

## 双光子激发光动力治疗研究进展

王少伟, 雷铭\*

教育部物质非平衡合成与调控重点实验室, 陕西省量子信息与光电量子器件重点实验室,  
西安交通大学物理学院, 陕西 西安 710049

**摘要** 光动力治疗以其高度选择性和低侵入性已在肿瘤和皮肤类疾病的临床治疗中展现出巨大的优势和广阔的前景。基于近红外光激发的双光子光动力治疗克服了传统紫外-可见光在生物组织中穿透能力有限的缺点,同时,非线性光学效应提升了光激活的时间和空间分辨率,使得其在深层肿瘤和病灶的精准诊疗中受到广泛关注。本文介绍了双光子光动力的基本原理,总结了目前高效双光子光敏剂的开发设计以及双光子光敏特性的表征技术,以具有聚集诱导发光特性的光敏剂为代表,对当前双光子光动力治疗的研究进展进行讨论和分析。最后对双光子光动力治疗未来的发展方向进行了展望。

**关键词** 医用光学; 双光子; 光动力治疗; 光敏剂; 近红外光; 聚集诱导发光

**中图分类号** O437; Q631

**文献标志码** A

**DOI:** 10.3788/CJL202249.1507101

## 1 引言

光介导的疾病诊疗利用光学技术实现疾病的诊断(光学成像、光谱检测等)和治疗(光激发的光热、光动力治疗等),与其他医学检测技术如核磁共振成像(MRI)、计算机断层扫描(CT)等相比,具有无辐射风险、特异性好、灵敏度和时空分辨率高等优点,在推动基础生物医学和临床诊疗应用等领域的发展中扮演着越来越重要的角色<sup>[1]</sup>。其中,光动力治疗(PDT)作为一种典型的光介导的诊疗技术<sup>[2-3]</sup>,在肿瘤以及一些皮肤类疾病的高效精准检测与治疗方面展现出了巨大优势,引起了包括光学、材料学、医学等领域专家学者的广泛关注。光动力治疗是一种低侵入性的检测治疗技术,即将光敏剂药物分子注射入体内,并使其在病灶部位富集,随后施加与光敏剂分子的吸收相对应的光源对病灶进行辐照,在此过程中,光敏剂分子从基态跃迁到激发态,随后通过能量转换使其周围的分子氧产生具有细胞毒性的活性氧(ROS),通过强氧化生物体内的还原性物质来杀灭癌细胞或者其他病原体<sup>[4]</sup>。根据不同的能量转换途径,ROS主要分为单线态氧( $^1\text{O}_2$ )、超氧阴离子自由基( $\text{O}_2^-$ )、羟基自由基( $\cdot\text{OH}$ )和过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )等。在被临床批准的光敏剂药物中, $^1\text{O}_2$ 是最主要的一种ROS<sup>[5]</sup>。在高效率的光动力治疗中,光敏剂、光源和分子氧三者之间相互依赖,同时扮演着重要角色<sup>[6]</sup>。首先,光敏剂分子在光源辐照下要具有强的吸光能力和光稳定性,同时具有较高的 $^1\text{O}_2$ 量子产

率(光能量转换效率)。对光源来说,它需要匹配光敏剂分子的最大吸收波长,在生物体内应用时需要具有较高的组织穿透能力,而且由正常组织吸收和散射导致的能量衰减要小,以避免治疗过程中的副作用,同时提高对深层组织中病灶的治疗效率<sup>[7]</sup>。随着光动力过程的进行,病灶部位的分子氧含量会降低,由此引发的缺氧状态不利于保持高效率的光动力激活<sup>[8-9]</sup>。

目前,临床上已经批准使用的光敏剂分子主要是卟啉及其衍生物<sup>[10]</sup>,它们的吸收主要在可见光范围内。由于可见光对组织的穿透力较弱,目前的治疗局限在体表肿瘤及疾病上<sup>[11]</sup>。Photofrin<sup>®</sup>是20世纪90年代被美国食品药品监督管理局(FDA)批准的第一个可临床应用的光敏剂药物分子,它是从牛血中提取并进行改性的卟啉低聚体混合物<sup>[11-12]</sup>。直到今天,它依然是全球范围内广泛使用的光敏剂药物之一,但是它自身也存在一些缺点:1)它注射体内之后的半衰期持续数周,甚至更久,由环境光照引起的光敏化会对病人的皮肤等产生副作用;2)它的激发光波长为630 nm(红光),但这并不是它最强吸收处(蓝光)的光波长,这是考虑红光比蓝光的穿透能力更好之后的折中选择。大部分的卟啉衍生物光敏剂都存在上述问题。为了能够实现深层组织的光动力治疗,一些具有红光和近红外光波段吸收的光敏剂分子,如亚甲基蓝和吡咯菁绿(ICG)被开发出来<sup>[13-14]</sup>。ICG虽然在近红外波段具有较强的吸收,但是根据ROS的产生原理,光敏剂分子需要有足够的三重激发态能量转移给分子氧才能产生

收稿日期: 2021-12-07; 修回日期: 2022-01-12; 录用日期: 2022-02-11

基金项目: 国家自然科学基金(62135003, 61905189, 62005208)、陕西省创新能力支撑计划(2021TD-57)

通信作者: \*ming.lei@mail.xjtu.edu.cn

ROS, 而近红外光子的能量较低, 因此 ICG 的 ROS 产生效率受到限制<sup>[15]</sup>。

近红外光相比紫外-可见光在生物组织中的散射更小, 因而具有更好的穿透能力<sup>[16]</sup>。为了充分利用这一巨大优势, 同时可以依托目前已经开发出来的具有高 ROS 产生效率但吸收在可见光范围的光敏剂, 研究人员提出了一种有效的策略, 那就是双光子激发光动力<sup>[7,17]</sup>。双光子激发光动力治疗就是利用近红外光激发光敏剂分子实现双光子吸收, 进而产生 ROS, 实现与普通单光子激发光动力治疗一致的治疗过程。而且, 双光子激发是一种非线性过程, 光能量在激发过程中的分布更加精准<sup>[18]</sup>。因此, 双光子光动力治疗不仅可以提升治疗深度, 还可以精准控制治疗精度<sup>[19]</sup>。基于这些特点, 近些年来这一领域受到广泛关注, 并产生了众多创新成果<sup>[7,20]</sup>。本文将首先介绍双光子光动力的基本原理, 随后围绕双光子光敏剂的开发设计、光源的选择以及生物医学应用等讨论近些年来的研究进展, 最后对这一领域的未来发展进行展望。

## 2 双光子激发光动力的原理

一般情况下, 在 ROS 产生过程中, 如图 1(a) 所

示, 一个光敏剂分子在光源辐照下吸收一个光子, 其电子从基态( $S_0$ )被激发到单重激发态( $S_1$  为第一单重激发态), 这一过程为单光子吸收(1PA); 随后, 分子通过内部转换(IC)和系间窜越(ISC)到达激发三重态( $T_1$  为第一三重激发态); 在返回基态过程中, 分子与周围处于基态的分子氧( $^3O_2$ )碰撞, 发生能量转换, 最终产生单线态氧( $^1O_2$ )。以上这一过程即为单光子激发的光动力治疗(1P-PDT)的基本过程<sup>[2]</sup>。当然, 在这个过程中, 处于单重态的分子也有可能直接回到基态并发射荧光, 或者通过其他非辐射途径损失能量。所以一般来说, 光敏剂分子同时也是荧光染料, 这对于荧光成像引导的光动力治疗非常重要。但是也应当看到, 荧光发射和 ROS 产生是一种竞争关系<sup>[21]</sup>。

在双光子激发光动力治疗(2P-PDT)中, 光敏剂分子需要“同时”(或者说在极短的时间内)吸收两个光子以被激发到激发态<sup>[17-18]</sup>, 随后产生 $^1O_2$ (与单光子激发光动力治疗过程相同)。如果是同样的一个光敏剂分子(吸收峰在 400 nm 左右), 利用 400 nm 蓝光就可以实现单光子的吸收和激发, 那么双光子激发所吸收的两个光子的能量之和应该接近一个 400 nm 光子的能量, 即可以使用 800 nm 光源, 故而双光子激发所使用

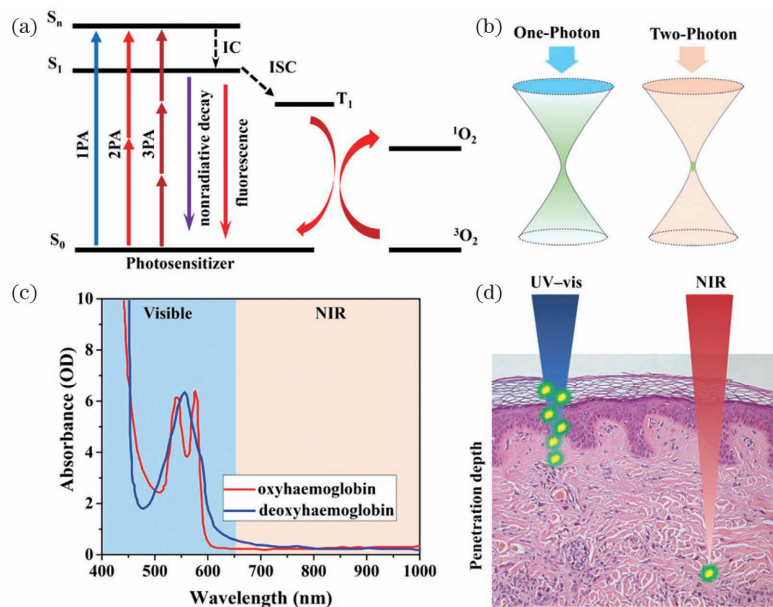


图 1 2P-PDT 的原理。(a)光敏剂吸收单光子、双光子和三光子后被激发产生单线态氧的 Jablonski 能级示意图, 其中,  $S_0$  表示基态,  $S_1$  表示第一单重激发态, IC 表示内部转换, ISC 表示系间窜越,  $T_1$  表示第一三重激发态,  $^1O_2$  表示单线态氧,  $^3O_2$  表示分子氧; (b)单光子和双光子激发下的荧光信号的空间分布<sup>[18]</sup>; (c)氧合血红蛋白和脱氧血红蛋白在可见光与近红外光波段的吸收光谱<sup>[25]</sup>; (d)紫外-可见光激发下的单光子光动力和近红外光激发下的双光子光动力在组织中的穿透能力和激活分布示意图

Fig. 1 Mechanism of two-photon excited photodynamic therapy (2P-PDT). (a) Jablonski diagram of singlet oxygen generation by photosensitizers with one-photon, two-photon, and three-photon absorption, where  $S_0$  represents ground state,  $S_1$  represents singlet excited state, IC represents internal conversion, ISC represents intersystem crossing,  $T_1$  represents the first triplet excited state,  $^1O_2$  represents singlet oxygen, and  $^3O_2$  represents molecular oxygen; (b) spatial distribution of one-photon and two-photon excited fluorescence signals<sup>[18]</sup>; (c) absorption spectra of oxyhaemoglobin and deoxyhaemoglobin in visible and near-infrared regions<sup>[25]</sup>; (d) illustration of penetrability and activation distribution of UV-vis light excited one-photon photodynamic and near-infrared light excited two-photon photodynamic in tissue

