

科技部補助
大專學生研究計畫研究成果報告

| | |
|------------|------------------------|
| 計 畫 名 稱 | : 探討光敏潛力材料對乳癌細胞毒殺的分子機制 |
|------------|------------------------|

執行計畫學生：賴怡婷
學生計畫編號：MOST 108-2813-C-040-038-B
研究期間：108年07月01日至109年02月28日止，計8個月
指導教授：張文瑋

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 109年03月30日

題目：探討光敏潛力材料對乳癌細胞毒殺的分子機制

中文摘要

根據政府衛生福利部統計處的調查顯示，民國106年的國人十大死亡原因依照死亡率排列，第一名即為惡性腫瘤。癌症治療的方式包含化學治療、外科手術、免疫治療、輻射治療、光療法等，其中光動力療法(Photodynamic therapy, PDT)，相較於其他治療方式，沒有手術傷口癒合的顧慮，也可有效的控制治療範圍及時間，光敏藥物的選擇也可降低副作用，在癌症治療上有相當多的安全性及優點。

本研究中，我們探討可以同時吸收400nm 波長及750-800nm 近紅外光的菌綠素類(Bacteriochlorin type)人工合成材料 LS-01'/LS-01"，是否對於 MCF7乳癌細胞具有光敏效應，以及可能參與的分子機制。我們首先發現，LS-01'或 LS-01"的暗室毒性測試顯示，在沒有其他提高效能的複合材料下，分別在濃度3.125 μ M、12.5 μ M 對於 MCF7乳癌細胞僅有約20%的細胞毒性效果，符合光敏物質的低暗室毒性條件。我們也將 LS-01' 或 LS-01" 在加入細胞培養液的30分鐘後移除，並以波長為405nm 之藍紫光雷射二極體作為激發光源照射後，顯示在405nm 波長的光輔助下，兩種菌綠素材料有增強細胞毒殺效果，並以 LS-01'效果較為顯著，這表示此光敏潛力材料確實有進入細胞內且具光敏劑效果。此外我們進一步發現，兩種菌綠素材料在405nm 波長的光輔助下，可降低 MCF-7乳癌細胞內存活蛋白 Survivin 的表現。同時我們也探討了 LS-01'對於 MCF-7細胞的細胞週期影響性，發現接受 LS-01'以及光照後停於細胞週期之 G2/M 期比例下降，進一步研究也發現經 LS-01'光照處理的 MCF-7細胞之細胞週期蛋白 Cyclin E1表現增加伴隨 CDK2表現下降。未來，我們將嘗試利用近紅外光作為激發光源，探討能否誘發 LS-01'、LS-01"的光敏效應；另外將以 LS-01'或 LS-01" 合併其他化療藥物，或與高分子材料 dendrimer 結合以增加細胞吸收力，並測試對 MCF7細胞的毒殺效果，探討成為癌症治療組合物的可能性。

文獻回顧

乳癌，是女性最常見的惡性腫瘤，全球每年新增上百萬的乳癌個案，並造成數十萬人死亡。其是由乳房組織發展成的癌症，乳腺管細胞或是乳小葉細胞產生不正常分裂、繁殖而形成之惡性腫瘤。乳癌的特徵包括乳房腫塊、乳房形狀改變、皮膚凹陷或是皮膚出現紅色鱗屑狀斑塊等等。乳癌除了局部侵犯乳房組織外，更可能轉移到遠處組織，而出現遠端轉移的病患，可能會有骨痛、淋巴結腫大、呼吸困難或黃疸的情形 [1]。

光動力療法(Photodynamic therapy, PDT)在臨床上已經運用於治療許多疾病，而要產生光動力療法首先需要三個元素：光敏感物質、光源、氧分子。治療的第一步是光敏劑的分佈管理，使光敏劑集中於目標細胞，與正常細胞產生濃度差異。接著將特定波長的光源照射於患部，使光敏劑接收到光子的能量而活化了光化學反應，將能量轉移給周邊的氧分子，使氧分子激發成活性較高的單重態氧(Single oxygen, $^1\text{O}_2$)^[2]。而單重態氧即為活性氧物質(Reactive oxygen species, ROS)，過多的活性氧物質進入細胞且累積後，會對細胞和基因結構造成損壞，造成細胞的凋亡，達到治療的效果^[3]。

光敏劑(Photosensitizers, PSs)是光動力療法中不可或缺的要素之一，光敏劑的發展一直是被廣泛研究的方向。Photofrin[®]是第一代的光敏劑，被應用於許多類型的癌症治療上，但它也存在幾項缺點，例如不易被身體代謝、光感性強導致易引起額外的皮膚光敏作用等等問題，都使之在臨床的使用受到了限制。因此，發展出具有較佳特性及效能的光敏劑，例如：Porphyrin-type PSs、Chlorin-type PSs、Phthalocyanine-type PSs...等，都是相當值得被關注且探討的項目。而我們在本研究中所使用的光敏潛力材料 LS-01'、LS-01''則是屬於Bacteriochlorin-type(附圖一)。一般來說，天然的Bacteriochlorin的結構不太穩定，因此限制了其應用價值，但是 North Carolina State 大學的 Lindsey 教授與其團隊，利用有機合成策略進行 Bacteriochlorin 的改質，因此讓人工合成的菌綠素衍生物可以被穩定的操作與使用。另外，相較於一般 Chlorin-type PSs (如 Ce6)，LS-01'與 LS-01''在相對無害的近紅外光區域(750-800nm)有明顯的吸收能力(附圖二)，因此可以深入滲透到生物組織中，降低光敏劑對正常細胞的傷害^[4]。此外，在試管中利用 405nm 波長雷射光對 LS-01'或 LS-01''做光照反應後偵測單態氧的生成，確實隨著光照時間增加，試管內單態氧有逐漸增加的情形(附圖三)，顯示可能具有成為光敏劑的潛力。

