

光动力活性氧的研究进展

蒋昕鹏, 戴志飞*

北京大学工学院生物医学工程系, 北京 100871

* 联系人, E-mail: zhifei.dai@pku.edu.cn

2018-03-08 收稿, 2018-04-19 修回, 2018-05-22 接受, 2018-06-14 网络版发表

国家重大科研仪器研制项目(81727803)和国家重点研发计划纳米科技专项(2016YFA0201400)资助

摘要 在光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)治疗癌症的过程中, 由光敏剂介导产生的活性氧起到了关键作用. 本文主要从PDT三要素(光、氧气、光敏剂)所涉及的光敏剂靶向性、光照频率转换、氧气递送等方面介绍了增加靶部位活性氧(reactive oxygen species, ROS)的方法; 总结了用于单线态氧直接检测的光电倍增管、单光子雪崩二极管、负反馈雪崩二极管检测器, 以及间接检测单线态氧、羟基或超氧阴离子的新型荧光或化学探针; 描述了ROS引发的从基因、蛋白质到细胞层面的凋亡信号通路以及免疫反应诱导肿瘤细胞凋亡的作用机制.

关键词 光动力治疗, 活性氧, 单线态氧, 光敏剂, 检测, 作用机制

癌症是一个非常严重的医疗和社会问题. 癌症是全球第2大死因, 据世界卫生组织(WHO)统计, 2015年癌症导致880万人死亡. 从全球情况看, 近1/6的死亡由癌症造成. 因此, 抗癌治癌在提高人类健康水平中显得尤为重要. 传统的肿瘤治疗手段有外科手术、放射治疗、化学治疗, 这些治疗方法对患者有较大的创伤或毒副作用, 且时常治疗效果不佳. 光动力治疗(PDT)则是一种新兴的肿瘤治疗方法, 其基本原理是: 以某一频率的光源(一般为光敏剂的激发光源)照射光敏剂富集的肿瘤部位, 光敏剂吸光后跃迁至激发态, 再与周围的生物分子或氧相互作用产生活性氧(ROS), ROS实现对肿瘤细胞的杀伤作用, 达到治疗肿瘤的目的^[1]. PDT治疗肿瘤时, 光敏剂与光照的双重靶向能够提高其治疗效果. ROS作为PDT中杀伤肿瘤细胞的关键物质, 其产生、含量检测是非常重要的, 目前有多种光敏剂与ROS检测技术处于研究之中. 另外, ROS的抗肿瘤机制也极为复杂, 涉及到多种生化途径与免疫反应. 下文将重点讨论ROS的产生及其影响因素、ROS的检测技术以及ROS的作

用机制.

1 活性氧的基本性质

ROS主要有单线态氧($^1\text{O}_2$)、过氧化氢(H_2O_2)、羟基自由基($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子自由基(O_2^-)、一氧化氮(NO)、次氯酸盐(ClO^-)、过亚硝酸盐(ONOO^-)等. 活性氧能迅速氧化体内的还原性物质, 如不饱和脂质. 除 H_2O_2 和 NO 外, 其他活性氧都具有较短的寿命. $^1\text{O}_2$ 在 H_2O 的寿命是 $2\sim 3.5\ \mu\text{s}$ ^[2], 而 $^1\text{O}_2$ 在细胞中的寿命则更短, 由在细胞膜脂质区域的100 ns到细胞浆的250 ns, 单线态氧在细胞环境中的扩散距离仅仅是45 nm, 因此不能穿过单层细胞膜^[3,4]. 单线态氧在不同溶剂中的寿命如表1所示^[3]. $\cdot\text{OH}$ 的半衰期仅为1 ns, 同时也是活性最高的ROS^[5], $\cdot\text{OH}$ 被认为是高活性氧类(hROS), 因为它们具有强烈的氧化特性, 并且这种化合物能直接氧化核酸, 蛋白质和脂质^[6]. O_2^- 的半衰期为5 s至几百秒^[7], 它也是 H_2O_2 和 $\cdot\text{OH}$ 的前体^[8], $^1\text{O}_2$ 被认为是最具破坏性的ROS之一^[9], 也是PDT中最重要的ROS之一, 在自然状态下衰变为基态氧时能放

引用格式: 蒋昕鹏, 戴志飞. 光动力活性氧的研究进展. 科学通报, 2018, 63: 1783–1802

Jiang X P, Dai Z F. Reactive oxygen species in photodynamic therapy (in Chinese). Chin Sci Bull, 2018, 63: 1783–1802, doi: 10.1360/N972018-00214

表1 单线态氧在不同溶剂中的寿命^[3]Table 1 Lifetime of singlet oxygen in different solvents^[3]

溶剂	单线态氧寿命(μs)
H ₂ O	3.5
甲醇	10
吡啶	33
CF ₃ Cl	1000
氯仿	300
CS ₂	1470
环己烷	23
CD ₃ OD	227
C ₆ D ₆	3900
D ₂ O	68

出1270 nm波长的荧光,这是单线态氧能被直接检测的依据^[2],具体检测方法见下文.活性氧能被某些特殊的淬灭剂淬灭,如叠氮钠(SA,一种单线态氧的猝灭剂)和D-甘露醇(DM,一种羟基猝灭剂).

2 活性氧的产生

2.1 内源性ROS的产生与清除

体内正常情况下约90%的活性氧由线粒体电子传递链(mitochondrial electron transfer chain, mitETC)产生^[10].由ETC产生ROS的产率在细胞缺氧、光刺激、氧再灌注、衰老、线粒体呼吸抑制时均会增加^[11].超过90%的氧气在线粒体中由细胞色素氧化酶还原成水分子,只有一小部分转化为部分还原产物,即活性氧(如超氧化物、氢氧化物、羟基自由基).体内活性氧的产生以及不同活性氧之间可以相互转换^[12],如O₂⁻能由内源超氧化物歧化酶(SOD)转化为H₂O₂.粒细胞与巨噬细胞也产生大量的ROS^[9],ROS也可以由应激因素如肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等诱导产生.

体内存在许多内源性的光敏性物质,常见的内源性光敏性物质主要有黄素(flavin)、卟啉(porphyrin)、视紫红质、醌类化合物等^[9].肿瘤细胞大量表达黄素载体蛋白(riboflavin carrier protein, RCP)^[13],因而肿瘤细胞内黄素含量比较高.核黄素-5-磷酸(FAD)和黄素腺嘌呤二核苷酸(FMN)为内源性光敏物质,黄素在蓝光下能最大程度的被激发,并产生ROS,研究显示^[14],正常光照下,对人体无任何毒性作用.

体内还具有非光依赖性的单线态氧的产生,主要是依赖于巨噬细胞的呼吸爆发,其中NADPH氧化

酶产生O₂⁻,其自发地或酶促地分解成H₂O₂,随后,催化还原成次氯酸(HOCl),最后,H₂O₂与HOCl自发反应生成¹O₂^[9].

活性氧的清除依靠于体内的活性氧清除酶以及非酶抗氧化分子.活性氧清除酶主要有过氧化物酶和超氧化物歧化酶(SOD)^[15],其中SOD有不同金属螯合形式,如Cu-, Zn-, Mn-SOD,其中Mn-SOD的作用最强^[16].细胞的非酶抗氧化分子有尿酸、抗坏血酸、 α -生育酚和含巯基的分子如谷胱甘肽(GSH)、半胱氨酸(Cys)等^[17].

2.2 光敏剂

光敏剂(photosensitizer, PS)是一类能吸收特定波长的光子而从基态跃迁到激发态,随后将吸收的能量转移到附近的氧气分子产生单线态氧,或与周围的物质发生光化学反应,产生活性氧自由基的光敏性化合物.

常用的光敏剂有:基于卟啉的光敏剂包括卟啉、酞菁、二氢卟吩、菌绿素和紫红素;非基于卟啉的光敏剂包括补骨脂素、蒽醌类如金丝桃素和竹红菌素、花青、吩噻嗪鎓化合物如亚甲蓝、尼罗蓝类似物、甲苯胺蓝、罗丹明、三芳基甲烷和吡啶等^[18].第一代光敏剂如二氢卟啉醚和光卟啉^[3],其激发波长短,在体内的滞留时间长,给患者带来极大的不便.第二代光敏剂相对于第一代光敏剂有所改进,甚至具有靶向性^[19].大多数第二代光敏剂也是基于卟啉结构,例如苯并卟啉、紫红素、泰克萨菲瑞、酞菁、萘酞菁和原卟啉IX(PpIX)^[20-22].

2.3 ROS产生机制

外源性ROS有两种产生机制,分别为通过电子转移或能量转移.通过能量转移主要产生单线态氧,而通过电子转移则产生的是除单线态氧之外的其他活性氧自由基,在PDT中分别称为II型PDT与I型PDT.单线态氧产生机制如图1所示:在一定波长光的照射下,光敏剂被激发,然后跃迁回基态,并将能量传递给氧分子,氧分子接受能量后由三线态激发至单线态.单线态氧有两种形式,但最终都以O₂(a¹ Δ_g)的形式存在^[18].单线态氧的浓度与其他因素的关系如下^[23]:

$$[{}^1\text{O}_2](t) = N\sigma[S_0]\phi_D \frac{\tau_D}{\tau_T - \tau_D} (\exp(-t/\tau_T) - \exp(-t/\tau_D)),$$

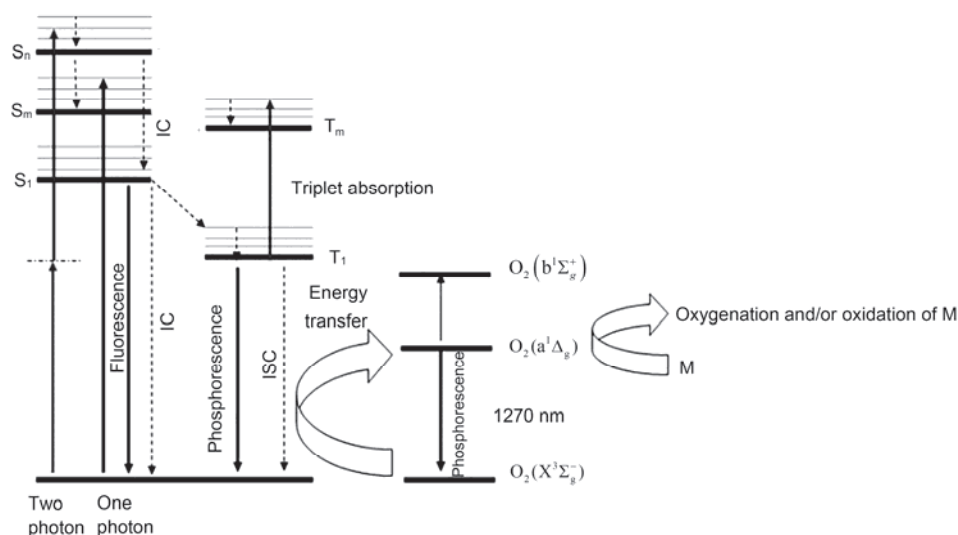


图1 单线态氧产生机制^[18]

Figure 1 The mechanism of singlet oxygen generation^[18]

式中, $[^1\text{O}_2]$ 为 t 时刻的单线态氧浓度, N 为激发脉冲内的光子数, σ 为光敏剂吸收截面, S_0 为光敏剂浓度, ϕ_D 为单线态氧量子产率, τ_T 为光敏剂三线态寿命, τ_D 为单线态氧寿命。

2.4 ROS产生的影响因素及相应光敏剂

由于光敏剂、光与氧气是PDT的三要素, 因此所有与这3个要素相关的因素都能影响ROS的产生, 从而影响PDT疗效。影响PDT疗效的因素有光敏剂的靶向性、ROS产率、水溶性、暗毒性以及肿瘤局部氧气浓度、光照频率、温度、单线态氧的自身淬灭等。

2.4.1 光敏剂靶向性

具有靶向性的光敏剂能在肿瘤部位富集, 提高局部光敏剂浓度与PDT疗效并减少毒副作用。研究表明, 在线粒体中极少量的ROS能比在细胞核中大量的ROS更为有效^[24]。在低剂量的PDT中, 由线粒体呼吸传递链产生的ROS对细胞凋亡起到了很大的作用。随着PDT剂量的增大, 内源性活性氧的作用变得不明显^[25], 因而将光敏剂靶向至线粒体是提高PDT疗效的一个有效方法。光敏剂在不同细胞器定位会引起不同的细胞死亡机制, 研究表明^[22], 当光敏剂主要聚集在线粒体与溶酶体时, 细胞死亡途径主要是凋亡; 当光敏剂聚集在内质网或细胞膜时, 细胞死亡途径分别是自噬和直接死亡。

三苯基膦^[26]具有线粒体靶向性, Tang课题组^[27]将三苯基膦连接到光敏剂使其能靶向到线粒体以选

择性触发线粒体局部ROS爆发, 启动线粒体内在凋亡途径。Chen课题组^[28]合成了一种接上叶酸的酞菁光敏剂, 研究显示其同时具有线粒体与内质网靶向性。

由于肿瘤具有酸性环境, 肿瘤细胞内的pH通常比正常细胞低0.2~1, 因而可据此设计出具有pH敏感性的光敏剂, 使其在酸性环境中起作用。Aoki课题组^[29,30]设计出一种pH敏感性的环金属Ir(III)复合物光敏剂, 含有2-(5'-N,N-二乙氨基-4'-甲基)吡啶配体基团, 结构如图2所示, 该复合物在中性和微酸性环境下(pH 6.5~7.4)显示出相当大的发射强度变化。HeLa-S3细胞的发光显微镜研究表明其可用于选择性染色细胞中的酸性细胞器溶酶体。此外, 还能够以pH依赖性方式产生单线态氧。Jeong课题组^[31]报道了一种pH敏感的MPEG聚(β-氨基酯)聚合物胶束(图3), 这些

