卟啉-石墨炔衍生物的光热/光动力联合治疗

郭洁^{1,3†}, 郭梦雨^{2†}, 吴延州^{1,3}, 王福慧^{1,3}, 金伟岳^{1,3}, 熊泽城^{1,3}, 陈春英^{2*}, 杨帆^{1,3}, 王建平^{1,3*}, 刘辉彪^{1,3*}

1. 中国科学院化学研究所, 北京 100190

2. 国家纳米科学中心, 北京 100190

3. 中国科学院大学化学科学学院, 北京 100049

†同等贡献

*通讯作者, E-mail: chenchy@nanoctr.cn; jwang@iccas.ac.cn; liuhb@iccas.ac.cn

收稿日期: 2021-09-21; 接受日期: 2021-11-26; 网络版发表日期: 2021-12-07

国家自然科学基金(编号: 21790050, 21790053, 22071251和 1875258) 和国家重点研究计划(编号: 2018YFA0703501) 资助项目

摘要 在本研究中, 我们设计合成了两种卟啉修饰的新型石墨炔衍生物GDYO-TPP和GDY-TPP, 它们在有机溶剂和水中具有良好的分散性及优异的生物相容性. 研究发现GDYO-TPP和GDY-TPP不仅具有优异的光热转换性能, 还具有优异的产单线态氧能力, 并可用于肿瘤的光热/光动力联合治疗, 在动物体内表现出优异的肿瘤细胞生长抑制作用, 且无毒副作用. 进一步研究表明卟啉与石墨炔之间的高效电子转移使得共轭连接的GDY-TPP的光热/光动力联合治疗效果要优于非共轭连接的GDYO-TPP, 实现了通过控制石墨炔中功能基团的键合方式对其光热/光动力联合治疗效果的调控, 为设计新型功能石墨炔和光热/光动力联合治疗肿瘤提供了新思路.

关键词 石墨炔, 卟啉, 化学修饰, 光热/光动力联合治疗

1 引言

光疗, 特别是光热治疗(PTT)和光动力治疗(PDT), 由于其微创性和高时空精度, 而成为一种很有前景的癌症治疗方法^[1]. 它可将吸收的光能转化为热能或产生包含单线态氧($^1\text{O}_2$)在内的活性氧(ROS)^[2-4], 从而导致细胞损伤甚至细胞死亡. 然而, 单一疗法的治疗效果受到复杂肿瘤微环境的限制, 因此常将PTT与PDT结合起来以提高肿瘤治疗效果. 此外, 在联合治疗中, PTT产生的热量不仅可以促进瘤内血流量, 提高氧含量, 还可以增强细胞对光敏剂(PSs)的摄取, 从而显著

提高其抗癌效果^[5,6].

许多研究人员正在致力于联合治疗的研究, 以提高肿瘤治疗效果. 例如, Liu等人^[7]探索了已负载光敏剂二氢卟吩e6 (Ce6)的聚乙二醇功能化氧化石墨烯(GO)平台用于癌症联合治疗. 石墨烯在激光照射下产生的热量可促进细胞对Ce6的吸收, 从而提高PDT的疗效. 到目前为止, 通过表面修饰和包封方法已成功将光敏剂负载于各种体系, 如核壳纳米结构、自组装纳米结构以及基于金、碳材料等的纳米杂化体系, 实现了PTT/PDT联合治疗^[8,9]. 如Hwang等人^[10]使用一种独特的金纳米海胆结构作为PTT/PDT联合治疗材

引用格式: Guo J, Guo M, Wu Y, Wang F, Jin W, Xiong Z, Chen C, Yang F, Wang J, Liu H. Photothermal/photodynamic synergetic therapy of functional graphdiyne with porphyrin. *Sci Sin Chim*, 2022, 52: 309–320, doi: [10.1360/SSC-2021-0213](https://doi.org/10.1360/SSC-2021-0213)

料, 实现了对肿瘤细胞的完全消除. Li等人^[11]构建了一个由富勒烯(C_{60})、叶酸(FA)和聚乙二醇共轭的氧化石墨烯组成的多功能体系, 用于PTT/PDT联合治疗. Zhu等人^[12]将单壁碳纳米管(SWCNTs)封装在吡咯菁绿(ICG)偶联透明质酸(HA)纳米颗粒的疏水“洞穴”中, 用于PTT/PDT癌症治疗. 最近, Zhao等人^[13]利用具有PTT和PDT协同效应的聚乙二醇化氧化钼纳米颗粒(PEG-MoO_x NPs)在近红外-II区(1064 nm)辐照下实现了肿瘤细胞的生长抑制. 然而石墨烯、碳纳米管、富勒烯等碳纳米材料由于其在近红外区的光吸收系数相对较低以及对生物体潜在的毒性而使其应用受到限制. 此外, 纳米复合材料的合成方法复杂, 非共价连接方式导致光敏剂的负载效率低和定量困难, 结构稳定性差, 组分不明确, 进一步阻碍了PTT/PDT联合治疗的重现性和实际应用^[14]. 因此, 构建简单、稳定、定量、且高效的PTT/PDT联合治疗的体系是当前的研究热点. 石墨炔(graphdiyne, GDY)是一种新的碳的同素异形体, 由于其独特的 π 共轭结构和在电子、光学、机械和医药等方面的优异性质而引起了广泛关注^[15,16]. 特别的, 由于GDY具有宽光谱吸收, 可作为光热治疗试剂^[17-19]. 卟啉是一类含18个 π 电子的芳香大环化合物, 在紫外-可见区有较大的消光系数, 以及良好的光化学电子转移能力, 卟啉及其衍生物被广泛应用于单线态氧方面的研究^[20], 并被用于各种分子电子学、光捕获和光电子器件^[21,22]. 据此, 我们提出将卟啉基团引入石墨炔有可能兼具光热和光动力联合治疗的性能, 卟啉与石墨炔之间的共价连接方式不仅可明确各组分的相对含量, 且稳定性大大提高, 而且石墨炔对氧气的吸附可以缓解肿瘤微环境的乏氧问题, 从而提高光动力治疗效果^[23].