的光源一般都在近红外波段(700~1700 nm)。另外,一个分子同时吸收两个近红外光子的概率是非常低的。为了提高效率,需要使用具有高峰值功率的飞秒激光同时对激发光进行高度聚焦来实现双光子激发<sup>[22]</sup>。图 1(b)展示了单光子和双光子激发下发射荧光的空间分布情况<sup>[18]</sup>。可以看出,在单光子激发下,除了聚焦平面以外,离焦区域也被激发出了荧光信号,这必然会影响到聚焦面的成像质量,使信噪比降低。而在双光子激发下,只有在高度聚焦的位置(焦平面)才能实现双光子吸收和荧光发射,因此避免了离焦信号带来的干扰。这是由于双光子吸收是一个非线性光学过程,双光子激发出的荧光强度与激发光能量的平方成正比,故而只有具有高峰值功率的超短脉冲飞秒激光才能够实现较高效率的双光子激发。这一特点使得双光子激发具有天生的三维层析能力,无需使用单光子共聚焦成像中的针孔来过滤离焦信号<sup>[23]</sup>,就可以实现高信噪比成像。在双光子激发下,只有在非常小的体积(约  $1 \mu\text{m}^3$ )内才能实现 ROS 产生,这一优势使得 2P-PDT 可以在三维组织内精准地实施光动力治疗<sup>[18,24]</sup>。图 1(c)展示了生物体内血红蛋白的吸收光谱,可以看出,血红蛋白在可见光区域有很强的吸收,但其在近红外区域的吸收非常弱。这说明近红外光在生物组织中因吸收而产生的损耗更小<sup>[25]</sup>。同时,近红外光子的能量相较于蓝光来说对正常生物组织的光损伤更小,而且在光所经之处,非聚焦目标位置产生的光毒性也更小,如图 1(d)所示。由此可以得出,双光子激发可以实现更深层组织的高精准可控光动力治疗。

### 3 2P-PDT 的性能参数

#### 3.1 双光子光敏剂

早期的 2P-PDT 采用纳秒光源<sup>[26]</sup>,使用的光敏剂主要还是在 1P-PDT 中被广泛使用的基于卟啉衍生物的光敏剂。随着钛宝石(Ti:sapphire)飞秒激光器的发展和普及,越来越多的单光子光敏剂的双光子特性被研究并且被应用到了 2P-PDT 中<sup>[24]</sup>,这些光敏剂包括 Photofrin<sup>®</sup> 及其衍生物<sup>[27-28]</sup>、5-氨基酮戊酸<sup>[29-30]</sup>(ALA)、卟吩类衍生物<sup>[31]</sup>(如二氢卟吩 e6)、金属酞菁类化合物<sup>[32]</sup>(如四磺酞菁铝)等。其中 Photofrin<sup>®</sup> 是第一代光敏剂,其他的是第二代光敏剂,它们都克服了卟啉衍生物在红光区域吸收较弱的缺点,主要吸收峰普遍都在 630 nm 以上,同时它们的单线态氧量子产率较高。当这些光敏剂分子被红光单光子激发时,可在一定程度上提升光动力治疗的深度。但是当它们被应用到 2P-PDT 时,所使用的飞秒光源主要在 700~1040 nm 波段,与它们的主吸收峰并不非常匹配,所以这些光敏剂分子的双光子吸收截面较小,通常为  $2\sim 100 \text{ GM}$ 。但它们具有较高的 ROS 产率,因此也表现出一定的 2P-PDT 效果<sup>[24]</sup>。第三代双光子光敏剂分子主要集中在改善对肿瘤的选择性(靶向性)

上。将光敏剂与抗体、蛋白、糖类等具有特异靶向性的分子连接,可使其更加高效地识别肿瘤细胞,同时增强其在肿瘤组织的富集,进而提高光动力治疗的效率。随着纳米技术的发展,光敏剂分子也被负载到各种各样的纳米载体(量子点、金属纳米颗粒、聚合物胶束等)上形成纳米药物递送系统<sup>[2,33]</sup>,这种策略可以提高光敏剂的稳定性。此外,可以通过荧光共振能量转移(FRET)技术来提升双光子的吸收能力<sup>[34-39]</sup>,还可以通过各种修饰来实现更多的功能。当然,对于一个优异的双光子光敏剂来说,最基本且最重要的是提升 ROS 的量子产率和双光子吸收能力(截面)。

#### 3.2 提高 ROS 产率

由光动力的基本原理可以看出,从单重态到三重态的系间窜越过程在 ROS 的产生中扮演着重要角色。一些典型的具有高效 ROS 产率的光敏剂往往具有较高的系间窜越速率,以这些典型光敏剂(如四吡咯、卟啉和苯酮等<sup>[10]</sup>)的核心骨架结构为基础,可以设计出高性能的光敏剂分子,如图 2 所示。其中,四吡咯环是被广泛使用的一种结构,通过在它的大环上修饰取代基,或者嵌入金属离子等,可以很好地调节光敏剂的 ROS 产率<sup>[40]</sup>。另一个提高 ROS 产率的方案是利用重原子效应来增强分子的系间窜越过程,即在发色团中引入重金属原子,如钆、铀、碘和溴等<sup>[41-43]</sup>。原子序数较大的重金属原子有助于单重态和三重态之间的自旋轨道耦合(SOC),SOC 效应的增强可以增大单重态到三重态的系间窜越,进而提升 ROS 产率<sup>[44]</sup>。在荧光素、罗丹明、氟硼二吡咯等传统的荧光染料分子中引入重原子,可以将它们转变成高效的光敏剂分子<sup>[45]</sup>。广泛使用的具有较高亲水性的玫瑰红就是一种典型的将卤素引入荧光素分子之后得到的高效光敏剂。荧光素的荧光量子产率高达 95%,但是它的单线态氧量子产率只有 3%,而玫瑰红的单线态氧量子产率可以达到 75%<sup>[6]</sup>。当然,这一提高 ROS 产率的方案也有缺点,比如,引入的重原子往往会带来暗毒性,合成制备光敏剂使用贵金属提高了成本<sup>[46]</sup>。此外,重原子效应不仅增强了单重态到三重态的过程,同时也增强了三重态到基态的过程,所以最终缩短了光敏剂分子在三重态的寿命,进而也会影响到 ROS 的产率<sup>[21]</sup>。近年来,一些不含重原子的光敏剂通过增强 SOC 效应也能够实现对系间窜越过程的增强<sup>[47]</sup>。除此之外,减小单重态( $S_1$ )到三重态( $T_1$ )的能级差( $\Delta E_{ST}$ )也可以增强系间窜越过程<sup>[48]</sup>。在具有给体(D)-受体(A)结构的分子中,通过分离分子最高已占分子轨道(HOMO)和最低未占分子轨道(LUMO)来降低  $\Delta E_{ST}$  也可以增强系间窜越过程<sup>[49]</sup>,如图 3(a)所示。这种方法的灵活性较高,通过精准调节不同的给体和受体基团,就可以得到不同的  $\Delta E_{ST}$ ;同时,光敏剂分子的吸收光谱和发射光谱也可以进行调节,故而基于给体-受体结构体系的光敏剂分子被广泛设计和开发出来,并被应用于光动力

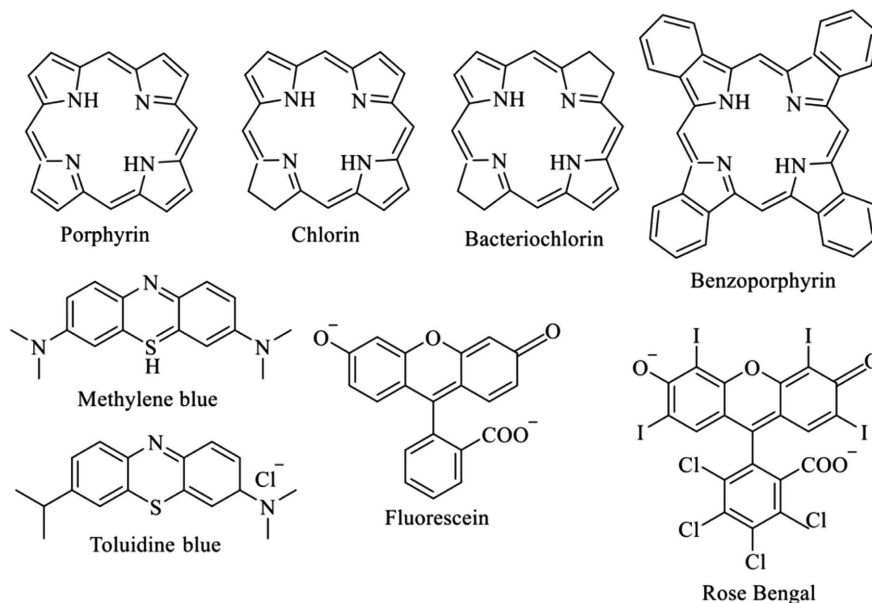


图 2 几种典型光敏剂的分子结构式

Fig. 2 Examples of chemical structures of typical photosensitizers

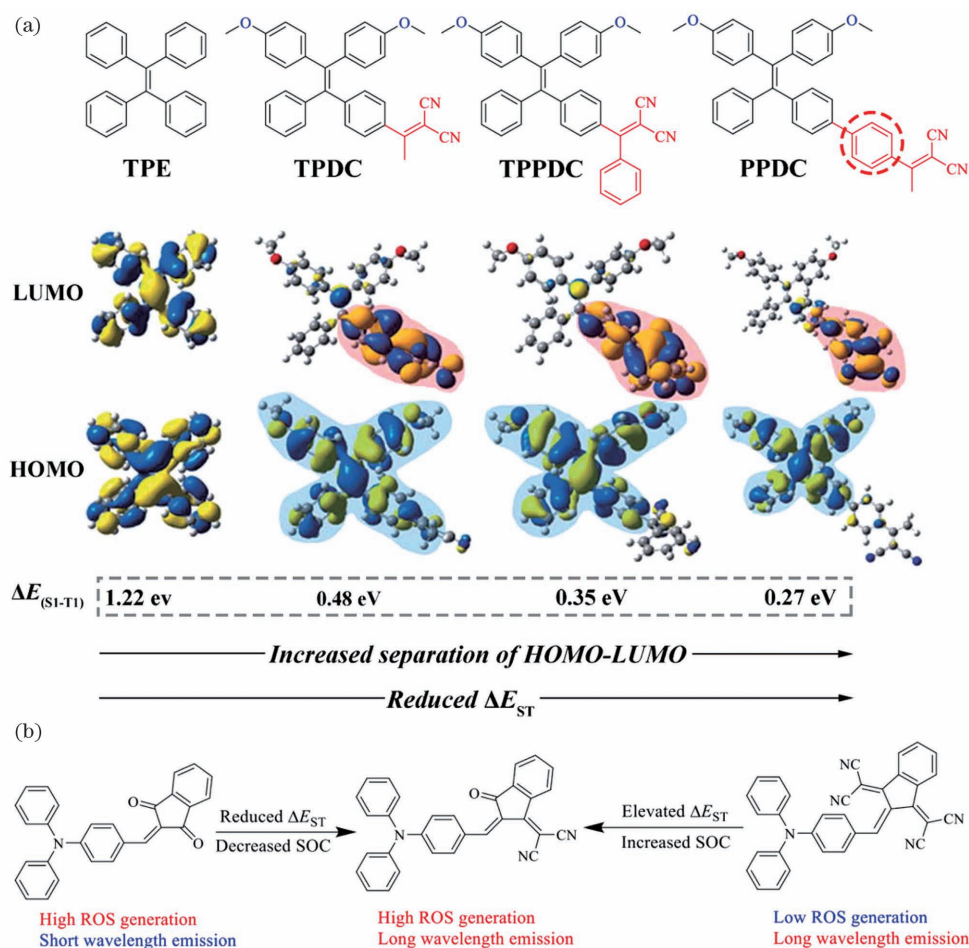


图 3 提升 ROS 产率。(a)通过 HOMO-LUMO 分离提高 ROS 产率<sup>[49]</sup>；(b)通过调节  $\Delta E_{ST}$  和 SOC 来提升 ROS 产率<sup>[50]</sup>

Fig. 3 Improvement of ROS generation efficiency. (a) Improving ROS generation efficiency through HOMO-LUMO separation<sup>[49]</sup>; (b) adjustment of  $\Delta E_{ST}$  and spin-orbit coupling (SOC) for enhanced ROS generation efficiency<sup>[50]</sup>