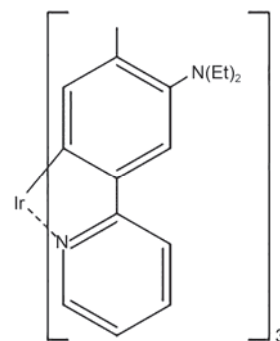
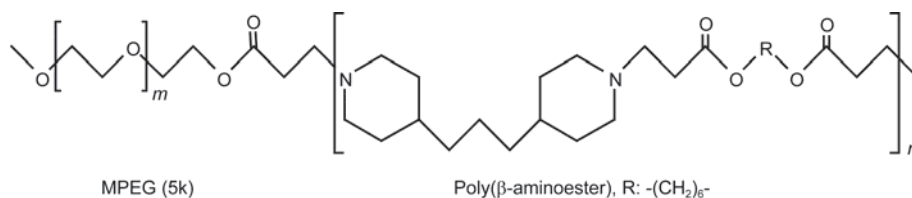


图2 pH敏感环金属铱复合物光敏剂^[29,30]

Figure 2 A pH sensitive ring metal Iridium complex photosensitizer^[29,30]

图3 pH敏感聚合物胶束^[31]Figure 3 A pH sensitive polymer micelle^[31]

胶束在肿瘤的酸性胞外pH下显示出很强的依赖于pH的胶束解聚, 因为疏水氨基酯嵌段中的叔胺基团($pK_b=6.5$)在pH低于6.5的酸性条件下被质子化。

另外将光敏剂与靶向性抗体或多肽、靶向性生物小分子连接均能提高PDT效果。如近红外酞菁蓝光敏剂IR700和靶向于表皮生长因子的单克隆抗体相结合^[32], 卟啉光敏剂与IgG抗体结合具有人表皮生长因子受体2(HER2)靶向性^[33]。Tsai课题组^[34]以肝素、磷脂和组氨酸作为光敏剂的载体合成了一种pH敏感胶束, 并有效地防止光敏剂聚合。Varchi课题组^[35]将光敏剂与非甾体抗雄激素分子连接用于前列腺癌的治疗。Ouk课题组^[36]合成了由多黏菌素B的衍生物与阳离子卟啉共价连接组成的新型化合物, 并且这种化合物具有增强的活性和靶向性质。磺化的聚乙烯醚亚胺也可与光敏剂结合用于靶向至选择素、膜黏附蛋白等^[37]。也有使用非感染病毒作为靶向载体如Steinmetz课题组^[38]将天然非感染性纳米颗粒豇豆花叶病毒(CPMV)用于改善黑色素瘤治疗。

2.4.2 氧气浓度

由于ROS的产生尤其是单线态氧的产生, 需要利用大量的氧气, 而肿瘤组织却由于其生长代谢旺盛, 形成了一个缺氧的环境, 而许多有机光敏剂在缺氧条件下难以产生单线态氧, 并且能和单线态氧反应即光漂白, 同时降低光敏剂和ROS浓度, 这使得其PDT疗效显著下降^[39-41]。因此, 如果能在PDT过程中增加氧气浓度, 将大大提高PDT效果。目前也有一系列关于解决PDT过程中缺少氧气问题的研究与报道。Achilefu课题组^[42]将钌复合物(N3)接到二氧化钛(TiO_2)纳米粒子上, 形成 TiO_2 -N3纳米粒子, 在光照下, N3将电子传递至 TiO_2 , 同在160 mmHg(1 mmHg=133.2 Pa)氧气浓度下, 产生比单独的 TiO_2 分别多3和4倍的羟基自由基和过氧化氢, 而在缺氧的条件下也能产生比单独的 TiO_2 多3倍的羟基自由基, 单线态氧产率基本不变。接上N3后的 TiO_2 纳米粒子将原本单

独 TiO_2 的一二型PDT转化为以一型PDT为主, 从而更少地依赖于氧气。

全氟化碳(PFC)具有优良的载氧能力, 有许多利用全氟化碳增加氧气在肿瘤部位浓度的报道。Hu课题组^[43]将光敏剂用全氟化碳纳米粒包裹, 发现光动力效果大大增强。随后, Hu课题组^[44]研制了一种新型氧自我富集的仿生红细胞(生物红细胞), 能产生荧光, 成像引导光热治疗和增强光动力治疗效果。它由含有吲哚菁绿(ICG)和PFC的红细胞膜和白蛋白纳米粒子(IPH)组成。红细胞膜成功包覆在纳米粒子上后, 由于红细胞膜中蛋白质的保留, 生物红细胞可以有效地降低巨噬细胞的免疫清除率, 并延长体内循环时间, 寿命更长, 氧气容量更高的新型生物红细胞可以显著地积聚在肿瘤上。另外, 高容量的PFC可以提供更多的氧气, 产生更多的 1O_2 , 延长其寿命, 增强PDT疗效。Huang课题组^[45]将五氟苯基和聚乙二醇(PEG)连接上卟啉, 发现能改善PDT过程中的缺氧, 增强PDT效果。

Zhang课题组^[46]合成了以碳纳米管(C3N4)为基础的多功能纳米复合材料(PCCN), 增强了红区吸收, 可用于光驱动水分解产生氧气。然后, 合成含有原卟啉的聚乙二醇链段和靶向Arg-Gly-Asp模体并引入碳点掺杂的C3N4纳米粒子, 体内外实验表明能够提高活性氧产率, 逆转缺氧导致的PDT耐受。

为了使光诱导的缺氧最小化, 光还可以被间歇地引入(部分PDT)以允许细胞补充氧。因此, Akkaya课题组^[47]使用了2-吡啶酮模块用于捕获单线态氧, 在光循环中, 2-吡啶酮的内过氧化物与单线态氧一起产生; 在暗循环中, 内过氧化物经历热循环逆转生成单线态氧与2-吡啶酮模块。

2.4.3 光照频率

光照频率会影响到光的组织穿透性以及光敏剂的激发, 波长偏向红外的光, 其组织穿透性越强, 在600 nm以下时, 光穿透深度不足5 mm, 不能用于

深部肿瘤,且对组织具有较大毒性;而当光照波长在650~1000 nm时,显示出良好的穿透性,因而将650~1000 nm这段波长称为治疗窗波长^[48],激发波长在治疗窗内的光敏剂具有更好的PDT疗效。

上转换纳米粒(UCNP)可以将近红外光(NIR)吸收转化为UV-Vis发射,与相应光敏剂结合用于PDT。UCNP系统^[49]具有较大的转换范围,能转换从近红外至波长更短的近红外、近红外至可见、甚至近红外至紫外发射,并且发出的光具有不间断、不散射等优点。因为NIR是生物组织的透明窗口,NIR可以较深入地穿入组织,而较多光敏剂的激发波长较短(600 nm左右),这就需要UCNP将光的波长进行转换。如TiO₂在275~390 nm光激发下能产生大量ROS,将TiO₂包上UCNP则能在较长波长激发下产生大量ROS^[50~52]。一种掺杂了镧系元素铽(Tm)的UCNP用来包裹TiO₂,UCNP能将980 nm波长处的近红外光转换为紫外光,激发TiO₂产生大量的ROS尤其是O₂^{·-}^[27]。Loh课题组^[53]将上转换纳米粒子与光敏剂二氢卟吩e6(Chlorin e6, Ce6)共价结合能用于深部组织PDT。然而共价结合的载药量很小,疏水性的光敏剂可以依靠分子间的吸附作用连接。Liu课题组^[54]将Ce6用两亲性分子C₁₈PMH-PEG的烷基端装载,得到UCNP-Ce6分子具有很好的PDT效果,在980 nm波长光照射下,能穿透8 mm厚的组织并保持50%的单线态氧产率。Chen课题组^[55]制备表面带Ln³⁺正电荷的UCNPs,可以与带负电荷的羧基锌酞菁(ZnPc-COOH)吸附结合,有96.3%的能量转换效率。用聚合物层修饰UCNP可以赋予其他功能,例如生物相容性、体内稳定性或药物递送能力^[56]。

双光子吸收(TPA)是指在脉冲激光器所产生的超强激光的焦点处,2个光子能同时激发1个分子,而焦点外的其他地方的能量不足以产生双光子吸收,双光子激发所用光的波长较长,组织穿透性很好,且相应的单光子过程不能发生,因此,双光子过程具有良好的空间选择性。相应的双光子吸收光敏剂也具有较多的研究。有直接通过双光子激发的光敏剂,也有通过激发具有较大双光子吸收截面(TPACS)的物质,通过荧光共振能量转移(FRET)间接激活光敏剂。

一些稀有金属(如钇、钼等)具有双光子吸收产生单线态氧性能,但这些重金属有较大毒性,不适用于临床;另一方面,有机光敏剂通常具有较低的双光子吸收截面(<50 GM),这就需要合成一些具有扩展的 π

共轭结构的光敏剂,直接增强TPA截面,或将光敏剂与具有大TPA的光捕获单元(例如聚合物点/半导体量子点和金纳米结构)结合。

Chao课题组^[57]合成了能被谷胱甘肽(GSH)激活的钌(II)-偶氮(ruthenium(II)-azo, Ru-azo)复合物光敏剂,其能在810 nm波长下实现双光子激发,在450 nm波长下实现单光子激发,并且Ru-azo结构中的偶氮键只有在被谷胱甘肽还原的条件下才能显示出很强的荧光强度与光动力效果,肿瘤细胞中的谷胱甘肽含量相对较高,这更有利于Ru-azo在肿瘤细胞中发挥作用。在Ru-azo的吸收光谱中,最大吸收波长有572和450 nm,当加入GSH后,450和572 nm的吸光度分别逐渐增加和减少,并且以1:2的摩尔比加入GSH后,在640 nm处的荧光发射强度增大50倍。

Qian课题组^[58]合成了一种可发射红色荧光的光敏剂四苯乙烯(tetraphenylethylene, TPE-red),与传统的聚集淬灭不同,这种光敏剂具有聚集诱导发光^[59]的特点。TPE-red用聚苯乙烯-马来酸酐(PSMA)包裹,形成TPE-red-PSMA纳米粒子,在1040 nm处具有很大的双光子吸收截面。

某些光敏剂TPACS较小,如一种卟啉类光敏剂5,10,15,20-四(1-甲基-4-吡啶鎓)卟啉(5,10,15,20-tetrakis(1-methyl 4-pyridinio) porphyrins, TMPyP)的TPACS仅为110 GM,不适合双光子激发,而碳纳米点在700 nm下的TPACS为15000 GM,适合于双光子激发,将碳量子点(CDot)与TMPyP通过静电结合,形成CDot-TMPyP复合物,在飞秒激光的激发下,通过FRET,激发TMPyP,所产生的单线态氧比单纯的TMPyP更多^[60,61]。Zhu课题组^[62]也同样将双光子吸收超支化共轭聚合物(hyperbranched conjugated polymer, HCP)核和温度敏感的超支化聚醚(hyperbranched polyether, HPE)外壳组合成HCP@HPE纳米粒,并且成功地实现了由HCP到Ce6的FRET过程的NIR双光子的门控。

2.4.4 光敏剂单线态氧产率

光敏剂的单线态氧产率根本上来说由光敏剂结构决定。已有研究发现,同类光敏剂修饰上不同的取代基其单线态氧产率也会有很大的变化。如在光敏剂分子上引入卤素原子一般能增加ROS产率,如罗丹明(rhodamine)和伊红(eosin),结构如图4(a), (b)所示^[18]。酞菁环的卤化能增加ROS产率^[18],在卟啉环中心引入Ag, Pd, Pt等原子也能增加ROS产率^[18,63],如双氮杂化卟啉以及银、铜原子整合的双氮杂化卟啉

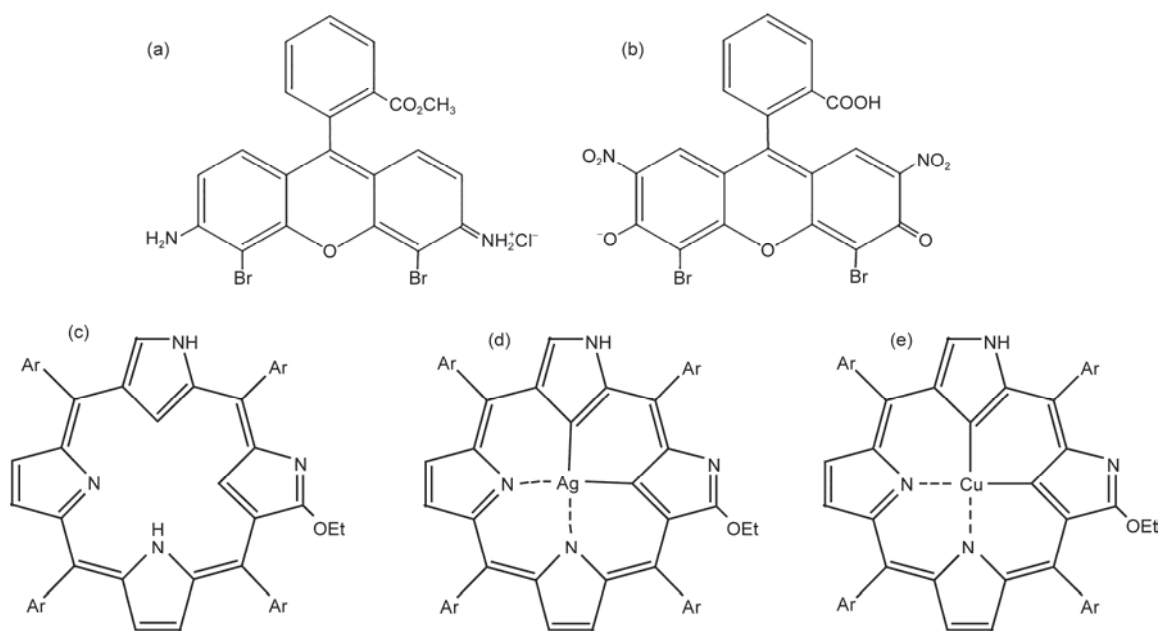


图4 光敏剂结构. (a) 罗丹明; (b) 伊红; (c) 双氮杂化卟啉; (d), (e) 银、铜原子螯合的双氮杂化卟啉^[18]

Figure 4 The structure of photosensitizer. (a) Dibromohodamine; (b) eosin; (c) doubly *N*-confused porphyrin; (d), (e) doubly *N*-confused porphyrin with metal complex^[18]

的单线态氧产率分别为0.19, 0.81, 0.49, 结构如图4(c)~(e)所示.

