

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.01196

Mppa 介导的光动力疗法诱导人卵巢癌细胞凋亡

田 思¹, 雍 敏², 朱 江³, 陈 青¹, 白定群^{1*}, 虞乐华³, 于廷和²

1. 重庆医科大学附属第一医院康复医学科, 重庆 400016
2. 重庆医科大学附属第二医院妇产科, 重庆 400010
3. 重庆医科大学附属第二医院康复医学科, 重庆 400010

[摘要] **目的** 探讨焦脱镁叶绿酸甲酯(methyl pyropheophorbide-a, Mppa)介导的光动力疗法(Mppa-PDT)抑制人卵巢癌 SKOV3 细胞活性、触发其凋亡的机制。**方法** 将处于对数生长期的人卵巢癌 SKOV3 细胞随机分为 Mppa-PDT 处理组(加光敏剂 Mppa 和 LED 光照处理)和对照组(空白对照、仅加光敏剂 Mppa 单药对照、仅接受 LED 单光对照)。Mppa-PDT 作用于人卵巢癌 SKOV3 细胞后, CCK-8 法检测细胞活性; Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡率; DAPI 染色观察细胞凋亡的核的形态学改变; DCFH-DA 染色观察细胞内活性氧(ROS)的产生; 单细胞凝胶电泳观察 DNA 损伤情况; 蛋白质印迹法检测 p53、Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白的表达变化。**结果** (1)Mppa-PDT 能显著抑制人卵巢癌 SKOV3 细胞的活性, 其抑制作用具有一定的剂量依赖性;(2)Mppa-PDT 诱导的人卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡率高于空白对照、单药对照和单光对照组($P < 0.05$), 且空白、单药、单光 3 组对照组间凋亡率差异无统计学意义($P > 0.05$); (3)Mppa-PDT 作用于人卵巢癌 SKOV3 细胞后, DAPI 细胞核荧光染色可见细胞核深染的凋亡细胞; DCFH-DA 荧光染色发现 Mppa-PDT 组细胞内 ROS 水平高于 3 个对照组; 单细胞凝胶电泳显示 Mppa-PDT 组的 DNA 损伤情况高于 3 个对照组; 蛋白质印迹法检测发现 p53、Caspase-3、Bax 蛋白表达升高, Bcl-2 蛋白表达降低($P < 0.05$)。**结论** Mppa 介导的光动力疗法能够抑制人卵巢癌 SKOV3 细胞活性并诱发其凋亡, 且伴随有 DNA 损伤及线粒体凋亡途径的激活。

[关键词] 光动力疗法; 焦脱镁叶绿酸甲酯; 活性氧; DNA 损伤; 线粒体凋亡途径

[中图分类号] R 737.31 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)11-1196-06

Methyl pyropheophorbide-a-mediated photodynamic therapy induces apoptosis in human ovarian cancer cells

TIAN Si¹, YONG Min², ZHU Jiang³, CHEN Qing¹, BAI Ding-qun^{1*}, YU Le-hua³, YU Ting-he²

1. Department of Rehabilitation Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
2. Department of Obstetrics and Gynecology, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China
3. Department of Rehabilitation Medicine, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism by which methyl pyropheophorbide-a-mediated photodynamic therapy (Mppa-PDT) inhibit cell viability and induce apoptosis in human ovarian cancer cell line SKOV3. **Methods** Human ovarian cancer cells SKOV3 at the logarithmic growth phase were divided into Mppa-PDT treated group (both Mppa and PDT treated group) and control groups (the blank group, the only Mppa treated group and only PDT treated group). After Mppa-PDT treatment, the cell viability was examined with CCK-8 assay; cell apoptosis was detected by flow cytometry with Annexin V-FITC/PI; and nuclear morphological changes during cell apoptosis was detected by DAPI staining. Moreover, the cellular reactive oxygen species (ROS) were detected by DCFH-DA staining; DNA damage was observed by single cell gel electrophoresis; and the protein expression of p53, Caspase-3, Bax, and Bcl-2 were assessed by Western blotting analysis. **Results** (1) Mppa-PDT could greatly suppress the cell viability of human ovarian cancer cells SKOV3 in a dose-dependent manner. (2) The cell apoptosis rate of Mppa-PDT treated group was significantly higher than those of three control groups (blank group, Mppa group and PDT group) ($P < 0.05$), and there was no difference among the three control groups ($P >$