治疗中<sup>[40]</sup>。此外,如图 3(b)所示,在 D-A 结构的光敏剂分子设计中,可以同时调节  $\Delta E_{ST}$  和 SOC 效应,以获得更高效的系间窜越<sup>[50-51]</sup>。

### 3.3 增强双光子吸收

传统的基于卟啉结构的光敏剂的双光子吸收一般都比较小,为了提高 2P-PDT 的治疗效率,必然需要提

高激发光功率, 这样就会导致光敏剂的漂白(不可逆的损害)加剧, 同时还会对正常生物组织产生光损伤。为了提高双光子的吸收能力, 早期的研究将具有较高双光子吸收能力的染料或者纳米颗粒与光敏剂连接, 通过荧光共振能量转移技术实现 2P-PDT<sup>[34-39]</sup>。其中,

纳米颗粒由于具有优异的光学特性, 并且易于修饰实现多重功能化, 在基于荧光共振能量转移技术的 2P-PDT 中被广泛使用。所使用的纳米颗粒主要包括量子点、金纳米棒、碳纳米管等<sup>[34]</sup>, 如图 4(a)所示<sup>[52-53]</sup>。在荧光共振能量转移技术中, 需要精准地匹配光敏剂

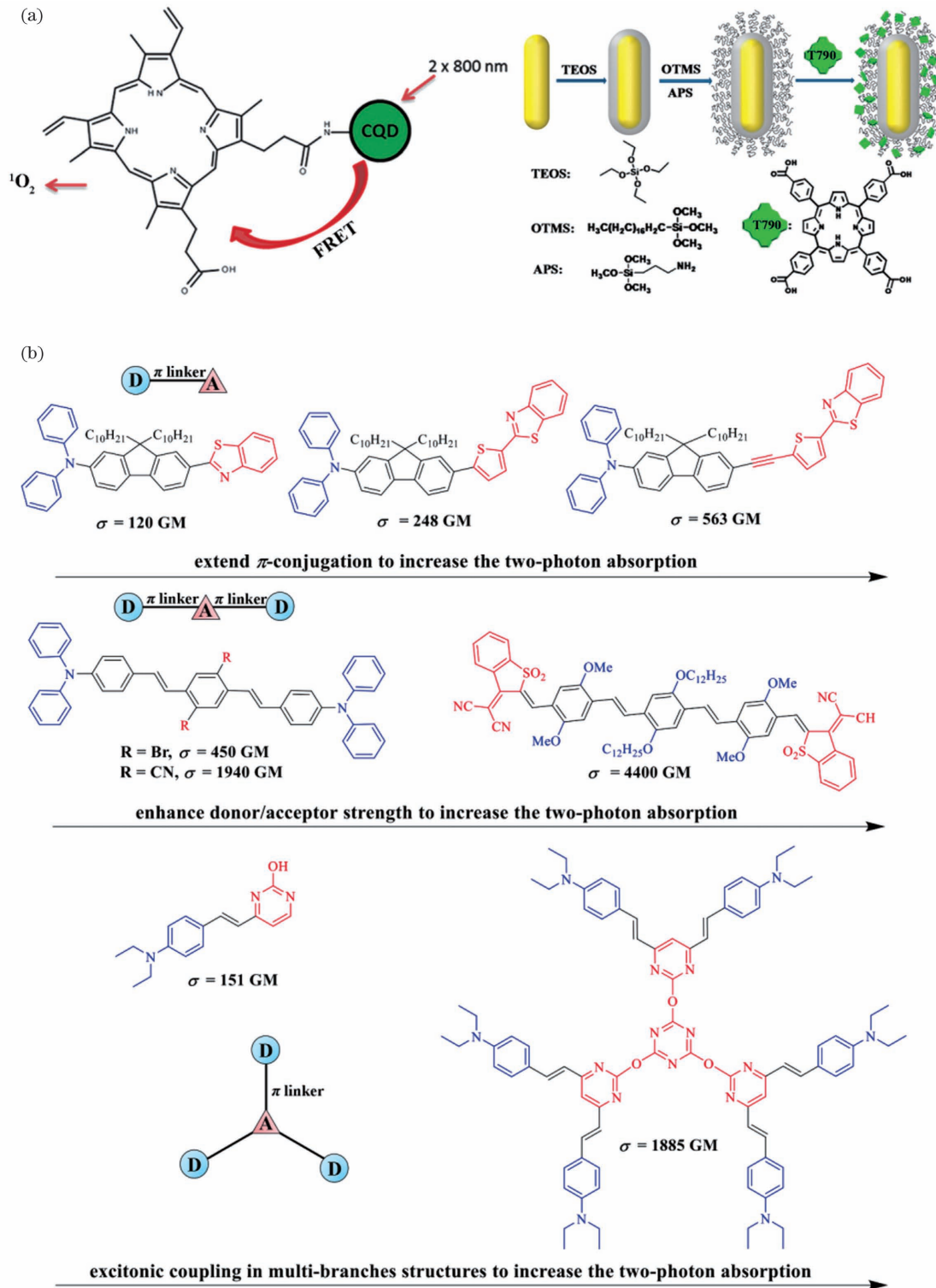


图 4 增强双光子吸收。(a)基于荧光共振能量转移的方法提高双光子吸收<sup>[52-53]</sup>; (b)在给体-受体体系中通过增强共轭来提高双光子吸收<sup>[57-59, 61]</sup>

Fig. 4 Enhancement of two-photon absorption. (a) FRET techniques for two-photon absorption improvement<sup>[52-53]</sup>; (b) enhancement of two-photon absorption through extended conjugation in donor-acceptor systems<sup>[57-59, 61]</sup>

的吸收光谱与扮演能量给体角色的双光子染料或纳米颗粒的发射光谱,而且光能的转换效率最终会影响光敏剂的 ROS 产生。如果需要进一步实现高效率的 2P-PDT,就要考虑直接提高光敏剂分子本身的双光子吸收能力。对于一个双光子分子(光敏剂或者染料分子)来说,表征其吸收能力的参数是双光子吸收截面( $\sigma$ ),它的单位为 GM ( $1 \text{ GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s} \cdot \text{photon}^{-1}$ ),该单位的命名是为了纪念双光子理论的提出者 Göppert-Mayer。在有机双光子染料分子中,双光子吸收与分子内电荷转移( ICT)以及由电子给体(D)、受体(A)及连接二者的共轭  $\pi$  桥基团所构成的 D- $\pi$ -A 体系的非中心对称偶极分子密切相关<sup>[22,54-55]</sup>。例如,在反式二苯乙烯中引入给体-受体结构实现有效的分子内电荷转移,可以使双光子吸收提高一个数量级<sup>[55]</sup>。众多研究表明,增强分子的共轭程度以及给体和受体的强度,可以提高双光子的吸收能力<sup>[56]</sup>。如图 4(b)所示,在由二苯胺基团和苯并噻唑分别作为供体和受体的 D- $\pi$ -A 结构分子中,通过引入噻吩基团和炔基团可以逐步增强分子共轭,从而实现双光子吸收截面从 120 GM 增大至 563 GM<sup>[57-58]</sup>。在由两个相同的供体或者受体构成的四极分子(A- $\pi$ -A 或者 D- $\pi$ -D)中,通过在共轭链上引入额外的强供体或者受体基团也可以进一步增强双光子吸收。一般来讲,在共轭  $\pi$  桥不变的情况下,D-A-D 结构的分子要比 D- $\pi$ -D 结构的分子的双光子吸收更大,这是由于受体基团促成了分子  $\pi$  系统与两端的供体基团的电荷转移,有效增强了双光子吸收<sup>[59]</sup>。如图 4(b)所示,当利用氰基替换溴作为受体后,分子的双光子吸收截面可从 450 GM 增加到 1940 GM<sup>[59]</sup>,但是当把氰基的位置从中心苯环转移到乙烯基团上以后,双光子吸收截面只增加到 730 GM。这说明引入的强电子受体在  $\pi$  桥上的位置也会影响双光子的吸收截面。在图 4(b)所示的 A-D-A 结构中,通过简单地增加电子供体基团(烷氧基团)的数量来增强供体电子的能力也是一种有效的增强双光子吸收的方法。此外,枝状结构的分子由于具有协同增强效应也能提高双光子的吸收能力,多枝结构分子的双光子吸收截面比所有单个分枝结构吸收截面的总和还要大<sup>[60-61]</sup>。以上这些针对双光子染料的增大吸收截面的策略同样适用于双光子光敏剂的设计<sup>[24]</sup>。前面也讲到了基于 D-A 结构体系的光敏剂分子可以通过对给体和受体进行搭配来精准地调节分子的光敏特性、吸收特性、发射特性和双光子吸收特性,所以,基于 D- $\pi$ -A 结构体系的双光子光敏剂在 2P-PDT 中得到了广泛的关注和研究。

### 3.4 双光子激发 ROS 产生的表征

对光敏剂 ROS 产率进行表征是光敏剂实现应用前的关键一步<sup>[62]</sup>。在单光子激发下的单线态氧检测技术已经较为成熟,目前主要有两种检测技术,一种是直接采用时间分辨光谱技术对单线态氧在 1270 nm

左右的磷光发射进行检测,另一种是利用分子探针间接地检测其与生成的 ROS 发生反应(被氧化)后的产物的吸收或者荧光强度变化<sup>[63-64]</sup>。第一种方法(即磷光法)的优势是直接检测,直接反映单线态氧的产率,但其缺点是磷光的量子产率低,寿命短,反应活性高,磷光信号极弱,需要特殊设备放大之后才能检测。第二种方法(间接方法)需要使用 ROS 探针,生成的 ROS 会与探针发生氧化反应,使得探针发射荧光或者吸收强度发生变化,通过普通的荧光分光光度计或者紫外-可见分光光度计即可进行检测。这种间接方法的优势是灵敏度高,易操作,成本低,不需要复杂的设备,而且除了可对离体的水溶液进行检测以外,还可以利用显微镜或者活体成像仪实时在体监测细胞、活生物体内 ROS 的产生。目前常见的 ROS 探针主要有 9,10-蒽二丙酸(ABDA)、2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFDA)、单线态氧荧光探针(SOSG)和 1,3-二苯基异苯并呋喃(DPBF)等。其中,DCFDA 也是一种双光子染料,它可以应用于水溶液和细胞内进行 ROS 检测。DCFDA 本身的荧光较弱,进入细胞之后被细胞内酯酶和产生的 ROS 氧化切割乙酸酯基团之后变成发射高亮度荧光的 2',7'-二氯荧光素(DCF),通过双光子荧光显微成像即可实时检测细胞内 ROS 的产生。对于单光子激发的 ROS 来说,其作用体积较大,产生的荧光强度或者吸收强度变化能够比较方便地利用普通的分光光度计进行检测;但是对于双光子激发的 ROS,其作用区域非常小(约为  $1 \mu\text{m}^3$ ),普通的分光光度计难以检测到非常微量的荧光信号或者探针吸收强度的变化。因此,设计开发一种能够实时检测双光子激发的 ROS 的技术非常有必要。如图 5 所示,将含有 DCFDA 的光敏剂溶液装载到一个毛细玻璃管(内径 0.3 mm)中,保证液柱的长度在 1 mm 左右(光敏剂溶液的体积越小越好),然后将此毛细玻璃管固定在载玻片之上,并将它们放置在双光子显微镜的载物台上,接着采用飞秒激光对溶液内的光敏剂进行双光子激发,并利用双光子荧光显微镜对溶液内生成的 DCF 进行成像,最后通过荧光图片的信号强度来分析

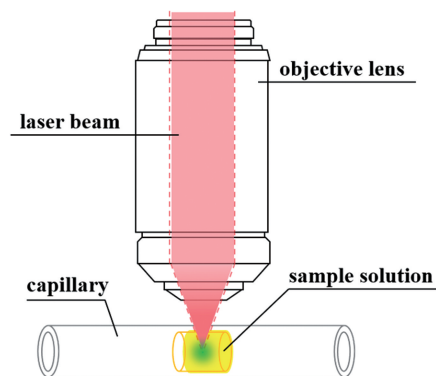


图 5 双光子激发下 ROS 产生的在体实时检测<sup>[65]</sup>  
Fig. 5 *In vitro* real time detection of ROS generation under two-photon excitation<sup>[65]</sup>