研究動機

雖然光動力療法與其他治療方式相比有明顯的優勢，但仍存在一些有待解決的問題。例如，在深層的治療上，光的穿透深度一直是光動力治療的一大問題，不論是傳統光療法所使用的可見光，亦或是目前醫療上使用的紅光來做為光源，當它們遇上腫瘤內的組織或血塊所增加光線穿透屏障的因素時，都會顯示光動力療法的成效不彰。此時在光敏感藥物的選擇上，能有效的進入癌症細胞，且具有產生單態氧的良好能力，其重要性都相對的提高。

在本次研究中，我們選用了與目前廣泛運用於光動力療法的光敏劑 Chlorin e6 (Ce6)^[5] 結構相似的菌綠素(Bacteriochlorin)衍生物 LS-01'與 LS-01''，這兩個分子是由合作團隊所設計與合成出來，其最特別之處是具備近紅外光波段750-800 nm 的吸收能力，比 Ce6的 Q-band 吸收波長紅位移了100 nm 左右。我們首先以405 nm 的藍紫光雷射來激發材料的 Soret-band 以驅動光動力行為。在實驗的過程中我們發現，兩個光敏潛

力材料有低的暗室毒性，符合光敏感藥物的選用條件。而在藍紫光雷射的照射下，也有明顯的增強毒性效果。再來我們也以西方點墨法 Western blot 來探討兩個材料在細胞凋亡途徑的影響，發現乳癌細胞 MCF-7 的蛋白 Survivin 在藍紫光照射下，對比於無照光的細胞，有顯著地減少。已有文獻顯示，在光動力療法所治療的乳癌細胞中，透過載體增加蛋白 Survivin 的表現量會使乳癌細胞的活性上升且降低了細胞的死亡^[6]。

本研究的目標包含：

- (1) 分析 LS-01' 或 LS-01'' 是否對 MCF7 乳癌細胞具有光敏劑特性；
- (2) 探討 LS-01' 或 LS-01'' 在光照下對 MCF7 細胞內存活蛋白 survivin 表現的影響；
- (3) 探討 LS-01' 或 LS-01'' 在光照下對 MCF7 之細胞週期及細胞週期相關蛋白表現的影響。

實驗材料與方法

材料合成與照光實驗設計

菌綠素衍生物 LS-01' 與 LS-01'' 是由合作團隊設計且合成得到，前者的 Soret-band 最大吸收波長主要在 372 nm，Q-band 的兩個吸收波長主要在 546、742 nm；後者的 Soret-band 最大吸收波長主要在 396 nm，兩個 Q-band 的吸收波長分別在 578、770 nm。在照光實驗設計上，我們首先使用 405-nm 的雷射二極體來激發光敏材料的 Soret-band，而我們將會使用高功率的燈源，透過濾光鏡後得到約 700-800 nm 波長的光來激發材料的第二個 Q-band。

細胞培養(Cell culture)

MCF-7 乳癌細胞株，以 DMEM/Insulin medium (含 10% 胎牛血清、1 μ M glutamine、1 μ M sodium pyruvate、100 μ g/ml penicillin / streptomycin / amphotericin B、non-essential amino acid、0.5 % insulin) 培養於 37°C 含 5% CO₂ 之培養箱。A549 肺癌細胞株培養基與 MCF7 細胞類似，但須額外添加 non-essential amino acids。

MTT assay

- I. 先以不同濃度的光敏潛力材料 LS-01'、LS-01'' 加於 MCF-7 乳癌細胞或 A549 肺癌細胞，種於 96 孔盤培養 48 小時後，加入 MTT 放置 2 小時，並測其在單波長 570 nm 下的 OD 值，得出不同濃度對細胞生長的影響差異。
- II. 選出適當光敏潛力材料濃度 (3.125 μ M LS-01'、12.5 μ M LS-01'') 後，將光敏潛力材料加於細胞並放置於石英管，接著以波長 405 nm 的雷射光照射處理，每組細胞皆照射 20 分鐘，每 5 分鐘 pipetting 一次，最後再種於 96 孔盤中培養 48 小時，加入 MTT 放置 2 小時，並測其在單波長 570 nm 下的存活率，且進行光敏潛力材料效果的比較。
- III. 選出適當光敏潛力材料濃度 (3.125 μ M LS-01'、12.5 μ M LS-01'')，將光敏潛力材料

加於細胞並放置30分鐘等細胞吸收後，離心下細胞並更換成不含光敏潛力材料的 medium，再取出至石英管，接著以波長405 nm的雷射光照射處理，每組細胞皆照射20分鐘，每5分鐘pipetting一次，最後再種於96孔盤中培養48小時，加入MTT放置2小時，並測其在單波長570 nm下的存活率，再進行光敏潛力材料效果及是否洗掉材料之效果比較。

