

三苯胺类荧光探针的合成与细胞成像

尹培¹, 马拉毛草², 马恒昌^{1*}

(1. 西北师范大学 化学化工学院 甘肃省高分子材料重点实验室 生态环境相关高分子材料教育部重点实验室, 甘肃 兰州 730070; 2. 西北师范大学 逸夫图书馆, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 以三苯胺为原料, 通过 Vilsmeier-Haack 和 McMurry 反应合成了一个碳碳双键连接两个三苯胺的荧光分子 1,2-二(三苯胺基)乙烯(TPAS)。采用紫外-可见光谱和荧光光谱对 TPAS 的光学性质进行了考察。结果表明:TPAS 有很强的荧光发射性能, 荧光发射为蓝光, 荧光强度与浓度的线性关系较好, 且溶剂化效应不强, 光稳定性良好。采用扫描电镜测试了 TPAS 的聚集态行为。结果显示:当水的体积分数增大后, TPAS 分子聚集, 形貌改变。采用 MTT 法对 TPAS 进行了细胞毒性测试。结果表明, 不同 TPAS 浓度下, 细胞的存活度都在 80%以上, 说明 TPAS 对细胞的毒性很低, 生物相容性好。并实现了 TPAS 对 A549 的活细胞成像。

关键词: 三苯胺; 荧光探针; 光学性质; 生物相容性; 细胞成像; 功能材料

中图分类号: O621.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214 (2019) 02-0212-06

Synthesis and Cell Imaging of Triphenylamine-based Fluorescent Probe

YIN Pei¹, MALA Mao-cao², MA Heng-chang^{1*}

(1. Key Laboratory of Eco-Environment-Related Polymer Materials of Ministry of Education, Key Laboratory of Polymer Materials of Gansu Province, College of Chemistry and Chemical Engineering, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, Gansu, China; 2. Shaw Library, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, Gansu, China)

Abstract: 4,4'-(Ethene-1,2-diyl)bis(*N,N*-diphenylaniline) (TPAS), a compound was characteristic of carbon-carbon double bond connecting triphenylamines was synthesized *via* Vilsmeier-Haack reaction and McMurry reaction using triphenylamine as a raw material. The optical properties of TPAS were studied by UV-vis absorption spectrum and fluorescence spectrum. The results showed that TPAS had strong fluorescence emission, and the fluorescence emission was blue light. The fluorescence intensity had a good linear relationship with the TPAS concentration. The solvation effect was not strong, and the optical stability was good. The aggregation of TPAS was characterized by scanning electron microscope (SEM). The results revealed that when the volume fraction of water increased, the TPAS molecules accumulated and the morphology changed. The cytotoxicity of TPAS was tested by MTT assays, the cell viability was above 80% at different concentrations of TPAS, indicating that TPAS had low toxicity to cells and good biocompatibility. In addition, the imaging was successfully achieved in living human lung cancer A549 cells.

Key words: triphenylamine; fluorescent probe; optical property; biocompatibility; cell imaging; functional materials

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (21764012)

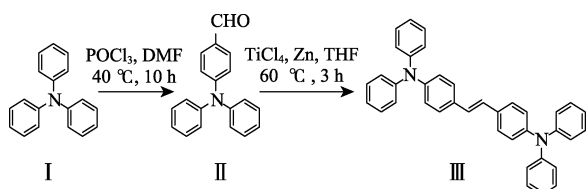
荧光探针由于灵敏度高、选择性好、响应时间短、可视化等优点, 在分子、离子检测和细胞成像领域获得广泛应用^[1]。一般地, 当待测体系中的物质与识别基团发生作用时, 会导致探针共轭程度和电荷分布发生变化, 使荧光强度发生敏化或猝灭,

从而实现检测^[2]。与其他生物成像方式相比, 荧光成像成本低廉、易于操作, 能够在细胞层面上提供高分辨率、高灵敏度的图像信息, 是一种广泛应用于生物科学和临床医学的生物成像方法^[3]。目前, 用于标记的荧光探针染料主要有荧光素类^[4]、罗丹

明类^[5]、氟硼荧类^[6]、三苯胺类^[7]等。其中, 三苯胺类衍生物成为化学分析领域的研究热点之一^[8-9]。

三苯胺是由具有 1 对孤对电子的氮原子与 3 个苯环连接形成的分子, 由于单键的可旋转性, 分子整体呈螺旋桨结构。三苯胺苯环的 3 个对位很容易发生芳环的亲电取代反应生成三苯胺衍生物。由于其结构的特殊性, 使得三苯胺类化合物具有离子化电位较低、空穴迁移率较高、给电子性和空穴传输性能良好、光稳定性好等特点。因而可应用于构筑具有不同性能的光电材料^[10]。由于三苯胺中氮原子是 sp^3 杂化, 使得三苯胺分子具有非平面的螺旋桨结构, 故三苯胺衍生物具有构象多样性。三苯胺类衍生物作为非线性光学材料^[11]、空穴传输材料^[12]、有机发光材料^[13]等, 已被广泛应用于三维光存储^[14]、静电印刷^[15]、发光器件^[16-17]等领域。此外, 三苯胺类化合物在有机染料^[18-19]、医药中间体^[20]、双光子荧光材料^[21-22]及电化学反应的催化剂等方面也具有广阔的应用前景。