首先, 我们通过5-(4-氨基苯基)-10,15,20-三苯基卟啉(NH_2 -TPP)与氧化石墨烯(GDYO)之间的酰胺化反应获得了非共轭连接的卟啉-石墨炔衍生物GDYO-TPP, 通过5-(4-溴苯基)-10,15,20-三苯基卟啉(Br-TPP)与石墨炔的Sonogashira交叉偶联反应合成了共轭连接的卟啉-石墨炔衍生物GDY-TPP. 这两种卟啉-石墨炔衍生物不仅在有机溶剂中具有良好的分散性, 还能在水中分散, 并具有优异的生物相容性. 研究结果表明GDY-TPP和GDYO-TPP不仅具有优异的光热性能, 还具有高效产生单线态氧的能力, 并展现出优异的光热/光动力联合治疗癌症的效果(图1). 电子转移过程的

图1 卟啉-石墨炔衍生物用于PTT/PDT联合治疗示意图(网络版彩图)

Figure 1 Schematic illustration of porphyrin-functionalized graphdiyne for PDT/PTT synergistic therapy (color online).

动力学研究发现由于卟啉与石墨炔之间的高效电子转移使得共轭连接的GDY-TPP的光热/光动力联合治疗效果要优于非共轭连接的GDYO-TPP.

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

5-(4-氨基苯基)-10,15,20-三苯基卟啉购自Frontier Scientific, Inc., 未经进一步纯化而使用. 5-(4-溴苯基)-10,15,20-三苯基卟啉根据文献报道的方法合成. 六溴苯、三甲基硅炔、氯化锌、四(三苯基膦)钯(0)、四正丁基氟化铵、过氧化氢、浓硫酸、亚硫酸氯、三乙胺、碘化亚铜, 二异丙胺、吡咯、苯甲醛、4-溴苯甲醛和丙酸购自化学试剂公司, 不用进一步纯化就可以使用. 四氢呋喃加入钠后重蒸除水. 铜箔在 1 mol L^{-1} 盐酸中超声处理, 分别用水和丙酮洗涤, 在氩气流下干燥后立即用于石墨炔的生长. 石墨炔氧化物是用改进的Hummers方法制备的. 本研究中使用的所有化学药品均为分析纯.

傅里叶变换红外光谱(FT-IR)由HITACHI F-4500IR光谱仪获得. 拉曼光谱(Raman)在LabRAM HR Evolution上测试获得. X射线光电子能谱(XPS)由VG-Scientific ESCALab 2201-XL能谱仪采集. 透射电子显微镜(TEM)图像由JEM-2100F显微镜在200 kV下获得. 紫外/可见吸收(UV-vis)测量是在SHIMADZU UV-2600分光光度计上进行的. 荧光光谱由爱丁堡FLS980

仪器获得. 光热温度的变化由FLIR E40便携式红外测温仪监测.

2.2 实验方法

2.2.1 石墨炔的合成

石墨炔是根据文献报道合成的^[15]. 首先, 以六溴苯和氯化锌为原料合成了六[(三甲基硅基)乙炔基]苯. 然后, 在六[(三甲基硅基)乙炔基]苯的四氢呋喃溶液中加入四正丁基氟化铵 (1 mol L^{-1} 四氢呋喃溶液), 在 0°C 下搅拌 10 min, 即可得到六乙炔基苯单体. 最后, 六乙炔基苯单体在吡啶溶液中通过偶联反应得到石墨炔.

2.2.2 氧化石墨炔的制备

以石墨炔为原料, 采用酸氧化法合成氧化石墨炔. 具体如下, 在冰浴下将石墨炔 (25 mg) 和双氧水 (0.75 mL, 30%) 的混合溶液搅拌半小时后, 加入浓硫酸 (0.5 mL), 并继续在冰水浴中搅拌 3 小时, 然后将该混合物置于室温下搅拌 3 小时. 结束后, 将该混合物滴入 10 mL 水中并超声 1 小时, 然后在 8000 转/分的速度下离心 3 分钟, 用水多次洗涤后烘干可得到棕色的氧化石墨炔粉末.

2.2.3 GDYO-TPP 的合成

70°C 时, 氩气保护下将氧化石墨炔 (30 mg) 与二氯亚砷 (20 mL) 在 DMF (0.5 mL) 中回流. 24 小时后, 减压蒸馏除去剩余的二氯亚砷. 室温下缓慢加入 DMF 溶液 (10 mL)、三乙胺 (0.5 mL)、 $\text{NH}_2\text{-TPP}$ (30 mg), 在 130°C 下搅拌 72 h. 反应结束后待冷却至室温, 将反应混合物倒入乙醚 (300 mL) 中产生沉淀, 抽滤后用四氢呋喃 ($5 \times 50 \text{ mL}$) 和三氯甲烷 ($5 \times 50 \text{ mL}$) 对产物进行多次洗涤, 直至滤液无色, 然后用纯水洗涤, 真空干燥得到黑色 GDYO-TPP 粉末.

2.2.4 Br-TPP 的合成

向沸腾的丙酸溶液 (125 mL, 1.67 mol) 中加入 4-溴苯甲醛 (1.55 g, 8.3 mmol) 和苯甲醛 (2.55 mL, 25 mmol). 5 min 后, 缓慢加入吡咯 (2.3 mL, 33 mmol), 回流 30 min. 反应结束后, 慢慢向反应混合物中加入氢氧化钠溶液, 降至室温后, 用二氯甲烷萃取, 无水硫酸钠除水旋蒸得到 Br-TPP 粗产物. 采用硅胶柱分离, 重结晶得到高纯度的 Br-TPP 棕色粉末.