西方點墨法(Western Blot)

在分別加入 LS-01' (3.125 μ M)以及 LS-01'' (12.5 μ M)，使細胞與吸收光敏潛力材料30分鐘後，離心下細胞並更換成不含光敏潛力材料的 medium。將每一樣品接受20分鐘的405 nm 藍紫雷射光照射，每5分鐘 pipetting。再來將細胞種於3.5公分培養盤，分別於培養後的3、6、24小時後，以細胞裂解液 NETN buffer (含150 mM NaCl、20 mM pH 8.0 Tris-HCL、0.5% NP40、1 mM EDTA)將細胞裂解收下後進行蛋白質定量。每個樣品取30 μ g 蛋白跑 SDS-page 電泳，轉漬於 PVDF 膜後以5%脫脂牛奶 blocking 一小時，並以一級抗體於4°C 反應過夜，隔天以含0.5%脫脂牛奶之二級抗體反應一小時，之後加入冷光試劑反應，以冷光照像儀擷取訊號後進行分析。

細胞週期染色(PI staining)

將貼附於培養盤上的細胞，以 trypsin-EDTA 分解部分細胞骨架使其變為懸浮，收集至 eppendorf 後以1300 rpm、5分鐘離心收集，以剩餘之上清液將細胞打散，在 vortex 上緩慢加入500 μ l、70%酒精後，至於冰箱保存。欲以流式細胞儀測定前，先將細胞以0.7G、6分鐘離心，除去上清液後加入1 ml PBS 清洗細胞，再次離心且去除上清液並拍散細胞，而後加入300 μ l BD pharmingen™ PI/RNase staining buffer，置於室溫30分鐘，隨後放置冰上等待以流式細胞儀測定。

結果

1. 光敏潛力材料 LS-01'、LS-01''對乳癌細胞 MCF-7的有低的暗室毒性

要成為良好光敏劑必須符合幾項特點，其中一項不外乎是要在無光照射時，對細胞的毒性低，避免在仍有藥劑殘留的狀態下，持續作用而造成正常細胞的損傷。因此，我們先測試了乳癌細胞 MCF-7在加入不同濃度的光敏潛力材料 LS-01'、LS-01''，於暗示培養後的生存狀態，並選出接下來適合進一步實驗的濃度。透過 MTT 分析，我們得出 LS-01' 或 LS-01'' 分別在3.125 μ M(圖一)或12.5 μ M(圖二)為較適合的濃度，其暗室條件下造成的細胞毒性控制在30%以下。

2. 在接受405 nm 的藍紫光雷射照射後，光敏潛力材料 LS-01'、LS-01''對乳癌細胞 MCF-7的毒性增加

由於光敏潛力材料 LS-01'、LS-01'' 在經測試後，得知除在遠紅外光波段有吸收外，其在波長約 400 nm 左右的藍紫光照射下，也有相對較高的吸收峰，因此我們先選用 405 nm 藍紫光雷射來作為驅動光動力療法的光源波長。為了確認 LS-01'、LS-01'' 是否真的有進入細胞進行作用，我們也比對了有無將光敏潛力材料移除的條件，並測試在此藍紫光雷射照射下，LS-01'、LS-01'' 對乳癌細胞 MCF-7 的毒殺能力。我們發現，暗室條件下無論是 LS-01' 或 LS-01''，造成的細胞毒性約 25%；而兩個潛力材料在 405nm 藍紫光雷射處理後，無論是否將材料移除，皆能增強其細胞毒性，尤其 LS-01' 的細胞抑制效果在光照後可達約 65% (圖三)。此結果顯示 LS-01' 對於 MCF-7 乳癌細胞具有較好的光敏劑特性。

3. MCF-7 細胞接受 LS-01' 以及光照後細胞存活蛋白 Survivin 的表現受到抑制

為了進一步找出 LS-01'、LS-01'' 影響細胞生存的機制，我們將目標放在細胞存活蛋白 Survivin。過去研究發現，當以 RNA 干擾技術抑制 MCF7 細胞內的 survivin 表現，可以抑制細胞的生長^[7]。並以西方點墨法 Western blot 去測定蛋白表現量的差異。初步的結果顯示，MCF-7 乳癌細胞當處理 LS-01' 並接受 405nm 雷射照光後，其細胞內 Survivin 蛋白的表現在第 3 小時即明顯下降(圖四)，而接受 LS-01'' 並照光的細胞則要等到第 24 小時才有看到 Survivin 下降(圖四)，這暗示 LS-01' 之所以較有細胞毒性，可能與快速造成 Survivin 下降有關，值得進一步探討。

4. MCF-7 細胞接受 LS-01' 合併光照後使細胞位於 G2/M 期比例下降

我們接著探討 LS-01' 是否參與了 MCF-7 的細胞週期調控，透過 propidium iodide (PI) 染色處理已接受 LS-01' 及 405 nm 藍紫雷射光照射後並培養 48 小時的 MCF-7 細胞，接續以流式細胞儀進行細胞 DNA 含量測定。相較於只加了 DMSO 的控制組，經過 LS-01' 處理的 MCF-7 細胞，其在細胞週期之 G2/M 期細胞下降了約 26.5% (比例由 12.1% 下降至 8.9%) (圖五)，這表示 LS-01' 可能透過影響 MCF-7 的細胞週期來抑制期生長，也值得進行後續的了解。

