnPc的激发态动力学行为, 阐明了其Type I型光动力治疗的作用机制, 初步证明了ZnPc NPs对癌细胞具有优异的治疗效果. 室温光谱研究表明ZnPc在近红外范围表现出强吸收和发光性能. 低温光谱研究揭示了ZnPc高度重合的单线态和三线态能级, 这一特征产生了极低的 ΔE_{ST} , 有利于ISC过程. 飞秒瞬态吸收光谱证明了ZnPc具有高效的ISC过程, ISC速率高达 $3.8 \times 10^6\ \text{s}^{-1}$, 产生的三线态寿命为327 ns, 有利于后续三线态光敏化生成活性氧. 进一步研究表明, ZnPc产生 $^1\text{O}_2$ 的能力可以忽略, 却产生了高效的超氧阴离子自由基和羟基自由基, 证明了其Type I的作

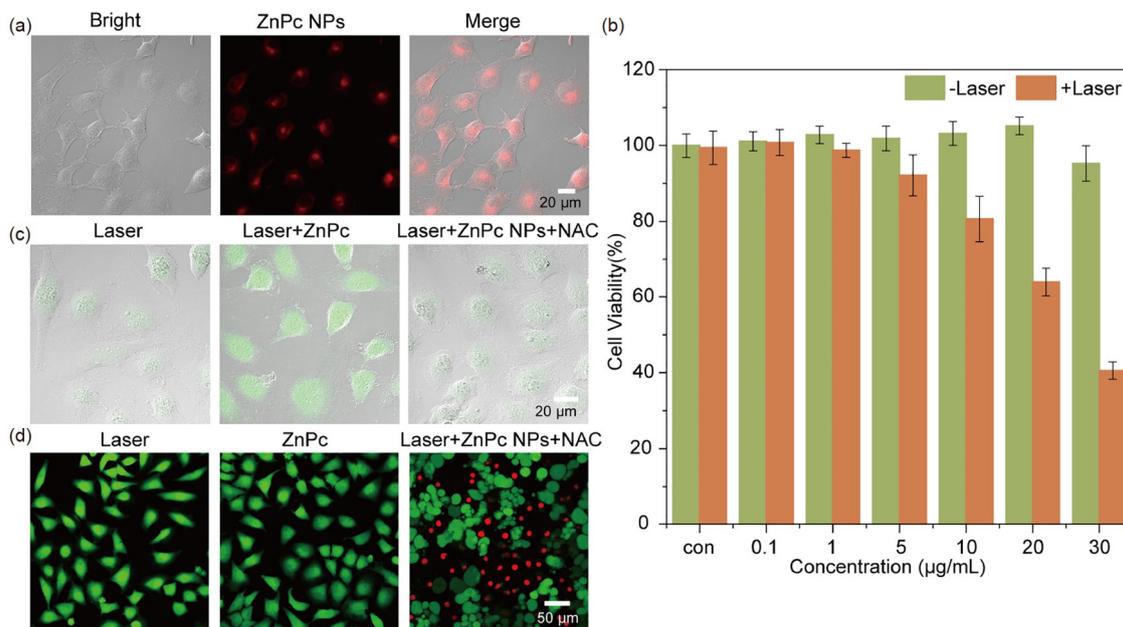


图6 (a) Zn Pc NPs在HeLa细胞中的荧光成像. (b) Zn Pc NPs对HeLa细胞活力的影响. (c) Zn Pc NPs在HeLa细胞中ROS的产生. (d) 细胞活死染色(网络版彩图)

Figure 6 (a) Fluorescence imaging of Zn Pc NPs in HeLa cells. (b) Effect of Zn Pc NPs on HeLa cell viability. (c) Production of ROS by Zn Pc NPs in HeLa cells. (d) Live-to-death staining of HeLa cells (color online).

用机制, 这些性质使得ZnPc在乏氧肿瘤治疗方面显示了广阔的应用前景. 同时, 本文针对ZnPc的激发态

动力学行为研究也为未来的临床癌症治疗提供了光敏剂分子的设计新思路.

补充材料

本文的补充材料见网络版<http://chemcn.scichina.com>. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