2.2.5 GDY-TPP 的合成

GDY-TPP 是通过 Sonogashira 偶联反应合成的. 将新制备的 GDY (30 mg)、Br-TPP (69.5 mg, 0.1 mmol)、四(三苯基膦)钯 (0) (4.56 mg, 0.0039 mmol)、碘化亚铜 (6.67 mg, 0.035 mmol) 和二异丙胺 (14.4 mg, 0.142 mmol) 加入到 THF (50 mL) 溶液中, 在 70°C 下搅拌 3 天. 反应结束降至室温后, 用乙腈、稀盐酸、水、四氢呋喃对反应混合物进行过滤洗涤, 真空干燥可得 GDY-TPP 黑色粉末.

2.2.6 光热转换性质测试

采用 808 nm (2 W cm^{-2}) 激光持续照射不同浓度 (25、50、100 和 $200 \mu\text{g mL}^{-1}$) 的 GDYO-TPP、GDY-TPP 水溶液 600 s, 使用便携式红外测温仪每隔 30 s 记录一次温度变化.

2.2.7 体外单线态氧检测

单线态氧可由绿色荧光探针(SOSG)特异性检测^[24]. 将不同体积的GDYO-TPP或GDY-TPP储备液(10 mg mL^{-1})加入到比色皿中, 并加入 $6 \mu\text{L}$ 的SOSG储备液(1 mg mL^{-1}), 然后在 660 nm (0.5 W cm^{-2})激光下照射 100 min , 在此期间对 530 nm 波长处荧光强度进行检测(480 nm 激发), 作为产生单线态氧的标志.

2.2.8 细胞毒性测试

用细胞计数盒CCK-8测试不同处理后的细胞活性. 向96孔培养板每孔中接种5000个4T1细胞, 过夜培养. 然后分别加入Br-TPP ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), NH_2 -TPP ($0.7 \mu\text{g mL}^{-1}$), GDY ($99 \mu\text{g mL}^{-1}$), GDY-TPP ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$)或GDYO-TPP ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). 培养6 h后, 将细胞用 1 W cm^{-2} 808 nm 激光持续照射4 min (PTT)或 0.5 W cm^{-2} 660 nm 激光持续照射5 min (PDT). 再孵育24小时, 取出培养基, 加入 $100 \mu\text{L}$ 含CCK-8(10%)的培养基, 在 37°C 下孵育2小时, 使用多功能酶标仪测量 450 nm 处的吸光度. 同时利用钙黄绿素AM (Calcein-AM)和碘化丙二钠(PI)对不同处理后的细胞进行染色, 并用倒置荧光显微镜(Leica)观察其绿色和红色荧光来检测细胞活性.

2.2.9 细胞内活性氧的检测

2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)用来检测细胞内产生的活性氧. 4T1细胞孵育6 h后, 用磷酸盐缓冲溶液洗涤细胞, 并加入含有DCFH-DA ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$)的新鲜培养基, 在黑暗中孵育20分钟. 通过激光共聚焦显微镜采集细胞图像, 并用流式细胞仪来检测荧光强度.

2.2.10 体内肿瘤治疗效果测试

所有动物实验均采用经中国医学科学院肿瘤研究所动物保护与利用委员会批准的方案进行. 首先, 在小鼠右侧背部皮下注射 $100 \mu\text{L}$ 含 1×10^5 个4T1肿瘤细胞的磷酸盐缓冲液. 当肿瘤体积接近 100 mm^3 时, 对小鼠进行治疗. 将小鼠随机分为11组(每组5只): (1) 对照组(只注射了磷酸盐缓冲溶液); (2) GDY-TPP (10 mg kg^{-1}); (3) GDY-TPP (10 mg kg^{-1})+ 808 nm 激光照射; (4) GDY-TPP (10 mg kg^{-1})+ 660 nm 激光照射; (5) GDY-

TPP (10 mg kg^{-1})+ 808 nm 激光照射+ 660 nm 激光照射; (6) GDYO-TPP (10 mg kg^{-1}); (7) GDYO-TPP (10 mg kg^{-1})+ 808 nm 激光照射; (8) GDYO-TPP (10 mg kg^{-1})+ 660 nm 激光照射; (9) GDYO-TPP (10 mg kg^{-1})+ 808 nm 激光照射+ 660 nm 激光照射; (10) GDY+ 808 nm 激光照射, TPP (0.1 mg kg^{-1})+ 660 nm 激光照射; (11)只有激光照射. 注射材料6 h后将激光照射组的小鼠置于 0.3 W cm^{-2} 的 660 nm 激光下照射 10 min , 继续在 0.5 W cm^{-2} 的 808 nm 激光下照射 5 min , 每隔一天测量肿瘤体积.

2.2.11 组织学检测

治疗28天后, 对对照组和治疗组小鼠的主要脏器(肝、肺、肾、心、脾)和肿瘤组织进行切片. 对于肿瘤切片, 采用TUNEL法检测细胞凋亡, 并进行Caspase 3和Ki67的免疫组化染色.

2.2.12 可见激发-红外探测光谱的测试

利用自行研制的可见激发-红外探测光谱装置测定瞬态可见-红外光谱. 简言之, 能产生具有35 fs脉宽、 1 mJ 能量、 800 nm 中心波长的激光放大器为光源, 经由两态飞秒光参量放大器分别产生可见泵浦光和红外探测光. 将所得的可见泵浦光和红外探测光聚焦在样品上, 并将泵浦光和探针光的相对偏振方向设置为魔角(54.7°)条件. 所产生的瞬态信号被引入到配备有碲化镉阵列探测器的红外单色仪中, 随着探测时间的改变而进行瞬态光谱数据的测量.