5. MCF-7 細胞接受 LS-01' 以及光照後其細胞週期蛋白 CDK2 下降而 Cyclin E1 增加

為了瞭解 LS-01' 如何使 MCF-7 細胞停留於細胞週期之 G1 期，我們挑選了一些與 G1 期相關的蛋白，並以西方點墨法 Western blot 去測定蛋白表現量的差異。結果顯示 MCF-7 細胞在處理 LS-01' 及接受 405nm 雷射照光並培養 48 小時後，其細胞內 CDK2 表現下降，以及 Cyclin E1 蛋白表現明顯增加(圖六)。而有文獻顯示，過度表現 Cyclin E1 在 MCF-7 乳癌細胞會增加由細胞激素 TNF- α 或 TNF-related apoptosis inducing ligand

(TRAIL)所誘導的細胞凋亡能力^[8]，未來將可以透過 LS-01'合併 TNF- α 或 TRAIL 的方式探討此種組合對 MCF7生長抑制的效果。

討論

LS-01'及 LS-01'的處理以及405 nm 的藍紫光雷射照射之後，都可以對 MCF-7產生一定的細胞毒性(圖一~三)。為了確認 LS-01'的作用機制，我們挑選了一些與細胞凋亡相關的蛋白作為方向，以 Western 測其表現量後發現存活蛋白 Survivin 在接受 LS-01'及 LS-01'及光照處理後，表現量皆有下降的趨勢，尤其以 LS-01'的效果更為明顯(圖表四)，因此 LS-01'的將作為我們著重了解的目標，而於此部分我們預計將 Survivin 之表現質體先送入 MCF-7細胞後，再處理 LS-01'及以405nm 雷射光處理，探討細胞存活情況是否受到改善，並分析細胞凋亡相關蛋白或基因的表現是否與細胞存活情況有相關性。

光動力療法主要機制為產生能量轉移，使氧分子得到能量激發成活性較高的單重態並進入細胞並累積，進而促使細胞凋亡發生，而為了增加 LS-01'的作用能力，我們也將嘗試提高氧氣在細胞培養液中的濃度，提高足夠的氧氣反應物，接著預計以經過 LS-01'處理 MCF-7細胞後以 ROS Detection Assay 分析 ROS 在有無接受405nm 雷射光的 MCF-7細胞中的變化量，來瞭解 LS-01'是否藉由細胞內 ROS 的累積調控基因表現。此外，我們也預計使用 ROS 抑制劑 NAC (N-acetyl-L-cysteine)來嘗試降低細胞內 ROS 含量，分析 LS-01'照光導致的細胞毒性是否受到抑制，來釐清 ROS 在 LS-01'對 MCF-7之光敏劑效果的角色。

有文獻指出 SMAC^[9]、p53^[10]、TGF- β ^[11]...等蛋白會藉由抑制 Survivin 的表現量，來促進細胞凋亡。因此，我們想瞭解 Survivin 在處理 LS-01'之 MCF-7細胞中的表現量，是否由 SMAC、p53、TGF- β ...等蛋白所調控，我們預計以 LS-01'處理 MCF-7細胞，接著分析 SMAC、p53、TGF- β ...等蛋白的表現情況，以瞭解 ROS 是否藉由提高 SMAC、p53、TGF- β ...等蛋白的活性，來促進細胞凋亡。

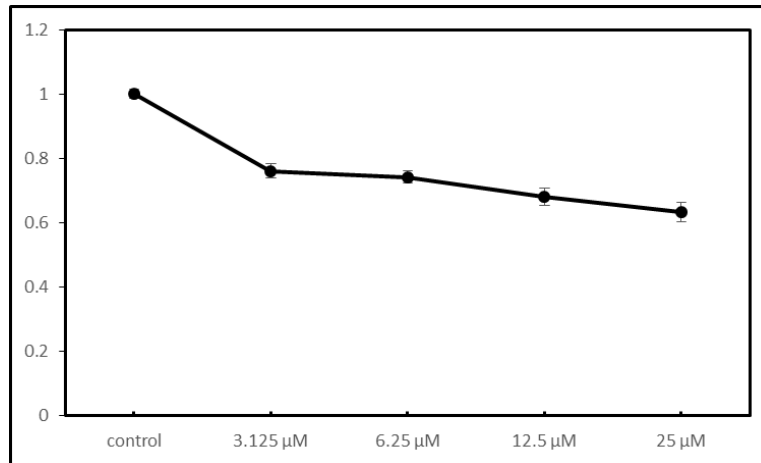
除了確認 MCF-7細胞受到的細胞凋亡影響，我們也同時探討 LS-01'是否參與了 MCF-7細胞的細胞週期調控，藉由 PI staining 及流式細胞儀的分析，我們初步發現了 LS-01'使 MCF-7細胞在細胞週期之 G1期停留的比例提高(圖五)，因此我們以 Western 來測定調控 G1期的相關蛋白表現量，發現 CDK2表現下降同時提高 Cyclin E1的表現(圖六)。CDK2原本作用為 S 期的 CDK，但有研究指出，CDK2在非 p53依賴性的 G2/M 細胞週期檢查點扮演一定角色，若在 p53缺失的細胞剔除 CDK2則使得放射線導致的 G2/M arrest 無法進行^[12]。而有文獻顯示，過表現的 Cyclin E 在 MCF-7乳癌細胞會使由 TRAIL 誘導的細胞凋亡敏感性增加^[8]，因此我們也將嘗試讓 MCF-7細胞接受 LS-01'並照光處理後加入 TRAIL，確認 LS-01'是否透過增加 Cyclin E 表現量而促進細胞凋亡。