双光子激发下的 ROS 产率。此方法简单高效,只要保证激发溶液体积较小,同时所有的参数保持一致即可,对于比较不同光敏剂在相同双光子激发下的 ROS 产率具有较高的参考价值<sup>[65]</sup>。

## 4 2P-PDT 的典型应用案例

### 4.1 聚集诱导发光光敏剂

前面讲到目前大部分被临床批准使用的光敏剂分子已经具有非常高效的 ROS 产生能力,但是这些特性是在单分子状态下获得的,也就是光敏剂分子处在其良性溶剂中所测试得到的数据<sup>[66]</sup>。在实际的光动力治疗中,生命体内的环境一般是水性的,而传统的光敏剂分子具有较强的疏水性,因此光敏剂分子容易在体内环境中聚集,导致 ROS 产率和荧光强度降低<sup>[6]</sup>。对光敏剂进行水溶性改造可以使其具有较高的亲水性,但这不仅会使光敏剂分子本身的 ROS 产率受到一定影响,还可能使其对肿瘤组织的选择性变差<sup>[40]</sup>。为了提高光敏剂在水性环境中的稳定性同时增强其对肿瘤的靶向性,一般可采用聚合物胶束包覆光敏剂形成亲水性纳米颗粒或者将光敏剂药物分子物理修饰或者化学修饰到纳米颗粒表面,以增强其在体内的递送<sup>[2]</sup>。这种方法虽然在一定程度上提高了光敏剂在体内的有效递送和靶向性,但无论是纳米胶束还是纳米颗粒负载,光敏剂都会不可避免地以聚集态的形式存在,也就是说,这种技术方案无法克服光敏剂分子因为分子聚

集堆叠而导致的 ROS 和荧光同时淬灭的问题<sup>[67]</sup>。

针对聚集导致的 ROS 淬灭的问题,中国科学院化学研究所的张德清等和新加坡国立大学的 Liu 等在 2014 年分别设计开发了具有聚集诱导发光(AIE)特性的光敏剂分子<sup>[68-69]</sup>。AIE 效应<sup>[70]</sup>由香港中文大学(深圳)的唐本忠院士等于 2001 年发现并提出,该效应是指一些具有螺旋桨结构的荧光团,如图 6(b)中的 TPE 分子,在其良性有机溶剂中处于单分子状态时,激发态的能量通过分子内的转动被耗散,使得荧光发射强度微弱或者不发光;但是当荧光团处于固态或者分子聚集态时,由于分子内的转动被限制,激发态的能量能够被充分用来发射荧光<sup>[67]</sup>。基于这个原理,近些年一系列具有 AIE 特性的光敏剂分子被设计开发出来<sup>[6]</sup>。与传统的光敏剂 Ce6 相比,在利用高分子聚合物包覆形成纳米颗粒过程中,AIE 光敏剂分子[如图 6(d)中的 TPEDC]的 ROS 产率和荧光亮度随着包覆率增大一直在增强,而 Ce6 在这个过程中由于分子堆叠聚集,其荧光亮度和 ROS 产率随着包覆率增大呈先增大后降低的趋势,如图 6(c)所示。由此可见,基于纳米颗粒的 AIE 光敏剂体系不但具有更好的亲水性和生物兼容性,还以聚集态的形式保证了高效的 ROS 产生和荧光发射,在生物体内的光动力治疗中具有非常大的优势<sup>[71]</sup>。

前面讲到通过 HOMO 和 LUMO 分离来增强系间窜越过程是一种非常有效的提高 ROS 产率的方法。

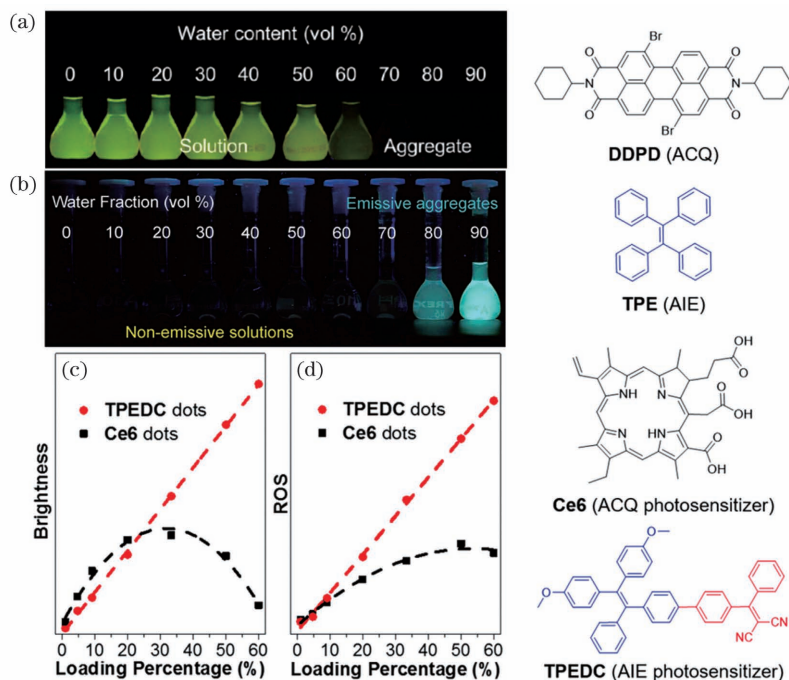


图 6 聚集诱导的发光特性<sup>[71]</sup>。紫外灯照射下,DDPD 和 TPE 分子在不同比例的四氢呋喃/水混合溶液中的荧光照片:(a)DDPD;(b)TPE。传统光敏剂 Ce6 和 AIE 光敏剂 TPEDC 在不同包覆比例下的纳米颗粒的荧光亮度和 ROS 产率的变化:(c)荧光亮度;(d)ROS 产率

Fig. 6 Aggregation-induced emission characteristics<sup>[71]</sup>. Fluorescence images of DDPD and TPE molecules in the mixtures of tetrahydrofuran and water with different ratios under UV light: (a) DDPD; (b) TPE. Fluorescence brightness and ROS generation efficiency changes of Ce6 and TPEDC in the nanoparticle formulations with varied loading percentages: (c) fluorescence brightness; (d) ROS generation efficiency

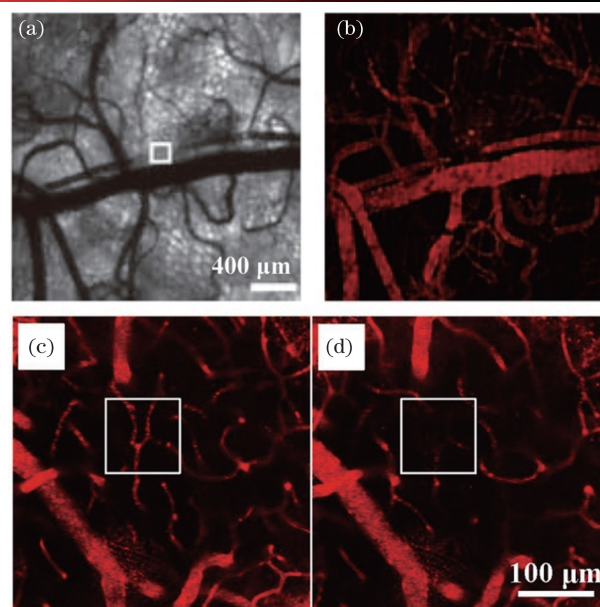
在 AIE 光敏剂的设计中,以具有 AIE 特性的基团,例如四苯基乙烯(TPE),作为电子给体,通过嫁接不同的电子受体以及  $\pi$  桥来实现高效率的系间窜越,国内外多个课题组开发了一系列具有高 ROS 产生能力的 AIE 光敏剂<sup>[6]</sup>,并成功地将其应用于皮下肿瘤的消融治疗(单光子激发)。此外,由于 AIE 材料特有的聚集增强荧光特性,其在多光子激发下的荧光产生效应也被众多学者研究<sup>[72-77]</sup>。AIE 材料以其高效的荧光量子产率和较大的多光子吸收截面,在多光子活体成像方面具有优异表现<sup>[78-83]</sup>。由此可见,开发设计双光子 AIE 光敏剂具有重要的研究和应用价值。

#### 4.2 2P-PDT 实现血管闭合

双光子激发下的光动力具有单光子光动力不可比拟的高时空分辨特性,可在生物体三维组织空间内精准控制激活 ROS 的产生。2008 年,Collins 等<sup>[84]</sup>首次报道了在生物活体上利用双光子激发的光动力实现血管的选择性闭合。他们设计了一系列基于卟啉共轭二聚体的新型光敏剂,与传统的卟啉光敏剂相比,该光敏剂由于分子共轭的增强而使得其双光子吸收截面出现两个数量级的提高。在 920 nm 飞秒激光的扫描辐照下,直径为 40  $\mu\text{m}$  左右的血管因双光子激发产生的 ROS 出现血栓效应而闭合,同时其周围的血管未受到任何损伤,如图 7(a)、(b)所示。这充分证明了 2P-PDT 的高度选择性和精准性。这项研究中所闭合的血管位于一个皮下窗口模型中,并未体现出双光子大穿透深度的优势。近年来,研究人员在一些小鼠耳朵血管模型中也实现了双光子光动力诱发的血管闭合,但这些血管依然是浅表层的血管<sup>[85]</sup>。2017 年,Gu 等<sup>[86]</sup>设计开发了一种以四苯基乙烯作为电子给体基团、以丙二腈作为电子受体基团的双光子光敏剂 TPEDC,其以苯环作为共轭  $\pi$  桥,实现了较好的 HOMO 和 LUMO 分离,其能带差  $\Delta E_{\text{ST}}$  可低至 0.23 eV。由于四苯基乙烯具有典型的 AIE 结构,因此 Gu 设计开发的 TPEDC 具有优异的 AIE 特性,在制备成纳米颗粒后可以高效率地产生单线态氧,同时其在 850 nm 处的双光子吸收截面高达 3500 GM。TPEDC 纳米颗粒注射入小鼠体内后,通过双光子成像可以重构出小鼠大脑 200  $\mu\text{m}$  深度处血管网络的三维结构。他们选择 100  $\mu\text{m}$  深度处直径为 5  $\mu\text{m}$  的血管进行双光子扫描,4 min 后,血管的荧光信号变弱,如图 7(d)所示,表明此处血管已经被闭合。而被另一种非光敏剂的 AIE 染料标记的血管在同样的激发条件下没有明显变化。这表明双光子激发可以对活体脑部微血管实现精准闭合,这种应用对于研究大脑尤其是制造局部缺血性中风模型非常有意义<sup>[87]</sup>。

#### 4.3 同时提高 ROS 产率和双光子吸收

在 2P-PDT 中,光敏剂的 ROS 产率和双光子吸收截面的大小是决定最终治疗效果的关键因素。虽然众多的具有高 ROS 产率的光敏剂在单光子激发下实现



the white line boxes in figures (c) and (d) indicate the laser irradiation areas

图 7 2P-PDT 实现血管闭合。注射了卟啉共轭二聚体的活体小鼠皮下血管经 920 nm 飞秒激光辐照之后的透射明场像和荧光成像图片<sup>[84]</sup>:(a)透射明场像;(b)荧光成像图片。注射了 TPEDC 纳米颗粒的小鼠脑部血管经 800 nm 飞秒激光辐照前后的双光子荧光成像图片<sup>[86]</sup>:(c)辐照前;(d)辐照后

Fig. 7 2P-PDT induced blood vessel closure. (a) Bright field and (b) fluorescence images of blood vessels in a skinfold window of a living mouse injected with conjugated porphyrin dimers after femtosecond laser excitation at 920 nm<sup>[84]</sup>: (a) bright field image; (b) fluorescence image. *In vivo* two-photon fluorescence images of mouse brain blood vessels labeled with TPEDC nanoparticles before and after femtosecond laser irradiation at 800 nm<sup>[86]</sup>: (c) before irradiation; (d) after irradiation