本文通过 Vilsmeier-Haack 反应和 McMurry 偶联反应合成了含有一个碳碳双键和两个三苯胺的化合物 1, 2-二(三苯胺基)乙烯 (TPAS), 合成路线如下所示, 并采用紫外-可见光谱、荧光光谱、扫描电镜、MTT 法对 TPAS 的光学性质和细胞成像进行了考察。



1 实验部分

1.1 试剂与仪器

三苯胺 (TPA, 质量分数 98%)、三氯氧磷 ($POCl_3$, 质量分数 98%), 上海萨恩化学技术有限公司; 四氯化钛 (质量分数 98%), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 锌 (AR), 天津市凯通化学试剂有限公司; 碳酸氢钠 (AR), 国药集团化学试剂有限公司; 培养基混合液, 甘肃省中医药院大学; 四氢呋喃 (THF)、正己烷、石油醚、丙酮 (DMK)、二甲基亚砜 (DMSO)、乙酸乙酯、*N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF), AR, 北京化工厂。

UV-3100 型紫外-可见分光光度计, 日本 Shimadzu 公司; JSM-3500 型扫描电镜, 日本 JEOL 公司; Bruker AV-400 型核磁共振波谱仪, 600 MHz, 瑞士 Bruker 公司; Ultra Plus 扫描电镜, 德国 Zeiss 公司; Fluorosens 2003 荧光光谱仪, 德国 Leica 公司。

1.2 DPBD (II) 的合成

将 4.91 g (20 mmol) 三苯胺与 16 mL *N,N*-二甲基甲酰胺加入圆底烧瓶内, 冰水浴 10 min, 然后将 16 mL 三氯氧磷逐滴加入到反应液中, 滴毕, 在氮气保护下, 80 °C 反应 10 h。用蒸馏水猝灭反应, 抽滤, 收集滤渣并用二氯甲烷溶解, 加蒸馏水萃取数次, 收集有机相, 并用无水硫酸镁干燥, 减压浓缩, 柱层析分离 (洗脱剂: 石油醚和乙酸乙酯体积比为 100 : 1), 旋除溶剂, 纯化后的产物为淡黄色粉末 4-醛基三苯胺 (DPBD), 产率为 89%。¹H NMR (600 MHz, $CDCl_3$), δ : 9.81 (s, 1H), 7.67 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.32~7.36 (t, 4H), 7.15~7.19 (m, 6H), 7.01 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H)。¹³C NMR (150 MHz, $CDCl_3$), δ : 190.38, 153.33, 146.19, 131.27, 129.70, 129.10, 126.29, 125.08, 119.33。IR (KBr), ν/cm^{-1} : 3064, 2824, 2725, 1589, 1263, 826, 751, 698。

1.3 TPAS (III) 的合成

将 819 mg (3 mmol) DPBD 溶于 1 mL 干燥的四氢呋喃里备用。向 100 mL 三口瓶中加入 585 mg (9 mmol) 锌, 氮气保护下加入 30 mL 无水四氢呋喃, 0 °C 下搅拌 30 min 后, 用针管向反应瓶中注入 2.1 mL 四氯化钛, 之后水浴加热升温至 60 °C, 再逐滴加入 DPBD 的四氢呋喃溶液, 氮气保护下回流 3 h。反应结束后, 待反应液冷却, 用二氯甲烷和摩尔分数为 10% 的碳酸氢钠水溶液萃取, 留有机相, 旋蒸, 柱层析法分离提纯 (洗脱剂: 石油醚), 旋除溶剂, 得黄色粉末状产物 TPAS, 产率为 46%。¹H NMR (600 MHz, $CDCl_3$), δ : 7.36 (d, $J = 8.6$ Hz, 4H), 7.24~7.27 (m, 8H), 7.10 (d, $J = 7.7$ Hz, 8H), 7.03 (m, 8H), 6.94 (s, 2H)。¹³C NMR (150 MHz, $CDCl_3$), δ : 147.56, 147.02, 131.88, 129.22, 127.10, 126.57, 124.37, 123.71, 122.90。IR (KBr), ν/cm^{-1} : 3065, 3037, 1586, 1504, 1493, 1217, 823, 722, 701。