為了能夠提高 LS-01'進入癌症細胞的效率，高分子 dendrimer 常用於藥物攜帶，增加細胞對藥物的吸收^[13]。未來我們將以 dendrimer 裝載 LS-01'方式提高其進入細胞能力，再分析此組合物對於 MCF7的生長抑制效果和相關蛋白之表現量。

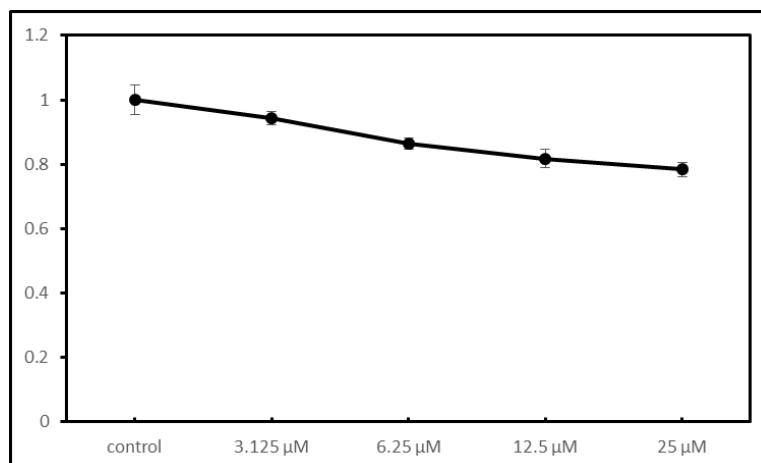
由於後期實驗發現處理 LS-01'且照光的毒殺效率下降，於是我們嘗試在實驗用之

培養液體先進行打氣，以增加培養液中的含氧濃度，結果確實有回復 LS-01'的作用效果，可得知細胞處於的環境氧濃度有一定程度的影響光敏藥物的效率。再後來我們也察覺到後期雷射光儀器功率下降而影響 LS-01' 的毒殺效率，由此發現了原先忽略到的問題，光動力療法除了須配合光敏藥物的吸收波長外，照光的功率也是需要注意的一項環節，才能使光敏藥物發揮到其效能。

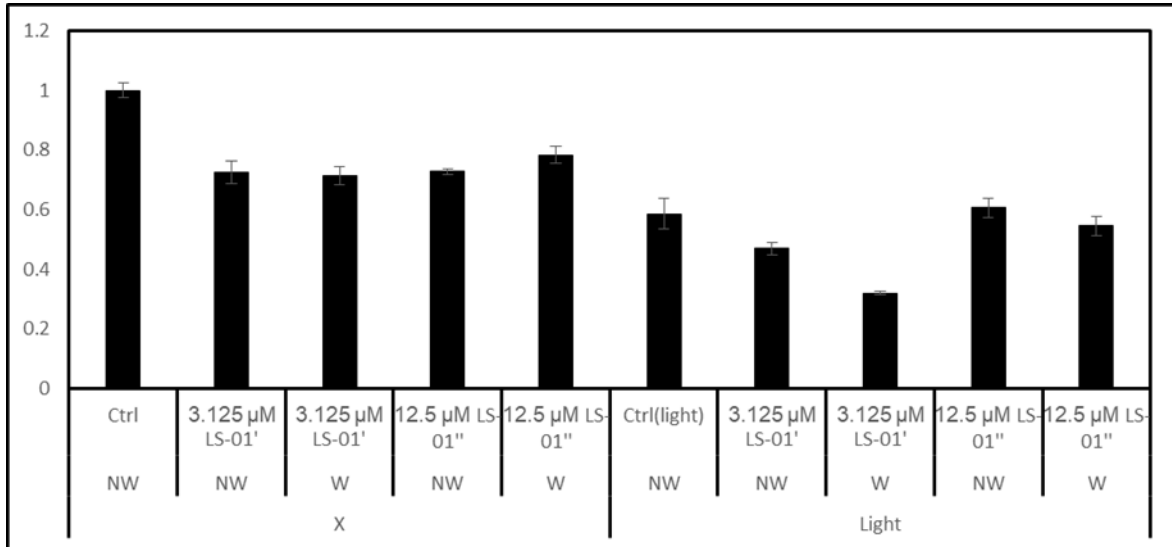
實驗數據



圖一、不同濃度的光敏潛力材料 LS-01'對乳癌細胞 MCF-7的暗室毒性測試。先以不同濃度的 LS-01'加於乳癌細胞 MCF-7，種於96孔盤培養48小時後，加入 MTT 放置2小時，測其在單波長570 nm下的 OD 值，並比較細胞存活度。