3 结果与讨论

3.1 卟啉-石墨炔衍生物的结构表征

两种卟啉-石墨炔衍生物的结构见图2a. 首先, 我们对GDY、GDYO、GDYO-TPP和GDY-TPP进行红外光谱表征. 如图2c所示, GDY在 1620 、 1510 和 1456 cm^{-1} 附近的峰属于芳香环的骨架振动, 2098 和 2222 cm^{-1} 处的峰可归属于 $\text{C}\equiv\text{C}$ 键的伸缩振动. 图2b中GDYO出现了明显的 $\nu_{\text{C-O}}$ (1094 cm^{-1})、 $\nu_{\text{C-O-C}}$ (1209 cm^{-1})、 $\nu_{\text{O-H}}$ (1383 cm^{-1})、 $\nu_{\text{C=O}}$ (1722 cm^{-1})的伸缩振动^[25-27]. 同时, GDYO-TPP(图2b)和GDY-TPP(图2c)的红外光谱中均出现了卟啉的特征峰, 说明卟啉已修饰在石墨炔表面. 此外, 在GDYO-PP的光谱中观察到 1697 和 1258 cm^{-1} 处的峰, 分别归属于酰胺键的 C=O

图 2 (a) GDYO-TPP和GDY-TPP的结构示意图. (b, c) GDYO、GDYO-TPP(b)和GDY、GDY-TPP(c)的FT-IR光谱. (d, e) GDYO、GDYO-TPP(d)和GDY、GDY-TPP(e)的拉曼光谱. (f, g) GDYO-TPP(f)和GDY-TPP(g)的TEM图像和EDS元素面扫图. (h, i) GDYO-TPP的高分辨C 1s (h)和N 1s (i)光谱. (j, k) GDY-TPP的高分辨C 1s (j)和N 1s (k) 光谱 (网络版彩图)

Figure 2 (a) Schematic diagrams of GDYO-TPP and GDY-TPP. (b, c) FT-IR spectra of (b) GDYO, GDYO-TPP and (c) GDY, GDY-TPP. (d, e) Raman spectra of (d) GDYO, GDYO-TPP and (e) GDY, GDY-TPP. (f, g) TEM images and TEM/EDS mapping for C, N, and O of (f) GDYO-TPP and (g) GDY-TPP. (h, i) High-resolution (h) C 1s and (i) N 1s XPS spectra of GDYO-TPP. (j, k) High-resolution (j) C 1s and (k) N 1s XPS spectra of GDY-TPP (color online).

和C-N的伸缩振动^[28].

拉曼光谱如图2d和2e所示. 在GDY中, 位于1582和1373 cm^{-1} 的两个峰分别属于G带和D带. 在1900和2180 cm^{-1} 附近出现的峰是由快键的振动引起的^[29]. GDYO-TPP中D带和G带轻微的位移变化可以证明TPP和GDYO之间存在相互作用. GDY-TPP中由于TPP向GDY的强烈电子转移, GDY的G带从1586移至1545 cm^{-1} , 从而证明了TPP的共轭连接^[30,31]. 此外, 由于化学修饰, GDY-TPP和GDYO-TPP中 I_D/I_G 比值均有所增加.

透射电镜可用来研究GDYO-TPP和GDY-TPP的形貌和结构. 如图2f和2g所示, GDYO-TPP和GDY-

TPP表面光滑、干净. 此外, 能谱仪(Energy Dispersive Spectrometer, EDS)元素面扫图中C、N、O元素均匀分布在整个GDYO-TPP(图2f)和GDY-TPP(图2g)上, 进一步说明卟啉分子被成功修饰到石墨炔和氧化石墨炔的表面.

为了阐明元素组成和结构信息, 我们对GDYO-TPP和GDY-TPP进行了XPS分析. 在GDYO-TPP(图2h)和GDY-TPP(图2j)的高分辨C 1s光谱中检测到位于286.8和285.8 eV的峰, 可归属于卟啉的C=N和C-N键^[32]. 图2i和2k是GDYO-TPP和GDY-TPP的高分辨N 1s 光谱, 400、399.6和399.2 eV处的3个峰分别是卟啉的C=N、N-H和C-N峰^[33, 34].

3.2 光学性质以及光热、光动力效应

NH_2 -TPP、GDY、GDYO、GDYO-TPP在DMF中的紫外-可见吸收光谱如图3a所示。GDY的光谱在274 nm处有一个吸收峰, 氧化后的GDYO在268 nm处的吸收带较GDY蓝移了6 nm。与 NH_2 -TPP的吸收光谱相比, GDYO-TPP在418 nm处Soret带和Q带没有移动, 但强度减弱, 而GDYO在268 nm处的吸收带蓝移到264 nm。与GDY相比, GDY-TPP在268 nm处也出现了类似的位移(图3b), 这表明卟啉基团与石墨炔之间有明显的相互作用。

在荧光光谱中(图3c), 相比于 NH_2 -TPP, GDYO-TPP表现出45%猝灭效率, 而对照组的荧光强度仅降低了19%。GDYO-TPP中卟啉的发射猝灭反映出卟啉与石墨炔激发态之间的存在着有效的相互作用, 包括光诱导的电子转移和/或能量转移。由于 NH_2 -TPP的发射(653和716 nm)与GDYO的吸收重叠, 从TPP到GDYO的单重态-单重态发生了能量转移^[35]。并且, 由于卟啉直接连接在石墨炔上, 且连接处的距离相对较

短, 因此有效的分子内能量猝灭是通过穿越化学键的方式实现的。图3d是Br-TPP、对样品和GDY-TPP在DMF中的荧光光谱。在416 nm的激发下, GDY-TPP表现出近乎100%的完全猝灭。以上结果表明, GDY-TPP具有比GDYO-TPP更高的荧光猝灭效率, 这是因为在GDY-TPP中, 卟啉与石墨炔之间通过共轭连接而进行了相当有效的电子和/或能量转移, 并且电子和/或能量转移可能同时发生在分子内和分子间^[36]。