1.4 光学性质测试

荧光测试在荧光光谱仪上完成, 紫外测试在紫外-可见分光光度计上完成。分别测定化合物 TPAS 的固体粉末与其在稀溶液中的荧光光谱与紫外可见光谱。

TPAS 稀溶液的浓度在 $1.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-5}$ mol/L 之间, 溶剂为四氢呋喃。选取了 6 种不同极性的溶剂进行测试, 不同溶剂的 TPAS 稀溶液浓度为 1.0×10^{-5} mol/L。

1.5 聚集态荧光考察

测定 TPAS 在不同水体积分数的四氢呋喃溶液中的荧光强度, 并计算 TPAS 的荧光强度。测试时的激发波长为 380 nm, 浓度为 1.0×10^{-5} mol/L。

1.6 细胞毒性测试

细胞毒性测试在合作单位甘肃省中医院大学完成, 选择人肺癌细胞 (A549), 采用 MTT 法^[23]检测

TPAS 的细胞毒性, MTT 化学名为 3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐。MTT 能够被活细胞中的酶还原为蓝紫色的 Formazan 晶体, 通过测试细胞吸光度来获得探针毒性的相关信息。

将 A549 细胞种于 96 孔培养板中 (接种密度为 1×10^5 /孔), 放入 37°C 的培养箱里培养 12 h。将 MTT 以 PBS 做溶剂配成浓度为 5 g/L 的溶液。分别向接种好的细胞里加入含有不同浓度 TPAS 的含 MTT 液的培养基混合液 (TPAS 的浓度依次为 0、1、10、30、50、70 和 $100 \mu\text{mol/L}$), 孵育 48 h, 倒扣 96 孔培养板除去多余的 MTT 液, 然后向各孔分别加入 $150 \mu\text{L}$ 二甲基亚砜 (DMSO) 溶液, 用荧光免疫分析仪检测 490 nm 处各孔的吸光度, 从而检测化合物 TPAS 的细胞毒性。

1.7 细胞成像实验

将接种好的 A549 细胞 (接种密度: 1×10^5 /孔) 培养 12 h 后, 贴壁加入含有 TPAS 的培养基混合液 (TPAS 浓度为 $1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$), 孵育 0.5 h 后, 在倒置荧光显微镜下观察并记录。

2 结果与讨论

2.1 光学性质测定

2.1.1 固体光学性质测试

化合物 TPAS 固体的紫外和荧光光谱图如图 1a 所示, 固体 TPAS 在日光灯和紫外灯下的照片如图 1b 所示。从图 1a 可以看出, TPAS 在紫外区有较好

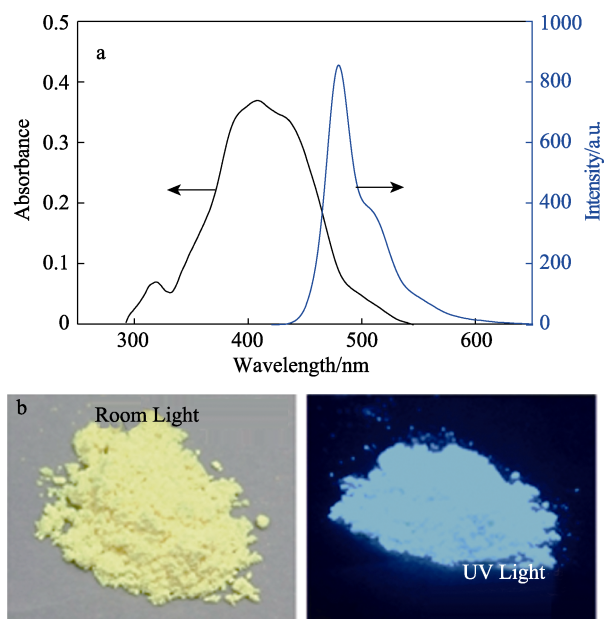


图 1 固体 TPAS 的紫外吸收和荧光光谱图 (a); 固体 TPAS 在日光灯和紫外灯下的照片 (b)