重原子能增强自旋轨道耦合, 从而易化系间跃迁并增加单线态氧的产率, 这称为“重原子效应”. 另外, 碘原子显示出比其他卤素更加有效的重原子效应. 然而也有研究表明, 过多的卤素原子取代的硼-二吡咯亚甲基(boron-dipyrromethene, BODIPY)光敏剂却不利于提高其单线态氧产率^[64]. 并且, 增加卤素原子也会增加光敏剂的暗毒性^[65].

由于大部分光敏剂具有较大的共轭结构, 容易聚集, 并且光敏剂暴露在高活性氧浓度的环境中, 影响到其稳定性, 这都会降低光敏剂单线态氧产率, 发生荧光淬灭. 然而一种新型的光敏剂能够具有聚集诱导发光(aggregation-induced emission, AIE)的特性, Liu课题组^[66]合成了此类光敏剂TPETCAQ, 结构如图5所示, TPETCAQ即使在聚集的状态下也具有强烈的荧光, 并且单线态氧产率不受影响.

2.5 其他新型光敏剂和PDT技术

2.5.1 无机或有机金属光敏剂

金属纳米簇、金属纳米结晶或金属纳米颗粒能增强表面电磁场, 表面等离子体共振能增加接触该表面的光敏剂的单线态氧产率, 具有金属中心的光敏

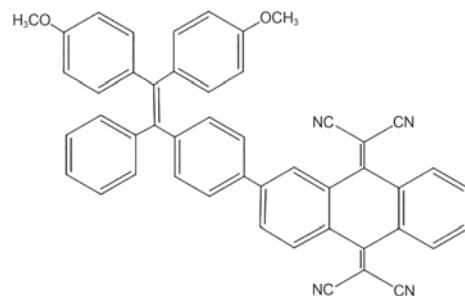


图5 TPETCAQ的结构^[66]

Figure 5 The structure of TPETCAQ^[66]

剂相对于无金属原子的有机光敏剂能产生更多的ROS^[18]. 有机金属光敏剂有更长的三线态寿命, 能增加其与氧物种的反应以及ROS的生成^[67], 如玫瑰红(RB)在银岛膜(silver island films, SiFs)存在的条件下, 比单纯的玫瑰红增加了3倍的单线态氧产率. 随后一系列的研究使用Ag, Au, Zn和Ni纳米粒子也得到了增高的单线态氧产率^[68,69].

Au纳米粒与ZnO纳米棒组成的混合金属光敏剂, 当ZnO: Au的摩尔比为20:1时, 单线态氧产率最佳, 此时ZnO和Au有最大的表面接触面积^[70]. 钌复合物Ru(II)(N3)具有多种三线态, 金属与配体或配体与配体之间存在多种电子转移, 目前有多种含有金属钌的光敏剂处于研究之中^[71~75].

石墨烯在整个可见区至近红外区都有较强的吸收,然而,其较大的生物毒性及激发光较低的穿透性限制了它在临床上的应用.一种铁的氧化物修饰的氧化石墨烯($\text{GO-Fe}_x\text{OH}$),在808 nm光照的激发下,电子由GO转移至Fe(III),加快与氧气的反应,形成超氧阴离子,超氧阴离子也能继续经过歧化反应形成过氧化氢,过氧化氢与Fe(II)发生芬顿反应生成羟基自由基,比单纯的GO能更快更多地生成ROS^[76].

2.5.2 光动力治疗与化疗或光热治疗的联用

利用ROS能使特定的共价键断裂或使聚合物降解的原理,将化疗药物通过ROS可降解材料连接在光敏剂纳米粒子上,就能实现ROS诱发的化疗药物控释,同时进行PDT与化疗.由UCNP包裹 SiO_2 的纳米粒子接上玫瑰红(RB),再由生物可降解的聚(1,4-亚苯基丙酮二亚甲基硫缩酮)(poly-(1,4-phenyleneacetone dimethylenethioketal, PPADT)载上多柔比星(DOX),自组装至纳米粒子上.在NIR的激发下,纳米粒子产生ROS,ROS可使得PPADT降解,从而释放DOX,实现同时化疗与光动力治疗^[77].

光动力治疗也可以与光热治疗(photothermal therapy, PTT)联合用于治疗肿瘤,达到联合促进治疗的效果,此两者联用可简称为联合光疗. Li课题组^[78]合成了金纳米棒和二氢卟吩e6(Ce6)掺杂的介孔 SiO_2 纳米棒(AuNRs-Ce6-MSNRs),在单波长近红外光激发下实现联合光疗,其中金纳米棒和Ce6分别实现PTT与PDT的效果. Liu课题组^[79]将通过使用与光敏剂二氢卟吩e6(Ce6)预先偶联的牛血清白蛋白(BSA)作为稳定剂来制造聚吡咯(PPy)纳米颗粒,所获得的PPy@BSA-Ce6纳米粒子能够同时触发光动力治疗和光热治疗.

2.5.3 ROS控释光敏剂

一些具有ROS控释作用的光敏剂能特定地实现在肿瘤部位的杀伤作用,而避免在其他组织产生毒副作用. 聚乙二醇-*b*-聚己内酯束(PCL)^[80]同时载有光敏剂脱镁叶绿酸(PHA)以及单线态氧清除剂 β -胡萝卜素(CAR),在非肿瘤部位时,CAR能清除PHA产生的单线态氧从而降低副作用,而在肿瘤部位时,PCL生物降解,PHA和CAR分开,产生的单线态氧不被清除而杀伤肿瘤细胞.

2.5.4 光敏剂的光纤递送

Bartusik课题组^[81]发明了一种轻便的光敏剂光纤递送装置,其光纤头是用氟化硅介孔材料构成,光敏

剂通过光照可断裂的键连接于光纤头,红光通过光纤递送至光纤头即可介导光敏剂释放,另外,光纤头还具有氧气释放功能,增加局部氧气浓度.这种技术杀伤范围半径为2~3 mm,适用于一些较小的且难以切除的肿瘤,比如脑瘤等.

2.5.5 荧光蛋白

基于绿色荧光蛋白中存在的基本发色团结构的一些修饰的荧光蛋白不仅可以发射荧光,还可以在光激发下产生ROS. 这些光动力学活性荧光蛋白中最著名的叫作KillerRed, KillerRed是一种独特的红色荧光蛋白,它具有生成ROS的能力和优异的光毒性,并且具有在肿瘤治疗的应用中作为光敏剂的潜力^[82~84]. 蛋白在细胞内的表达位置可以通过连接到KillerRed分子的DNA序列上的其他遗传元件来控制^[21].

3 活性氧的检测

有几种方法可以用于生物样品中ROS的检测与定量,其中直接检测单线态氧的方法是磷光分光光度法,它利用单线态氧发出的1270 nm处的磷光^[85]. 另外还有基于探针分子的间接检测方法,主要有化学发光探针、荧光探针等. 虽然间接检测信号更强,可以用于荧光显微镜,但间接方法的一个主要缺点是它们不能解决任何包含关于周围环境的特定信息的动力学,在体内的非均质系统时,探针分子和光敏剂有着不同的分布形式,并可能与蛋白质等发生反应,从而造成一个不可靠的结果,并且这些探针分子还具有一定的毒副作用. 因而直接检测显得尤为重要,但直接检测也存在一系列困难,如量子产率低、单线态氧寿命短等,尤其是在体内环境中,检测限往往达不到要求,这也是活性氧体内检测的一个难点. 虽然活性氧的在体检测存在困难,但PDT过程中的血氧水平实时监测已经实现,并应用于临床前或临床研究,对血氧水平的检测能一定程度上指导PDT^[86]. 由于活性氧尤其是单线态氧水平仅仅占氧气水平的很小一部分,且在光敏剂、光照等条件改变的情况下能发生很大的变化,因此活性氧水平不能与血氧水平直接关联起来,可见实现活性氧在体实时监测也是很有必要的. 以下将逐一介绍用于单线态氧以及其他活性氧检测的方法.

3.1 直接磷光光度法

直接磷光法主要基于单线态氧回到基态时发出

的1270 nm的磷光来检测单线态氧. 由于单线态氧非常低的磷光量子产率、极高反应活性以及极短的寿命, 发出的1270 nm处的磷光信号极弱, 因而将其磷光信号增强放大才能直接进行检测. 目前有两种方法用于 $^1\text{O}_2$ 的直接发光成像: (1) 利用NIR光电倍增管(PMT)或铟镓砷(InGaAs)线性阵列结合激发激光束的扫描; (2) 基于使用带有滤光片的NIR相机^[87].

由于单线态氧寿命短, 对于直接磷光光度法, 时间分辨率尤为重要, 于是出现了时间分辨磷光光度法(time-resolved detection of $^1\text{O}_2$ phosphorescence, TRPD), 其基本上有3种主要的光子计数技术: 门控光子计数(GPC)、多通道计数(MCS)和时间相关单光子计数(TCSPC)^[88].

在TCSPC中, 每次激光照射中, 只有第1个撞击探测器的1个光子能被计数. 这种方法提供了所有光子计数技术中最精确的光子定时, 每通道低至几个皮秒. 因此, 当对时间分辨率需求很高时, 时间相关单光子计数为首选, 但是每次激光脉冲激发时, 只记录1个光子, 所以需要以较长的采集时间为代价来构建完整的信号轮廓.

在GPC中, 首先设定一个时间窗口, 在预设时间窗口内, 激发脉冲激发后所有超过最小阈值的脉冲信号都进行计数. 在不同的时间延迟下重复测量可以建立波形. 门控光子计数仅用于选择总发射光子的一部分. 典型的应用是区分瞬态发射和延迟发射, 例如从磷光信号中甄别荧光信号, 或者去除激发后的散射光. GPC的主要缺点是, 它不能记录所有待测光子的信号, 只能计算门内的光子.

MCS技术与GPC技术相似, 最终可以看作是一个多门控光子计数, 它把所有检测到的光子在板存储器的不同位置进行计数和分类. 所有检测到的光子的时间分布因此一次获得. 该技术的时间分辨率取决于内存速度, 目前约为每个通道1 ns, 足够用于单线态氧的检测^[76].

两种不同的方法可以用于在检测器感测之前调节发射信号. 一是使用单色仪, 以信号强度为代价, 在灵敏度下降的情况下分辨出样品的发光, 二是使用带通滤波器和干涉滤波器以光谱分辨率为代价提供最高的通量. 不同方法适用于不同情况. 体内时间分辨的 $^1\text{O}_2$ 发光测量仍然是非常困难的并且需要改进以提供用于临床方案或研究的诊断工具^[89]. InGaAs相机具有良好的光子探测效率(>30%)和较大的有效

面积(>10 mm×10 mm), 但没有时间分辨能力. 另一方面, PMT是许多单线态氧实验中选择的探测器. 它们的主要优点是大的有效面积(>10 mm×10 mm), 这是收集大型漫射样品的光子所必需的; 然而, 它们具有很低的量子效率(<1%)、中等噪声(>10000 cps)、精细的光电阴极(可能被环境光损坏)以及在检测期间难以通过检测器来抑制杂散光^[90].

在可见光和低NIR光谱(400~1000 nm)的不同区域, 硅或半导体单光子雪崩二极管(silicon single-photon avalanche diodes或semiconductor-based single-photon avalanche diodes, SPADS)正在取代PMT, 因为它们具有更高的检测效率、更低的噪声、更小的体积和更好的门控性. 在近红外波长范围内(1000~1700 nm), 单光子雪崩二极管探测器也是一种新兴的技术, 但是它们的使用受到高噪声(暗计数速率、DCR)和最大栅极宽度为几十纳秒的门控模式的限制^[90].

Hasan课题组^[91]新开发了基于光电倍增管的单线态氧检测(singlet oxygen detection, SOD)系统. PMT-SOD系统检测到的最低和最高的 $^1\text{O}_2$ 浓度分别为15 nmol/L和10 $\mu\text{mol/L}$. Zbinden课题组^[92]首次提出了基于半导体单光子探测器的时间分辨单线态氧发光检测装置. 与超导探测器相比, 展示了超过2个数量级的信噪比(signal to noise ratio, SNR)改善. 与PMT相比, 具有更低的噪声和更高的量子效率, 允许用于体内测量更短的采集时间和更低的激发功率^[92].

