

血卟啉衍生物在 3 种肺癌细胞系中的细胞摄取和定位

马亿江¹, 丁晓倩¹, 隋爱华², 杨晓晖¹, 曹艺巍¹, 林存智¹

(青岛大学附属医院, 山东 青岛 266555 1 呼吸与危重症医学科; 2 医学研究中心)

[摘要] 目的 以支气管上皮 BEAS-2B 细胞系为对照, 比较不同肺癌细胞系(肺腺癌 A549、肺鳞癌 H520、肺小细胞癌 H446 细胞)之间血卟啉衍生物(HPD)的细胞摄取和定位差异。方法 用不同浓度 HPD 测得的荧光值绘制 HPD 荧光值的标准曲线。将 4 种细胞分别与 HPD 孵育不同时间后, 用多功能酶标仪检测荧光强度。进一步用流式细胞仪量化细胞摄取, 比较 4 种细胞 HPD 摄取差异。用激光扫描共聚焦显微镜观察比较细胞内 HPD 摄取和分布情况。结果 4 种细胞系摄取 HPD 随着时间增加而增加, 但 HPD 的累积速率有所差异。5 mg/L 的 HPD 孵育细胞 24、48 h, 4 种细胞内平均荧光强度差异有统计学意义($F=199.00, 71.15, P<0.001$), 其中 A549 细胞内平均荧光强度显著高于 H446、BEAS-2B、H520 细胞, H446 和 BEAS-2B 细胞内平均荧光强度显著高于 H520 细胞($P<0.05$)。15 mg/L 的 HPD 孵育细胞 48 h, 4 种细胞内呈现出强度不等的红色荧光信号, 均呈点状分布于细胞质内。结论 不同类型肺癌细胞系摄取 HPD 存在差异, 其中肺腺癌 A549 细胞摄取 HPD 的能力最强, 支气管上皮 BEAS-2B 细胞与肺小细胞癌 H446 细胞次之, 肺鳞癌 H520 细胞摄取能力最弱; HPD 细胞内定位均位于细胞质内, 呈点状分布。

[关键词] 肺肿瘤; 血卟啉衍生物; 光化学疗法; 细胞摄取; 细胞内定位

[中图分类号] R734.2; R349.21 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2096-5532(2023)05-0703-06

doi: 10.11712/jms.2096-5532.2023.59.168

[开放科学(资源服务)标识码(OSID)]



[网络出版] <https://link.cnki.net/urlid/37.1517.R.20231129.1505.007>;

2023-12-01 10:52:02

UPTAKE AND LOCALIZATION OF HEMATOPORPHYRIN DERIVATIVES IN THREE LUNG CANCER CELL LINES MA Yi-jiang, DING Xiaoqian, SUI Aihua, YANG Xiaohui, CAO Yirwei, LIN Cunzhi (Department of Respiratory and Critical Care Medicine, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266555, China)

[ABSTRACT] **Objective** To compare the differences in cellular uptake and localization of hematoporphyrin derivatives (HPDs) between different lung cancer cell lines (lung adenocarcinoma A549, lung squamous cell carcinoma H520, and lung small cell carcinoma H446) using the bronchial epithelial cell line BEAS-2B as control. **Methods** The standard curve of HPD fluorescence values was plotted using values measured at different concentrations of HPDs. The four cell lines were incubated with HPDs for different time periods and then measured for fluorescence intensity using a multifunctional microplate meter. Flow cytometry was used to quantify the cell uptake and compare the differences in HPD uptake between the four cell lines. The uptake and distribution of HPDs in the cells were observed and compared using a laser scanning confocal microscope. **Results** The uptake of HPDs in the four cell lines increased over time, with some differences in the accumulation rate of HPDs. After cells were incubated with 5 mg/L HPD for 24 h and 48 h, the mean fluorescence intensities of the four cell lines were significantly different ($F=199.00, 71.15, P<0.001$), with the mean fluorescence intensity significantly higher in A549 cells than in H446, BEAS-2B, and H520 cells, and the mean fluorescence intensity significantly higher in H446 and BEAS-2B cells than in H520 cells ($P<0.05$). The four cell lines showed varying intensities of red fluorescent signals distributed in a dot pattern in the cytoplasm when the cells were incubated with 15 mg/L HPDs for 48 h. **Conclusion** There are differences in HPD uptake between different lung cancer cell lines, with the highest uptake in A549 cells, followed by BEAS-2B and H446 cells, and the lowest uptake in H520 cells. HPDs are located in the cytoplasm of all the cell lines, showing a dotted distribution pattern.