[收稿日期] 2015-03-06 **[接受日期]** 2015-04-28

[基金项目] 国家自然科学基金(81171859, 81101692), 重庆市自然科学基金(2010-1-20). Supported by National Natural Science Foundation of China (81171859, 81101692) and Natural Science Foundation of Chongqing (2010-1-20).

[作者简介] 田 思, 硕士生. E-mail: 464662413@qq.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 023-89012164, E-mail: baidingqun@163.com

0.05). (3) After treating with Mppa-PDT, DAPI staining showed strongly stained nuclei of the apoptotic cells; DCFH-DA staining displayed higher level of ROS than those of the three control groups; single cell gel electrophoresis showed greater DNA damage than those of the three control groups; and Western blotting analysis showed that the expression of p53, Caspase-3 and Bax protein was increased and Bcl-2 protein was decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Mppa-PDT can significantly suppress cell viability and induce apoptosis in human ovarian cancer cell SKOV3, accompanied by DNA damage and the activation of mitochondrial apoptosis pathway.

[Key words] photodynamic therapy; methyl pyropheophorbide-a; reactive oxygen species; DNA damage; mitochondrial apoptosis pathway

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(11):1196-1201]

卵巢癌为女性生殖系统常见的恶性肿瘤,其中上皮性卵巢癌死亡率居妇科肿瘤首位,严重威胁着女性的生命健康。卵巢癌症状不典型,发现时已是晚期,使患者失去了手术机会,并且随着对化疗药物耐受的产生,寻求新的卵巢癌治疗方法已迫在眉睫^[1]。光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)是顺应医学发展而兴起的一种新型肿瘤治疗方法,其利用特异性聚集于肿瘤组织中的光敏剂,在特定波长的光照下被激活,发生复杂的光化学反应产生活性氧(reactive oxygen species, ROS),导致肿瘤组织不可逆的损伤^[2]。焦脱镁叶绿酸甲酯(methyl pyropheophorbide-a, Mppa)属于叶绿素衍生物,为第 2 代新型光敏剂,于 667 nm 处有最大吸收峰。因其吸收性好、能量密度高、渗透性强而具有广泛的临床应用前景^[3-5]。本课题通过观察 Mppa 介导的 PDT 抑制人卵巢癌 SKOV3 细胞活性及触发其凋亡的现象,探讨其可能的作用机制,为 PDT 应用于卵巢癌的临床治疗提供实验资料。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 Mppa(购于 Sigma-Aldrich)用二甲亚砜(DMSO)溶解后过滤除菌,配制成浓度为 10 mmol/L 的储存液, -20℃ 避光保存; LED 多波长光源由本研究小组自行开发研制; 胎牛血清、RPMI 1640 培养基、胰蛋白酶购于 HyClone; CCK-8 购于日本同仁化学研究所; Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购于南京凯基生物科技发展有限公司; 荧光染料 DAPI 购于碧云天生物技术有限公司; DCFH-DA 购于 Sigma; p53 抗体、Caspase-3 抗体购于 Abcam; Bax、Bcl-2、 β -actin 抗体购于 Proteintech; 二抗购于中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 细胞培养及实验分组 人卵巢癌 SKOV3 细胞株购于上海复旦大学细胞库, 37℃、5% CO₂ 条件