图3e是 NH_2 -TPP、对照组和GDYO-TPP在418 nm处的吸光度相同时(0.24)的荧光量子产率。对照组的荧光量子产率约为 NH_2 -TPP的66%, 而GDYO-TPP的荧光量子产率很小。为了进一步了解石墨炔与卟啉在激发态时的相互作用, 采用时间相关单光子计数技术, 在405 nm激发波长下测量了 NH_2 -TPP、对照组和GDYO-TPP的荧光衰减寿命。图3f中, NH_2 -TPP分子呈现9.25 ns的单指数衰减寿命, 这归因于 $\text{S}_1 \rightarrow \text{S}_0$ 弛豫引起的第一单重态的减少^[37]。 NH_2 -TPP与GDYO简单混合体系, 荧光衰减略有变化。

图3 (a, b) GDY、GDYO、 NH_2 -TPP、GDYO-TPP(a)和GDY、Br-TPP和GDY-TPP(b)在DMF中的紫外-可见吸收光谱。(c) NH_2 -TPP、对照组和GDYO-TPP在DMF中的荧光光谱。(d) Br-TPP、对照组和GDY-TPP在DMF中的荧光光谱变化。(e, f) NH_2 -TPP、对照组和GDYO-TPP的量子产率(e)和荧光衰减曲线(f)。(g) H_2O 、GDYO-TPP ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$)和GDY-TPP ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$)在808 nm (2 W cm^{-2})激光照射下的温度变化图。(h) GDYO-TPP ($400 \mu\text{g mL}^{-1}$)和GDY-TPP ($400 \mu\text{g mL}^{-1}$)在660 nm (0.5 W cm^{-2})照射下引起的SOSG($3 \mu\text{g mL}^{-1}$)强度变化(网络版彩图)

Figure 3 (a, b) UV-vis absorption spectra of (a) GDY, GDYO, NH_2 -TPP, GDYO-TPP and (b) GDY, Br-TPP, and GDY-TPP in DMF. (c) Fluorescence spectra of NH_2 -TPP, the controlled sample, and GDYO-TPP in DMF. (d) Fluorescence spectroscopic changes observed for Br-TPP, the controlled sample, and GDY-TPP in DMF. (e) PTT profiles of H_2O , GDYO-TPP ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), and GDY-TPP ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) upon irradiation at 808 nm (2 W cm^{-2}) for 600 s and the next 1000 s after irradiation. (f) Singlet oxygen generation by GDYO-TPP ($400 \mu\text{g mL}^{-1}$), and GDY-TPP ($400 \mu\text{g mL}^{-1}$) with an irradiation at 660 nm (0.5 W cm^{-2}), detected by SOSG assay ($3 \mu\text{g mL}^{-1}$) (color online).

对于GDYO-TPP, 荧光寿命进一步缩短, 寿命的降低表明GDYO-TPP中存在能量转移和电子转移.

GDY在紫外-可见吸收光谱中表现出的宽吸收促进对其进行光热效应研究. 为了研究GDYO-TPP和GDY-TPP的光热效应, 在功率为 2 W cm^{-2} 的808 nm激光照射下进行了体外光热实验. 如图3g所示, GDYO-TPP照射600 s后温度升高了 8.6°C , 而GDY-TPP的温度提升明显, 达到 10.4°C , 说明GDY-TPP的光热转换效率高于GDYO-TPP. 为定量评价光热效应, 根据方程(1)计算出GDYO-TPP和GDY-TPP的光热转换效率 η 分别为18%和35%^[38,39], 高于传统的光热试剂^[40,41].

$$\eta = \frac{hA\Delta T_{\max} - Q_s}{I(1 - 10^{-A_\lambda})} \quad (1)$$

式中 h 为传热系数, A 为容器的表面积. h 与 A 的乘积可由图3g的冷却期得出. $\Delta T_{\max}$ 为最大温差, A_λ 是溶液在808 nm处的紫外-可见吸收强度, I 是激光功率, Q_s 是溶剂在照射下吸收的热量.

接下来以SOSG为荧光探针, 检测GDYO-TPP和GDY-TPP在光照下产生单线态氧的能力. 如图3h所示, 在530 nm处绘制出SOSG、GDYO-TPP+SOSG、GDY-TPP+SOSG的荧光强度增加百分比随照射时间的变化趋势. 光照后, SOSG的荧光强度保持不变, 而GDYO-TPP+SOSG、GDY-TPP+SOSG的荧光增加百分率($E_x=480 \text{ nm}$, $E_m=530 \text{ nm}$)随光照时间的延长线性增加. 说明GDYO-TPP和GDY-TPP生成 $^1\text{O}_2$ 是导致荧光强度增加的原因. 此外, GDY-TPP的荧光强度变化远高于GDYO-TPP, 这说明共轭水平越高, $^1\text{O}_2$ 产生越多.

3.3 体外细胞毒性

为研究GDY-TPP和GDYO-TPP对癌细胞的体外细胞毒性, 采用标准CCK-8法测定不同光照条件下癌细胞的相对存活能力. 与光照组相比, 黑暗条件下GDY-TPP和GDYO-TPP几乎无细胞毒性, 表明GDY-TPP和GDYO-TPP具有良好的生物相容性 (图4b). 然而, 如图4c所示, 我们发现经过PTT (808 nm, 0.5 W cm^{-2} , 4 min)或PDT (660 nm, 0.5 W cm^{-2} , 5 min)治疗的GDY-TPP组细胞存活率显著降低, 而TPP组、GDY组、GDYO-TPP组细胞存活率没有显著降低. 此外, GDY-TPP组TPP和PDT联合治疗的细胞存活率显

著降低(小于60%), 表明GDY-TPP对肿瘤细胞的PDT/PTT协同治疗是非常有效的. 为了进一步证实上述结果, 我们用钙黄绿素AM与碘化丙啶(PI)对不同处理后的细胞进行活/死染色. 如图4d所示, 我们观察到, 在没有激光照射的情况下, 几乎所有细胞都显示绿色荧光, 这表明这些材料在黑暗条件下无细胞杀伤作用. 在单光源照射下, 一些细胞被杀死并显示出红色荧光. 而在808 nm和660 nm激光照射下, GDY-TPP组的大部分细胞呈现红色荧光, 表明光热/光动力联合治疗效果非常有效.