负反馈InGaAs/InP雪崩二极管(negative-feedback InGaAs/InP avalanche diode, NFAD)探测器^[93]能够以10%的效率达到低至1 cps的DCR. 这样低的DCR值, 通常只能通过SNSPD实现. 此外, 在这项工作中提出的检测器耦合到一个大面积的多模光纤, 提高了生物样品的体内和体外的收集效率. 相对之前报道的基于单模光纤耦合探测器, 采集效率比同类应用高100倍. 驱动电子元件也被设计成允许检测器在自由运行模式(检测器总是开启并准备好检测光子)或门控模式(检测器可以选择性地关闭以屏蔽不想要的光信号)下工作. 后者的操作模式特别有用, 因为当在测量样品单线态氧信号时, 存在大量来自荧光的杂散光子.

Hadfield课题组^[23]目前使用门控Peltier冷却InGaAs/InP单光子雪崩二极管探测器进行类似的研

究. 这样的门控SPAD不需要与自由运行的SPAD相同的冷却限制, 采用紧凑的Peltier冷却系统而不是庞大的斯特林系统, 因此它们更便携、更可靠、更实用. 通过使检测器与泵浦光源的频率同步, 能够创建一个门控模式, 使得检测器仅在重要的时间间隔期间(即当 $^1\text{O}_2$ 产生发光信号时)有效, 从而减小光敏剂的即时发光背景. 该系统通过使用远程传感器头进一步增强, 其中泵浦激光器和发光信号耦合到光纤中, 允许检测和电子定时装置远离治疗位置, 结构如图6所示.

523 nm激光器通过远程传感器头中的准直封装(CP1)耦合到传输光纤中. 来自收集光纤的光通过CP2耦合输出, 先后通过带通滤波器(FW), 长通滤波器(LP, >1000 nm). 显微镜物镜(MO)将光纤芯成像到检测器的表面上(图6(a)). 图6(b)表示透镜(L1-L3)和二向色镜(DM)的传感器头的示意图. x - y 平移台允许两个光轴在样品上对齐. 脉冲模式发生器(pulse pattern generator, 简称PPG)的电信号(蓝色)触发释放两个信号(红色). 一个充当TCSPC的“开始”信号, 另一个触发SPAD门控. 来自SPAD(绿色)的输出(只能在门控期内发生)发送到TCSPC停止“通道”(图6(c)). 详细部件与参数介绍见参考文献[23].

激光器输出同步电信号到可编程脉冲图案发生器, 每个脉冲在2个独立的通道上产生输出, 每个通

道的脉冲形状与预期的输入相匹配. 第1个输出是发送到时间相关单光子计数器的同步或“开始”通道的单个脉冲, 而第2个是脉冲模式(频率高于激光重复频率)输送到SPAD控制模块. 每当后者接收到来自PPG的脉冲时, SPAD被打开预定的持续时间, 这里被称为栅极宽度(通常比激光周期短得多, 约24 ns). 任何落在此门宽度内的检测事件(或暗计数)都会输出停止TCSPC的通道的脉冲. 入射到检测器外部的任何光子都不能被检测到. 该方法能够仅在预选择的门窗口内生成检测事件的定时直方图; 因此, 可以有意避免只有少量光子(例如, 接近直方图的末端)或荧光光子将会使检测器饱和(在直方图的开始处)的情况下检测到光子. 该策略也降低了检测器的总体计数率, 有助于避免由于直方图形状扭曲造成的脉冲堆积效应, 从而降低了能增加背景水平的脉冲后效应. 这种方法导致在检测器门控周期时间之外的光子信号的不可避免的损失, 然而, 这种信号丢失似乎对数据质量没有影响^[23].

除了使用光电倍增技术放大磷光信号外, 目前, 也有一系列其他方法用来增强1270 nm磷光发射. 已经报道具有适当的表面等离子体的金纳米颗粒使得 $^1\text{O}_2$ 的磷光增强达到几百倍^[94]. 使用同样的等离子体原理, 银岛膜也能使 $^1\text{O}_2$ 的近红外磷光增强35倍^[95].

基于多孔硅微腔(porous silicon microcavity, pSiMC)

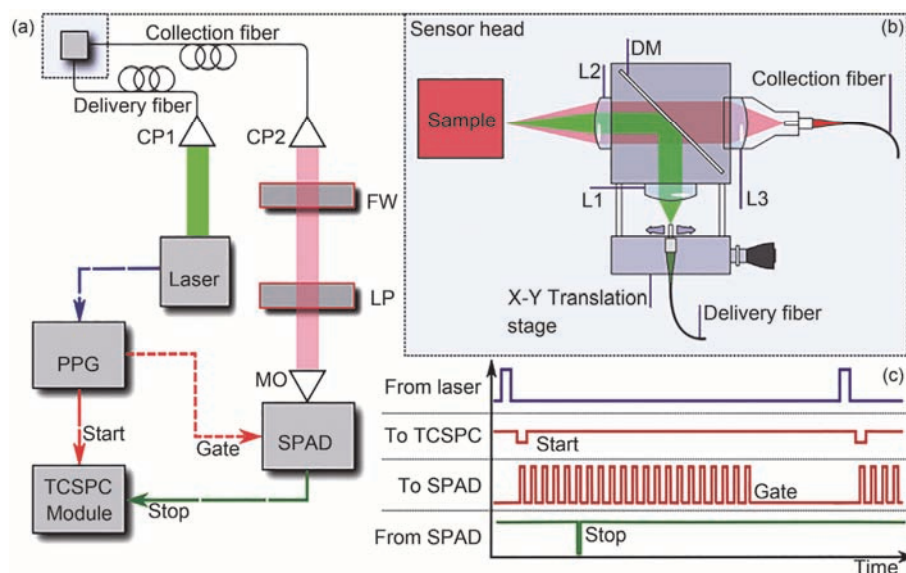


图6 SPAD的实验装置框图. (a) 实验装置框图; (b) 便携式紧凑型传感器头的原理图; (c) 信号传递通路^[23]

Figure 6 The block diagram of SPAD's experimental device. (a) The block diagram of experimental device; (b) schematic of the portable compact sensor head; (c) signal transmission path^[23]

的结构能增强受限荧光基团的发光. pSiMCs是一个很好的发光分子主体基质,因为它能锐化和放大发射. Voelcker课题组^[94]设计了一种基于铕(Eu)的探针 pSiMC-EuA用于检测 $^1\text{O}_2$, 探针EuA由高度发射性的铕络合物和碳硼烷偶极子组成,能克服铕和蒽基团作为 $^1\text{O}_2$ 化学陷阱的固有低摩尔吸收性.

还有一种用于直接检测的方法是延迟荧光检测方法. 单线态氧敏化延迟荧光(singlet oxygen-sensitized delayed fluorescence, SOSDF)^[96]是由来自 $^1\text{O}_2$ 的能量反向转移至光敏剂的 S_1 状态的延迟发射,图7描述了延迟荧光的产生. 这是水溶性光敏剂的一个普遍现象. SOSDF光谱与即时荧光光谱相匹配,但发生在磷光特征之后的微秒时间范围内, SOSDF具有特征性的上升-衰减动力学,对其分析可以提供 $^1\text{O}_2$ 和光敏剂三重态寿命的信息. 由于光敏剂本身作为特定的 $^1\text{O}_2$ 探针,所以SOSDF可以被认为是用于 $^1\text{O}_2$ 检测的半直接方法, SOSDF能提供与直接 $^1\text{O}_2$ 检测相似的动力学参数. 据估计SOSDF发射的强度比 $^1\text{O}_2$ 磷光强度高几个数量级,然而仍然比间接荧光探针的信号弱几个数量级^[97,98].

3.2 荧光探针与荧光光度法

由于光诱导电子转移的淬灭作用,有机荧光探针本身没有荧光,而与单线态氧发生反应形成内氧化物后,探针分子发出强荧光^[99],有机荧光探针主要是键合有蒽衍生物的荧光素分子. 目前商业化的单线态氧的荧光探针^[100]有9, 10-蒽二丙酸(9,10-anthracenedipropionic acid, APDA)、单线态氧探针绿(singlet oxygen sensor green, SOSG)、海萤荧光素类似物(fluoresceinyl cypridina luciferin analogue, FCLA)和1,3-二苯基异苯并呋喃(1,3-diphenylisobenzofuran, DPBF)等. 但这些探针主要用于均质的溶液系统,由于体内复杂的环境以及探针在体内的分布与药动学特征,并且其具有较大的潜在毒性,而难以在体内应

用并用于单线态氧的定量.

SOSG与单线态氧反应生成SOSG内过氧化物(SOSG-EP),在485 nm光激发下能在528 nm处检测到荧光. 然而, SOSG可以被530 nm光激活,起到光敏剂作用产生单线态氧,并产生荧光,导致结果不准确,因此,在适当条件下使用这种探针和适当的控制是必要的^[101]. Nonell课题组^[102]开发了ADPA共价结合到介孔 SiO_2 纳米粒子的新型单线态氧纳米探针,保护探针免于与蛋白质的相互作用.

用于在活细胞中测量 O_2^- 的最流行的化学探针是MitoSOX, 其由三苯基磷离子(TPP^+)与氢化可的松分子(HE)共价结合组成. 探针在与 O_2^- 反应后发出荧光. TPP^+ 是亲脂性阳离子,其基于基质和膜间间隙之间的电荷差异促进线粒体对HE的摄取,在激发波长396 nm处测量HE荧光^[103].

BirchMachin课题组^[104]开发出一种通过细胞色素c功能化的安培计传感器,能用于实时测量线粒体 O_2^- 的生产,甚至能检测到线粒体复合物II产生的 O_2^- . 黄色荧光蛋白(cpYFP)可以在细胞系统或体内稳定表达, cpYFP可通过线粒体定位序列选择性靶向线粒体. O_2^- 氧化荧光蛋白中Cys171和Cys193的残基引起cpYFP荧光变化可用于检测超氧化物^[105].

对于 H_2O_2 的检测方法,在分离的线粒体中, Amplex Red是用于精确测定 H_2O_2 的最常用的方法,该测定方法依赖于由 H_2O_2 对非荧光Amplex Red的氧化生成产生荧光的试卤灵(Resorufin),该反应需要存在辣根过氧化物酶^[106]. Amplex Red分析不能在完整的组织系统进行,但可以应用于组织和细胞. 另一种可用于检测线粒体 H_2O_2 的化学方法是MitoB法^[107]. 该方法依赖于 H_2O_2 将芳基硼酸MitoB氧化成相应的可被荧光探测的苯酚MitoP,其中芳基硼酸部分被 TPP^+ 标记,能实现在线粒体定位,通过液相色谱串联质谱法量化MitoP/MitoB比能够测量线粒体 H_2O_2 的加权平均值.

现已开发了3种高度敏感的荧光蛋白,允许直接和间接定量 H_2O_2 :HyPer, 还原-氧化敏感的绿色荧光蛋白-氧固醇结合蛋白相关蛋白1(roGFP-Orp1)和重组人谷氧还蛋白-1-还原-氧化敏感的绿色荧光蛋白(Grx1-roGFP). HyPer最初由Belousov等人^[108]开发,由原核 H_2O_2 感受蛋白OxyR和环状黄色荧光蛋白(cpYFP)缀合组成. HyPer荧光的变化依赖于OxyR上的Cys199和Cys208, OxyR中Cys199的氧化形成SOH,

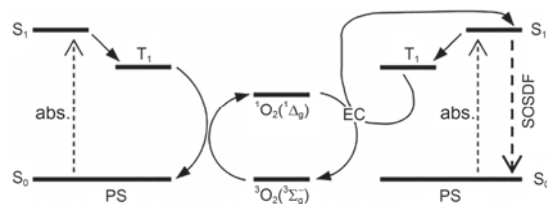


图7 延迟荧光产生原理^[96]

Figure 7 Delayed fluorescence generation principle^[96]

然后SOH迅速与Cys208反应形成分子内二硫键, H_2O_2 介导OxyR的氧化诱导cpYFP荧光的变化. 在一些研究中显示, HyPer对于 H_2O_2 的变化是高度敏感的, 这是由于Cys199与 H_2O_2 的快速反应. HyPer现在常用于测量活细胞中 H_2O_2 的动态变化, 包括细胞信号传导和细胞凋亡的诱导. roGFP2-Orp1直接检测 H_2O_2 , 而Grx1-roGFP2通过与谷胱甘肽二硫化物(GSSG)反应间接测量, GSSG是两个还原型谷胱甘肽分子与 H_2O_2 酶介导氧化的结果. 对于roGFP2-Orp1, Orp1上的硫醇阴离子被 H_2O_2 氧化形成SOH, 然后与Orp1上的相邻SH反应形成二硫桥, 通过二硫键交换反应, roGFP2上的2个硫醇随后被氧化, 从而改变探针的荧光强度. Grx1-roGFP2通过类似的机制进行, 除了GSSG的增加提示Grx1与硫醇二硫化物发生交换反应生成S-谷胱甘肽-Grx1-roGFP2. 通过另一系列硫醇二硫化物交换反应, 将谷胱甘肽部分转移至roGFP2, 然后促使形成二硫桥, 并改变roGFP2荧光, 这些探针在检测活体动物中 H_2O_2 的时空变化方面显示出很大的希望^[109].