[KEY WORDS] lung neoplasms; hematoporphyrin derivative; photochemotherapy; cellular uptake; intracellular localization

在中国, 肺癌是最常见的癌症事件, 也是癌症死亡的主要原因^[1-2]。光动力疗法(PDT)作为一种有前景的、非侵入性的癌症治疗方式, 在近几十年广泛

用于肺癌的治疗。PDT 由 3 个基本成分组成, 即光、氧和光敏剂(PS)^[3-4]。血卟啉衍生物(HPD)存在化学纯度低、组织穿透性差、半衰期长等缺点, 但到目前为止仍是最常用、且是唯一一种被 FDA 批准用于多种实体恶性肿瘤临床治疗的 PS^[5-6]。PS 的细胞摄取、胞内分布是决定 PDT 功效的重要因素^[7]。实体肿瘤由多种具有不同 PS 摄取特性的细

[收稿日期] 2023-01-15; **[修订日期]** 2023-07-27

[基金项目] 北京科创医学发展基金会项目(KC2021-JX-0186-

64)

[第一作者] 马亿江(1996-), 女, 硕士研究生。

[通信作者] 林存智(1963-), 男, 博士, 主任医师, 博士生导师。

E-mail: lindoc@126.com。

胞组成。因此,细胞水平的药代动力学是优化 PDT 效果的一个重要参数^[8]。本实验以人支气管上皮 BEAS-2B 细胞作对照,选取 3 种肺癌细胞系如人肺腺癌 A549、人肺鳞癌 H520、人肺小细胞癌 H446 细胞进行研究,在体外通过多功能酶标仪、流式细胞仪、激光扫描共聚焦显微镜等仪器检测细胞内荧光强度,比较分析 HPD 在 4 种细胞内的摄取、定位差异,以期为针对不同的肺癌类型选取特定方案(特定的 PS 注射浓度和时间)来增强 HPD 介导的 PDT 疗效提供一定的指导。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

HPD 由重庆迈乐生物制药有限公司生产,规格为 5 mL:25 mg;在超净工作台分装后于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光保存,用含体积分数 0.10 胎牛血清和体积分数 0.01 青霉素/链霉素双抗溶液的 DMEM 高糖完全培养液现配现用。DMEM 高糖培养液、胰蛋白酶、青霉素/链霉素双抗溶液及 40 g/L 多聚甲醛固定液均购于大连 meilunbio 公司,胎牛血清购于武汉 Procell 公司,4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)、抗荧光淬灭封片液购于北京 Solarbio 公司。

1.2 细胞培养

人肺腺癌 A549 细胞系购于美国菌种保藏中心(ATCC),人支气管上皮 BEAS-2B 细胞系、人肺鳞癌 H520 细胞系、人肺小细胞癌 H446 细胞系均购于武汉 Procell 公司,于青岛大学附属医院中心实验室液氮罐中保存。4 种细胞系均使用含体积分数 0.10 胎牛血清和体积分数 0.01 青霉素/链霉素双抗溶液的 DMEM 高糖完全培养液,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 0.05 CO_2 的饱和湿度孵箱中培养。

1.3 绘制 HPD 荧光值的标准曲线

取 96 孔板,将 HPD 浓度设为 5.0、7.5、10.0、12.5、15.0 mg/L,每个浓度设 3 个复孔,应用多功能酶标仪检测不同浓度 HPD 的荧光值(激发波长为 405 nm,发射波长为 630 nm),取其平均值,从低浓度开始绘制标准曲线。

1.4 多功能酶标仪检测 4 种细胞系对 HPD 的摄取

将 4 种细胞以每孔 10^4 个细胞的密度接种于 5 块 96 孔板中,每组设 4 个复孔,12 h 后随机分为对照组(无 HPD 孵育)和实验组(用 HPD 孵育不同时间)。实验组加入 5 mg/L 的 HPD,分别于培养箱内继续避光培养 4、8、12、24、48 h,后弃去未结合

HPD,加入完全培养液后用多功能酶标仪检测荧光强度,激发波长为 405 nm,发射波长为 630 nm。

1.5 流式细胞仪检测 4 种细胞系对 HPD 的摄取

将 4 种细胞以每孔 10^5 个细胞的密度接种于 12 孔板中,至 12 h 细胞贴壁以后随机分为对照组(无 HPD 孵育)和实验组(用 HPD 孵育不同时间)。实验组加入 5 mg/L 的 HPD,于培养箱内继续避光培养 24、48 h,后弃去未结合 HPD。两组均用 PBS 洗 2 次后收集细胞,以 PBS 重悬,各取 $400\text{ }\mu\text{L}$ (每组细胞总数为 10^5 个),过滤后用流式细胞仪检测细胞荧光强度。