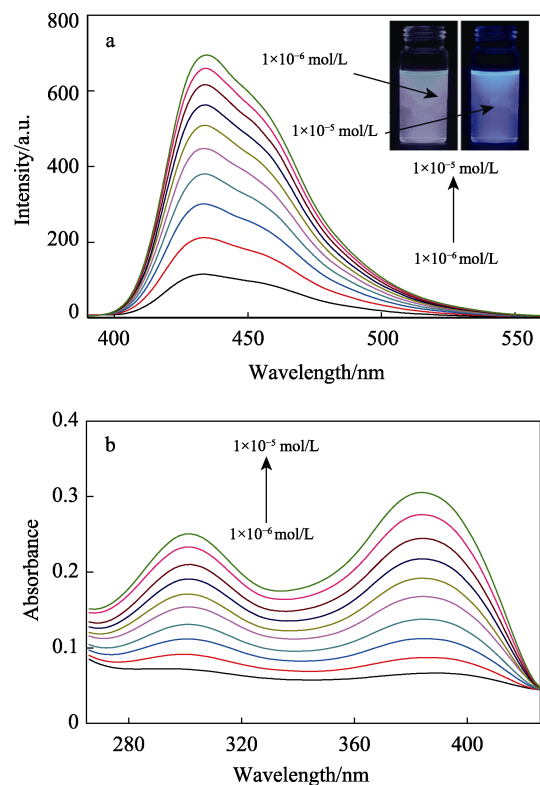
Fig. 1 UV-vis absorption and PL spectra of TPAS powders (a); photographs of TPAS powders taken under room light and UV light (b)

吸收, 固体紫外吸收主要出现在 407 nm 处, 为分子大共轭体系的 $\pi-\pi^*$ 电子跃迁所致。在 318 nm 处出现了 1 个小肩峰, 为 N 原子上孤对电子的 $n-\pi^*$ 跃迁所致^[24]。化合物有很强的荧光发射, 其最大发射峰在 479 nm 处, 由图 1b 可知, 荧光发射为蓝光。

2.1.2 液体光学性质测试

荧光材料在稀溶液中一般存在以下规律: 当溶液中荧光材料的浓度小于一定范围时, 荧光强度与荧光材料的浓度成正比关系^[25]。为了验证 TPAS 在稀溶液中是否存在此规律, 测试了一系列不同浓度 TPAS 溶液的荧光和紫外光谱, 结果如图 2a、b 所示。图中可看出, 随着溶液浓度的增大, 紫外吸光度逐渐增大, 荧光也逐渐变强。说明在 $1.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 内, 溶液的荧光强度与其浓度成正比。通过作 433 nm 处相对荧光强度与浓度的线性拟合图, 如图 2c 所示, 其中, I_0 是 TPAS 浓度为 $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 时的荧光强度 (114.12), I 是 TPAS 的浓度在 $2.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 范围的荧光强度, 将 I/I_0 的值定义为相对荧光强度。由图 2c 可知, 433 nm 处荧光强度与浓度的线性关系较好, 得到线性方程为 $y=0.53917x+0.97333$, R^2 为 0.99282, 说明 TPAS 在稀溶液中 (TPAS 浓度在 $2.0 \times 10^{-6} \sim 9.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$) 的荧光强度正比于浓度, 且呈线性系。

考察了 TPAS 的溶剂化效应, 分别将 TPAS 溶于石油醚、正己烷、乙酸乙酯、丙酮、DMF 以及 DMSO 6 种溶剂中, 荧光测试结果如图 3 所示。



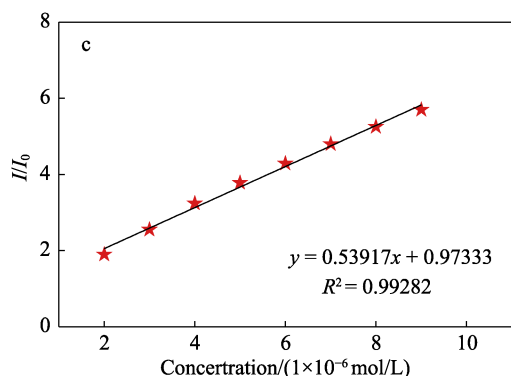


图2 (a)不同浓度TPAS的荧光谱图(激发波长为380 nm)(插图为TPAS浓度分别为 1.0×10^{-6} mol/L和 1.0×10^{-5} mol/L时在紫外灯下的照片);(b)不同浓度TPAS的紫外吸收谱图;(c)在433 nm处不同浓度TPAS的荧光相对强度与浓度的线性拟合图

Fig. 2 (a) PL spectra of TPAS with different concentrations in THF ($\lambda_{ex}=380$ nm) (the insets are photographs of 1×10^{-6} mol/L and 1×10^{-5} mol/L TPAS under UV light); (b) UV-vis absorption spectra of TPAS with different concentrations; (c) Plot of (I/I_0) values of TPAS with different concentrations at 433 nm