二氢钙黄绿素(H_2 -Calcein)是不同于二氯二氢荧光素(H_2 -DCF)的细胞内ROS检测的优异探针, 其氧化产物钙黄绿素不会泄漏出细胞, 积累在线粒体中, 而二氢荧光素位于细胞质中, H_2 -Calcein的氧化可能是电子直接转移到线粒体复合物I的结果^[110]. Jelinek课题组^[111]设计了嵌有两亲性碳量子点的抗坏血酸衍生物水凝胶, 通过ROS对抗坏血酸残基的氧化, 导致氢键水凝胶支架的解体和随后的碳量子点的聚集, 而导致荧光淬灭用于检测活性氧.

基于单个波长的荧光可能受到其他生物基质的影响, 为了避免这个问题, 目前有许多双荧光探针被陆续报道, 双荧光探针在单一波长光的激发下能发出两个波长的荧光, 而与活性氧发生反应后, 其中一个波长的荧光强度发生变化, 另一个波长的荧光强度不变, 通过计算两个发射强度比率, 能避免其他因素对信号的干扰, 使结果更加准确. 由 SiO_2 和金纳米粒子组成的纳米复合材料显示出单激发和双发射荧光性质, 已被用于羟基自由基的检测^[111].

Kong课题组^[5]首次报道了一种用于检测活细胞中羟基自由基的双发射比率荧光硅量子点(Si QDs-Ce6)纳米复合物, 通过静电引力将硅量子点(Si QDs)与Ce6连接构建, 能显示良好分辨的双荧光发射信号(490和660 nm), Si QDs的荧光能被 $\cdot\text{OH}$ 淬灭, 而Ce6

的荧光保持不变. 测量两个波长下Si QDs和Ce6荧光强度的比值作为内建校正以避免环境干扰, 因此探针可用于高灵敏度的生物测定.

一个新的金簇(AuNCs)和量子点(QDs)构建的荧光比率感应ROS检测系统. 与ROS相互作用后, 检测系统中红色发射荧光(来自QD的645 nm)逐渐减少, 而绿色荧光(来自AuNCs的480 nm)变化不大. 两种波长的荧光比值($I_{480\text{ nm}}/I_{645\text{ nm}}$)与ROS含量呈线性相关, 可用于ROS的实时比率检测. 通过AuNC-QD监测炎症细胞内的ROS, 结果与传统的二氯荧光素二醋酸盐法一致, 证实了所开发方法的可靠性. AuNC-QD偶联物具有较高的光稳定性, 低背景和比率检测的准确性, 显示了其作为炎症细胞中实时ROS检测探针的潜力^[112,113]. Peng课题组^[6]合成了一种基于杂环吩噻嗪(phenothiazine-cyanine, PTZ-Cy2)的新花青染料, 其含有2个活性位点. 吸收和荧光信号的变化来源于噻嗪硫原子被hROS氧化以及花青 π 键共轭的破坏, 在470和595 nm处, 双重荧光发射显著增强. 在水溶液中, PTZ-Cy2与其他ROS相比, 对hROS具备很好的荧光选择性, 并且还能够检测活细胞线粒体中的内源性hROS产生.

$^1\text{O}_2$ 荧光探针的另一个主要问题是与蛋白质形成复合物, 影响它们对 $^1\text{O}_2$ 的反应, 并且经常阻止它们被细胞摄取. 将其做成纳米粒子能有效地防止探针分子与蛋白质分子的反应并且增加细胞的摄取率, 如9,10-蒽醌酸(ADPA)与多孔硅共价结合的纳米粒探针, 具有与单线态氧极高的反应活性, 可同时通过荧光与吸光度的改变检测单线态氧^[102].

3.3 化学探针法

化学探针主要指的是化学发光探针, 化学发光探针与单线态氧反应产生高能量的化合物, 然后迅速分解以发光的形式释放能量, 或者与引发剂发生作用而发出可以探测的光信号.

目前主要的化学发光探针是含有蒽衍生物的探针, 如9-[2-(3-羧基-9,10-二甲基)蒽基]-6-羟基-3H-咕吨-3-酮(DMAX), MTTA-Eu(III), MTDTA-Eu(III)等, 这些化学探针最初是不发光的, 在 $^1\text{O}_2$ 的存在下, 这些探针在9,10位置形成内过氧化物而发光, 据报道在大多数情况下量子产率为0.5~0.9^[94,114]. 单线态氧化学发光探针-细胞穿透肽(singlet oxygen chemiluminescence-cell penetrating peptide, SOCL-CPP)^[115]能与

单线态氧反应产生酚二氧杂环丁烷物种,之后迅速在水溶液中降解,产生相应的电子激发态的苯甲酸酯,后者衰变回基态时发出515 nm绿色的光.目前比较成功的活性氧化化学发光测定法主要有光泽精法、鲁米诺法和海蜇荧光素类似物法(CLA).鲁米诺又称为发光氨,鲁米诺能与极微量的单线态氧反应,发出较强的荧光.

光泽精化学发光检测 O_2^- ,其细胞膜通透性好、细胞毒性小、反应灵敏度高、特异性强, O_2^- 和光泽精的反应速率常数是 O_2^- 和细胞色素c的3倍,能够实时监测血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、成纤维细胞、肾细胞、淋巴细胞、肺泡上皮细胞等的 O_2^- [17].

也有报道不通过化学发光来检测活性氧的探针,这类探针与活性氧发生反应改变结构,根据其不同结构的比例来对活性氧进行定量. Lu课题组[116]设计了一种基于肽的探针,用于快速(<10 min)高通量测量临床药物诱导的或生物样本的活性氧,使用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)检测半胱氨酸中巯基(Cys-SH)、次磺酸(Cys-SOH)、亚磺酸(Cys-SO₂H)和磺酸(Cys-SO₃H)不同氧化/还原形式(包括Cys-SOH/Cys-SH, CysSO₂H/Cys-SH和Cys-SO₃H/Cys-SH)的比例来评估样品中氧化应激的程度.

3.4 基于分子磁性的单线态氧检测

基于分子磁信号的检测方法为电子自旋共振法(ESR, EPR),其能检测具有不成对电子的化合物.已经开发了特殊的单线态氧自旋捕获剂2,2,6,6-四甲基哌啶(2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidine, TEMP),它与单线态氧反应形成稳定的氮氧自由基2,2,6,6-四甲基哌啶氮氧化物(TEMPO),可以使用ESR来测量.在Bruker ELEXSYS E500光谱仪中,ESR的理论检测限为 4.0×10^{-12} mol. ESR不仅能够检测单线态氧,还能以高灵敏度进行量化.然而,ESR信号常常受到共存的离子和溶剂的影响,可能导致严重的错误.在处理生物样品时,需要考虑几个关键因素:(1)水的存在导致ESR信号的衰减达到大约 1×10^{-9} mol的工作极限,为了进一步提高EPR信噪比,必须开发提取方法从其水环境分离ESR响应;(2)许多生物分子可以与自旋陷阱相互作用,因此,有必要检查是否修改了陷阱;(3)自旋陷阱渗透到组织中的量是重要的考虑因素,应该注意的是并非所有的自旋陷阱都在生理pH下最佳地起作用[101].而且,分析程序的相对复杂性

和昂贵的仪器也妨碍了其广泛的应用. Que课题组[117]展示了单核高自旋 Co^{II} 复合物作为氧化还原活性 ^{19}F MRI探针的应用.通过 Co^{II} 中心的非配对d电子引起附近 ^{19}F 核的顺磁弛豫增强(paramagnetic relaxation enhancement, PRE)效应衰减 ^{19}F NMR信号,导致 T_2 弛豫时间缩短. Co^{II} 复合物可以被 H_2O_2 以及其他活性更强的ROS氧化成抗磁性 Co^{III} 复合物, T_2 值将增加,在NMR或 ^{19}F MRI中产生强烈的氟信号,开启对氧化的响应,并且氧化是可逆的,这可以允许动态氧化还原成像. Luty课题组[118]开发了一种磁性纳米颗粒生物传感器,可以通过荧光蛋白报告细胞对氧化应激的反应.这项技术使研究人员能够使用无创显微镜实时监测ROS反应.

3.5 正电子发射断层扫描

正电子发射断层扫描(PET)是一种能够测量体内组织中的特定化学或酶促反应的非侵入性成像技术[119].由于其高灵敏度、低毒性和高的空间分辨率,PET具有检测ROS的潜力[120]. Mach课题组[119]合成一种新型 ^{18}F 放射性标记的PET示踪剂,DHE类似物(DHE analog),结构如图8所示,未被氧化时有很好的细胞穿透性,其能选择性被超氧阴离子氧化而带正电荷,被氧化后难以穿过细胞膜. Wilson课题组[120]利用维生素C的还原性,将其用 ^{11}C 标记,在ROS的作用下被氧化为 $[^{11}C]$ 脱氢抗坏血酸(dehydroascorbic acid, $[^{11}C]$ DHA).也有其他报道使用 $[^{11}C]$ 或 $[^{18}F]$ 标记的示踪剂用于PET[121,122].

4 活性氧的作用机制

大部分研究认为ROS主要通过如下3种不同的机制破坏肿瘤[123]:(1)对肿瘤细胞的直接毒性使其坏死或诱导其凋亡、自噬;(2)对肿瘤毛细血管内皮细胞的损伤和微脉管系统的破坏;(3)激活宿主防御机制的急性炎症反应.下面重点介绍ROS对免疫系统和肿瘤细胞凋亡通路的影响.

4.1 对免疫系统的作用

由ROS引起的对肿瘤的组织损伤导致释放损伤相关模式分子(damage-associated molecular patterns, DAMP),如钙网织蛋白(CRT)、高迁移率族蛋白(HMGB1)等,如同侵入性病原体释放的病原体相关模式分子(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)

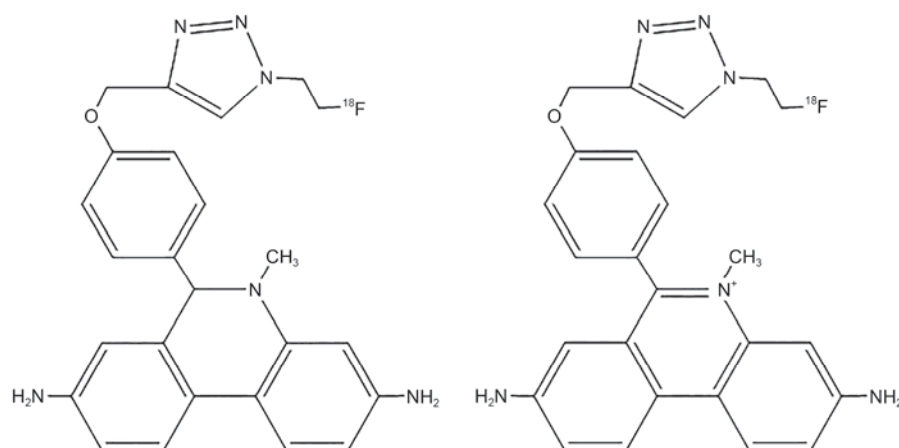


图8 DHE类似物结构^[119]

Figure 8 The structure of DHE analogue^[119]

的方式激活宿主免疫细胞如巨噬细胞、嗜中性粒细胞和树突细胞等,引发适应性免疫反应.树突状细胞(DC)可以摄取由凋亡肿瘤细胞释放的抗原并迁移到引流淋巴结,在那里它们成熟并将主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)分子与抗原衍生的肽呈递给T淋巴细胞,这导致了肿瘤特异性的CD⁴⁺ T辅助细胞(Th)和CD⁸⁺细胞毒性T细胞(cell toxic lymphoid T cells, CTL)的活化^[124]. PDT后DAMPs释放的最常见的是热休克蛋白HSP60, HSP70, HSP90和GRP94,它们被上调并转移到细胞膜上^[124,125].另外ROS可以诱导肿瘤细胞表面MHC I表达的表现遗传性上调^[123],ROS产生的内质网压力(ER stress)能促进DAMPs/危险信号的细胞内运输和随后的表面/细胞外表达^[126].

ROS还能激活补体系统^[123].补体级联有3个主要的激活途径:经典途径、旁路途径和凝集素途径.现在认为补体旁路途径是与PDT相关的补体途径.PDT通过ROS诱导C3中不稳定的硫酯键断裂形成补体活化片段C3a和C3b.在与细胞膜结合后,C3b与因子B结合形成C3bB.在D因子存在下的这种复合物将被分解成Ba和Bb.Bb将保持与C3b共价结合以形成C3bBb,其是替代途径C3转化酶.C3, C3b复合物水解后变成C3bBb3b,将C5裂解成C5a和C5b.C5b与C6, C7, C8和C9复合物(C5b6789)形成膜攻击复合物(MAC),其被插入细胞膜中,“打孔”并引发细胞溶解.

4.2 对细胞凋亡通路的影响

ROS能调节细胞中多种凋亡相关蛋白、活化凋亡

通路,促进肿瘤细胞的凋亡.线粒体ROS爆发能活化内膜离子通道(IMAC),细胞内钙离子浓度增加,线粒体膜电位下降,细胞色素c释放,活化半胱天冬酶caspase3, 7,引起细胞凋亡,而活化的caspase3, 7也可进一步促进ROS爆发^[27].Chen课题组^[28]研究发现细胞色素c释放后,B淋巴细胞瘤-2基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)表达下调,Bax表达上调,引起caspase9, 12的活化,与此同时,C/EBP同源蛋白(CHOP)和葡萄糖调节蛋白(glucose-regulated protein, GRP78)也产生增加.细胞色素c还能与apaf-1结合,结合复合物招募活化caspase 9.在caspase独立途径中,线粒体释放凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF)和核酸内切酶(endonuclease G, Endo G),接着转运至细胞核,诱导染色质浓缩.细胞凋亡抑制剂(inhibitors of apoptosis, IAPs)通过caspase 9的内源性途径阻止caspase-3的活化.ROS的增加激活p38和JNK MAPKs途径,引起细胞周期阻滞,最终诱导细胞凋亡^[127].