1.6 激光扫描共聚焦显微镜观察 4 种细胞系 HPD 的细胞定位

将盖玻片用体积分数 0.75 的乙醇浸泡、培养液冲洗后置于 24 孔板中,4 种细胞以每孔 10^4 个细胞的密度接种,12 h 后随机分为对照组(无 HPD 孵育)和实验组(用 HPD 孵育)。实验组加入 15 mg/L 的 HPD,于培养箱内继续避光培养 48 h,后弃去未结合 HPD,用 40 g/L 多聚甲醛常温固定 20 min, PBS 洗 3 次后用 DAPI 避光染 8 min,以 PBS 洗 3 次。将染色好的盖玻片盖于滴有抗荧光淬灭封片液的载玻片上并封片,于激光扫描共聚焦显微镜下观察并拍照。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 8 统计软件进行数据分析。本研究实验均独立重复 3 次及以上,所得计量资料结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数比较采用 F 检验,组间两两比较采用 Tukey 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 HPD 荧光值标准曲线绘制

利用 5.0、7.5、10.0、12.5、15.0 mg/L HPD 测得的荧光值绘制标准曲线(图 1),同时做相关回归分析,得回归方程 $Y = 2\ 276 \times X + 17\ 563$ (式中 Y 表示荧光强度, X 表示浓度),相关系数 $r = 0.992\ 0$, $P = 0.000\ 9$, $95\% \text{CI} = (0.878\ 7 \sim 0.999\ 5)$ 。结果表明,在一定浓度范围内 HPD 浓度与荧光强度呈正相关,可以用 HPD 的荧光强度来代表 HPD 含量。

2.2 多功能酶标仪检测 4 种细胞系对 HPD 的摄取

将 5 mg/L HPD 与 4 种细胞分别共孵育 4、8、12、24、48 h,多功能酶标仪检测荧光强度,绘制时间依赖曲线(图 2)。如图 2 所示,4 种细胞系的 HPD

时间依赖曲线总体呈现上升的趋势,表明随着时间增加细胞摄取 HPD 增加。4 种细胞系摄取 HPD 在 4、8、12 h 无明显增加, BEAS-2B、A549、H446 细胞在 12 h 之后 HPD 迅速积累, H520 细胞则出现一定的延缓,在 24 h 后才表现出摄取速率的加快。

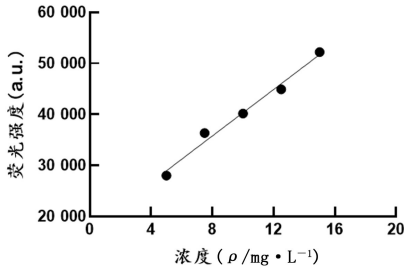


图 1 HPD 荧光值的标准曲线

2.3 流式细胞仪检测 4 种细胞系对 HPD 的摄取

为了排除细胞增殖差异的影响,进一步量化细胞摄取,对 5 mg/L HPD 孵育 24、48 h 的细胞进行流式细胞仪检测。结果显示,4 种细胞在 24、48 h 表现出很强的荧光信号,表明 HPD 在细胞内高效累积,且 48 h 累积量高于 24 h。随着孵育时间延长细胞摄取 HPD 增加,但 4 种细胞系在 48 h 均未达到摄取饱和。见图 3。HPD 孵育 24、48 h 时,4 种

细胞内平均荧光强度差异具有统计学意义 ($F = 199.00, 71.15, P < 0.001$),其中 A549 细胞内 HPD 平均荧光强度显著高于 H446、BEAS-2B、H520 细胞, H446 和 BEAS-2B 细胞内平均荧光强度显著高于 H520 细胞 ($P < 0.05$),而 H446 和 BEAS-2B 细胞内平均荧光强度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。所以, A549 细胞摄取 HPD 的能力最强, BEAS-2B 细胞和 H446 细胞次之, H520 细胞摄取 HPD 的能力最弱。见图 4。