下于 RPMI 1640 培养液(含 1% 青霉素-链霉素和 10% 胎牛血清)中常规培养。将处于对数生长期的人卵巢癌 SKOV3 细胞随机分为 Mppa-PDT 处理组(加光敏剂 Mppa 和 LED 光照处理)、空白对照组(既不加光敏剂 Mppa 也不接受 LED 光照处理)、单药对照组(仅加光敏剂 Mppa 处理)、单光对照组(仅接受 LED 光照处理)3 组。Mppa-PDT 组及单药对照组更换为含终浓度为 2 μ mol/L Mppa 的培养液避光培养, 空白及单光对照组加入含等浓度 DMSO 的培养液培养。12 h 后去除含 Mppa 的培养液, PBS 洗涤细胞 3 次后更换成完全培养液。Mppa-PDT 组及单光对照组接受 LED 光照处理, 波长为 630 nm, 连续输出方式, 功率密度为 30 mW/cm², 光照时间为 360 s。调整光斑面积使各组细胞接受到的光照强度为 10.8 J/cm²(光照强度 = 功率 \times 光照时间)。

1.3 CCK-8 法检测 SKOV3 细胞活性 常规消化处于对数生长期的 SKOV3 细胞, 以 5×10^3 /孔的密度接种于 96 孔板培养。待其贴壁后随机分组并进行光动力处理, 光敏剂 Mppa 浓度分别为 0、1、2、3、4、5 μ mol/L, LED 光照时间为 0、120、240、360、480、600 s, 即使其接受到的光照强度为 0、3.6、7.2、10.8、14.4、18.0 J/cm²。继续避光培养 24 h 后加入 CCK-8 试剂 10 μ L, 37℃、5% CO₂ 条件下孵育 1 h, 用全波长酶标仪于 450 nm 波长下测定各孔光密度值(D 值), 取平均值, 按公式计算细胞存活率: 存活率(%) = (实验组 D 值 - 空白对照组 D 值) / (阴性对照组 D 值 - 空白对照组 D 值) \times 100%。实验组为具有细胞和 CCK-8 溶液且受处理的孔, 空白对照组为具有培养液和 CCK-8 溶液而没有细胞的孔, 阴性对照组为有细胞和 CCK-8 溶液而没有受处理的孔。

1.4 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测 Mppa-PDT 诱发的 SKOV3 细胞凋亡 常规消化处

于对数生长期的 SKOV3 细胞,以 1×10^5 /孔的密度接种于 6 孔板培养。待其贴壁后随机分为组,并进行光动力处理。12 h 后常规消化收集细胞,采用 Annexin V-FITC/PI 双染,流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.5 DAPI 染色观察凋亡细胞的形态学改变 将处于对数生长期的人卵巢癌 SKOV3 细胞接种于 48 孔板中,分组及处理同上。12 h 后去掉原培养液, PBS 轻轻洗涤细胞 3 次,4%多聚甲醛固定 15 min, 0.1% Triton X-100 破膜 2 min,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI 染料于暗处染色 15 min, PBS 洗涤细胞 3 次后用荧光显微镜观察并拍照。

1.6 DCFH-DA 染色检测 SKOV3 细胞内 ROS 水平 细胞内的 ROS 可以将不带荧光的 DCFH-DA 氧化为带绿色荧光的 DCF,通过检测 DCF 能够反映细胞内 ROS 的水平。常规消化处于对数生长期的 SKOV3 细胞,接种于 48 孔板中,待其贴壁后随机分组并进行光动力处理。1 h 后去掉原培养液, PBS 洗涤细胞 3 次,加含 20 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 DCFH-DA 无血清培养液,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下孵育 30 min,弃掉培养液后 PBS 洗涤细胞 3 次,荧光显微镜下观察并拍照。另取细胞接种于 96 孔板中, Mppa-PDT 处理 1 h 后,按上述方法进行 DCFH-DA 染色后用全波长酶标仪对 ROS 水平进行定量检测(激发波长为 488 nm,发射波长 525 nm)。