用特异性半胱天冬酶-6抑制剂预处理消除了PDT诱导的核纤层蛋白A/C裂解和随后的细胞凋亡,这表明ROS能通过激活半胱天冬酶-6增强对核纤层蛋白A/C的切割,并且诱导凋亡^[128].Yin课题组^[129]研究了芦荟大黄素(Aloe-emodin, AE)介导的光动力治疗(Aloe-emodin-mediated photodynamic therapy, AE-PDT)对人骨肉瘤细胞株MG-63的作用及其机制.发现AE-PDT诱导ROS和p-JNK的表达.活性氧清除剂N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC, 5 mmol/L)能阻断JNK诱导的自噬、凋亡和磷酸化,JNK抑制剂SP600125(10

$\mu\text{mol/L}$)显著抑制AE-PDT对MG63细胞的自噬和凋亡,证明了ROS-JNK通路在ROS诱导的细胞凋亡中的作用. Lee课题组^[127]使用了低能量的质子束照射LLC, HepG2和Molt-4三种肿瘤细胞表明,照射后caspase的活性提高,同时也证明了p38和JNK(不是ERK)能被ROS激活,从而诱导细胞凋亡. 线粒体ROS(mitROS)在肿瘤细胞比正常细胞要高,诱导Mn-SOD的增加. 肿瘤细胞中血红素转运蛋白HCP1表达增加, HCP1是一类转运卟啉类化合物的转运蛋白,在缺氧的肿瘤中,其表达较高. 线粒体ROS增加,诱导前癌症因子表达,转录因子NF- κ B活化,缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α)表达,形成肿瘤特异性表型,被机体免疫系统识别清除肿瘤细胞^[130]. 另外PDT中HIF-1转录活性强烈上调诱导产生PDT抗性表型, HIF-1的RNAi敲除可以减少对PDT的抗性. PDT后氧化应激诱导的ERK1/2的激活涉及HIF-1转录活性的正调节,因此得出结论,对PDT的耐受性部分由ROS-ERK1/2-HIF-1轴的激活介导^[131].

凋亡敏感基因(sensitive to apoptosis gene, SAG,也叫作RBX2或ROC2)是一种双功能蛋白质,单独存在时具有抗氧化活性,与SCF-E3(Skp1-cullins-F box proteins)泛素连接酶复合时具有E3连接酶活性,最近研究表明, SAG siRNA沉默能使癌细胞对辐射的敏感性增加,放射增敏作用与细胞内ROS的稳态水平升高有关,此外,消除Sag能减少核因子抑制因子 α (IkB α)的降解并且抑制核因子 κ B(NF- κ B)激活. IkB α 是SAG-SCF β -TrCP E3泛素连接酶的直接底物. 总之,ROS水平的上升和NF- κ B的去活化使得消除了Sag的ES细胞对辐射诱导细胞死亡的敏感性增加^[132]. Zhou课题组^[133]报道了ALA-PDT刺激产生的ROS引起PKC下游的FGFR2b途径的抑制,引起白细胞介素1 α (IL-1 α)表达的下降,最终抑制角质形成细胞的分化和增殖.

Yang课题组^[134]研究了上转换荧光纳米粒子包封二氢卟吩e6(UCNPs-Ce6)介导的PDT对THP-1巨噬细胞源性泡沫细胞的胆固醇流出的影响,并探讨了这种作用的可能机制. 首先,发现PDT显著增强THP-1和腹膜巨噬细胞源性泡沫细胞中的胆固醇外流和诱导自噬. 自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤和ATG5 siRNA显著减弱了PDT诱导的自噬;随后抑制了

ABCA1介导的胆固醇流出. 此外,由PDT产生的活性氧(ROS)负责诱导自噬,其可被ROS抑制剂N-乙酰半胱氨酸(NAC)阻断. NAC可逆转PDT诱导的p-mTOR和p-Akt的抑制. 因此, PDT通过诱导自噬而促进胆固醇流出,而THP-1和腹腔巨噬细胞衍生的泡沫细胞中的ROS/PI3K/Akt/mTOR信号通路部分介导了自噬. Yang课题组^[49]也研究了UCNPs-Ce6介导的PDT通过促进活性氧(ROS)的产生来诱导THP-1巨噬细胞凋亡. 结果表明, PDT组ROS水平显著升高,导致线粒体敏感性转化孔(MPTP)开放和线粒体膜电位(MMP)去极化、细胞色素c的释放. 促凋亡因子Bax随后从细胞质移位至线粒体,切割的caspase 9,切割的caspase 3和切割的聚(ADP-核糖)聚合酶的上调,因此证明了UCNPs-Ce6介导的PDT通过ROS爆发诱导THP-1巨噬细胞的凋亡.

5 结论与展望

本文主要论述了近几年光动力治疗中活性氧的研究进展. 针对PDT中光敏剂的靶向性差、肿瘤局部氧气浓度低、光照穿透性弱等问题,介绍了近几年出现的新型光敏剂以及一些较新的PDT技术,如上转换系统、双光子PDT、光纤递送PDT等;另外也描述了用于单线态氧或其他ROS检测的新型探针与能用于直接检测单线态氧磷光的检测器,信号放大与处理方法;最后阐明了ROS促进肿瘤细胞凋亡的机制,主要有免疫途径和细胞内的一系列凋亡通路. 用于活性氧的高灵敏检测的荧光分子探针已经得到广泛而深入的研究. 由于每一种活性氧都有其独特的生理活性,因此研制高选择性的能够检测具体一种活性氧的荧光探针已成为当前生物医药的研究前沿.

迄今为止,能够直接测定的活性氧种类不多,直接测定的方法也十分有限. 由于活性氧的寿命短、反应活性高,到目前为止除了 H_2O_2 之外,其他活性氧的测定仍然是一项国际性难题,还没有特别专一有效的方法. 然而,在生物医学与环境等诸多领域里,人们亟待开发高灵敏、高选择性的活性氧检测方法. 尤其是建立简便可靠的活性氧的活体检测方法,对于生物医学研究以及生命体的各种生理病理的解释具有重要意义. 随着技术的发展,在不久的将来,一定能够实现ROS的高灵敏度与高分辨率在体实时监测.

参考文献

- 1 Liu Y Y, Wang X S, Zhang B W. Hypocrellin-based photodynamic sensitizers (in Chinese). Prog Chem, 2008, 20: 1345–1352 [刘岩岩, 王雪松, 张宝文. 竹红菌素类光动力药物. 化学进展, 2008, 20: 1345–1352]
- 2 Ogilby P R. Singlet oxygen: There is indeed something new under the sun. Chem Soc Rev, 2010, 41: 3181–3209
- 3 Ethirajan M, Chen Y, Joshi P, et al. ChemInform abstract: The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. Chem Soc Rev, 2011, 42: 340–362
- 4 Yang J. Chemical modification of bacterial chlorophyll and its PDT performance (in Chinese). Master Dissertation. Taiyuan: Shanxi University, 2008 [杨瑾. 细菌叶绿素的化学修饰及其 PDT 性能研究. 硕士学位论文. 太原: 山西大学, 2008]
- 5 Zhao Q, Zhang R, Ye D, et al. A ratiometric fluorescent silicon quantum dots-Ce6 complex probe for the live cell imaging of highly reactive oxygen species. ACS Appl Mater Interfaces, 2017, 9: 2052–2058
- 6 Liu F, Wu T, Cao J, et al. A novel fluorescent sensor for detection of highly reactive oxygen species, and for imaging such endogenous hROS in the mitochondria of living cells. Analyst, 2013, 138: 775–778
- 7 Wang D, Zhao L, Guo L H, et al. Online detection of reactive oxygen species in ultraviolet (UV)-irradiated nano-TiO₂ suspensions by continuous flow chemiluminescence. Anal Chem, 2014, 86: 10535–10539
- 8 La Favor J D, Anderson E J, Hickner R C. Novel method for detection of reactive oxygen species *in vivo* in human skeletal muscle. Physiol Res, 2014, 63: 387–392
- 9 Vatansever F, De Melo W C M A, Avci P, et al. Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species-bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond. FEMS Microbiol Rev, 2013, 37: 955–989
- 10 Sarniak A, Lipińska J, Tytman K, et al. Endogenous mechanisms of reactive oxygen species (ROS) generation. Postepy Hig Med Dosw, 2016, 70: 1150–1165
- 11 Li W, Tan G, Zhang H, et al. Folate chitosan conjugated doxorubicin and pyropheophorbide acid nanoparticles (FCDP-NPs) for enhance photodynamic therapy. RSC Adv, 2017, 7: 44426–44437
- 12 Grivennikova V G, Vinogradov A D. Mitochondrial production of reactive oxygen species. Am J Physiol, 2013, 78: 1490–1511
- 13 Jayapaul J, Arns S, Lederle W, et al. Riboflavin carrier protein-targeted fluorescent USPIO for the assessment of vascular metabolism in tumors. Biomaterials, 2012, 33: 8822–8829
- 14 Yang M Y, Chang C J, Chen L Y. Blue light induced reactive oxygen species from flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide on lethality of HeLa cells. J Photochem Photobiol B, 2017, 173: 325–332
- 15 Ekoue D N, He C, Diamond A M, et al. Manganese superoxide dismutase and glutathione peroxidase-1 contribute to the rise and fall of mitochondrial reactive oxygen species which drive oncogenesis. Biochem Biophys Acta Bioenerget, 2017, 1858: 628–632
- 16 Kirkinezos I G, Moraes C T. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. Semin Cell Dev Biol, 2001, 12: 449–457
- 17 Fan L M, Li J M. Evaluation of methods of detecting cell reactive oxygen species production for drug screening and cell cycle studies. J Pharmacol Toxicol, 2014, 70: 40–47
- 18 Mehraban N, Freeman H S. Developments in PDT sensitizers for increased selectivity and singlet oxygen production. Materials, 2015, 8: 4421–4456
- 19 Gao Y, Qia G M, Li N, et al. Progress of photosensitizer for cancer diagnosis and therapy. Chin J Anal Chem, 2011, 39: 1926–1931
- 20 Güzel E, Günsel A, Bilgiçli A T, et al. Synthesis and photophysical properties of novel thiadiazole-substituted zinc(II), gallium(III) and silicon(IV) phthalocyanines for photodynamic therapy. Inorg Chim Acta, 2017, 467: 169–176
- 21 Kou J, Dou D, Yang L. Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. Oncotarget, 2017, 8: 81591–81603
- 22 Abrahamse H, Hamblin M R. New photosensitizers for photodynamic therapy. Biochem J, 2016, 473: 347–364
- 23 Gemmell N R, McCarthy A, Kim M M, et al. A compact fiber-optic probe-based singlet oxygen luminescence detection system. J Biophoton, 2017, 10: 320–326
- 24 Rubio N, Fleury S P, Redmond R W. Spatial and temporal dynamics of *in vitro* photodynamic cell killing: Extracellular hydrogen peroxide mediates neighbouring cell death. Photochem Photobiol Sci, 2009, 8: 457–464
- 25 Zhao H, Xing D, Chen Q. New insights of mitochondria reactive oxygen species generation and cell apoptosis induced by low dose photodynamic therapy. Eur J Cancer, 2011, 47: 2750–2761
- 26 Hu Z, Ying S, Kon O L, et al. Unique triphenylphosphonium derivatives for enhanced mitochondrial uptake and photodynamic therapy. Bioconjugate Chem, 2017, 28: 590–599
- 27 Yu Z, Sun Q, Pan W, et al. A near-infrared triggered nanophotosensitizer inducing domino effect on mitochondrial reactive oxygen species burst for cancer therapy. ACS Nano, 2015, 9: 11064–11074
- 28 Li D, Li L, Li P, et al. Apoptosis of HeLa cells induced by a new targeting photosensitizer-based PDT via a mitochondrial pathway and