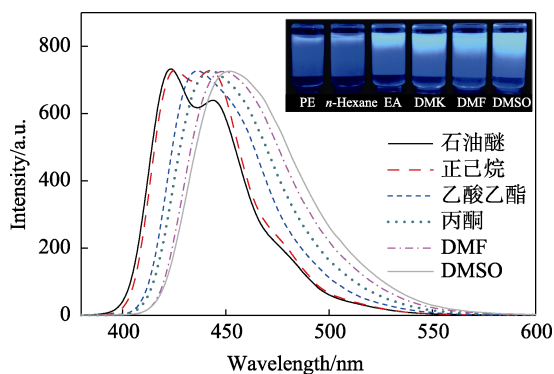


图3 TPAS在不同溶剂中的荧光谱图(插图为不同溶剂的TPAS在紫外灯下的照片)(激发波长 $\lambda_{ex}=380$ nm,浓度为 1.0×10^{-5} mol/L)

Fig. 3 PL spectra of TPAS in different solvents (the inset is photographs of TPAS under UV light) ($\lambda_{ex}=380$ nm, concentration: 1×10^{-5} mol/L)

由图3可知,在非极性溶剂,如石油醚和正己烷中,最大发射峰的右侧各有一个肩峰,在乙酸乙酯等极性溶剂中没有肩峰出现,且随着溶剂极性增大,化合物TPAS的溶液荧光最大发射峰发生红移。结果表明,不同溶剂对于TPAS溶液的荧光强度有影响。进一步分析了不同溶剂对TPAS荧光发射波长的影响,考察了化合物的荧光发射光谱与溶剂极性之间的关系,通过以下方程计算溶剂极性(Δf)^[26]:

$$\Delta f = f(\varepsilon) - f(n^2) \approx \frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1}$$

式中: ε 、 n 分别表示静电介电常数和溶剂的折光率。

溶剂极性由小到大的顺序依次为石油醚 < 正己烷 < 乙酸乙酯 < 丙酮 < DMF < DMSO。图3中,化

合物TPAS在石油醚中的最大发射峰位于423 nm。随着溶剂极性增大,化合物TPAS的溶液荧光最大发射峰发生红移,在二甲基亚砷中的最大发射峰位于452 nm。实验结果说明,化合物TPAS有溶剂化效应,但波长红移不大,说明其溶剂化效应不强,并且其溶液在紫外灯下的荧光并无明显的颜色变化,表明TPAS有良好的光稳定性。

2.1.3 聚集态荧光性质探究

检测TPAS在水和四氢呋喃不同体积比的溶液中的荧光强度^[27],结果如图4所示。由图4可知,水的体积分数从0增大到50%的过程中,TPAS溶液的荧光强度缓慢减弱;但是水的体积分数从50%增加到60%时,溶液的荧光急剧猝灭,水的体积分数达到80%时,荧光强度降低30倍。这是因为:一方面,TPAS分子自身不溶于水而溶于四氢呋喃中,水的体积分数增大,引起分子聚集导致荧光猝灭;另一方面,TPAS溶液的荧光受溶剂极性影响,水体积分数增大的同时溶剂极性随之增加,荧光猝灭,溶液的最大荧光发射波长有较小红移。

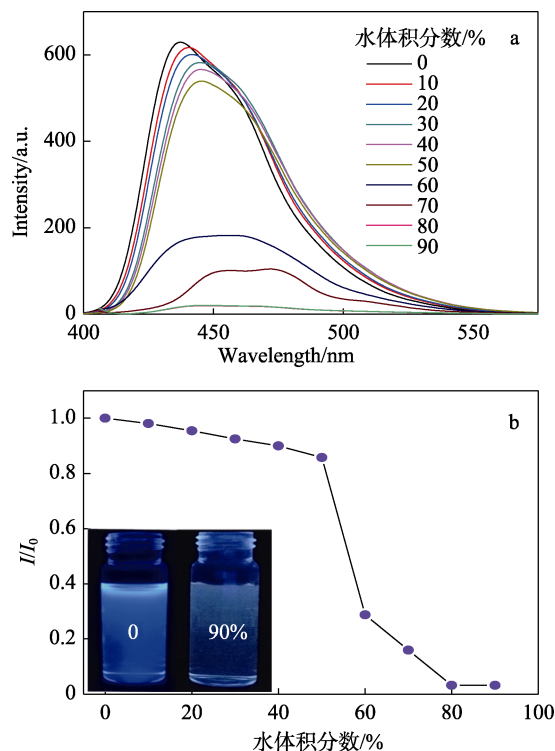


图4 (a)TPAS在含不同体积分数水的四氢呋喃溶液中的荧光谱图;(b)TPAS的相对荧光强度(插图为水体积分数分别为0和90%时TPAS溶液在紫外灯下的照片)

Fig. 4 (a) PL spectra of TPAS with different water fractions in THF; (b) Plot of (I/I_0) values versus of TPAS in THF/water system (the inset shows the image of TPAS in THF/water system under UV light, the volume fraction of water is 0% and 90%, respectively)