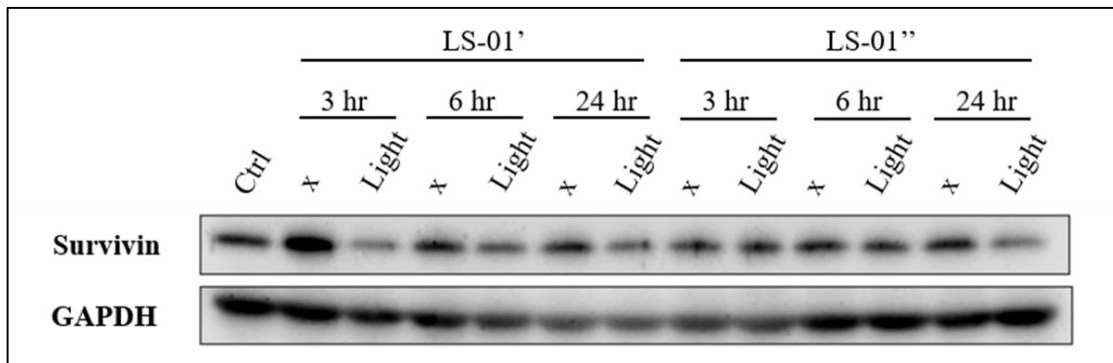


圖二、不同濃度的光敏潛力材料 LS-01''對乳癌細胞 MCF-7的暗室毒性測試。先以不同濃度的 LS-01''加於乳癌細胞 MCF-7，種於96孔盤培養48小時後，加入 MTT 放置2小時，測其在單波長570 nm下的 OD 值，並比較細胞存活度。



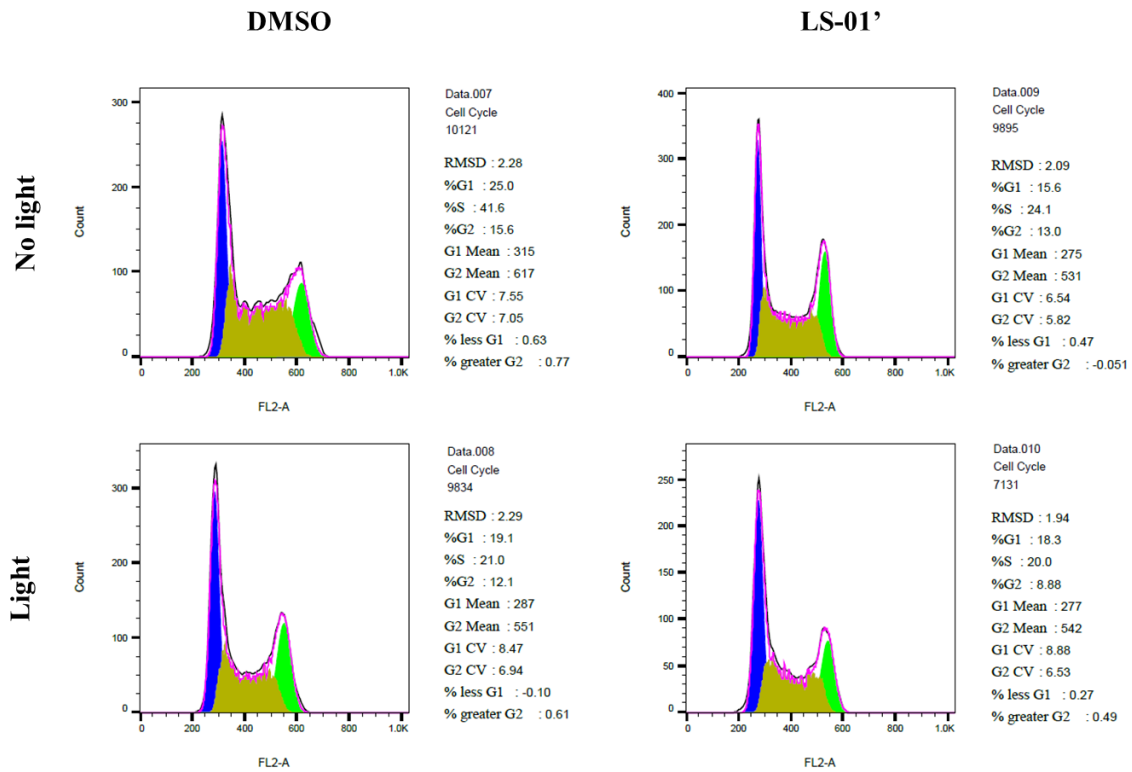
圖三、LS-01'對乳癌細胞 MCF-7具有光敏效果

(1)在分別加入 LS-01' (3.125 μM)以及 LS-01'' (12.5 μM)，使細胞與光敏淺力材料接觸30分鐘後，將 Wash 組離心移除光敏淺力材料，並補入新的細胞培養液。(2)Light 組則是每一樣品接受20分鐘的405 nm 藍紫雷射光照射，過程中每5分鐘 pipetting，確保細胞有均勻受到光照。最後將細胞種於96孔盤培養48小時後，加入 MTT 放置2小時，測其在單波長570 nm下的 OD 值，並比較細胞存活度。Ctrl: 無處理對照組；NW: 未移除材料組；W: 20分鐘後移除材料組；X: 未照光組；Light: 照光組。