1.7 单细胞凝胶电泳观察 DNA 损伤 单细胞凝胶电泳实验又称彗星实验,可检测 DNA 断裂水平,准确反映 DNA 损伤情况。通过观察彗星的头长、尾长及头尾比来确定 DNA 损伤情况。细胞接种于 6 孔板中,随机分组并进行光动力处理。12 h 后收集细胞用于实验。1%正常熔点琼脂糖凝胶 150 μL 滴加于经多聚赖氨酸处理的载玻片上,4 $^{\circ}\text{C}$ 固化 20 min 后再滴加含 8×10^3 细胞的 1%低熔点胶,4 $^{\circ}\text{C}$ 固化 20 min 后置于碱性裂解液中过夜,取出玻片,碱性电泳液中解旋 20 min 后,25 V、300 mA 电泳 20 min,中性缓冲液洗涤 3 次(每次 10 min),5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DAPI 暗处染色 15 min,蒸馏水洗 15 min,置于荧光显微镜下观察并拍照。

1.8 蛋白质印迹法检测凋亡相关蛋白 处于对数生长期的实验组和对照组细胞,经 PBS 洗涤后于冰上加入裂解液 RIPA 及 PMSF(RIPA : PMSF =

100 : 1),提取细胞全蛋白,BCA 法测各组蛋白浓度。取等质量各组蛋白进行 SDS-PAGE,湿转法将蛋白质转移至 0.45 μm 的 PVDF 膜上,经封闭、孵育一抗(1 : 1 000)、二抗(1 : 1 000)后采用 ECL 化学发光法显色,观察各组相应蛋白的表达情况。以 β -actin 为内参,以目的蛋白条带和 β -actin 条带的灰度比值进行半定量。

1.9 统计学处理 所得数据采用 SPSS 17.0 统计软件分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据的差异比较采用单因素方差分析及两因素方差分析,两两比较采用 SNK- q 法。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 Mppa-PDT 抑制人卵巢癌 SKOV3 细胞活性 如图 1 所示,在 0~5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 浓度范围内单纯的 Mppa 对细胞活性无影响,在 0~18.0 J/cm^2 的光照强度范围内单纯的光照对细胞活性也几乎无影响。Mppa 联合光照对细胞活性有明显的抑制作用,且其抑制作用呈剂量依赖性。本研究在后续的实验参考以往研究^[6]选择 2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 Mppa 用于实验。

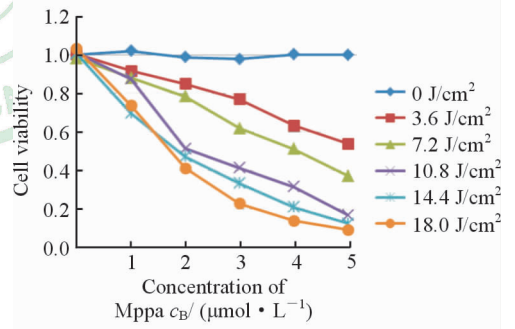


图 1 CCK-8 法检测人卵巢癌细胞 SKOV3 的活性

Fig 1 Viability of SKOV3 cells detected by cell counting kit-8 Mppa; Methyl pyropheophorbide-a

2.2 Mppa-PDT 诱导人卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡 PDT 处理(2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Mppa 接受 10.8 J/cm^2 光照)人卵巢癌 SKOV3 细胞 12 h 后,流式细胞术检测细胞凋亡情况,结果见图 2。Mppa-PDT 组人卵巢癌细胞 SKOV3 的凋亡率[(28.30 \pm 1.96)%]高于空白对照组[(2.43 \pm 0.24)%]、单药对照组[(2.86 \pm 0.41)%]和单光对照组[(2.95 \pm 0.36)%]($P < 0.05$),Mppa-PDT 组凋亡率分别为空白、单药、单光对照组的 11.65、9.90、9.60 倍,且空白、单