2.4 HPD 在 4 种细胞内的定位

本文激光扫描共聚焦显微镜观察结果显示,与 15 mg/L HPD 共孵育 48 h 后,4 种细胞系的实验组细胞内呈现出强度不等的红色荧光信号,均呈点状分布于细胞质内,而在对照组几乎观察不到。表明 4 种细胞系摄取 HPD 定位于细胞质中,且分布未观察到明显差异。见图 5。

3 讨 论

PDT 治疗的原理是 PS 在符合其吸收光谱的光波长照射下,吸收光子的能量转移给氧分子,产生超氧阴离子、单线态氧等细胞毒性活性氧(ROS),导致

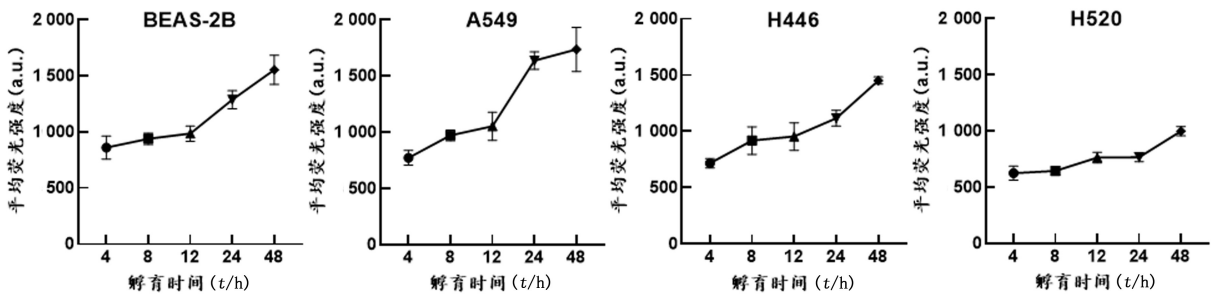
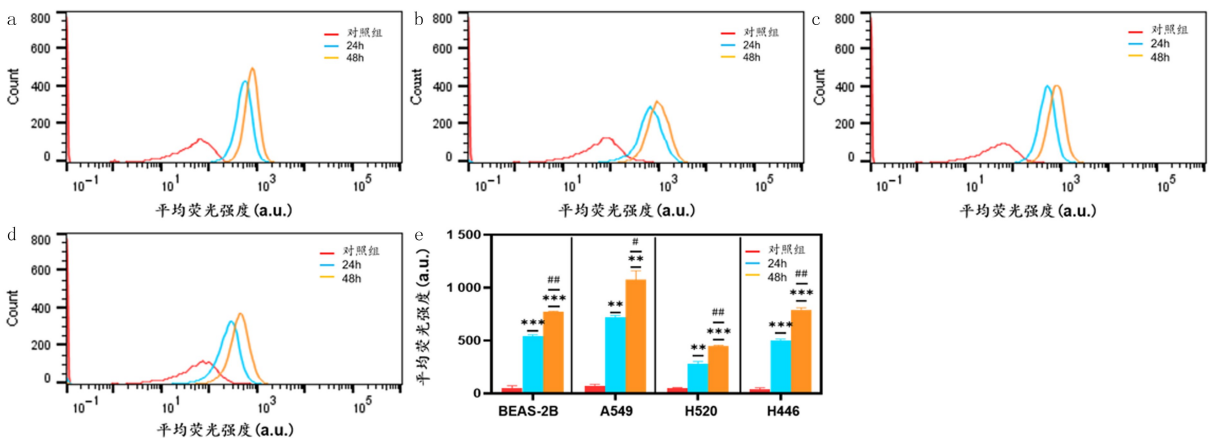
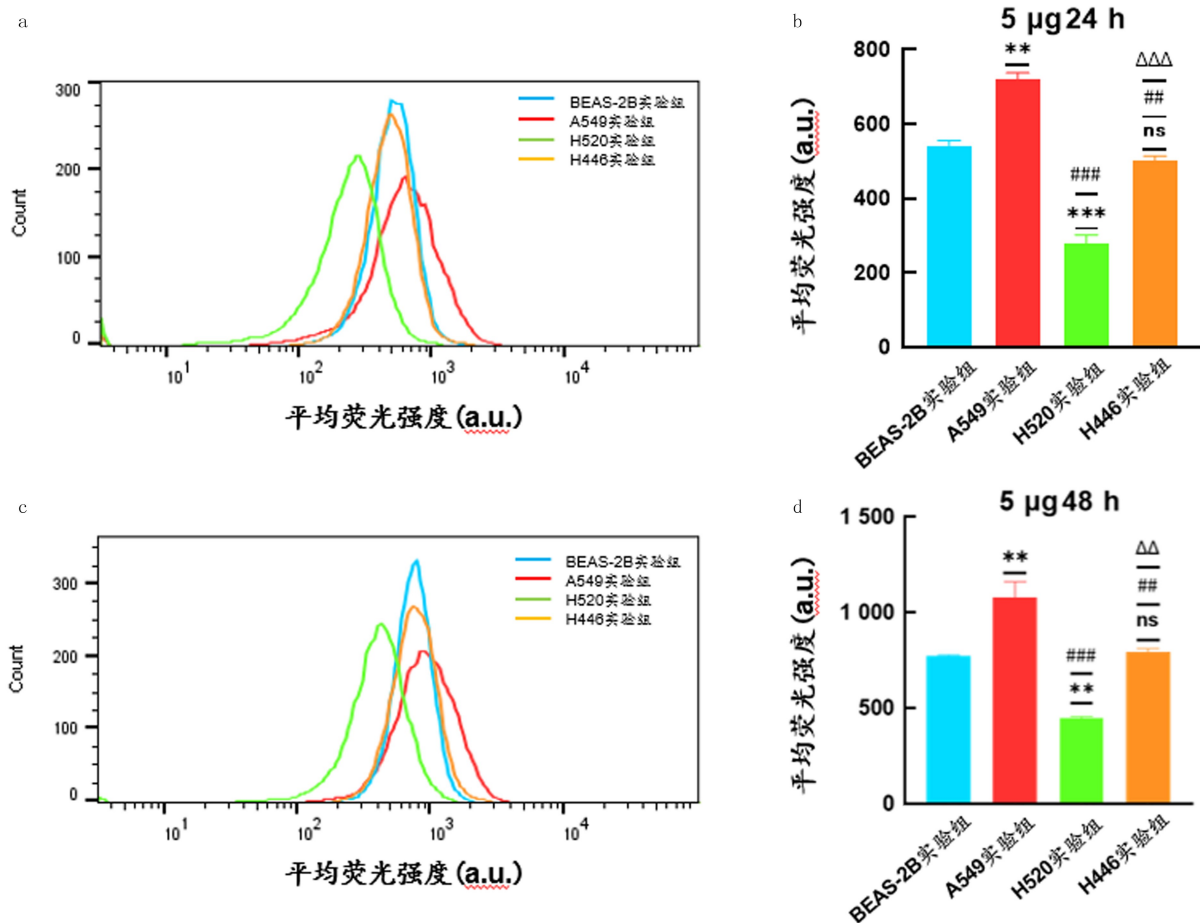