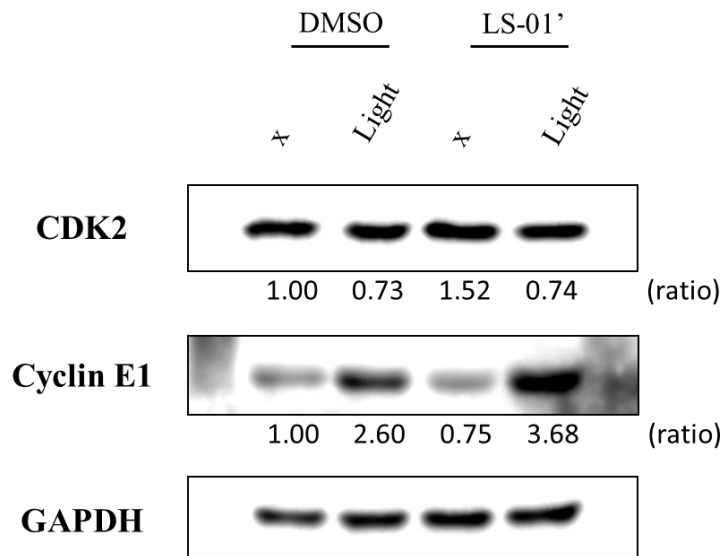


圖四、乳癌細胞 MCF-7經 LS-01'及405nm 光照處理使 Survivin 蛋白表現下降。

在分別加入 LS-01' (3.125 μM)以及 LS-01'' (12.5 μM)，使細胞與光敏淺力材料接觸30分鐘後，離心移除光敏淺力材料，並補入新的細胞培養液。將每一樣品接受20分鐘的405 nm 藍紫雷射光照射，過程中每5分鐘 pipetting，確保細胞有均勻受到光照。再來將細胞種於3.5公分培養盤，分別於培養後的3、6、24小時後收下蛋白，進行西方點墨法實驗。Ctrl: 無處理對照組；X: 未照光組；Light: 照光組。



圖五、乳癌細胞 MCF-7 經 LS-01' 及 405nm 光照處理後於細胞週期之 G2/M 期比例下降。在 MCF-7 細胞處理 LS-01' (3.125 μ M) 後，將每一樣品接受 20 分鐘的 405 nm 藍紫雷射光照射，過程中每 5 分鐘 pipetting，確保細胞有均勻受到光照。再來將細胞種於 6 公分培養盤，培養後的 48 小時後收下細胞，進行細胞週期染色 PI staining 實驗，並以流式細胞儀進行測定及分析。

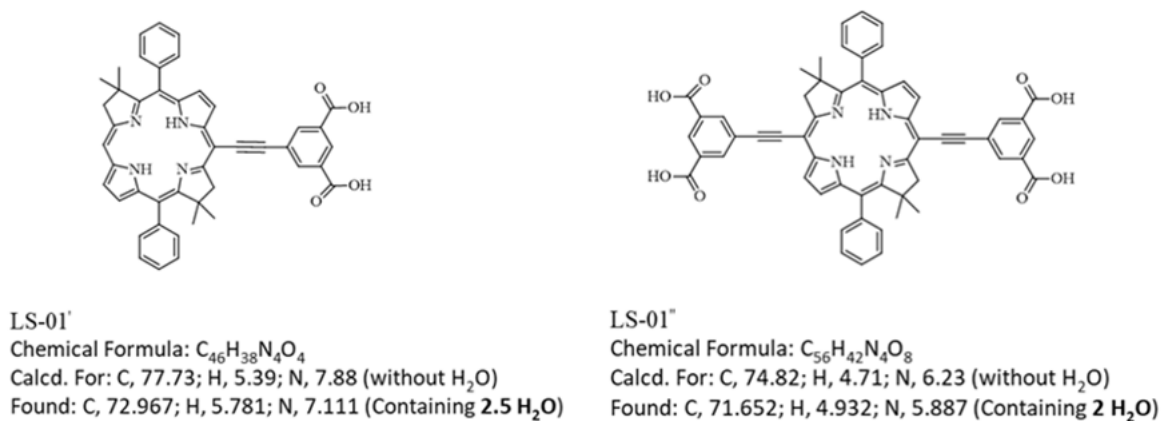


圖六、乳癌細胞 MCF-7 經 LS-01' 及 405nm 光照處理後 CDK2 表現下降而 Cyclin E1 表現量增加。

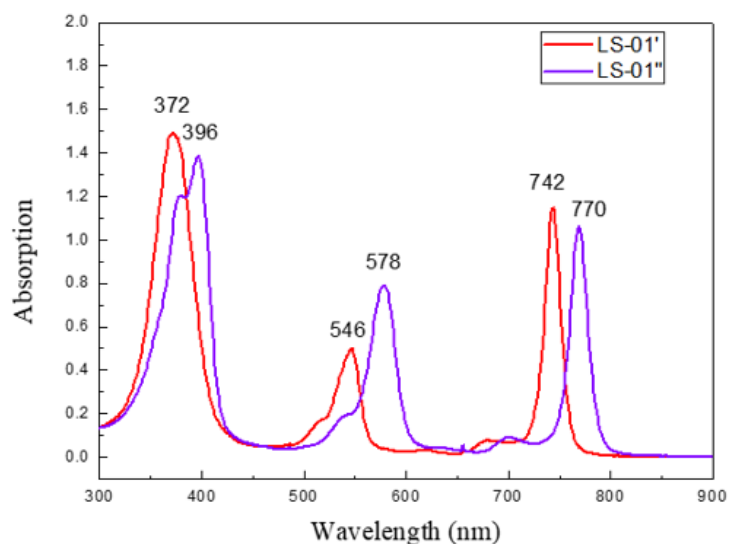
在 MCF-7 細胞處理 LS-01' (3.125 μ M) 後，將每一樣品接受 20 分鐘的 405 nm 藍紫雷射光