了高效的光动力治疗效果,但是当它们被应用到 2P-PDT 时,由于双光子吸收截面较小,很难有令人满意的光动力治疗效果。虽然通过 FRET 等技术可以辅助提高双光子吸收,但是对于光动力治疗来说,复合纳米体系往往制备程序比较复杂,稳定性较差,所含有的无机材料在生物安全方面也存在需要解决的问题。只使用单一的光敏剂分子来实现双光子激发下的高效 ROS 产率在临床应用转化方面具有更大优势。有机光敏剂具有精确的分子结构,合成制备过程可控,易于实现规模化生产,研究其体内代谢以及生物安全等也较复合纳米体系更容易。前面提到了通过分离有机分子的 HOMO 和 LUMO 来增强其光敏性会在一定程度上影响材料的双光子吸收。对于目前众多的有机光敏剂分子来说,在同一个分子中同时提升其 ROS 产率和增强双光子吸收非常困难<sup>[88]</sup>。共轭聚合物是一种具有  $\pi$  共轭骨架结构的大分子,较大的共轭结构使其具有较高的双光子吸收能力<sup>[89-90]</sup>。上述提到的卟啉共



轭二聚体光敏剂分子也是利用类似的原理来增强其双光子吸收的。此外,在聚合物光敏剂中,单重态和三重态之间的能级差逐渐接近(变得致密),这就使得系间窜越过程更加高效<sup>[91]</sup>。所以相对于与聚合物重复单元相似的小分子来说,共轭聚合物表现出了更加出色的 ROS 产率。基于这一原理,Wang 等<sup>[65]</sup>设计合成了基于 TPEDC 的共轭聚合物光敏剂 PTPEDC1,它具有

更大的双光子吸收截面和 ROS 产率。进一步,他们通过改变给体和受体的连接位点得到共轭聚合物光敏剂 PTPEDC2 进一步改善了聚合物的共轭强度,如图 8 所示。通过比较他们发现,小分子 TPEDC 和两个聚合物具有相似的吸收光谱和荧光发射光谱。Wang 等将高分子聚合物包覆成纳米颗粒并分散在水溶液中,通过 ABDA 降解法来表征其 ROS 产率;结果显示,与

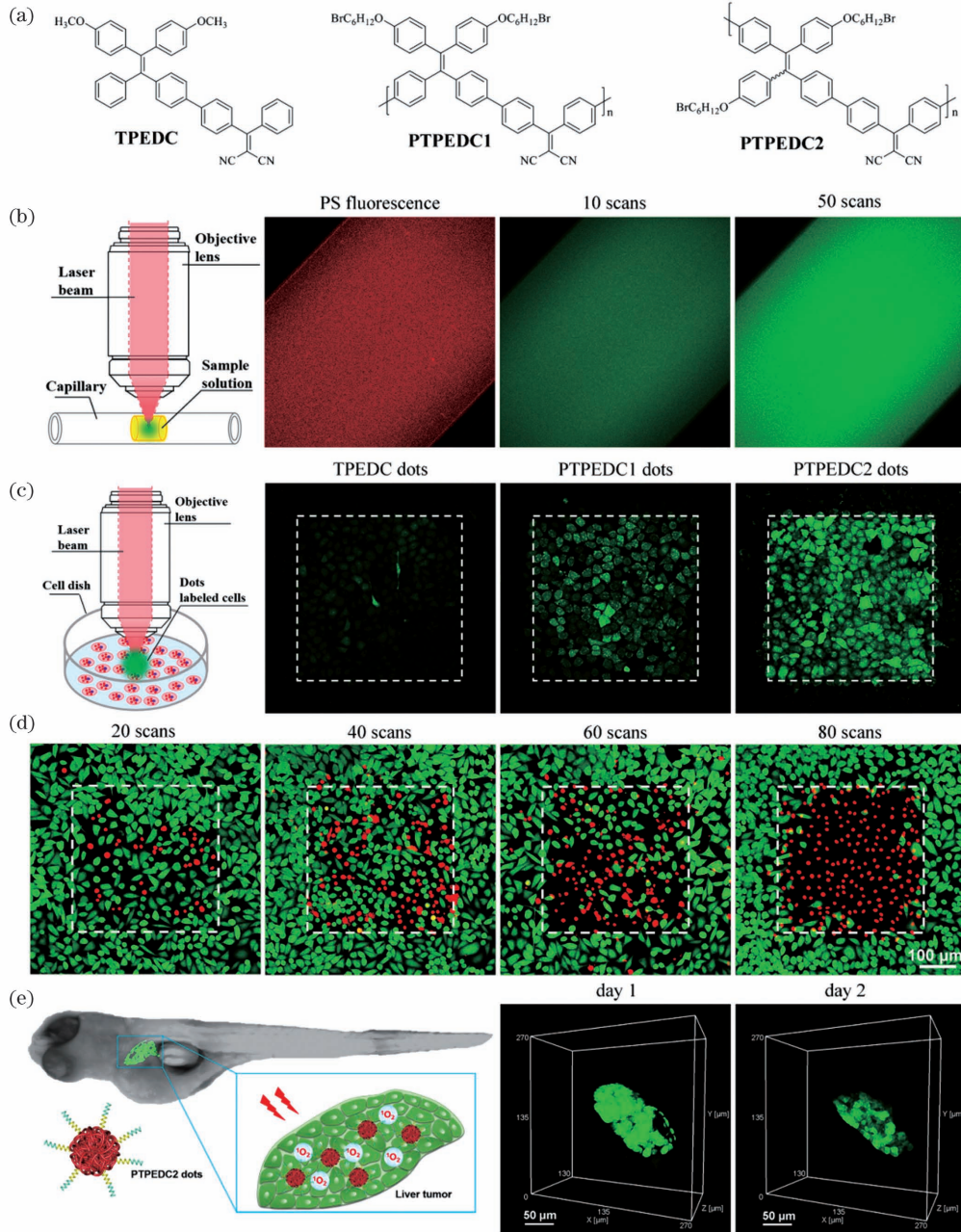


图 8 聚合增强双光子光敏性<sup>[65]</sup>。(a)小分子和共轭聚合物光敏剂的化学结构式;(b)水溶液中的光敏剂纳米颗粒在双光子激发下的单线态氧活体检测;(c)光敏剂纳米颗粒标记的 HeLa 细胞在双光子激发下的细胞内单线态氧检测;(d) PTPEDC2 纳米颗粒标记的 HeLa 细胞在接收不同激光扫描数之后的活体双光子光动力治疗效果,绿色为活细胞,红色为死细胞;(e) PTPEDC2 纳米颗粒靶向的斑马鱼肝肿瘤的活体双光子光动力治疗

Fig. 8 Polymerization-enhanced two-photon photosensitization<sup>[65]</sup>. (a) Chemical structures of small molecule and conjugated polymer photosensitizers; (b) *in vitro* <sup>1</sup>O<sub>2</sub> detection of photosensitizer dots in aqueous media under two-photon excitation; (c) intracellular <sup>1</sup>O<sub>2</sub> detection of photosensitizer dots-stained HeLa cells under two-photon excitation; (d) *in vitro* 2P-PDT on PTPEDC2 dots-stained HeLa cells under different laser scanning numbers, green represents live cells and red represents dead cells; (e) *in vivo* 2P-PDT on PTPEDC2 dots targeted zebrafish liver tumor

小分子光敏剂 TPEDC 相比, PTPEDC1 和 PTPEDC2 的 ROS 产率分别提升了 2.27 和 5.48 倍。Wang 等又采用双光子荧光法测试得到了它们的双光子吸收截面, 结果显示, TPEDC、PTPEDC1 和 PTPEDC2 的双光子吸收截面分别  $1.13 \times 10^5$ 、 $3.56 \times 10^5$ 、 $7.36 \times 10^5$  GM。由此可见, 共轭聚合物光敏剂的双光子吸收能力得到了明显提升。在这项工作中, Wang 等设计了利用毛细玻璃管和双光子荧光显微镜来实时在体检测水溶液中的纳米颗粒光敏剂在双光子激发下实现 ROS 产生的技术方案(3.4 节提到的方法)。在同等条件下, 与小分子 TPEDC 以及 Ce6 相比, PTPEDC2 表现出了更优异的双光子光敏性能。在 PTPEDC2 纳米颗粒表面修饰靶向多肽, 可以使其高效地被特异肿瘤细胞摄取, 通过双光子显微成像系统的精准控制, 可以对特定细胞区域进行飞秒激光扫描, 之后通过双光子荧光成像即可对细胞的活死状态(采用细胞活死染料染色)进行表征。PTPEDC2 纳米颗粒被注射入具有肝脏肿瘤模型的斑马鱼体内后, 利用双光子荧光成像对进入肿瘤的纳米颗粒进行高分辨检测; 当光敏剂富集达到最高状态时, 实施双光子激光辐照, PTPEDC2 表现出来的优异的肿瘤细胞杀灭能力使得肿瘤体积减小。这项研究工作为设计高效的双光子光敏剂提供了新思路, 同时为从水溶液到细胞再到活体对双光子光敏性进行表征提供了可行方案, 对于研究双光子光动力治疗具有重要的参考价值。

#### 4.4 近红外二区激发 2P-PDT

目前, 2P-PDT 主要利用近红外一区光(NIR-I, 700~950 nm)来激发在短波长吸收的光敏剂<sup>[7,24,33]</sup>。近些年来, 近红外二区光(NIR-II, 1000~1700 nm)已经展现出比近红外一区光更好的组织穿透能力<sup>[25]</sup>。近红外二区光在生物组织中的散射更小<sup>[92]</sup>, 如图 9(a)所示, 在组织中传输时的损耗更小<sup>[92]</sup>, 如图 9(b)所示, 所以到达深处组织的光能量更多, 非常有利于激发荧光和光动力。目前, 近红外二区光是国际上的研究热点, 利用染料的荧光发射可以在近红外二区获得更大深度和更高信噪比的成像<sup>[93]</sup>。但是这种荧光发射在近红外二区的成像从原理上来讲属于单光子荧光成像, 依然避免不了离焦区域的荧光信号的干扰<sup>[94-95]</sup>。而对于双光子激发来说, 近红外二区作为激发光源, 可以进一步提升双光子成像的深度和信噪比<sup>[73,78,96-98]</sup>, 不用担心离焦干扰信号。如果充分利用近红外二区光的穿透优势来激活光敏剂, 就可以进一步改善深层组织肿瘤的光动力治疗效果。能够被近红外二区的光进行双光子激发的光敏剂需要在长波段(500 nm 以上)具有较强的吸收, 但是目前高效率的光敏剂在长波段的吸收相对较弱。在将光敏剂的吸收波段进行红移的同时又保证其具有高效的 ROS 产生能力非常具有挑战性, 这也是目前关于近红外二区光激发的双光子光动力治疗的报道普遍较少的原因。Wang 等<sup>[92]</sup>通过对