TPAS 在水的体积分数为 0 和 90% 的四氢呋喃溶液中的扫描电镜图见图 5a、b，插图是图 5b 中 TPAS 的放大图片。可以看出，在纯的四氢呋喃溶液中 TPAS 溶解性强，分子呈现良好的分散状态（图 5a）。随着水体积分数逐渐变大，TPAS 由于疏水作用而开始聚集。本文以水体积分数为 90% 时的样品为例观察其形貌。结果发现，混合溶剂中聚集的 TPAS 在 SEM 测试制样过程中随着溶剂挥发而大量聚集，从而形成不规则的棒状或花瓣状形貌（图 5b）。

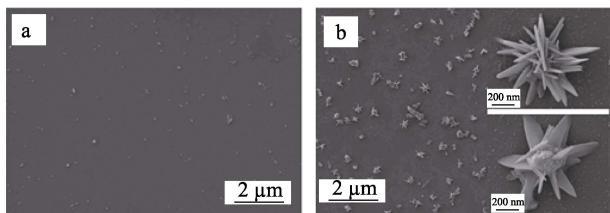


图 5 TPAS 在水的体积分数为 0 (a) 和 90% (b) 时的扫描电镜图片

Fig. 5 SEM images of TPAS in THF/water system (a) the volume fraction of water is 0, (b) the volume fraction of water is 90%

2.2 细胞成像

2.2.1 细胞毒性评价

为了进一步探究探针分子在生物体内的应用潜力，本文测试了 TPAS 对 A549 细胞的毒性，结果如图 6 所示。由图 6 可知，细胞的存活率随着 TPAS 探针浓度的增大而降低，但是细胞的存活度都在 80% 以上，表明化合物 TPAS 对细胞的毒性较小。当探针的浓度为 1.0×10^{-5} mol/L 时，细胞发出强的蓝色荧光，且细胞具有 95% 以上的存活率。因此，选择 TPAS 探针的细胞成像浓度为 1.0×10^{-5} mol/L。

为了测试 TPAS 分子是否能进入细胞，本文测试了 TPAS 在水溶液中的粒径分布情况，结果见图 7。由图 7 可知，TPAS 在浓度为 1.0×10^{-5} mol/L 时，动态光散射测试得到 TPAS 分子截面的直径为 15.3 nm，分散系数 (PDI) 为 0.956，说明 TPAS 分子在水溶液中聚集形成的纳米颗粒尺寸较小，分布均匀，易于进入细胞。

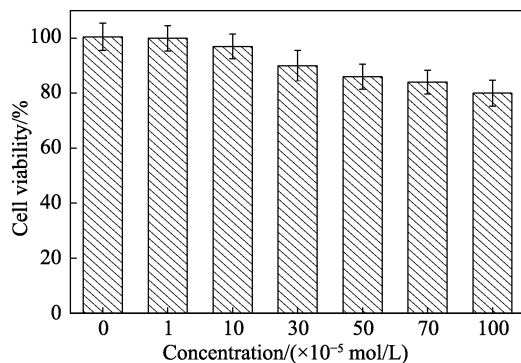


图 6 不同浓度的 TPAS 对 A549 细胞的毒性效应
Fig. 6 Cell viabilities of A549 cells treated with different concentrations of TPAS

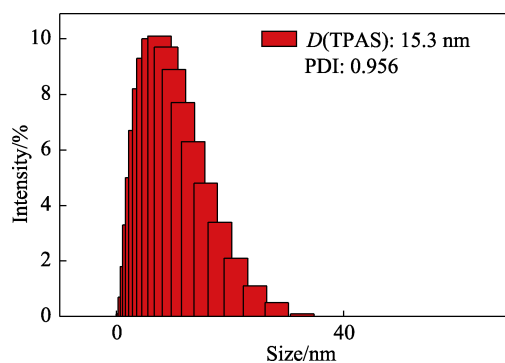
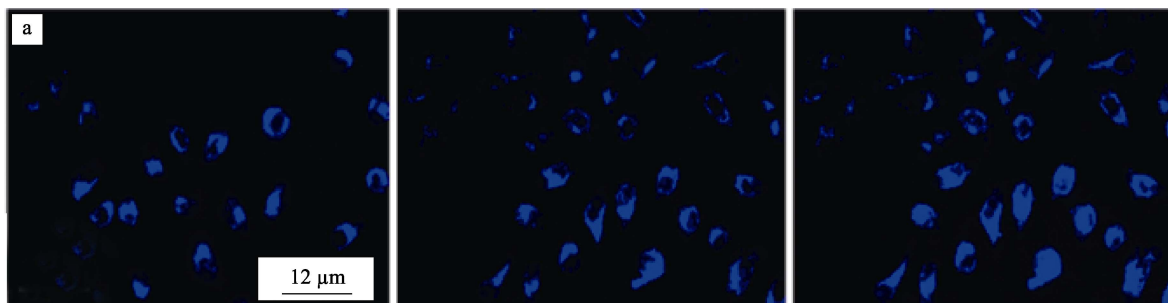