药、单光 3 对照组间细胞凋亡率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

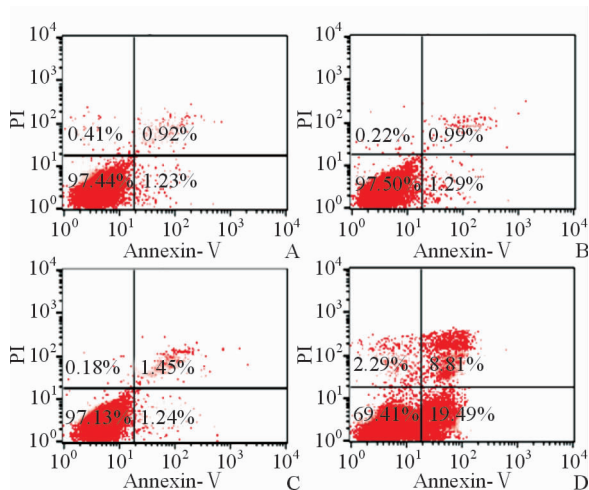


图 2 流式细胞术检测人卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡情况

Fig 2 Analysis of apoptosis in SKOV3 cells in different groups by flow cytometry

A: Blank group; B: Only Mppa treated group; C: Only PDT treated group; D: Mppa-PDT group. PDT: Photodynamic therapy; Mppa: Methyl pyropheophorbide-a

2.3 Mppa-PDT 导致人卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡的形态学观察 由图 3 A₁~D₁ 所示, Mppa-PDT 处理组细胞核染色质浓缩、深染, 凋亡小体形成, 且这类细胞明显多于空白、单药、单光 3 对照组, 而 3 个对照组间这类染色质深染的细胞数无明显差异。

2.4 Mppa-PDT 诱导人卵巢癌 SKOV3 细胞内 ROS 水平的升高 DCFH-DA 荧光染色结果(图 3 A₂~D₂)显示, Mppa-PDT 组绿色荧光强度(1.82 ± 0.07)高于空白(0.27 ± 0.03)、单药(0.30 ± 0.05)、单光(0.28 ± 0.04)3 个对照组 ($P < 0.05$)。且 3 组对照组绿色荧光强度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。这表明 Mppa-PDT 能够诱导细胞产生 ROS。

2.5 Mppa-PDT 触发人卵巢癌 SKOV3 细胞 DNA 损伤 单细胞凝胶电泳结果(图 3 A₃~D₃)显示, Mppa-PDT 处理组有明显“彗星”现象形成, 而空白、单药、单光 3 个对照组无“彗星”形成, 即 Mppa-PDT 组存在 DNA 损伤, 而 3 个对照组无明显 DNA 损伤。