分子进行精准调控设计, 利用具有低带隙的基团 TQ 作为强电子受体, 同时结合两个 TPE 基团作为弱电子给体, 得到了光敏剂 TQ-BTPE。这种结构不仅实现了吸收波段的红移, 同时在一定程度上保证了光敏剂的 ROS 产率, 而且分子内的强电子转移也有助于增强双光子的吸收能力。TQ-BTPE 在长波波段(550~600 nm)具有较强的吸收, 并且在近红外二区(1200 nm)也具有较高的双光子吸收。在近红外二区光激发下, TQ-BTPE 的双光子光敏效率是目前广泛使用的商业光敏剂 Chlorin e6 的 7 倍。TQ-BTPE 在近红外一区的双光子吸收截面要大于在近红外二区的双光子吸收截面, 当水溶液中的 TQ-BTPE 分子分别被近红外一区光和近红外二区光激发时, 很明显, 近红外一区光激发产生的 ROS 更多, 如图 9(d)所示。但是当在样品表面放置一块猪肉组织后, 结果正好反转。这说明近红外二区光可以更好地穿透组织进而激发 ROS 产生。由于 TQ-BTPE 含有两个 TPE 基团, 也具有 AIE 特性, 因此在分散的分子态下的 ROS 产生能力较弱, 而在聚集态时 ROS 的产生能力会显著增强。TQ-BTPE 分子被癌细胞摄取之后主要以纳米聚集体的形式分布在溶酶体中, 在近红外二区光辐照下, 细胞内会产生大量的 ROS, 如图 9(e)所示, 最终这些 ROS 实现了高效率的癌细胞杀灭效应。与此同时, Wang 等通过模拟生物组织比较了近红外一区光和近红外二区光的细胞内双光子光敏效率[如图 9(f)所示]以及 2P-PDT 诱导的细胞杀灭效果[如图 9(g)所示], 证明了近红外二区光更深的组织穿透能力以及更好的双光子光动力治疗效果。这项研究为开发近红外光可激发的高效光敏剂提供了新途径, 为光动力治疗领域研究人员开发可被近红外二区光激活的光敏剂以实现深层组织处肿瘤的高效光动力治疗提供了新思路。

#### 4.5 实体肿瘤治疗

在双光子光动力治疗中, 双光子激发的作用截面较小, 产生 ROS 的效率和范围相比单光子激发要小很多, 所以大部分评价双光子光动力治疗肿瘤效果的研究都是在离体培养的细胞层面进行的。即: 将飞秒脉冲光源通过物镜聚焦到生长在培养皿中的癌细胞上, 采用类似于成像的方式对二维细胞面进行激光辐照, 然后通过细胞活死染色的结果来评价光动力对癌细胞的杀灭效果。为了进一步突显双光子光动力在深穿透治疗中的作用, 研究人员相继开发了癌细胞球模型来模仿实体肿瘤。癌细胞球的尺寸一般在数百微米, 通过抑制癌细胞的贴壁生长使其在培养液中聚集生长, 形成球状的肿瘤微环境。由于癌细胞球尺寸增大, 紫外-可见光和近红外光不同的穿透能力就可以在这样的模型中体现出来。Dobos 等<sup>[99]</sup>开发了一种骨肉瘤的三维细胞球模型, 用它来筛选高效的双光子光敏剂分子, 如图 10(a)所示。在光束聚焦过程中, 使用  $10 \times$

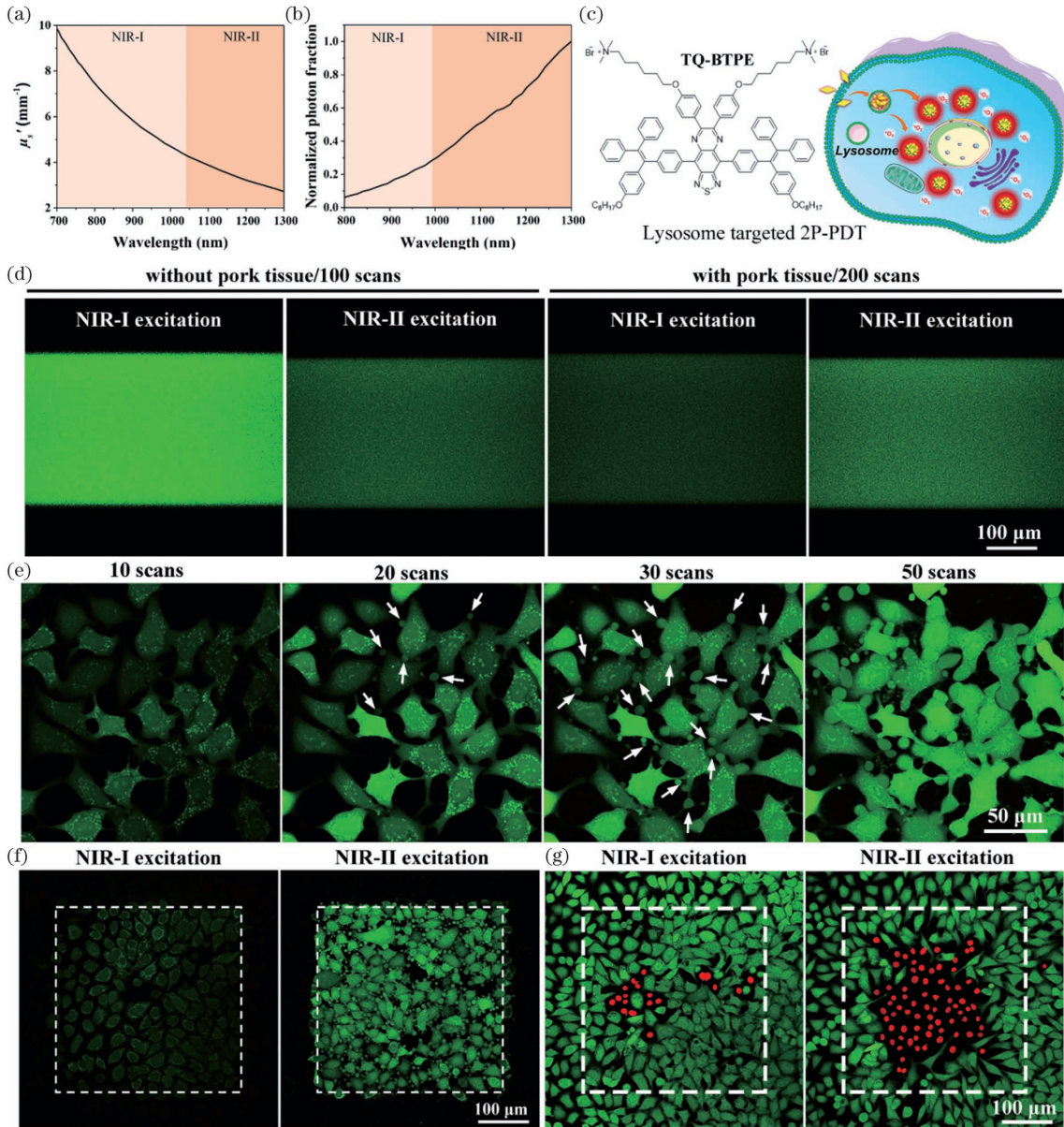


图 9 近红外二区激发 2P-PDT<sup>[92]</sup>。(a)700~1300 nm 波段脑组织的散射系数;(b)归一化后的不同波长光穿过 1 mm 厚脑组织后的剩余能量;(c)TQ-BTPE 实现溶酶体靶向的近红外二区激发的双光子光动力治疗;(d)水溶液中的 TQ-BTPE 在近红外一区和近红外二区光激发下的 ROS 产生比较;(e)近红外二区激发下 TQ-BTPE 靶向 HeLa 细胞内的 ROS 产生;(f)近红外一区 and 近红外二区光激发下的细胞内 ROS 产生;(g)近红外一区 and 近红外二区光激发下的双光子光动力诱导的细胞杀灭效率比较

Fig. 9 NIR-II excited 2P-PDT<sup>[92]</sup>. (a) Scattering coefficient of brain tissue as a function of wavelength in 700–1300 nm; (b) normalized photo fraction of light after passing through a brain tissue with thickness of 1 mm; (c) photosensitizer TQ-BTPE for lysosome targeted and NIR-II excited 2P-PDT; (d) comparison of NIR-I and NIR-II excited ROS generation of TQ-BTPE in aqueous media; (e) intracellular ROS generation of TQ-BTPE targeted HeLa cells under NIR-II excitation; (f) comparison of NIR-I and NIR-II excited intracellular ROS generation; (g) comparison of NIR-I and NIR-II excited 2P-PDT induced ablation of TQ-BTPE labeled cells

镜头 ( $NA = 0.3$ ) 得到的体像素为几十立方微米的聚焦点, 适用于高精度治疗; 而使用  $2.5\times$  镜头 ( $NA = 0.085$ ) 得到的体像素为几千立方微米, 适用于高通量的光动力治疗。在对细胞球进行激光辐照时, 所使用的峰值功率密度为  $700 \text{ GW/cm}^2$ 。但这种模型与常见的皮下实体肿瘤相比体积还是比较小。近些年逐渐出现了采用 2P-PDT 成功地消融皮下实体肿瘤的报

道。Karges 等<sup>[100]</sup>设计了一种基于钌和聚吡啶复合物的光敏剂, 并在二维单层细胞、三维细胞球以及皮下肿瘤模型中验证了它的 2P-PDT 效果。Karges 等在将光敏剂注射入小鼠体内 1 h 后, 采用 800 nm 光 ( $50 \text{ mW}$ ,  $1 \text{ kHz}$ , 脉宽  $35 \text{ fs}$ ,  $5 \text{ s/mm}$ ) 对体积为  $80 \text{ mm}^3$  的皮下肿瘤进行光动力治疗, 结果显示, 800 nm 光对肿瘤生长的抑制效果很好, 甚至要好于

500 nm 光 (60 min,  $10.0 \text{ mW/cm}^2$ ,  $36 \text{ J/cm}^2$ ) 辐照的单光子光动力治疗效果。但是这项工作中并未说明飞秒脉冲激光在实体肿瘤辐照中的详细实验参数和装置。Zhou 等<sup>[101]</sup>将钌和聚吡啶复合物与基于铂的超分子配位复合物结合起来,构建了 Ru-Pt 金属错合物双光子光敏剂。在钌聚吡啶稳定性的基础上,金属错合物表现出了红移的荧光发射、更大的双光子吸收和更高的单线态活性氧产率。Zhou 等在活体双光子皮下实体肿瘤的治疗中使用的是半导体激光器 (800 nm, 50 mW, 20 s/mm)。Sun 等<sup>[102]</sup>报道了一种可以被激活的乙缩醛封端的二苯乙烯衍生物双光子光敏剂 (Ace-DSB), 其被激活之后会形成 Ald-DSB, 双光子吸收截面得到极大提高 (从 93 GM 提高到 2421 GM)。Sun 等在活体 2P-PDT 治疗中选用的是皮下黑色素瘤模型, 光源 (760 nm, 120 fs, 1000 Hz,  $80 \text{ mW/cm}^2$ ) 持续辐照 15 d 之后, 对肿瘤生长的抑制效果与对照组相比更好, 如图 10(b) 所示。这项工作中选用的黑色素

瘤本身对光有较强的吸收, 但是在活体光动力治疗中并未在对照组中排除激光辐照所产生的光热效应对肿瘤生长的抑制。He 等<sup>[103]</sup>开发设计了一种可靶向线粒体的双光子光敏剂分子 DPASP。在活体双光子皮下实体肿瘤的光动力治疗中, He 等利用  $5\times$  镜头聚焦光束 (960 nm,  $1.5 \text{ W/cm}^2$ , 30 min), 采用从表面开始沿肿瘤垂直方向进行步进的方式对整个肿瘤进行离体辐照。这种方式相比其他直接采用类似于单光子光动力中直接对肿瘤进行辐照的方式更能最大程度地“照亮”整个实体肿瘤, 如图 10(c) 所示。通过比较分析各种已经报道的 2P-PDT 在活体实体皮下肿瘤模型中的应用不难发现, 目前实际的光学装置系统以及具体的操作流程和光学辐照参数等存在很大差异, 许多关键参数在一些报道中并没有提及或者详细描述。2P-PDT 在应用上还未形成一个较为统一的方案, 这也是该技术实现活体应用亟待解决的问题。