- ER stress. *Oncotargets Ther*, 2015, 8: 703–711
- 29 Moromizato S, Hisamatsu Y, Suzuki T, et al. Design and synthesis of a luminescent cyclometalated Iridium(III) complex having *N*, *N*-diethylamino group that stains acidic intracellular organelles and induces cell death by photoirradiation. *Inorg Chem*, 2012, 51: 12697–12706
- 30 Nakagawa A, Hisamatsu Y, Moromizato S, et al. Synthesis and photochemical properties of pH responsive tris-cyclometalated iridium(III) complexes that contain a pyridine ring on the 2-phenylpyridine ligand. *Inorg Chem*, 2014, 53: 409–422
- 31 Koo H, Lee H, Lee S, et al. *In vivo* tumor diagnosis and photodynamic therapy via tumoral pH-responsive polymeric micelles. *Chem Commun*, 2010, 46: 5668–5670
- 32 Mitsunaga M, Ogawa M, Kosaka N, et al. Cancer cell-selective *in vivo* near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules. *Nat Med*, 2011, 17: 1685–1691
- 33 Bryden F, Maruani A, Rodrigues J M M, et al. Assembly of high-potency photosensitizer-antibody conjugates through application of dendron multiplier technology. *Bioconjugate Chem*, 2017, 29: 176–181
- 34 Debele T A, Mekuria S L, Tsai H C. A pH-sensitive micelle composed of heparin, phospholipids, and histidine as the carrier of photosensitizers: Application to enhance photodynamic therapy of cancer. *Int J Biol Macromol*, 2017, 98: 125–138
- 35 Varchi G, Rapozzi V, Ragno D, et al. Androgen receptor targeted conjugate for bimodal photodynamic therapy of prostate cancer *in vitro*. *Bioconjugate Chem*, 2015, 26: 1662–1671
- 36 Le F G, Sol V, Ouk C, et al. Enhanced photobactericidal and targeting properties of a cationic porphyrin following attachment of Polymyxin B. *Bioconjugate Chem*, 2017, 28: 2493–2506
- 37 Chitgupi U, Zhang Y, Chi Y L, et al. Sulfonated-polyethyleneimine for photosensitizer conjugation and targeting. *Bioconjugate Chem*, 2015, 26: 1633–1639
- 38 Wen A M, Lee K L, Cao P, et al. Utilizing viral nanoparticle/dendron hybrid conjugates in photodynamic therapy for dual delivery to macrophages and cancer cells. *Bioconjugate Chem*, 2016, 27: 1227–1235
- 39 Mitra S, Foster T H. *In vivo* confocal fluorescence imaging of the intratumor distribution of the photosensitizer mono-*L*-aspartylchlorine6. *Neoplasia*, 2008, 10: 429–438
- 40 Celli J P, Spring B Q, Rizvi I, et al. Imaging and photodynamic therapy: Mechanisms, monitoring, and optimization. *Chem Rev*, 2010, 110: 2795–2838
- 41 Obaid G, Broekgaarden M, Bulin A L, et al. Photonanomedicine: A convergence of photodynamic therapy and nanotechnology. *Nanoscale*, 2016, 8: 12471–12503
- 42 Gilson R, Black K, Lane D D, et al. Hybrid TiO₂-ruthenium nano-photosensitizer synergistically produces reactive oxygen species in both hypoxic and normoxic conditions. *Angew Chem*, 2017, 56: 10717–10720
- 43 Cheng Y, Hao C, Jiang C, et al. Perfluorocarbon nanoparticles enhance reactive oxygen levels and tumour growth inhibition in photodynamic therapy. *Nat Commun*, 2015, 6: 8785–8792
- 44 Ren H, Liu J, Li Y, et al. Oxygen self-enriched nanoparticles functionalized with erythrocyte membranes for long circulation and enhanced phototherapy. *Acta Biomater*, 2017, 59: 269–282
- 45 Que Y, Liu Y, Tan W, et al. Enhancing photodynamic therapy efficacy by using fluorinated nanoplateform. *ACS Macro Lett*, 2016, 5: 168–173
- 46 Zheng D W, Li B, Li C X, et al. Carbon-dot-decorated carbon nitride nanoparticles for enhanced photodynamic therapy against hypoxic tumor via water splitting. *ACS Nano*, 2016, 10: 8715–8722
- 47 Turan I S, Yildiz D, Turksoy A, et al. A bifunctional photosensitizer for enhanced fractional photodynamic therapy: Singlet oxygen generation in the presence and absence of light. *Angew Chem*, 2016, 128: 2925–2928
- 48 Nyokong T, Ahsen V. Photosensitizers. In: *Medicine, Environment, and Security*. Netherlands: Springer, 2012. 4: 315–349
- 49 Zhu X, Wang H, Zheng L, et al. Upconversion nanoparticle-mediated photodynamic therapy induces THP-1 macrophage apoptosis via ROS bursts and activation of the mitochondrial caspase pathway. *Int J Nanomed*, 2015, 10: 3719–3736
- 50 Zhou Z, Song J, Nie L, et al. Reactive oxygen species generating systems meeting challenges of photodynamic cancer therapy. *Chem Society Rev*, 2016, 45: 6597–6626
- 51 Idris N M, Sasidharan L S, Li Z, et al. Photoactivation of core-shell titania coated upconversion nanoparticles and its effect on cell death. *J Mater Chem B*, 2014, 2: 7017–7026
- 52 Lucky S S, Muhammad I N, Li Z, et al. Titania coated upconversion nanoparticles for near-infrared light triggered photodynamic therapy. *ACS Nano*, 2015, 9: 191–205
- 53 Dou Q Q, Teng C P, Ye E, et al. Effective near-infrared photodynamic therapy assisted by upconversion nanoparticles conjugated with photosensitizers. *Int J Nanomed*, 2015, 10: 419–432
- 54 Wang C, Tao H, Cheng L, et al. Near-infrared light induced *in vivo* photodynamic therapy of cancer based on upconversion nanoparticles. *Biomaterials*, 2011, 32: 6145–6154
- 55 Wang M, Chen Z, Zheng W, et al. Lanthanide-doped upconversion nanoparticles electrostatically coupled with photosensitizers for near-infrared-triggered photodynamic therapy. *Nanoscale*, 2014, 6: 8274–8282

- 56 Bagheri A, Arandiyah H, Adnan N N M, et al. Controlled direct growth of polymer shell on upconversion nanoparticle surface via visible light regulated polymerization. *Macromolecules*, 2017, 50: S1–S14
- 57 Zeng L, Kuang S, Li G, et al. A GSH-activatable ruthenium(II)-azo photosensitizer for two-photon photodynamic therapy. *Chem Commun*, 2017, 53: 1977–1980
- 58 Alifu N, Dong X, Li D, et al. Aggregation-induced emission nanoparticles as photosensitizer for two-photon photodynamic therapy. *Mater Chem Frontiers*, 2017, 1: 1746–1753
- 59 Li M. Design of nano-fluorescent probes based on AIE luminescence mechanism and study on targeted imaging of tumor cells (in Chinese). Doctoral Dissertation. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2013 [李民. 基于 AIE 现象发光机理的纳米荧光探针的设计及肿瘤细胞靶向成像的研究. 博士学位论文. 华中科技大学, 2013]
- 60 Cui C L. Synthesis and properties of novel fluorescent chemical sensors (in Chinese). Master Dissertation. Qingdao: Qingdao University of Science and Technology, 2010 [崔存丽. 新型荧光化学传感器的合成及性能研究. 硕士学位论文. 青岛: 青岛科技大学, 2010]
- 61 Wang J, Zhang Z, Zha S, et al. Carbon nanodots featuring efficient FRET for two-photon photodynamic cancer therapy with a low fs laser power density. *Biomaterials*, 2014, 35: 9372–9381
- 62 Yu H, Feng Q, Shen L, et al. Combining two-photon activated fluorescence resonance energy transfer and near infrared photothermal effect of unimolecular micelles for enhanced photodynamic therapy. *ACS Nano*, 2016, 10: 10489–10499
- 63 Patel N J, Chen Y, Joshi P, et al. Effect of metalation on porphyrin-based bifunctional agents in tumor imaging and photodynamic therapy. *Bioconjugate Chem*, 2016, 27: 667–680
- 64 Zou J, Yin Z, Ding K, et al. BODIPY derivatives for photodynamic therapy: Influence of configuration versus heavy atom effect. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9: 32475–32481
- 65 Watley R L, Awuah S G, Bio M, et al. Dual functioning thieno-pyrrole fused BODIPY dyes for NIR optical imaging and photodynamic therapy: singlet oxygen generation without heavy halogen atom assistance. *Chem Asian J*, 2015, 10: 1335–1343
- 66 Wu W, Mao D, Hu F, et al. A highly efficient and photostable photosensitizer with near-infrared aggregation-induced emission for image-guided photodynamic anticancer therapy. *Adv Mater*, 2017, 29: 1700548
- 67 Lincoln R, Kohler L, Monro S, et al. Exploitation of long-lived 3IL excited states for metal-organic photodynamic therapy: Verification in a metastatic melanoma model. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 17161–17175
- 68 Zhang Y, Aslan K, Previte M J, et al. Metal-enhanced singlet oxygen generation: A consequence of plasmon enhanced triplet yields. *J Fluoresc*, 2007, 17: 345–349
- 69 Pfau R, Tzatsos A, Kampranis S C, et al. Members of a family of JmjC domain-containing oncoproteins immortalize embryonic fibroblasts via a JmjC domain-dependent process. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 1907–1912
- 70 Kang Z, Yan X, Zhao L, et al. Gold nanoparticle/ZnO nanorod hybrids for enhanced reactive oxygen species generation and photodynamic therapy. *Nano Res*, 2015, 8: 2004–2014
- 71 Fantacci S, De A F, Selloni A. Absorption spectrum and solvatochromism of the [Ru(4,4'-COOH-2,2'-bpy)₂(NCS)₂] molecular dye by time dependent density functional theory. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 4381–4387
- 72 Teles J, Pina J, Ribeiro C, et al. PEG-containing Ruthenium phthalocyanines as photosensitizers for photodynamic therapy: Synthesis, characterization and *in vitro* evaluation. *J Mater Chem B*, 2017, 5: 5862–5869
- 73 Hess J, Huang H, Kaiser A, et al. Evaluation of the medicinal potential of two Ruthenium(II) polypyridine complexes as one- and two-photon photodynamic therapy photosensitizers. *Chemistry*, 2017, 23: 9888–9896
- 74 Rui C, Zhang J, Chelora J, et al. Ruthenium(II) complex incorporated UiO-67 metal-organic frameworks nanoparticles for enhanced two-photon fluorescence imaging and photodynamic cancer therapy. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2017, 9: 5699–5708
- 75 Gupta J, Mohapatra J, Bahadur D. Visible light driven mesoporous Ag-embedded ZnO nanocomposites: Reactive oxygen species enhanced photocatalysis, bacterial inhibition and photodynamic therapy. *Dalton Trans*, 2017, 46: 685–696
- 76 He Y, Del V A, Qian Y, et al. Near infrared light-mediated enhancement of reactive oxygen species generation through electron transfer from graphene oxide to iron hydroxide/oxide. *Nanoscale*, 2016, 9: 1559–1566
- 77 Zhou F, Zheng B, Zhang Y, et al. Construction of near-infrared light-triggered reactive oxygen species-sensitive (UCN/SiO₂-RB+DOX)@PPADT nanoparticles for simultaneous chemotherapy and photodynamic therapy. *Nanotechnology*, 2016, 27: 235601
- 78 Li L, Cho H, Yoon K H, et al. Antioxidant-photosensitizer dual-loaded polymeric micelles with controllable production of reactive oxygen species. *Int J Pharm*, 2014, 471: 339–348
- 79 Sun Q, You Q, Pang X, et al. A photoresponsive and rod-shape nanocarrier: Single wavelength of light triggered photothermal and photodynamic therapy based on AuNRs-capped & Ce6-doped mesoporous silica nanorods. *Biomaterials*, 2017, 122: 188–200
- 80 Bartusik D, Aebischer D, Ghogare A, et al. A fiberoptic (photodynamic therapy type) device with a photosensitizer and singlet oxygen delivery probe tip for ovarian cancer cell killing. *Photochem Photobiol*, 2013, 89: 936–941
- 81 Song X, Liang C, Gong H, et al. Photosensitizer-conjugated albumin-polypyrrole nanoparticles for imaging-guided *in vivo* photodynamic/photothermal therapy. *Small*, 2015, 11: 3932–3941