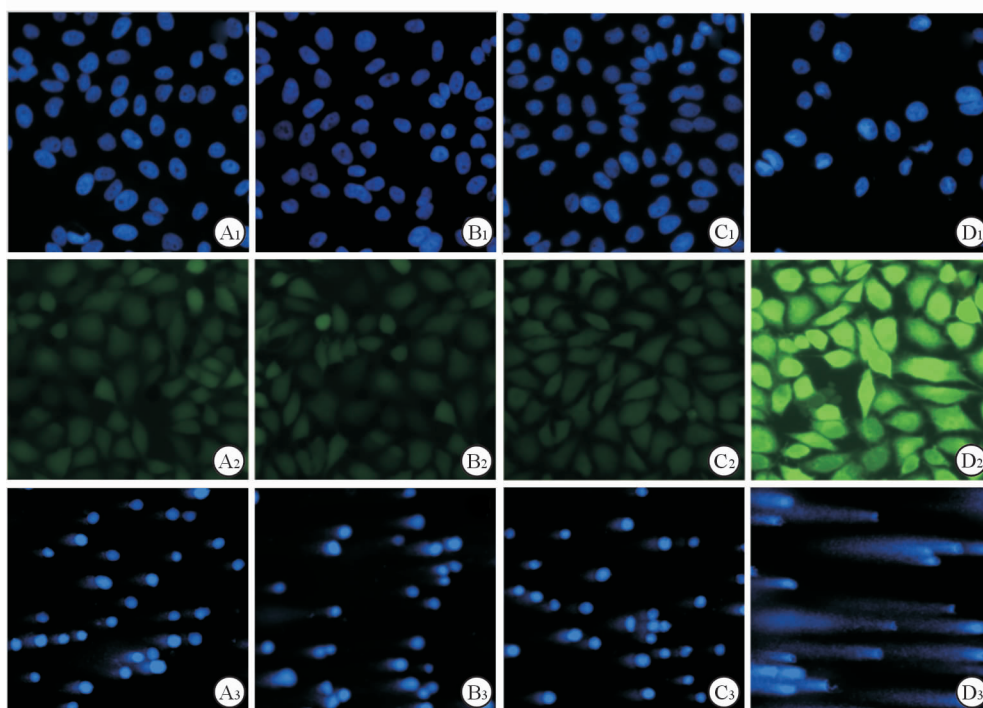


图 3 DAPI 染色观察人卵巢癌 SKOV3 细胞核改变情况 (A₁~D₁); DCFH-DA 染色检测 SKOV3 细胞内 ROS 的产生及其定量 (A₂~D₂); 单细胞凝胶电泳观察 SKOV3 细胞 DNA 损伤情况 (A₃~D₃)

Fig 3 Changes of nuclei in SKOV3 cells by DAPI staining (A₁-D₁); production of ROS in SKOV3 cells by DCFH-DA staining (A₂-D₂); and DNA damage in SKOV3 cells by single cell gel electrophoresis (A₃-D₃)

A₁, A₂, A₃: Blank group; B₁, B₂, B₃: Only Mppa treated group; C₁, C₂, C₃: Only PDT treated group; D₁, D₂, D₃: Mppa-PDT group. ROS: Reactive oxygen species; PDT: Photodynamic therapy; Mppa: Methyl pyropheophorbide-a. Original magnification: $\times 200$

2.6 Mppa-PDT 诱导 p53 及凋亡相关蛋白的表达 蛋白质印迹结果(图 4)显示,Mppa-PDT 组 p53、Caspase-3、Bax 蛋白表达高于空白、单药、单光

3 个对照组,Bcl-2 低于 3 个对照组($P < 0.05$),且空白、单药、单光 3 个对照组间上述蛋白的表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。

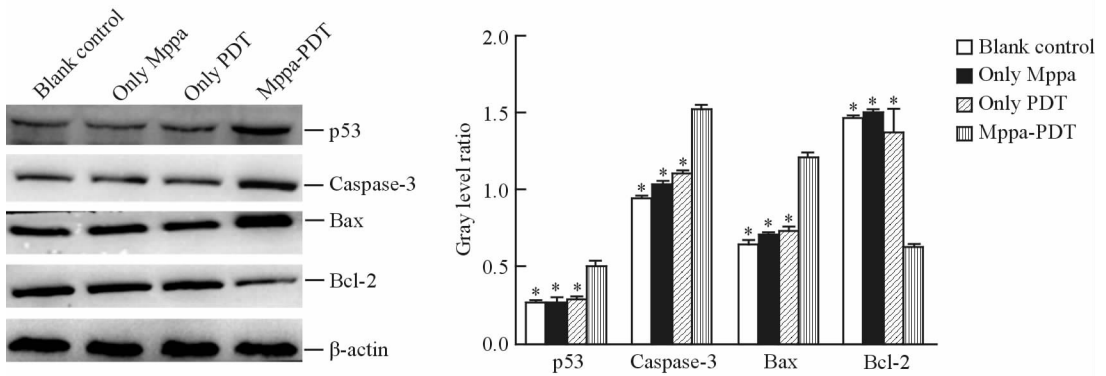


图 4 蛋白质印迹法检测 p53、Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达情况

Fig 4 Analysis of p53, Caspase-3, Bax and Bcl-2 protein levels in differernt groups by Western blotting analysis