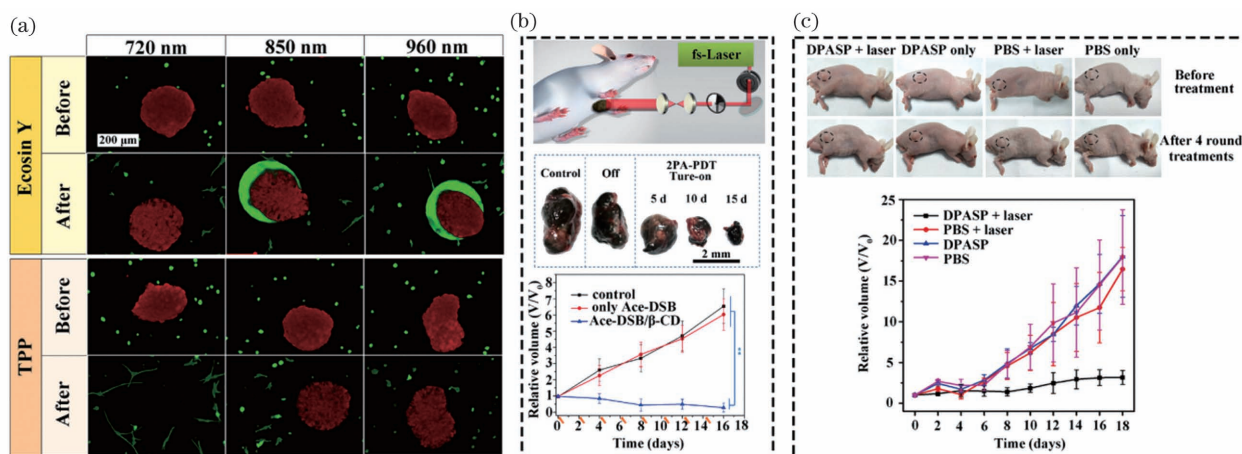


图 10 实体肿瘤的 2P-PDT。(a) 三维肿瘤细胞球模型<sup>[99]</sup>; (b) 可被激活的 Ace-DSB 光敏剂实现 2P-PDT<sup>[102]</sup>; (c) 立体 2P-PDT<sup>[103]</sup>

Fig. 10 2P-PDT for solid tumors. (a) Three-dimensional tumor spheroids model<sup>[99]</sup>; (b) activable photosensitizer Ace-DSB for 2P-PDT<sup>[102]</sup>; (c) stereotactic 2P-PDT<sup>[103]</sup>

## 5 结束语

近些年来,随着纳米技术和先进光子技术的发展与进步,2P-PDT 得到了蓬勃发展。本文通过介绍光动力治疗过程面临的一些问题来引入研究 2P-PDT 的原因,接着简要介绍了单光子和双光子的区别,以及双光子激发光动力的基本机理。随后在第三部分重点介绍了目前双光子光敏剂的设计和开发,从提高 ROS 产率、增强双光子吸收以及如何表征双光子激发下的 ROS 效率等三个方面展开,分析了如何实现高效率的 2P-PDT。在第四部分,本文以目前最新颖的聚集诱导发光光敏剂为代表,从几个 2P-PDT 应用领域的重点方向分析和讨论了近些年的研究进展。光动力治疗是非常有前景的实现低侵入性光介导的肿瘤治疗技术,围绕实现它的三个关键因素(光敏剂、光源和分子氧),以及在最终走向临床应用前所面临的各种问题,包括

ROS 产率、肿瘤缺氧、穿透深度、体内递送效率、特异靶向性、可激活响应、暗毒性等,人们开展了大量研究。本文重点从解决光动力治疗面临的穿透深度以及精准激活出发,介绍了双光子光动力治疗带来的优势。近红外光使得更深层处的肿瘤和病灶得以实现 ROS 激活,同时基于非线性效应的双光子吸收使得光动力激活在三维空间内更加精准。随着双光子荧光成像技术向大深度活体成像不断发展,2P-PDT 也获得了更快的发展和成长,各种高性能的双光子光敏剂被开发出来,特异性、靶向性和功能性也在不断地被附加到双光子光动力治疗体系中。

虽然 2P-PDT 利用非线性效应大大提高了双光子光动力激活的空间分辨率,但不可否认的是,与单光子光动力激活相比,非线性的双光子激发效率太低。最为直接的影响就是难以实现与单光子同样的 ROS 产率,从而最终影响肿瘤的杀灭。在实体肿瘤治疗中,这

种影响尤为重要。根据双光子激发 ROS 产生的基本原理,只有高度聚焦的飞秒脉冲才能高效地激发出 ROS。虽然目前有一些研究已经实现双光子激发下皮下实体大块肿瘤的消融,但值得思考的是,直接利用展宽的飞秒光束对肿瘤进行辐照,其中的双光子激发效率问题如何考察?还是应从双光子的基本原理出发,充分利用 2P-PDT 的优势——活体穿透深和高分辨激活,在基础研究中大展身手,比如用它来实现小鼠脑内微小区域中风模型的建立(通过血管闭合)、细胞器中 ROS 的精准激活、小鼠活体内组织细胞的选择性杀灭等。

如果要进一步提升双光子光动力治疗的深度,势必需要向近红外二区(1000~1700 nm)拓展。在双光子或者三光子的荧光成像上,近红外二区已经展现了它的优势。但是限制近红外二区光在光动力治疗中的最关键因素还是光敏剂。如果用 1700 nm 的光源去激发现有光敏剂,大部分光敏剂会以三光子吸收形式被激发(由光敏剂的吸收光谱决定),三光子吸收的效率相比双光子吸收要低一个数量级,这势必会导致很难实现高效的非线性激发。如果利用 1200~1300 nm 波段,那么目前很多吸收峰在 600 nm 左右的光敏剂有可能实现双光子激发,这将是一个比较好的突破口。

在科研人员的不断努力下,目前光敏剂的 ROS 产率已经非常高了,接下来需要重点考虑的将是如何提高双光子吸收。前面本文也提到,在同一个分子内,ROS 过程和双光子吸收过程是相悖的。提高双光子吸收的方法会导致光敏剂的 ROS 产率降低,这就需要采用新的方法去解决这个难题。比如前文提到的聚合增强双光子光敏性的方法,就提供了一个全新的思路。

双光子荧光成像由于具有天生的三维层析能力以及深穿透能力,在活体生物组织成像上广受欢迎。在双光子光动力中,光敏剂在产生 ROS 的同时也会发射荧光,这样就可以实现双光子成像引导的光动力治疗。从 ROS 的产生机理可以看到,ROS 和荧光也是一种竞争关系,总的光能量是一定的,它们之间必定是此消彼长的。在具体的实际应用中,如果能够对激发态能量进行动态调控,或者根据生物环境实现响应性的分子结构和功能变化,那对于实现高分辨成像引导下的高效精准光动力治疗将更为有利。

### 参 考 文 献

- [1] Yun S H, Kwok S J J. Light in diagnosis, therapy and surgery [J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2017, 1: 8.
- [2] Lucky S S, Soo K C, Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy [J]. *Chemical Reviews*, 2015, 115(4): 1990-2042.
- [3] 张昌, 任恩, 庞鑫, 等. 光动力抗菌纳米制剂研究进展 [J]. *中国激光*, 2020, 47(2): 0207012.  
Zhang C, Ren E, Pang X, et al. Recent advances in nanophotosensitizers for antibacterial photodynamic therapy [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2020, 47(2): 0207012.
- [4] 李文博, 沈毅, 李步洪. 光学成像技术在光动力剂量监测中的应用进展 [J]. *中国激光*, 2020, 47(2): 0207006.  
Li W B, Shen Y, Li B H. Advances in optical imaging for monitoring photodynamic therapy dosimetry [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2020, 47(2): 0207006.
- [5] Zhou Z J, Song J B, Nie L M, et al. Reactive oxygen species generating systems meeting challenges of photodynamic cancer therapy [J]. *Chemical Society Reviews*, 2016, 45(23): 6597-6626.
- [6] Hu F, Xu S D, Liu B. Photosensitizers with aggregation-induced emission: materials and biomedical applications [J]. *Advanced Materials*, 2018, 30(45): e1801350.
- [7] Sun Z Y, Zhang L P, Wu F P, et al. Photosensitizers for two-photon excited photodynamic therapy [J]. *Advanced Functional Materials*, 2017, 27(48): 1704079.
- [8] Qian C G, Yu J C, Chen Y L, et al. Light-activated hypoxia-responsive nanocarriers for enhanced anticancer therapy [J]. *Advanced Materials*, 2016, 28(17): 3313-3320.
- [9] Du J J, Shi T C, Long S R, et al. Enhanced photodynamic therapy for overcoming tumor hypoxia: from microenvironment regulation to photosensitizer innovation [J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2021, 427: 213604.
- [10] Berg K, Selbo P K, Weyergang A, et al. Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications [J]. *Journal of Microscopy*, 2005, 218(2): 133-147.
- [11] Baskaran R, Lee J, Yang S G. Clinical development of photodynamic agents and therapeutic applications [J]. *Biomaterials Research*, 2018, 22: 25.
- [12] dos Santos A F, de Almeida D R Q, Terra L F, et al. Photodynamic therapy in cancer treatment—an update review [J]. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, 2019, 5: 25.
- [13] Tardivo J P, del Giglio A, de Oliveira C S, et al. Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications [J]. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2005, 2(3): 175-191.
- [14] Sheng Z H, Hu D H, Xue M M, et al. Indocyanine green nanoparticles for theranostic applications [J]. *Nano-Micro Letters*, 2013, 5(3): 145-150.
- [15] Wang H L, Li X X, Tse B W C, et al. Indocyanine green-incorporating nanoparticles for cancer theranostics [J]. *Theranostics*, 2018, 8(5): 1227-1242.
- [16] Bhandari C, Guirguis M, Savan N A, et al. What NIR photodynamic activation offers molecular targeted nanomedicines: perspectives into the conundrum of tumor specificity and selectivity [J]. *Nano Today*, 2021, 36: 101052.
- [17] Brown S. Two photons are better than one [J]. *Nature Photonics*, 2008, 2(7): 394-395.
- [18] Helmchen F, Denk W. Deep tissue two-photon microscopy [J]. *Nature Methods*, 2005, 2(12): 932-940.
- [19] 张荣丽, 李慧, 吴岳恒, 等. 利用光谱和时间分辨的多光子显微技术识别人体冠状动脉粥样硬化斑块 [J]. *中国激光*, 2020, 47(2): 0207025.  
Zhang R L, Li H, Wu Y H, et al. Identification of human coronary atherosclerotic plaques using spectrum- and time-resolved multiphoton microscopy [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2020, 47(2): 0207025.
- [20] Robbins E, Leroy-Lhez S, Villandier N, et al. Prospects for more efficient multi-photon absorption photosensitizers exhibiting both reactive oxygen species generation and luminescence [J]. *Molecules*, 2021, 26(20): 6323.
- [21] Zhao J Z, Wu W H, Sun J F, et al. Triplet photosensitizers: from molecular design to applications [J]. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42(12): 5323-5351.
- [22] Pawlicki M, Collins H A, Denning R G, et al. Two-photon absorption and the design of two-photon dyes [J]. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 2009, 48(18): 3244-3266.
- [23] Nwaneshiudu A, Kuschal C, Sakamoto F H, et al. Introduction to confocal microscopy [J]. *The Journal of Investigative*