图 2 4 种细胞系摄取 HPD 的时间依赖曲线



BEAS-2B(a)、A549(b)、H520(c)、H446(d)细胞分别与 HPD 共孵育 24、48 h,流式细胞仪检测细胞内 HPD 荧光强度;4 种细胞系在 24、48 h 时的 HPD 摄取差异(e)。*、#: $P < 0.05$; **、##: $P < 0.01$; ***、###: $P < 0.001$ 。*: 对照组与摄取 HPD 24 h 比较; #: 摄取 HPD 24 h 与摄取 HPD 48 h 比较。

图 3 4 种细胞系 HPD 摄取的时间差异



HPD 共孵育 24 h(a,b) 和 48 h(c,d), 流式细胞仪检测 4 种细胞系之间的摄取差异。*、#、 Δ ; $P < 0.05$; **、# #、 $\Delta\Delta$; $P < 0.01$; * * *、# # #、 $\Delta\Delta\Delta$; $P < 0.001$ 。*、ns: 与 BEAS-2B 实验组比较; #: 与 A549 实验组比较; Δ : 与 H520 实验组比较。

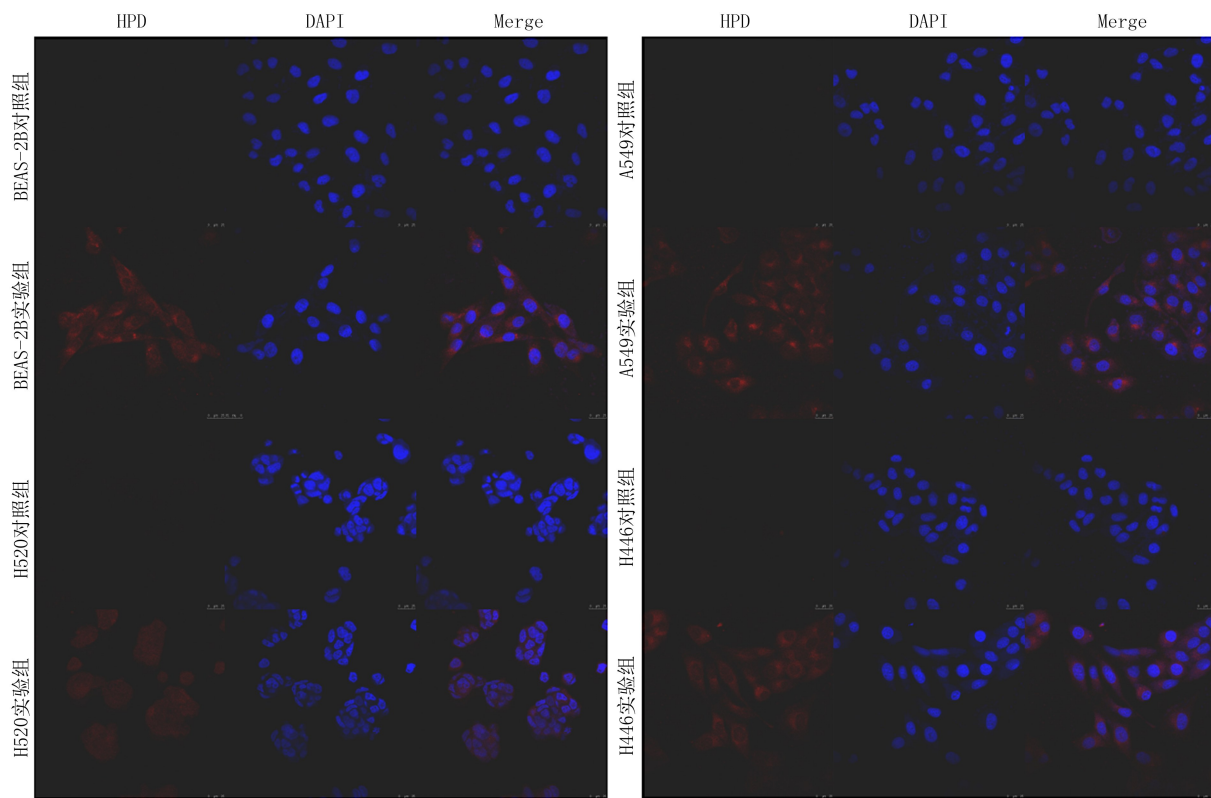
图 4 HPD 共孵育 24、48 h 时 4 种细胞系的摄取差异

氧化应激进而破坏肿瘤细胞。单线态氧的寿命极短 (10~320 ns), 其在细胞内的扩散范围仅为 10~55 nm, 因此 PDT 的效果在一定程度上取决于所使用 PS 的细胞内分布、定位^[6,9-10]。PS 的细胞摄取、细胞内分布和滞留取决于 PS 的化学性质、PS 浓度、孵育时间以及细胞特性, 包括细胞体积、增殖状态、细胞内靶位点与 PS 结合的亲和力以及细胞类型等^[7,11]。

已知一个特定的细胞类型有它自己的 PS 吸收和清除的比例 (即细胞动力学特征)。早在 1990 年 PERRY 等^[12] 就研究证明了 Photofrin II 的细胞摄取在不同细胞系间有所差异。随后 FICKWEILER 等^[13] 的实验研究证明了另外一种 PS(ATMPn) 在皮肤细胞系之间的细胞摄取差异。CHWIŁKOWSKA 等^[14] 在 2003 年研究显示, Photofrin II 在不同肿瘤细胞 (乳腺癌腺癌 MCF7 细胞和白血病 T 细胞淋巴瘤 Jurkat 细胞) 之间存在着摄取差异。本研究探讨临床上应用的 HPD (喜泊分) 在不同组织学类型

肺癌细胞中摄取的差异性。多功能酶标仪检测结果显示, 支气管上皮 BEAS-2B 细胞、肺腺癌 A549 细胞、肺小细胞癌 H446 细胞与 HPD 共孵育 12 h 后, HPD 迅速累积, 而肺鳞癌 H520 细胞摄取 HPD 速率缓慢, 在 24 h 后摄取加快。由于多功能酶标仪检测的是细胞总的荧光强度, 所以在 24、48 h 进一步用流式细胞仪量化细胞内平均荧光强度, 结果显示, 4 种细胞 48 h 的细胞内平均荧光强度均高于 24 h。以上结果表明, 随着时间增加 4 种细胞系摄取 HPD 的速率不同, 也进一步证实细胞类型不同, 其 PS 摄取存在差异。