Mppa; Methyl pyrropeophorbide-a; PDT: Photodynamic therapy. * $P < 0.05$ vs Mppa-PDT group. $n = 3, \bar{x} \pm s$

3 讨论

卵巢癌严重威胁着女性健康,传统的手术、放化疗等治疗手段具有一定的局限性,因此寻找新型的卵巢癌治疗方法迫在眉睫^[7]。PDT 因其无创、不良反应小、可反复应用等优点具有广阔的临床应用前景^[8]。目前研究认为 PDT 杀伤肿瘤的机制主要是:(1)产生大量的 ROS 损伤蛋白、质膜等,最终导致细胞凋亡;(2)作用于肿瘤血管,使血管闭塞,形成血栓等导致肿瘤营养输入途径的中断,最终杀伤肿瘤细胞;(3)激活机体免疫系统,通过特异性及非特异性免疫反应杀伤肿瘤细胞^[2]。Mppa 属于叶绿素衍生物,最大吸收波长位于红光区,因其能量密度高、渗透性强而成为非常具有潜能的新型光敏剂^[3-5]。但目前 Mppa-PDT 对卵巢癌细胞的作用研究报道甚少,本研究探讨 Mppa-PDT 对卵巢癌细胞增殖的影响及其可能的机制,为 Mppa-PDT 用于临床卵巢癌治疗提供实验资料。本研究结果提示 LED 光照(10.8 J/cm^2)活化 Mppa($2 \mu\text{mol/L}$)能显著抑制人卵巢癌细胞活性,促进其凋亡。

PDT 通过一定波长的光照活化光敏剂,使低能量态的氧分子跃迁到高能态产生 ROS 而起作用^[9]。ROS 是生物代谢的产物,化学反应性极强,参与广泛的细胞信号转导,通过调节凋亡信号通路导致细胞凋亡^[10-11]。本实验发现经 Mppa-PDT 处

理后细胞内 ROS 表达升高。ROS 可以攻击细胞 DNA,使 DNA 链断裂、位点突变^[12]。p53 为一种抑癌基因,主要分布于细胞核,能特异性与 DNA 结合,还可在细胞周期的 G₁ 期检查 DNA 损伤点,监视基因组的完整性。如存在 DNA 损伤,p53 蛋白能够阻止 DNA 进行复制,以便提供足够的时间修复受损的 DNA;但如果 DNA 修复失败,p53 蛋白则引发受损细胞凋亡^[13-14]。本实验观察到 Mppa-PDT 处理后出现明显的“彗星”现象,p53 蛋白表达上调,提示细胞核可能为光动力作用靶点。DNA 损伤能够启动细胞凋亡,也能够激活外源性死亡受体细胞凋亡通路及内源性线粒体凋亡通路^[15-16]。线粒体为细胞能量代谢的中心,在维持细胞稳态中起着举足轻重的作用。于是我们检测了线粒体凋亡途径相关蛋白的表达,发现在 Mppa-PDT 处理后有线粒体凋亡蛋白 Bax、Caspase3 的升高及抗凋亡蛋白 Bcl-2 的降低。与本研究一致的是也有研究证实 Mppa-PDT 能够引起骨巨细胞瘤线粒体膜电位降低,导致线粒体凋亡通路激活^[6]。

综上所述,本研究证实 Mppa-PDT 能够抑制人卵巢癌 SKOV3 细胞活性,诱导 SKOV3 细胞凋亡。同时在该过程中伴随有 ROS 的产生、DNA 的损伤及线粒体凋亡通路的激活。最近也有研究证实光动力能够诱导自噬的发生,将自噬抑制后凋亡增多,说明在光动力中自噬起着抗凋亡的作用^[17]。至于

Mppa-PDT 导致 SKOV3 细胞 DNA 损伤后发生凋亡的同时是否有自噬的发生、自噬在该过程的作用如何及自噬发生的具体机制将是本研究小组进一步深入探讨的方向。

[参考文献]