下面以2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)为活性氧探针, 研究GDY-TPP在细胞内的光动力活性. 黑暗条件下, GDY-TPP或GDYO-TPP组细胞内ROS含量变化不大. 相比之下, GDY-TPP或GDYO-TPP组以660 nm激光(0.5 W cm^{-2})照射5 min后, 细胞内荧光强度显著增加(图4e). 流式细胞仪检测结果证实, 660 nm激光照射后, GDY-TPP组ROS水平较GDYO-TPP ($P<0.01$)及其他各组显著升高(图4f). 以上结果表明GDY-TPP在细胞中具有明显的光毒性和良好的生物相容性.

3.4 体内光热/光动力联合治疗

受体外联合治疗的结果启发, 我们进一步对4T1荷瘤小鼠进行PTT/PDT联合治疗(图5a). 治疗后每隔一天监测各组肿瘤体积和小鼠体重, 各组均可观察到小鼠体重的增长(图5b), 表明GDY-TPP和GDYO-TPP在体内具有良好的生物相容性和低毒性. 图5c中PTT/PDT联合治疗后, GDY-TPP组的肿瘤生长明显小于其他任何治疗组($P<0.01$). 为了进一步阐明疗效, 对经过28天治疗后的肿瘤切片进行TUNEL检测和免疫组织化学染色. 如图5d所示, 与其他治疗组相比, GDY-TPP组PTT/PDT联合治疗后的肿瘤Ki67表达降低, Caspase 3表达增加, TUNEL信号增强, 进一步证明了GDY-TPP的PTT/PDT联合治疗具有显著效果.

3.5 可见激发-红外探测光谱

可见激发-红外探测光谱可以用来直接跟踪激发态电子的动力学. 图6a给出了GDY-TPP、GDYO-TPP、GDY、Br-TPP、GDYO以及 NH_2 -TPP的红外光谱. 吡啶的C=C键在 1575 cm^{-1} 左右有伸缩振动峰, 而在 1600 cm^{-1} 以上没有明显的红外跃迁. 因此,

图 4 (a) 不同照射条件下(808 nm, 0.5 W cm^{-2} 激光照射4 min; 660 nm, 0.5 W cm^{-2} 激光照射5 min), 用GDY-TPP、GDYO-TPP处理4T1细胞. (b, c) 不同处理后4T1细胞的细胞毒性数据. (d) 不同照射条件下, TPP、GDY、GDY-TPP、GDYO-TPP处理后4T1细胞活死情况观察(细胞用钙黄绿素AM及PI染色). (e, f) DCFH-DA染色4T1细胞的荧光图像及平均荧光强度. 由双因素方差分析计算三组独立数据的平均值 $\pm$ 标准差如下: *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ (网络版彩图)

Figure 4 (a) 4T1 cells were treated with GDY-TPP, GDYO-TPP in different irradiating conditions (808 nm at 0.5 W cm^{-2} for 4 min, 660 nm at 0.5 W cm^{-2} for 5 min). (b, c) Cytotoxicity data of 4T1 cells after different treatments. (d) Fluorescence images of 4T1 cells after incubation with TPP, GDY, GDY-TPP, and GDYO-TPP in different irradiating conditions. The cells were stained with calcein-AM. Scale bars, 200 μm . (e, f) Fluorescence images and the mean fluorescence intensity of 4T1 cells stained with DCFH-DA. The mean $\pm$ s.d. from three independent replicates is shown. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, calculated by two-way ANOVA (color online).

1550~1750 cm^{-1} 之间的宽吸收峰主要来源于GDY或GDYO与苯环的C=C伸缩振动峰, 并且C=O的伸缩振动峰位于1715 cm^{-1} 左右. 图6a中位于1595.4、1633.8、1716.7和1766.9 cm^{-1} 处的虚线用于指示所选动力学的探测频率位置.

我们利用可见激发-红外探测光谱研究了GDY-TPP和GDYO-TPP的光诱导电子转移过程. 图6b中的

瞬态光谱包括叠加在宽电子吸收信号上的基态漂白. GDY-TPP中非常宽的负峰主要对应于宽电子吸收信号下石墨炔单元的C=C和C=O伸缩振动的基态漂白吸收. 此外, 我们观察到GDY-TPP的基态漂白吸收信号比较小, 这种现象可归因于GDY-TPP中电子转移引起的强背景吸收. 同样, 在GDYO-TPP中也发现了同样的现象, 但是相对GDY-TPP要弱一些.

图 5 (a) 体内光疗过程示意图。(b~d) 不同治疗组的小鼠体重(b), 肿瘤大小(c)和细胞凋亡、增殖水平(d)。比例尺: 50 μm 。I: GDYO-TPP; II: GDYO-TPP + 808 nm; III: GDYO-TPP + 660 nm; IV: GDYO-TPP+808 nm+660 nm; V: GDY-TPP; VI: GDY-TPP + 808 nm; VII: GDY-TPP+660 nm; VIII: GDY-TPP+808 nm+660 nm; IX: GDY+808 nm、TPP+660 nm; X: 808 nm+660 nm (网络版彩图)

Figure 5 (a) Schematic illustration of *in vivo* phototherapy process. (b~d) body weight (b), tumor growth measurements (c), and levels of apoptosis and proliferation (d) of different treatments. Scale bar: 50 μm . I: GDYO-TPP; II: GDYO-TPP+laser 808; III: GDYO-TPP+laser 660; IV: GDYO-TPP+laser 808, 660; V: GDY-TPP; VI: GDY-TPP+laser 808; VII: GDY-TPP+laser 660; VIII: GDY-TPP+laser 808, 660; IX: GDY+laser 808, TPP+laser 660; X: laser 808+laser 660 (color online).