本实验中细胞与 HPD 共孵育 48 h 后, 肺腺癌 A549 细胞内的平均荧光强度甚至达到了肺鳞癌 H520 细胞的 2 倍, 肺小细胞癌 H446 细胞内荧光强度也远高于肺鳞癌 H520 细胞, 表明不同类型的肺癌细胞之间 HPD 摄取存在差异。可能随着孵育时间的延长, 细胞的增殖状态影响了 PS 的摄取。此外, 也可能是由于在 HPD 孵育初期, HPD 更多地



红色表示 HPD 荧光,蓝色表示 DAPI 荧光,比例尺=25 μm 。

图 5 HPD 在 4 种细胞内的定位

定位于线粒体,随后在溶酶体中表现出时间依赖性的摄取^[15]。这也解释了本研究 4 种细胞与 HPD 共孵育 4、8、12、24、48 h 细胞内 HPD 荧光强度随着时间延长而增强的现象。

PS 的特性之一是选择性靶向肿瘤组织^[16]。有研究发现,肿瘤细胞中 HPD 的摄取量甚至比相应组织的正常细胞高 5 倍^[17]。然而本研究结果显示,正常支气管上皮 BEAS-2B 细胞内 HPD 的摄取量高于肺鳞癌 H520 细胞,与肺小细胞癌 H446 细胞相比无统计学差异;虽然肺腺癌 A549 细胞内 HPD 的摄取量高于正常支气管上皮 BEAS-2B 细胞,但远不到 5 倍。1990 年,PERRY 等^[12]的实验也表明,正常肺纤维母细胞 CCL-210 细胞内 PS 的浓度高于肺癌细胞。这可能是由于体内体外实验条件差异所引起,在体内情况下,多种因素可能促进 HPD 对肿瘤组织的高选择性。可能因素包括:肿瘤组织中的肿瘤相关巨噬细胞(TAM)水平高于正常组织^[18];与正常组织相比,肿瘤毛细血管相对高的渗透性和扩散作用^[19];肿瘤组织存在增强渗透性和保留效应^[20]。也有研究表明,在体外单独肿瘤细胞中 PS 的累积并不是都高于正常组织来源的细胞^[21]。

PS 在细胞内的定位对于确定 PS 的靶点很重

要,而 PS 的靶点可能决定了 PDT 产生光动力损伤的位点和程度,并且决定了细胞死亡的途径和类型^[22-23]。卟啉主要通过被动扩散、与脂蛋白结合以及在外周苯二氮草受体结合等方式在细胞中累积,定位于线粒体、溶酶体、内质网、高尔基体、核膜等细胞膜结构,在细胞中发出弥漫性荧光^[24-26]。本研究在激光扫描共聚焦显微镜下观察 4 种细胞系 HPD 的细胞内定位,结果显示,HPD 在细胞质内弥漫性分布,并未观察到明显的分布差异,其亚细胞定位是否有差异需进一步研究。

综上所述,在体外控制一定条件的情况下,不同的人肺癌细胞系摄取 HPD 存在差异,HPD 的细胞摄取能力肺腺癌 A549 细胞>肺小细胞癌 H446 细胞>肺鳞癌 H520 细胞。然而是否所有的肺腺癌细胞均具有高 HPD 摄取能力,以及 HPD 细胞摄取与组织学分型的相关性,还需要进一步研究验证。未来将在本实验的基础上选用动物移植瘤模型、类器官模型等模拟体内环境,探究 HPD 对肿瘤组织高选择性的机制。

[参考文献]