- [1] Gentry-Maharaj A, Menon U. Screening for ovarian cancer in the general population[J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2012, 26: 243-256.
- [2] Rkein A M, Ozog D M. Photodynamic therapy[J]. *Dermatol Clin*, 2014, 32: 415-425.
- [3] Luo T, Wilson B C, Lu Q B. Evaluation of one- and two-photon activated photodynamic therapy with pyropheophorbide-a methyl ester in human cervical, lung and ovarian cancer cells [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2014, 132: 102-110.
- [4] Guelluy P H, Fontaine-Aupart M P, Grammenos A, Lécart S, Piette J, Hoebeke M. Optimizing photodynamic therapy by liposomal formulation of the photosensitizer pyropheophorbide-a methyl ester: *in vitro* and *ex vivo* comparative biophysical investigations in a colon carcinoma cell line[J]. *Photochem Photobiol Sci*, 2010, 9: 1252-1260.
- [5] Xu J, Xia X, Leung A W, Xiang J, Jiang Y, Yu H, et al. Sonodynamic action of pyropheophorbide-a methyl ester induces mitochondrial damage in liver cancer cells [J]. *Ultrasonics*, 2011, 51: 480-484.
- [6] Li K T, Zhang J, Duan Q Q, Bi Y, Bai D Q, Ou Y S. Apoptosis triggered by pyropheophorbide- α methyl ester-mediated photodynamic therapy in a giant cell tumor in bone[J]. *Laser Phys*, 2014, 24: 066002.
- [7] Bagley C M Jr, Young R C, Canellos G P, DeVita V T. Treatment of ovarian carcinoma: possibilities for progress[J]. *N Engl J Med*, 1972, 287: 856-862.
- [8] Allison R R, Bagnato V S, Cuenca R, Downie G H, Sibata C H. The future of photodynamic therapy in oncology[J]. *Future Oncol*, 2006, 2: 53-71.
- [9] Pena Luengas S L, Marin G H, Aviles K, Cruz Acuña R, Roque G, Rodríguez Nieto F, et al. Enhanced singlet oxygen production by photodynamic therapy and a novel method for its intracellular measurement[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2014, 29: 435-443.
- [10] Wu C C, Bratton S B. Regulation of the intrinsic apoptosis pathway by reactive oxygen species [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 19: 546-558.
- [11] Hua P, Sun M, Zhang G, Zhang Y, Tian X, Li X, et al. Cepharanthine induces apoptosis through reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction in human non-small-cell lung cancer cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 460: 136-142.
- [12] Klammer H, Mladenov E, Li F, Iliakis G. Bystander effects as manifestation of intercellular communication of DNA damage and of the cellular oxidative status[J]. *Cancer Lett*, 2015, 356: 58-71.
- [13] Li Z J, Mack S C, Mak T H, Angers S, Taylor M D, Hui C C. Evasion of p53 and G₂/M checkpoints are characteristic of Hh-driven basal cell carcinoma [J]. *Oncogene*, 2014, 33: 2674-2680.
- [14] Akdemir K C, Jain A K, Allton K, Aronow B, Xu X, Cooney A J, et al. Genome-wide profiling reveals stimulus-specific functions of p53 during differentiation and DNA damage of human embryonic stem cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: 205-223.
- [15] Roos W P, Kaina B. DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis [J]. *Cancer Lett*, 2013, 332: 237-248.
- [16] De Zio D, Cianfanelli V, Cecconi F. New insights into the link between DNA damage and apoptosis [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 19: 559-571.
- [17] 涂平华, 李开庭, 陈青, 欧云生, 白定群. 芦荟大黄素介导的光动力诱导骨肉瘤 MG63 细胞自噬 [J]. *第二军医大学学报*, 2014, 35: 1347-1352.
- Tu P H, Li K T, Chen Q, Ou Y S, Bai D Q. Autophagy of osteosarcoma MG63 cells induced by aloe emodin-mediated photodynamic therapy [J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2014, 35: 1347-1352.

[本文编辑] 周燕娟