- 82 Sha S, Qin L, Wang A, et al. Metabolic imaging of the tumor treated by KillerRed fluorescent protein-based photodynamic therapy in mice. *Int Soc Optics Photon*, 2014: 89440T
- 83 Takehara K, Tazawa H, Hashimoto Y, et al. Abstract 706: A novel photodynamic therapy with virus-mediated delivery of photosensitive cytotoxic fluorescent protein KillerRed for human cancers. *Cancer Res*, 2014, 74: 706
- 84 Liao Z X, Kempson I M, Fa Y C, et al. Magnetically guided viral transduction of gene-based sensitization for localized photodynamic therapy to overcome multidrug resistance in breast cancer cells. *Bioconjugate Chem*, 2017, 28: 1702–1708
- 85 Schlothauer J, Röder B, Hackbarth S, et al. *In vivo* detection of time-resolved singlet oxygen luminescence under PDT relevant conditions. *Int Soc Optic Eng*, 2010, 7551: 484–490
- 86 Wang M X, Dai Z F. Advances in equipment for tumor photodynamic therapy (in Chinese). *Chin Sci Bull*, 2017, 62: 1591–1601 [王梦玄, 戴志飞. 癌症光动力治疗仪的研究进展. *科学通报*, 2017, 62: 1591–1601]
- 87 Lin L, Chen L, Wang M, et al. Direct imaging of singlet oxygen luminescence generated in blood vessels during photodynamic therapy. In: Popp J, Tuchin V V, Matthews D L, eds. *Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care IV*. Bellingham: SPIE-The International Society for Optical Engineering, 2014. 9129: 912920
- 88 Jimá@Nez-Banzo A, Ragã s X, Kapusta P, et al. Time-resolved methods in biophysics. 7. Photon counting vs. analog time-resolved singlet oxygen phosphorescence detection. *Photochem Photobiol*, 2008, 7: 1003–1010
- 89 Schlothauer J C, Hackbarth S, Jäger L, et al. Time-resolved singlet oxygen luminescence detection under photodynamic therapy relevant conditions: comparison of *ex vivo* application of two photosensitizer formulations. *J Biomed Opt*, 2012, 17: 115005
- 90 Boso G, Ke D, Korzh B, et al. Time-resolved singlet-oxygen luminescence detection with an efficient and practical semiconductor single-photon detector. *Biomed Optic Express*, 2015, 7: 211–224
- 91 Kim I W, Park J M, Roh Y J, et al. Direct measurement of singlet oxygen by using a photomultiplier tube-based detection system. *J Photochem Photobiol B*, 2016, 159: 14–23
- 92 Boso G, Korzh B, Zbinden H. Low noise InGaAs/InP single-photon negative feedback avalanche diodes: Characterization and applications. In: Itzler M A, Campbell J, eds. *Advanced Photon Counting Techniques IX*. Bellingham: SPIE-International Society of Optical Engineering, 2015. 9492: 94920Q
- 93 Boso G, Korzh B, Sanguinetti B, et al. Low noise InGaAs/InP single-photon detector for singlet oxygen detection. In: Razeghi M, Tournie E, Brown G J, eds. *Quantum Sensing and Nanophotonic Devices XII*. Bellingham: SPIE-International Society of Optical Engineering, 2015. 9370: 93701S
- 94 Sna J, Plush S E, Voelcker N H. Singlet oxygen detection on a nanostructured porous silicon thin film via photonic luminescence enhancements. *Langmuir*, 2017, 33: 8606–8613
- 95 Ragàs X, Gallardo A, Zhang Y, et al. Singlet oxygen phosphorescence enhancement by silver islands films. *J Phys Chem C*, 2011, 115: 16275–16281
- 96 Scholz M, Biehl A L. The singlet-oxygen-sensitized delayed fluorescence in mammalian cells: A time-resolved microscopy approach. *Photochem Photobiol Sci*, 2015, 14: 700–713
- 97 Maryakhina V S, Letuta S N. Pathology development stage and its influence on the delayed fluorescence kinetics of molecular probes. *Laser Phys*, 2013, 23: 54–58
- 98 Letuta S N, Kuvandykova A F, Pashkevich S N, et al. Features of the delayed fluorescence kinetics of exogenous fluorophores in biological tissues. *Russ J Phys Chem A*, 2013, 87: 1582–1587
- 99 Yin Y J. Synthesis and application of singlet oxygen-specific ruthenium complex phosphorescence probes (in Chinese). Master Dissertation. Dalian: Dalian University of Technology, 2012 [尹月皎. 单线态氧特异性钌配合物磷光探针的合成与应用. 硕士学位论文. 大连: 大连理工大学, 2012]
- 100 Li B H, Lin H Y, Chen D F, et al. Singlet oxygen detection during photosensitization. *J Innov Optic Health Sci*, 2013, 6: 1330002
- 101 Koh E, Fluhr R. Singlet oxygen detection in biological systems: Uses and limitations. *Plant Signal Behav*, 2016, 11: e1192742
- 102 Bresolí-Obach R, Nos J, Mora M, et al. Anthracene-based fluorescent nanoprobe for singlet oxygen detection in biological media. *Methods*, 2016, 109: 64–72
- 103 Kalyanaraman B. Oxidative chemistry of fluorescent dyes: Implications in the detection of reactive oxygen and nitrogen species. *Biochem Soc Transact*, 2011, 39: 1221–1225
- 104 Henderson J R, Swallow H, Boulton S, et al. Direct, real-time monitoring of superoxide generation in isolated mitochondria. *Free Radic Res*, 2009, 43: 796–802
- 105 Schwarzländer M, Logan D C, Fricker M D, et al. The circularly permuted yellow fluorescent protein cpYFP that has been used as a superoxide probe is highly responsive to pH but not superoxide in mitochondria: Implications for the existence of superoxide “flashes”. *Biochem J*, 2011, 437: 381–387
- 106 Starkov A A. Measurement of mitochondrial ROS production. *Methods Mol Biol*, 2010, 648: 245–255

- 107 Cochemé H M, Quin C, Mcquaker S J, et al. Measurement of H₂O₂ within living *Drosophila* during aging using a ratiometric mass spectrometry probe targeted to the mitochondrial matrix. *Cell Metab*, 2011, 13: 340–350
- 108 Belousov V, Fradkov A, Lukyanov K, et al. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat Methods*, 2006, 3: 281–286
- 109 Mailloux R J. Teaching the fundamentals of electron transfer reactions in mitochondria and the production and detection of reactive oxygen species. *Redox Biol*, 2015, 4: 381–398
- 110 Keller A, Mohamed A, Dröse S, et al. Analysis of dichlorodihydrofluorescein and dihydrocalcein as probes for the detection of intracellular reactive oxygen species. *Free Radical Res*, 2004, 38: 1257–1267
- 111 Bhattacharya S, Sarkar R, Nandi S, et al. Detection of reactive oxygen species by a carbon-dot-ascorbic acid hydrogel. *Anal Chem*, 2016, 89: 830–836
- 112 Ma Y, Wang Q, Zhu Q, et al. Dual fluorescence nano-conjugates for ratiometric detection of reactive oxygen species in inflammatory cells. *J Biophoton*, 2018, 11: 201700015
- 113 Ju E, Liu Z, Du Y, et al. Heterogeneous assembled nanocomplexes for ratiometric detection of highly reactive oxygen species *in vitro* and *in vivo*. *ACS Nano*, 2014, 8: 6014–6023
- 114 Tanaka K, Miura T, Umezawa N, et al. Rational design of fluorescein-based fluorescence probes. Mechanism-based design of a maximum fluorescence probe for singlet oxygen. *J Am Chem Soc*, 2001, 123: 2530–2536
- 115 Shabat D, Hananya N, Green O, et al. A highly-efficient chemiluminescence probe for detection of singlet oxygen in living cells. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 1793–1796
- 116 Keng C L, Lin Y C, Tseng W L, et al. Design of peptide-based probes for the microscale detection of reactive oxygen species. *Anal Chem*, 2017, 89: 10883–10888
- 117 Yu M, Xie D, Phan K P, et al. A Co^{II} complex for ¹⁹F MRI-based detection of reactive oxygen species. *Chem Commun*, 2016, 52: 13885–13888
- 118 Prow T W, Sundh D, Luty G A. Nanoscale biosensor for detection of reactive oxygen species. *Methods Mol Biol*, 2013, 1028: 3–14
- 119 Chu W, Chepetan A, Zhou D, et al. Development of a PET radiotracer for noninvasive imaging of the reactive oxygen species, superoxide, *in vivo*. *Org Biomol Chem*, 2014, 12: 4421–4431
- 120 Carroll V N, Truillet C, Shen B, et al. [¹¹C]Ascorbic and [¹¹C]dehydroascorbic acid, an endogenous redox pair for sensing reactive oxygen species using positron emission tomography. *Chem Commun*, 2016, 52: 4888–4890
- 121 Zhang W, Cai Z, Li L, et al. Optimized and automated radiosynthesis of [¹⁸F]DHMT for translational imaging of reactive oxygen species with positron emission tomography. *Molecules*, 2016, 21: 1696–1706
- 122 Wilson A A, Sadovski O, Nobrega J N, et al. Evaluation of a novel radiotracer for positron emission tomography imaging of reactive oxygen species in the central nervous system. *Nucl Med Biol*, 2017, 53: 14–20
- 123 Hamblin M R. Strategies to potentiate immune response after photodynamic therapy. *Int Soc Optic Photon*, 2015, 932405
- 124 Wachowska M, Gabrysiak M, Muchowicz A, et al. 5-Aza-2'-deoxycytidine potentiates antitumour immune response induced by photodynamic therapy. *Eur J Cancer*, 2014, 50: 1370–1381
- 125 Zhao H Y, Wang Y C, Qiu H X, et al. Photodynamic therapy and anti-tumor immunity (in Chinese). *Chin J Laser Med Surg*, 2014, (1): 34–38 [赵洪友, 王钰斌, 邱海霞, 等. 光动力治疗与抗肿瘤免疫. *中国激光医学杂志*, 2014, (1): 34–38]
- 126 Garg A D, Agostinis P. ER stress, autophagy and immunogenic cell death in photodynamic therapy-induced anti-cancer immune responses. *Photochem Photobiol Sci*, 2014, 13: 474–487
- 127 Lee K B, Lee J S, Park J W, et al. Low energy proton beam induces tumor cell apoptosis through reactive oxygen species and activation of caspases. *Exp Mol Med*, 2008, 40: 118–129
- 128 Shahzidi S, Brech A, Sioud M, et al. Lamin A/C cleavage by caspase-6 activation is crucial for apoptotic induction by photodynamic therapy with hexaminolevulinate in human B-cell lymphoma cells. *Cancer Lett*, 2013, 339: 25–32
- 129 Pinghua T U, Huang Q, Yunsheng O U, et al. Aloe-emodin-mediated photodynamic therapy induces autophagy and apoptosis in human osteosarcoma cell line MG-63 through the ROS/JNK signaling pathway. *Oncol Rep*, 2016, 35: 3209–3215
- 130 Ito H, Matsui H. Mitochondrial reactive oxygen species and photodynamic therapy. *Laser Therapy*, 2016, 25: 193–199
- 131 Lamberti M J, Pansa M F, Vera R E, et al. Transcriptional activation of HIF-1 by a ROS-ERK axis underlies the resistance to photodynamic therapy. *PLoS One*, 2017, 12: e0177801
- 132 Tan M, Zhu Y, Kovacev J, et al. Disruption of Sag/Rbx2/Roc2 induces radiosensitization by increasing ROS levels and blocking NF-κB activation in mouse embryonic stem cells. *Free Radical Bio Med*, 2010, 49: 976–983
- 133 Gozali M V, Yi F, Zhang J A, et al. Photodynamic therapy inhibit Fibroblast Growth Factor-10 induced keratinocyte differentiation and proliferation through ROS in Fibroblast Growth Factor Receptor-2b pathway. *Sci Rep*, 2016, 6: 27402
- 134 Han X B, Li H X, Jiang Y Q, et al. Upconversion nanoparticle-mediated photodynamic therapy induces autophagy and cholesterol efflux of macrophage-derived foam cells via ROS generation. *Cell Death Disease*, 2017, 8: e2864

Summary for “光动力活性氧的研究进展”

Reactive oxygen species in photodynamic therapy

Xinpeng Jiang & Zhifei Dai*

Department of Biomedical Engineering, College of Engineering, Peking University, Beijing 100871, China

* Corresponding author, E-mail: zhifei.dai@pku.edu.cn

Photosensitizer-mediated production of reactive oxygen species (ROS) plays a key role in photodynamic therapy (PDT). Reactive oxygen species mainly includes singlet oxygen, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide anion radical and so on, among which singlet oxygen is the most important reactive oxygen species.

In this paper, we firstly introduce the basic property of reactive oxygen species, generation and elimination of endogenous reactive oxygen species and generation mechanism of exogenous reactive oxygen species based on light, oxygen and photosensitizer. Next, we focus on the photosensitizers used to generate reactive oxygen species, factors that affect the yield of reactive oxygen species, and methods to increase the reactive oxygen species concentration at the tumor site. There are many factors that can affect the reactive oxygen species concentration at the tumor site, mainly among which are the singlet oxygen yield of the photosensitizer, the targeting of the photosensitizer, the oxygen concentration, and the illumination frequency. To achieve a good PDT effect, many photosensitizers or their nanoparticles with high singlet oxygen generation and good targeting ability are synthesized. Perfluorocarbon is used to deliver oxygen to overcome oxygen deficiency. Upconversion nanoparticles and two-photon absorption are very useful to solve the problem of weak penetration of short-wavelength light. New PDT methods are also introduced in the text, such as PDT combined photothermal therapy or chemotherapy.

Then, we summarized various methods and technologies for reactive oxygen species detection, including direct detection of phosphorescence spectrophotometry, fluorescent probes and chemical probes for indirect detection, electron spin resonance, and positron emission tomography. The direct phosphorescence method mainly detects singlet oxygen based on the 1270 nm phosphorescence emission when singlet oxygen returns to the ground state. The first method to enhance the 1270 nm phosphor signal is to use a NIR photomultiplier tube (PMT) or an InGaAs linear array in combination with scanning of the excitation laser beam, and the second one is based on the use of a NIR camera with a filter. Because the lifetime of singlet oxygen is very short, time resolution is especially important. There are basically three main photon counting techniques: gated photon counting (GPC), multichannel scaling (MCS), and time-correlated single photon counting (TCSPC). In addition, singlet oxygen-sensitized delayed fluorescence (SOSDF) can also be used to detect singlet oxygen.

Various new types of probes can specifically detect different types of reactive oxygen species, for example, 9, 10-anthracenedipropionic acid and MitoSOX can be used to detect singlet oxygen and superoxide anion in living cells respectively. The fluorescent probe itself does not have fluorescence, but reacts with reactive oxygen species to form an inner oxide, and emits strong fluorescence under the excitation of a certain wavelength of light. The difference of chemical probe is that it does not require light excitation because it can emit light spontaneously after reacted with reactive oxygen species. Electrons spin resonance (ESR) and positron emission tomography (PET) are also available to detect reactive oxygen species by using a probe.

Finally, we discussed the mechanism of reactive oxygen species killing tumor cells, mainly in the following three aspects: (1) direct toxicity to tumor cells and induce their necrosis, apoptosis or autophagy; (2) damage on the tumor capillary endothelial cells and destruction of the microvasculature; (3) activation of an acute inflammatory response in host defense mechanisms. The effect of reactive oxygen species on the immune system and the apoptotic pathway of tumor cells from genes, proteins to the cell level were described in detail.

photodynamic therapy, reactive oxygen species, singlet oxygen, photosensitizer, detection, mechanism

doi: 10.1360/N972018-00214