[1] FENG R M, ZONG Y N, CAO S M, et al. Current cancer si-

- tuation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics[J]? *Cancer Communications*, 2019,39(1):22.
- [2] CHEN W Q, ZHENG R S, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 2016,66(2):115-132.
- [3] ZHANG Y H, WANG B L, ZHAO R B, et al. Multifunctional nanoparticles as photosensitizer delivery carriers for enhanced photodynamic cancer therapy[J]. *Materials Science & Engineering C, Materials for Biological Applications*, 2020, 115:111099.
- [4] WANG K, YU B X, PATHAK J L. An update in clinical utilization of photodynamic therapy for lung cancer[J]. *Journal of Cancer*, 2021,12(4):1154-1160.
- [5] ZHANG J, JIANG C S, FIGUEIRÓ LONGO J P, et al. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2018,8(2):137-146.
- [6] KWIATKOWSKI S, KNAP B, PRZYSTUPSKI D, et al. Photodynamic therapy — mechanisms, photosensitizers and combinations[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 106:1098-1107.
- [7] GUPTA S, DWARAKANATH B S, MURALIDHAR K, et al. Cellular uptake, localization and photodynamic effects of haematoporphyrin derivative in human glioma and squamous carcinoma cell lines[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology*, 2003,69(2):107-120.
- [8] ROUSSET N, VONARX V, ELÉOUET S, et al. Cellular distribution and phototoxicity of Benzoporphyrin derivative and Photofrin[J]. *Research in Experimental Medicine*, 1999,199(6):341-357.
- [9] KWON S, LEE Y, JUNG Y, et al. Mitochondria-targeting indolizino[3, 2-c]quinolines as novel class of photosensitizers for photodynamic anticancer activity[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018,148:116-127.
- [10] LIM C K, HEO J, SHIN S, et al. Nanophotosensitizers toward advanced photodynamic therapy of Cancer[J]. *Cancer Letters*, 2013,334(2):176-187.
- [11] CASTANO A P, DEMIDOVA T N, HAMBLIN M R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization [J]. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2004,1(4):279-293.
- [12] PERRY R R, MATTHEWS W, MITCHELL J B, et al. Sensitivity of different human lung cancer histologies to photodynamic therapy[J]. *Cancer Research*, 1990,50(14):4272-4276.
- [13] FICKWEILER S, ABELS C, KARRER S, et al. Photosensitization of human skin cell lines by ATMPn (9-acetoxy-2, 7, 12, 17-tetrakis-(beta-methoxyethyl)-porphycene) in vitro: mechanism of action[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology*, 1999,48(1):27-35.
- [14] CHWIŁKOWSKA A, SACZKO J, MODRZYCKA T, et al. Uptake of photofrin II, a photosensitizer used in photodynamic therapy, by tumour cells in vitro[J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2003,50(2):509-513.
- [15] WOODBURN K W, VARDAXIS N J, HILL J S, et al. Subcellular localization of porphyrins using confocal laser scanning microscopy[J]. *Photochemistry and Photobiology*, 1991, 54(5):725-732.
- [16] KOU J Y, DOU D, YANG L M. Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications[J]. *Oncotarget*, 2017,8(46):81591-81603.
- [17] DÖCCHIO F, RAMPONI R, SACCHI C A, et al. Time-resolved fluorescence microscopy of hematoporphyrin-derivative in cells[J]. *Lasers in Surgery and Medicine*, 1982,2(1):21-28.
- [18] KORBELIK M. Low density lipoprotein receptor pathway in the delivery of Photofrin: how much is it relevant for selective accumulation of the photosensitizer in tumors? [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology*, 1992,12(1):107-109.
- [19] OENBRINK G, JÜRGENLIMKE P, GABEL D. Accumulation of porphyrins in cells: influence of hydrophobicity aggregation and protein binding[J]. *Photochemistry and Photobiology*, 1988,48(4):451-456.
- [20] IYER A K, GREISH K, SEKI T, et al. Polymeric micelles of zinc protoporphyrin for tumor targeted delivery based on EPR effect and singlet oxygen generation[J]. *Journal of Drug Targeting*, 2007,15(7-8):496-506.
- [21] HAMBLIN M R, NEWMAN E L. On the mechanism of the tumour-localising effect in photodynamic therapy[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology*, 1994,23(1):3-8.
- [22] PUCELIK B, SUŁEK A, DROZD A, et al. Enhanced cellular uptake and photodynamic effect with amphiphilic fluorinated porphyrins: the role of sulfoester groups and the nature of reactive oxygen species[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020,21(8):2786.
- [23] MROZ P, YAROSLAVSKY A, KHARKWAL G B, et al. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer[J]. *Cancers*, 2011,3(2):2516-2539.
- [24] VERMA A, SNYDER S H. Peripheral type benzodiazepine receptors[J]. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 1989,29:307-322.
- [25] SHULOK J R, WADE M H, LIN C W. Subcellular localization of hematoporphyrin derivative in bladder tumor cells in culture[J]. *Photochemistry and Photobiology*, 1990,51(4):451-457.
- [26] VAN STRATEN D, MASHAYEKHI V, DE BRUIJN H S, et al. Oncologic photodynamic therapy: basic principles, current clinical status and future directions[J]. *Cancers*, 2017,9(2):19.