参考文献

- Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3: 380–387
- Zhou Z, Song J, Nie L, Chen X. *Chem Soc Rev*, 2016, 45: 6597–6626
- Yang B, Chen Y, Shi J. *Chem Rev*, 2019, 119: 4881–4985
- Ran B, Wang Z, Cai W, Ran L, Xia W, Liu W, Peng X. *J Am Chem Soc*, 2021, 143: 17891–17909
- Wang YY, Liu YC, Sun H, Guo DS. *Coord Chem Rev*, 2019, 395: 46–62
- Wan Y, Fu LH, Li C, Lin J, Huang P. *Adv Mater*, 2021, 33: 2103978
- Chen D, Xu Q, Wang W, Shao J, Huang W, Dong X. *Small*, 2021, 17: 2006742
- Kang M, Zhang Z, Xu W, Wen H, Zhu W, Wu Q, Wu H, Gong J, Wang Z, Wang D, Tang BZ. *Adv Sci*, 2021, 8: 2100524
- Li X, Kwon N, Guo T, Liu Z, Yoon J. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57: 11522–11531
- Teng KX, Chen WK, Niu LY, Fang WH, Cui G, Yang QZ. *Angew Chem Int Ed*, 2021, 60: 19912–19920
- Li M, Xiong T, Du J, Tian R, Xiao M, Guo L, Long S, Fan J, Sun W, Shao K, Song X, Foley JW, Peng X. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 2695–2702
- Xiao P, Shen Z, Wang D, Pan Y, Li Y, Gong J, Wang L, Wang D, Tang B Z. *Adv Sci (Weinh)*, 2022, 95: e2104079
- Gurram B, Li M, Li M, Gebremedhin KH, Sun W, Fan J, Wang J, Peng X. *J Mater Chem B*, 2019, 7: 4440–4450
- Li X, Lee D, Huang JD, Yoon J. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57: 9885–9890
- Li M, Xia J, Tian R, Wang J, Fan J, Du J, Long S, Song X, Foley JW, Peng X. *J Am Chem Soc*, 2018, 140: 14851–14859
- Li X, Peng XH, Zheng BD, Tang J, Zhao Y, Zheng BY, Ke MR, Huang JD. *Chem Sci*, 2018, 9: 2098–2104
- Zhou Y, Wang D, Zhang Y, Chitgupi U, Geng J, Wang Y, Zhang Y, Cook TR, Xia J, Lovell JF. *Theranostics*, 2016, 6: 688–697
- Lo P-C, Rodriguez-Morgade M S, Pandey R K, Ng D K P, Torres T, Dumoulin F. *Chem Soc Rev*, 2020, 494: 1041–1056
- Machacek M, Cidlina A, Novakova V, Svec J, Rudolf E, Miletin M, Kučera R, Simunek T, Zimcik P. *J Med Chem*, 2015, 58: 1736–1749
- Hu W, He T, Zhao H, Tao H, Chen R, Jin L, Li J, Fan Q, Huang W, Baev A, Prasad PN. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58: 11105–11111
- Yin C, Zhang H, Sun B, Chen S, Jiang X, Miao X, Sun P, Hu W, Fan Q, Huang W. *Adv Funct Mater*, 2021, 31: 2106575
- Miao X, Hu W, He T, Tao H, Wang Q, Chen R, Jin L, Zhao H, Lu X, Fan Q, Huang W. *Chem Sci*, 2019, 10: 3096–3102
- Hu W, Zhang H, He GS, Baev A, Xia J, Huang W, Prasad PN. *ACS Photonics*, 2020, 7: 3161–3165
- Hu W, Miao X, Tao H, Baev A, Ren C, Fan Q, He T, Huang W, Prasad PN. *ACS Nano*, 2019, 13: 12006–12014
- Hu W, Prasad PN, Huang W. *Acc Chem Res*, 2021, 54: 697–706

Revealing excited-state dynamics of type I zinc phthalocyanine photosensitizer for photodynamic therapy

Weiyun Yao^{1,2}, Man Xu¹, Jie Li¹, Wenbo Hu^{1,2*}, Wei Huang^{1,2,3*}

¹ Frontiers Science Center for Flexible Electronics, Xi'an Institute of Flexible Electronics, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710129, China

² Key Laboratory of Flexible Electronics of Zhejiang Province, Ningbo Institute of Northwestern Polytechnical University, Ningbo 315103, China

³ State Key Laboratory for Organic Electronics and Information Displays & Institute of Advanced Materials (IAM), Nanjing University of Posts & Telecommunications, Nanjing 210023, China

*Corresponding authors (email: iamwbhu@nwpu.edu.cn; iamwhuang@nwpu.edu.cn)

Abstract: Photodynamic therapy is a clinically approved novel therapeutic technique that employs photosensitizer in the presence of suitable light to produce a cytotoxic reactive oxygen species (ROS). According to the ROS types, photosensitizers are divided into Type I (free radical) and Type II (singlet oxygen). Compared with Type II, Type I has low dependence on oxygen, presenting excellent prospects in overcoming the limitations of the hypoxic cancer treatment. However, there is a limited scope of Type I photosensitizers. Moreover, few studies concentrated on the mechanism research, which hinders the development of Type I photodynamic therapy. This study proved that zinc phthalocyanate (ZnPc) has a negligible singlet-triplet energy gap, ultrafast intersystem crossing rate ($3.8 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$), and a long triplet excited state lifetime (327 ns), all of these together give rise to facile triplet-photosensitization. Furthermore, ZnPc exhibits efficient generation of superoxide anion radicals and hydroxyl radicals but negligible singlet oxygen production, validating its Type I feature. Finally, we demonstrated the preliminary *in vitro* photodynamic therapy mediated by ZnPc.

Keywords: zinc phthalocyanine, ultrafast spectroscopy, photodynamic therapy, excited state, free radicals

doi: [10.1360/SSC-2022-0057](https://doi.org/10.1360/SSC-2022-0057)