图 7 TPAS 在水溶液中的粒径分布 (TPAS 浓度为 1.0×10^{-5} mol/L)

Fig. 7 Particle size distribution of 1×10^{-5} mol/L TPAS in water

2.2.2 TPAS 对 A549 细胞成像测试

将化合物 TPAS 应用于 A549 活细胞成像，将培养好的 A549 细胞在 37°C 下用 1.0×10^{-5} mol/L 的 TPAS 孵育 30 min，通过倒置荧光显微镜观察，TPAS 对 A549 细胞成像情况，结果见图 8。由图 8 可看到，大多数细胞都能观察到很强的荧光。TPAS 进入细胞后荧光发光区主要集中在核周围，TPAS 均匀地分散在细胞质中并发出蓝色荧光，表明 TPAS 有良好的生物相容性。荧光猝灭 30 min 后，通过高倍镜观察到荧光发光强的区域集中于细胞一侧的细胞质中，如图 8b 所示。以上结果表明，TPAS 可轻易穿透细胞膜，染色过程快速且操作简便。



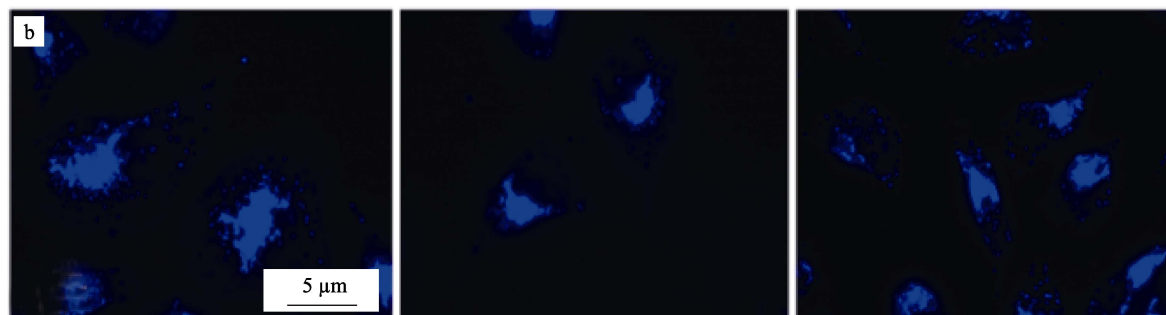


图 8 TPAS 作为荧光探针用于 A549 活细胞成像图片, (a) 放大倍率为 40 倍, (b) 放大倍率为 100 倍

Fig. 8 Images of A549 cells stained with TPAS, the fluorescence images were taken at magnifications of (a) with a magnification of 40 times, (b) with a magnification of 100 times

3 结论

通过 Vilsmeier-Haack 反应和 McMurry 反应合成了 1 个由双键桥连接了 2 个三苯胺基团的荧光探针 TPAS。TPAS 分子在稀溶液中表现出聚集荧光猝灭 (ACQ) 性质, 而其固体却有强的蓝色荧光。TPAS 分子光稳定性好、尺寸小、细胞毒性低、分布均一且易穿透细胞膜。作为荧光探针能实现对 A549 活细胞高灵敏度、高分辨率的成像。这些研究结果可以为细胞跟踪器的设计提供理论依据, 并帮助更深入的理解生物问题。

参考文献:

- [1] Zhou X, Lee S, Xu Z, *et al.* Recent progress on the development of chemosensors for gases[J]. *Chemical Reviews*, 2015, 115(15): 7944-8000.
- [2] Chan J, Dodani S C, Chang C J. Reaction-based smallmolecule fluorescent probes for chemoselective bioimaging[J]. *Nature Chemistry*, 2012, 4(12): 973-984.
- [3] Goswami S, Das S, Aich K, *et al.* Chemodosimeter for the ratiometric detection of hydrazine based on return of ESIPT and its application in live-cell imaging[J]. *Organic Letters*, 2013, 15(21): 5412-5415.
- [4] Kambam S, Wang B, Wang F, *et al.* A highly sensitive and selective fluorescein-based fluorescence probe for Au³⁺ and its application in living cell imaging[J]. *Sensors and Actuators B*, 2015, 209: 1005-1010.
- [5] Li X M, Zhao R R, Yang Y, *et al.* A rhodamine-based fluorescent sensor for chromium ions and its application in bioimaging[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2017, 28(6): 1258-1261.
- [6] Bessette A, Hanan G S. Design, synthesis and photophysical studies of dipyrromethene-based materials: Insights into their applications in organic photovoltaic devices[J]. *Chemical Society Reviews*, 2014, 43(10): 3342-3405.
- [7] Ma H, Yang M, Zhang C, *et al.* Aggregation-induced emission (AIE)-active fluorescent probes with multiple binding sites toward ATP sensing and live cell imaging[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2017, 5(43): 8525-8531.
- [8] Wang Y G, Zhou K J, Huang G, *et al.* A nanoparticle based strategy for the imaging of a broad range of tumours by nonlinear amplification of microenvironment signals[J]. *Nature Materials*, 2014, 13(2): 204-212.
- [9] Yao J, Yang M, Duan Y. Chemistry, biology, and medicine of fluorescent nanomaterials and related systems: new insights into biosensing, bioimaging, genomics, diagnostics, and therapy[J]. *Chemical Reviews*, 2014, 114(12): 6130-6178.
- [10] Li J, Ma C, Tang J, *et al.* Novel starburst molecule as a hole injecting and transporting material for organic light-emitting devices[J]. *Chemistry of Materials*, 2005, 17(3): 615-619.
- [11] Ghale G, Nau W M. Dynamically analyte-responsive macrocyclic host-fluorophore systems[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2014, 47(7): 2150-2159.
- [12] Wang Y X, Shyy J Y J, Chien S. Fluorescence proteins, live-cell imaging, and mechanobiology: Seeing is believing[J]. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2008, 10(1): 1-38.
- [13] Borisov S M, Wolfbeis O S. Optical biosensors[J]. *Chemical Reviews*, 2008, 108(2): 423-461.
- [14] Shrey Sindhwani, Abdullah Muhammad Syed, Stefan Wilhelm, *et al.* Three-dimensional optical mapping of nanoparticle distribution in intact tissues[J]. *ACS Nano*, 2016, 10(5): 5468-5478.
- [15] Yasuhiro Kubota, Masahiro Tsukamoto, Katsuhiro Ohnishi, *et al.* Synthesis and fluorescence properties of novel squarylium-boron complexes[J]. *Organic Chemistry Frontiers*, 2017, 8(4): 1522-1527.
- [16] Ma H C, Yang Z M, Cao H Y, *et al.* One bioprobe: A fluorescent and AIE-active macromolecule; two targets: nucleolus and mitochondria with long term tracking[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2017, 5: 655-660.
- [17] Wang H, Xie L, Peng Q, *et al.* Novel thermally activated delayed fluorescence materials—thioxanthone derivatives and their applications for highly efficient OLEDs[J]. *Advanced Materials*, 2014, 26(30): 5198-5204.
- [18] Ma H C, Yang Z M, Cao H Y, *et al.* Triphenylamine-based fluorescent sensors for CO₂ response and detection of F⁻ with high sensitivity and selectivity[J]. *Dyes and Pigments*, 2017, 140: 131-140.
- [19] Ma H C, Ma Y, Li W F, *et al.* Triphenylamine-based fluorescent soft matter: interlaced methyl cinnamate groups as the dominant interaction tools for gel formation[J]. *Macromolecular Chemistry & Physics*, 2014, 215(23): 2305-2310.
- [20] Cao Yuanle, Yang Mingdi, Wang Yang, *et al.* Aggregation-induced and crystallization-enhanced emissions with time-dependence of a new Schiff-base family based on benzimidazole[J]. *Journal of Materials Chemistry C*, 2014, 2(19): 3686-3694.
- [21] König K, Ehlers S, Riemann I, *et al.* Clinical two-photon microendoscopy[J]. *Microscopy Research & Technique*, 2007, 70(5): 398-402.
- [22] Hwan Myung Kim, Bong Rae Cho. Small-molecule two-photon probes for bioimaging applications[J]. *Chemical Reviews*, 2015, 115(11): 5014-5055.
- [23] Tim Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. *Journal of Immunological Methods*, 1983, 65(1): 55-63.
- [24] Zhang J F, Chen R, Zhu Z L, *et al.* Highly stable near-infrared fluorescent organic nanoparticles with a large Stokes shift for noninvasive long-term cellular imaging[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, 7(47): 26266-26274.
- [25] Drobizhev M, Karotki A, Dzenis Y, *et al.* Strong cooperative enhancement of two-photon absorption in dendrimers[J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2003, 107(31): 7540-7543.
- [26] Duan X F, Zeng J, Lü J W, *et al.* Insights into the general and efficient cross McMurry reactions between ketones[J]. *Journal of Organic Chemistry*, 2006, 71(26): 9873-9876.
- [27] Hu R, Lager E, Aguilar-Aguilar A, *et al.* Twisted intramolecular charge transfer and aggregation induced emission of BODIPY derivatives[J]. *Journal of Physical Chemistry C*, 2009, 113(36): 15845.