图6c是GDY-TPP, GDYO-TPP, GDY和GDYO在C=O伸缩振动频率下(1716.7 cm^{-1})的动力学曲线。我们发现石墨炔与卟啉复合后的动力学比石墨炔快, 这表明给受体之间存在相互作用。并且GDY-TPP比GDYO-TPP也要快一些。此外, 荧光猝灭也表明证明了卟啉与石墨炔单元之间存在较强的相互作用。

4 结论

综上所述, 我们提出通过卟啉化学修饰石墨炔的策略成功实现了石墨炔的功能化, 首次制备了两种卟啉-石墨炔新型衍生物GDY-TPP和GDYO-TPP。GDY-TPP和GDYO-TPP同时具有优异的光热性能和产生单

图 6 (a) GDY、GDYO、GDYO-TPP和GDYO、Br-TPP、GDY-TPP的红外光谱. (b) GDY-TPP和GDY的可见激发-红外探测光谱. (c) 550 nm激发下GDY、GDY-TPP及GDYO、GDYO-TPP的动力学分析 (网络版彩图)

Figure 6 (a) FT-IR spectra of GDY, GDYO, NH₂-TPP, Br-TPP, GDY-TPP, and GDYO-TPP. All spectra are baseline subtracted. (b) fs-IR transient spectra of GDY-TPP and GDY excited at 550 nm, and the corresponding FT-IR spectra were shown in the top panel. (c) Comparison of dynamics for GDY-TPP and GDY (left), and for GDYO-TPP and GDYO (right) collected at 1716.7 cm⁻¹ after 550 nm excitation (color online).

线态氧的能力, 在细胞和动物水平上均展现出优异的抑制肿瘤生长的作用, 且无毒副作用. 用于对4T1荷瘤小鼠进行PTT/PDT联合治疗, 具有显著的效果, 动力学研究表明由于卟啉与石墨炔之间的高效电子转

移使得共轭连接的GDY-TPP的光热/光动力联合治疗效果要优于非共轭连接的GDYO-TPP. 该研究拓展了石墨炔的应用, 并为PTT/PDT联合治疗提供了新的思路.

补充材料

本文的补充材料见网络版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

- 1 Younis MR, Wang C, An R, Wang S, Younis MA, Li ZQ, Wang Y, Ihsan A, Ye D, Xia XH. *ACS Nano*, 2019, 13: acsnano.8b09552