照射，過程中每5分鐘 pipetting，確保細胞有均勻受到光照。再來將細胞種於3.5公分培養盤，並於培養後的48小時後收下蛋白，進行西方點墨法實驗。X: 未照光組；Light: 照光組。

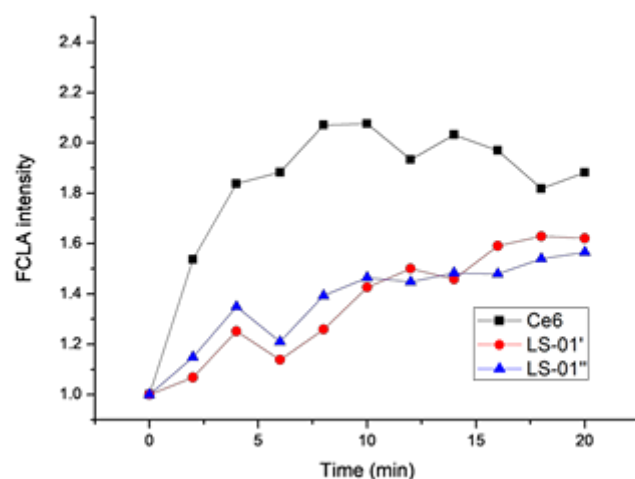
附圖



附圖一、LS-01'與LS-01''之結構及化學式。(由中山醫學大學醫學應用化學系朱智謙老師提供)



附圖二、LS-01'與LS-01''之吸收光譜。(由中山醫學大學醫學應用化學系朱智謙老師提供)



附圖三、LS-01'與LS-01''溶液受405nm光照可產生單態氧(由中山醫學大學醫學應用化學系朱智謙老師提供)

參考文獻

1. Saunders, Christobel; Jassal, Sunil. **Chapter 13. Breast cancer** 1st. Oxford: Oxford University Press. 2009. ISBN 9780199558698.
2. Heidi Abrahamse and Michael R. Hamblin. **New photosensitizers for photodynamic therapy**. Biochem J. Author manuscript; available in PMC 2017 Feb 15.
3. Song X, Wang Z, Liang H, Zhang W, Ye Y, Li H, Hu Y, Zhang Y, Weng H, Lu J, Wang X, Li M, Liu Y, Gu J. **Dioscin Induces Gallbladder Cancer Apoptosis by Inhibiting ROS-Mediated PI3K/AKT Signalling**. Int J Biol Sci. 2017 Jun 1;13(6):782-793. doi: 10.7150/ijbs.18732. eCollection 2017.
4. Trachootham D, Alexandre J, Huang P. **Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?** Nat Rev Drug Discov. 2009;8(7):579–91.
5. Wang YY, Ryu AR, Jin S, Jeon YM, Lee MY. **Chlorin e6-Mediated Photodynamic Therapy Suppresses P. acnes-Induced Inflammatory Response via NFκB and MAPKs Signaling Pathway**. PLoS One. 2017 Jan 24;12(1):e0170599. doi: 10.1371/journal.pone.0170599. eCollection 2017.
6. Cogno IS, Vittar NB, Lamberti MJ, Rivarola VA. **Optimization of photodynamic therapy response by survivin gene knockdown in human metastatic breast cancer T47D cells**. J Photochem Photobiol B. 2011 Sep 2;104(3):434-43. doi: 10.1016/j.jphoto-biol.2011.05.001. Epub 2011 May 20.

7. Wang H, Ye YF. **Effect of survivin siRNA on biological behaviour of breast cancer MCF7 cells.** Asian Pac J Trop Med. 2015. 8(3):225-8.
8. Dhillon NK, Mudryj M. **Cyclin E overexpression enhances cytokine-mediated apoptosis in MCF7 breast cancer cells.** Genes Immun. 2003 Jul;4(5):336-42.
9. Chen Q, Zhang H. **Smac combined with DDP can inhibit drug resistance of ovarian cancer through regulation of Survivin expression.** Cancer Biomark. 2018;22(1):1-6. doi: 10.3233/CBM-170325.
10. Dang T, Modak C, Meng X, Wu J, Narvaez R, Chai J. **CCN1 induces apoptosis in esophageal adenocarcinoma through p53-dependent downregulation of survivin.** J Cell Biochem. 2018 Sep 11. doi: 10.1002/jcb.27515.
11. Song K, Shankar E, Yang J. *et al.* **Critical role of a survivin/TGF-beta/mTORC1 axis in IGF-I-mediated growth of prostate epithelial cells.** PLoS One. 2013;8:e61896.
12. Chung JH, Bunz F. **Cdk2 is required for p53-independent G2/M checkpoint control.** PLoS Genet. 2010. 6(2):e1000863.
13. Elham Abbasi, Sedigheh Fekri Aval, Abolfazl Akbarzadeh, Morteza Milani, Hamid Tayefi Nasrabadi, Sang Woo Joo, Younes Hanifehpour, Kazem Nejati-Koshki and Roghiyeh Pashaei-Asl. **Dendrimers: synthesis, applications, and properties.** Nanoscale Research Letters 2014, 9:247.