- 2 Jang B, Park JY, Tung CH, Kim IH, Choi Y. *ACS Nano*, 2011, 5: 1086–1094
- 3 Gao C, Dong P, Lin Z, Guo X, Jiang BP, Ji S, Liang H, Shen XC. *Chem Eur J*, 2018, 24: 12827–12837
- 4 Liu J, Wang L, Shen X, Gao X, Chen Y, Liu H, Liu Y, Yin D, Liu Y, Xu W, Cai R, You M, Guo M, Wang Y, Li J, Li Y, Chen C. *Nano Today*, 2020, 34: 100907
- 5 Zhao N, Yan L, Zhao X, Chen X, Li A, Zheng D, Zhou X, Dai X, Xu FJ. *Chem Rev*, 2019, 119: 1666–1762
- 6 Wei X, Chen H, Tham HP, Zhang N, Xing P, Zhang G, Zhao Y. *ACS Appl Nano Mater*, 2018, 1: 3663–3672
- 7 Tian B, Wang C, Zhang S, Feng L, Liu Z. *ACS Nano*, 2011, 5: 7000–7009
- 8 Yang P, Tian Y, Men Y, Guo R, Peng H, Jiang Q, Yang W. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10: 42039–42049
- 9 Poulouse AC, Veerananarayanan S, Mohamed MS, Aburto RR, Mitcham T, Bouchard RR, Ajayan PM, Sakamoto Y, Maekawa T, Kumar DS. *Sci Rep*, 2016, 6: 35961
- 10 Vijayaraghavan P, Liu CH, Vankayala R, Chiang CS, Hwang KC. *Adv Mater*, 2014, 26: 6689–6695
- 11 Hu Z, Li J, Huang Y, Chen L, Li Z. *RSC Adv*, 2015, 5: 654–664
- 12 Wang G, Zhang F, Tian R, Zhang L, Fu G, Yang L, Zhu L. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8: 5608–5617
- 13 Yin W, Bao T, Zhang X, Gao Q, Yu J, Dong X, Yan L, Gu Z, Zhao Y. *Nanoscale*, 2018, 10: 1517–1531
- 14 Bai J, Jia X, Ruan Y, Wang C, Jiang X. *Inorg Chem*, 2018, 57: 10180–10188
- 15 Li G, Li Y, Liu H, Guo Y, Li Y, Zhu D. *Chem Commun*, 2010, 46: 3256–3258
- 16 Guo M, Zhao L, Liu J, Wang X, Yao H, Chang X, Liu Y, Liu J, You M, Ren J, Wang F, Wang L, Wang Y, Liu H, Li Y, Zhao Y, Cai R, Chen C. *Nano Lett*, 2021, 21: 6005–6013
- 17 Li S, Chen Y, Liu H, Wang Y, Liu L, Lv F, Li Y, Wang S. *Chem Mater*, 2017, 29: 6087–6094
- 18 Jin J, Guo M, Liu J, Liu J, Zhou H, Li J, Wang L, Liu H, Li Y, Zhao Y, Chen C. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10: 8436–8442
- 19 Zhou X, You M, Wang F, Wang Z, Gao X, Jing C, Liu J, Guo M, Li J, Luo A, Liu H, Liu Z, Chen C. *Adv Mater*, 2021, 33: 2100556
- 20 Khaing Oo MK, Yang Y, Hu Y, Gomez M, Du H, Wang H. *ACS Nano*, 2012, 6: 1939–1947
- 21 Balaban TS, Bhise AD, Fischer M, Linke-Schaetzl M, Roussel C, Vanthuyne N. *Angew Chem Int Ed*, 2003, 42: 2140–2144
- 22 Choi MS, Yamazaki T, Yamazaki I, Aida T. *Angew Chem Int Ed*, 2004, 43: 150–158
- 23 Jiang W, Zhang Z, Wang Q, Dou J, Zhao Y, Ma Y, Liu H, Xu H, Wang Y. *Nano Lett*, 2019, 19: 4060–4067
- 24 Zhao B, Bilski PJ, He YY, Feng L, Chignell CF. *PhotoChem PhotoBiol*, 2008, 84: 1215–1223
- 25 Hontoria-Lucas C, López-Peinado AJ, López-González JD, Rojas-Cervantes ML, Martín-Aranda RM. *Carbon*, 1995, 33: 1585–1592
- 26 Titelman GI, Gelman V, Bron S, Khalfin RL, Cohen Y, Bianco-Peled H. *Carbon*, 2005, 43: 641–649
- 27 Stankovich S, Piner RD, Nguyen SBT, Ruoff RS. *Carbon*, 2006, 44: 3342–3347
- 28 Niyogi S, Bekyarova E, Itkis ME, McWilliams JL, Hamon MA, Haddon RC. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 7720–7721
- 29 Zheng T, Gao Y, Deng X, Liu H, Liu J, Liu R, Shao J, Li Y, Jia L. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10: 32946–32954
- 30 Su Q, Pang S, Alijani V, Li C, Feng X, Müllen K. *Adv Mater*, 2009, 21: 3191–3195
- 31 Ghosh A, Rao KV, George SJ, Rao CNR. *Chem Eur J*, 2010, 16: 2700–2704
- 32 Wang A, Yu W, Xiao Z, Song Y, Long L, Cifuentes MP, Humphrey MG, Zhang C. *Nano Res*, 2015, 8: 870–886
- 33 Du Y, Dong N, Zhang M, Zhu K, Na R, Zhang S, Sun N, Wang G, Wang J. *Phys Chem Chem Phys*, 2017, 19: 2252–2260
- 34 Wang A, Song J, Huang Z, Song Y, Yu W, Dong H, Hu W, Cifuentes MP, Humphrey MG, Zhang L, Shao J, Zhang C. *Nano Res*, 2016, 9: 458–472
- 35 Wang A, Fang Y, Long L, Song Y, Yu W, Zhao W, Cifuentes MP, Humphrey MG, Zhang C. *Chem Eur J*, 2013, 19: 14159–14170
- 36 Zhu W, Minami N, Kazaoui S, Kim Y. *J Mater Chem*, 2003, 13: 2196–2201
- 37 Neto NMB, Boni LD, Rodrigues Jr. JJ, Misoguti L, Mendonça CR, Dinelli LR, Batista AA, Zilio SC. *J Porphyrins Phthalocyanines*, 2003, 07: 452–456
- 38 Liu Y, Ai K, Liu J, Deng M, He Y, Lu L. *Adv Mater*, 2013, 25: 1353–1359
- 39 Wang W, Wang L, Li Y, Liu S, Xie Z, Jing X. *Adv Mater*, 2016, 28: 9320–9325
- 40 Hessel CM, P. Pattani V, Rasch M, Panthani MG, Koo B, Tunnell JW, Korgel BA. *Nano Lett*, 2011, 11: 2560–2566
- 41 Tian Q, Jiang F, Zou R, Liu Q, Chen Z, Zhu M, Yang S, Wang J, Wang J, Hu J. *ACS Nano*, 2011, 5: 9761–9771

Photothermal/photodynamic synergetic therapy of functional graphdiyne with porphyrin

Jie Guo^{1,3†}, Mengyu Guo^{2†}, Yanzhou Wu^{1,3}, Fuhui Wang^{1,3}, Weiyue Jin^{1,3}, Zecheng Xiong^{1,3}, Chunying Chen^{2*}, Fan Yang^{1,3}, Jianping Wang^{1,3*}, Huibiao Liu^{1,3*}

¹ Institute of Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190

² National Center for Nanoscience, Beijing 100190

³ College of Chemical Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049

†These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors (email: chenchy@nanocr.cn; jwang@iccas.ac.cn; liuhb@iccas.ac.cn)

Abstract: In this study, we designed and synthesized two novel porphyrin-modified graphdiyne derivatives (GDYO-TPP and GDY-TPP), which have good dispersity in organic solvents and water and exhibit favourable biocompatibility. It was found that the GDYO-TPP and GDY-TPP not only have excellent photothermal conversion performances, but also have outstanding singlet oxygen generation ability, and can be used for photothermal/photodynamic combination therapy of tumors, showing tremendous inhibition of tumor growth in animals, without side effects. Further studies showed that the efficient electron transfer between porphyrin and graphdiyne made the photothermal/photodynamic combination therapy effect of conjugated GDY-TPP much better than that of non-conjugated GDYO-TPP, which realized the regulation of the photothermal/photodynamic combination therapy by controlling the bonding mode of functional groups. The results provide new ways for designing novel functional graphdiyne and photothermal/photodynamic combination therapy of tumors.

Keywords: graphdiyne, porphyrin, chemical modification, photothermal/photodynamic combination therapy

doi: [10.1360/SSC-2021-0213](https://doi.org/10.1360/SSC-2021-0213)