- Dermatology, 2012, 132(12): e3.
- [24] Bolze F, Jenni S, Sour A, et al. Molecular photosensitisers for two-photon photodynamic therapy [J]. Chemical Communications, 2017, 53(96): 12857-12877.
- [25] Hong G, Antaris A L, Dai H. Near-infrared fluorophores for biomedical imaging[J]. Nature Biomedical Engineering, 2017, 1: 10.
- [26] Lenz P. *In vivo* excitation of photosensitizers by infrared light [J]. Photochemistry and Photobiology, 1995, 62(2): 333-338.
- [27] Karotki A, Khurana M, Lepock J R, et al. Simultaneous two-photon excitation of photofrin in relation to photodynamic therapy[J]. Photochemistry and Photobiology, 2006, 82(2): 443-452.
- [28] Secret E, Maynadier M, Gallud A, et al. Two-photon excitation of porphyrin-functionalized porous silicon nanoparticles for photodynamic therapy[J]. Advanced Materials, 2014, 26(45): 7643-7648.
- [29] Beck T J, Burkanas M, Bagdonas S, et al. Two-photon photodynamic therapy of C6 cells by means of 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B, 2007, 87(3): 174-182.
- [30] Chen R, Huang Z F, Chen G N, et al. Kinetics and subcellular localization of 5-ALA-induced PpIX in DHL cells via two-photon excitation fluorescence microscopy [J]. International Journal of Oncology, 2008, 32(4): 861-867.
- [31] Sengul O, Marazzi M, Monari A, et al. Photophysical properties of novel two-photon absorbing dyes: assessing their possible use for singlet oxygen generation [J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2018, 122(28): 16315-16324.
- [32] Wang J, Zhuo X L, Xiao X, et al. ALPcS-loaded gold nanobipyramids with high two-photon efficiency for photodynamic therapy *in vivo* [J]. Nanoscale, 2019, 11(7): 3386-3395.
- [33] Shen Y Z, Shuhendler A J, Ye D J, et al. Two-photon excitation nanoparticles for photodynamic therapy [J]. Chemical Society Reviews, 2016, 45(24): 6725-6741.
- [34] Huang Y, Qiu F, Chen R J, et al. Fluorescence resonance energy transfer-based drug delivery systems for enhanced photodynamic therapy [J]. Journal of Materials Chemistry B, 2020, 8(17): 3772-3788.
- [35] Wang J, Zhang Z H, Zha S, et al. Carbon nanodots featuring efficient FRET for two-photon photodynamic cancer therapy with a low fs laser power density [J]. Biomaterials, 2014, 35(34): 9372-9381.
- [36] Huang Y, Qiu F, Shen L Y, et al. Combining two-photon-activated fluorescence resonance energy transfer and near-infrared photothermal effect of unimolecular micelles for enhanced photodynamic therapy [J]. ACS Nano, 2016, 10(11): 10489-10499.
- [37] Yang Y, Liu H L, Han M J, et al. Multilayer microcapsules for FRET analysis and two-photon-activated photodynamic therapy [J]. Angewandte Chemie (International Ed. in English), 2016, 55(43): 13538-13543.
- [38] Cao H Q, Wang L, Yang Y, et al. An assembled nano complex for improving both therapeutic efficiency and treatment depth in photodynamic therapy [J]. Angewandte Chemie (International Ed. in English), 2018, 57(26): 7759-7763.
- [39] Sun J H, Xin Q, Yang Y, et al. Nitrogen-doped graphene quantum dots coupled with photosensitizers for one-/ two-photon activated photodynamic therapy based on a FRET mechanism [J]. Chemical Communications, 2018, 54(7): 715-718.
- [40] Abrahamse H, Hamblin M R. New photosensitizers for photodynamic therapy [J]. The Biochemical Journal, 2016, 473(4): 347-364.
- [41] McKenzie L K, Bryant H E, Weinstein J A. Transition metal complexes as photosensitisers in one- and two-photon photodynamic therapy [J]. Coordination Chemistry Reviews, 2019, 379: 2-29.
- [42] Gandioso A, Purkait K, Gasser G. Recent approaches towards the development of Ru(II) polypyridyl complexes for anticancer photodynamic therapy [J]. Chimia, 2021, 75(10): 845-855.
- [43] Zhang L P, Ding D. Recent advances of transition Ir (III) complexes as photosensitizers for improved photodynamic therapy [J]. VIEW, 2021, 2(6): 20200179.
- [44] Marian C M. Spin-orbit coupling and intersystem crossing in molecules [J]. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science, 2012, 2(2): 187-203.
- [45] Wainwright M. Non-porphyrin photosensitizers in biomedicine [J]. Chemical Society Reviews, 1996, 25(5): 351-359.
- [46] Kamkaew A, Lim S H, Lee H B, et al. BODIPY dyes in photodynamic therapy [J]. Chemical Society Reviews, 2013, 42(1): 77-88.
- [47] Zhang X, Wang Z J, Hou Y Q, et al. Recent development of heavy-atom-free triplet photosensitizers: molecular structure design, photophysics and application [J]. Journal of Materials Chemistry C, 2021, 9(36): 11944-11973.
- [48] Nguyen V N, Kumar A, Lee M H, et al. Recent advances in biomedical applications of organic fluorescence materials with reduced singlet-triplet energy gaps [J]. Coordination Chemistry Reviews, 2020, 425: 213545.
- [49] Xu S D, Yuan Y Y, Cai X L, et al. Tuning the singlet-triplet energy gap: a unique approach to efficient photosensitizers with aggregation-induced emission (AIE) characteristics [J]. Chemical Science, 2015, 6(10): 5824-5830.
- [50] Yang Z M, Zhang Z J, Sun Y Q, et al. Incorporating spin-orbit coupling promoted functional group into an enhanced electron D-A system: a useful designing concept for fabricating efficient photosensitizer and imaging-guided photodynamic therapy [J]. Biomaterials, 2021, 275: 120934.
- [51] Nguyen V N, Qi S J, Kim S, et al. An emerging molecular design approach to heavy-atom-free photosensitizers for enhanced photodynamic therapy under hypoxia [J]. Journal of the American Chemical Society, 2019, 141(41): 16243-16248.
- [52] Fowley C, Nomikou N, McHale A P, et al. Extending the tissue penetration capability of conventional photosensitizers: a carbon quantum dot-protoporphyrin IX conjugate for use in two-photon excited photodynamic therapy [J]. Chemical Communications, 2013, 49(79): 8934-8936.
- [53] Zhao T T, Yu K, Li L, et al. Gold nanorod enhanced two-photon excitation fluorescence of photosensitizers for two-photon imaging and photodynamic therapy [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2014, 6(4): 2700-2708.
- [54] He G S, Tan L S, Zheng Q D, et al. Multiphoton absorbing materials: molecular designs, characterizations, and applications [J]. Chemical Reviews, 2008, 108(4): 1245-1330.
- [55] Albota M, Beljonne D, Brédas J L, et al. Design of organic molecules with large two-photon absorption cross sections [J]. Science, 1998, 281(5383): 1653-1656.
- [56] Zhang Q, Tian X H, Zhou H P, et al. Lighting the way to see inside two-photon absorption materials: structure-property relationship and biological imaging [J]. Materials, 2017, 10(3): 223.
- [57] Schafer K J, Belfield K D, Yao S, et al. Fluorene-based fluorescent probes with high two-photon action cross-sections for biological multiphoton imaging applications [J]. Journal of Biomedical Optics, 2005, 10(5): 051402.
- [58] Andrade C D, Yanez C O, Rodriguez L, et al. A series of fluorene-based two-photon absorbing molecules: synthesis, linear and nonlinear characterization, and bioimaging [J]. The Journal of Organic Chemistry, 2010, 75(12): 3975-3982.
- [59] Pond S J K, Rumi M, Levin M D, et al. One- and two-photon spectroscopy of donor-acceptor-donor distyrylbenzene derivatives: effect of cyano substitution and distortion from planarity [J]. The Journal of Physical Chemistry A, 2002, 106(47): 11470-11480.

- [60] Xu L, Lin W J, Huang B B, et al. The design strategies and applications for organic multi-branched two-photon absorption chromophores with novel cores and branches: a recent review [J]. *Journal of Materials Chemistry C*, 2021, 9(5): 1520-1536.
- [61] Wang H, Zhang Q, Zhang J, et al. Synthesis, two-photon absorption properties and bioimaging applications of mono-, di- and hexa-branched pyrimidine derivatives [J]. *Dyes and Pigments*, 2014, 102: 263-272.
- [62] Nosaka Y, Nosaka A Y. Generation and detection of reactive oxygen species in photocatalysis [J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(17): 11302-11336.
- [63] Wu H Y, Song Q J, Ran G X, et al. Recent developments in the detection of singlet oxygen with molecular spectroscopic methods [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2011, 30(1): 133-141.
- [64] Entradas T, Waldron S, Volk M. The detection sensitivity of commonly used singlet oxygen probes in aqueous environments [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 2020, 204: 111787.
- [65] Wang S W, Wu W B, Manghni P, et al. Polymerization-enhanced two-photon photosensitization for precise photodynamic therapy [J]. *ACS Nano*, 2019, 13(3): 3095-3105.
- [66] Singh S, Aggarwal A, Bhupathiraju N V S D K, et al. Glycosylated porphyrins, phthalocyanines, and other porphyrinoids for diagnostics and therapeutics [J]. *Chemical Reviews*, 2015, 115(18): 10261-10306.
- [67] Mei J, Leung N L C, Kwok R T K, et al. Aggregation-induced emission: together we shine, united we soar! [J]. *Chemical Reviews*, 2015, 115(21): 11718-11940.
- [68] Hu F, Huang Y Y, Zhang G X, et al. Targeted bioimaging and photodynamic therapy of cancer cells with an activatable red fluorescent bioprobe [J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86(15): 7987-7995.
- [69] Yuan Y Y, Feng G X, Qin W, et al. Targeted and image-guided photodynamic cancer therapy based on organic nanoparticles with aggregation-induced emission characteristics [J]. *Chemical Communications*, 2014, 50(63): 8757-8760.
- [70] Luo J, Xie Z, Lam J W, et al. Aggregation-induced emission of 1-methyl-1, 2, 3, 4, 5-pentaphenylsilole [J]. *Chemical Communications*, 2001(18): 1740-1741.
- [71] Feng G X, Liu B. Aggregation-induced emission (AIE) dots: emerging theranostic nanolights [J]. *Accounts of Chemical Research*, 2018, 51(6): 1404-1414.
- [72] Dou Y D, Zhu Q, Du K. Recent advances in two-photon AIEgens and their application in biological systems [J]. *ChemBiochem: a European Journal of Chemical Biology*, 2021, 22(11): 1871-1883.
- [73] Wang S W, Liu J, Goh C C, et al. NIR-II-excited intravital two-photon microscopy distinguishes deep cerebral and tumor vasculatures with an ultrabright NIR-I AIE luminogen [J]. *Advanced Materials*, 2019, 31(44): e1904447.
- [74] Wang S W, Hu F, Pan Y T, et al. Bright AIEgen-protein hybrid nanocomposite for deep and high-resolution *in vivo* two-photon brain imaging [J]. *Advanced Functional Materials*, 2019, 29(29): 1902717.
- [75] Wang Y, Han X, Xi W, et al. Bright AIE nanoparticles with F127 encapsulation for deep-tissue three-photon intravital brain angiography [J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2017, 6(21): 1700685.
- [76] Wang Y L, Chen M, Alifu N, et al. Aggregation-induced emission luminogen with deep-red emission for through-skull three-photon fluorescence imaging of mouse [J]. *ACS Nano*, 2017, 11(10): 10452-10461.
- [77] Wang Y L, Hu R R, Xi W, et al. Red emissive AIE nanodots with high two-photon absorption efficiency at 1040 nm for deep-tissue *in vivo* imaging [J]. *Biomedical Optics Express*, 2015, 6(10): 3783-3794.
- [78] Wang S W, Li X Q, Chong S Y, et al. *In vivo* three-photon imaging of lipids using ultrabright fluorogens with aggregation-induced emission [J]. *Advanced Materials*, 2021, 33(11): e2007490.
- [79] Samanta S, Huang M N, Li S Q, et al. AIE-active two-photon fluorescent nanoprobe with NIR-II light excitability for highly efficient deep brain vasculature imaging [J]. *Theranostics*, 2021, 11(5): 2137-2148.
- [80] Zheng Z, Zhang T F, Liu H X, et al. Bright near-infrared aggregation-induced emission luminogens with strong two-photon absorption, excellent organelle specificity, and efficient photodynamic therapy potential [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(8): 8145-8159.
- [81] Zhen S J, Wang S W, Li S W, et al. Theranostics: efficient red/near-infrared fluorophores based on benzo[1, 2-b: 4, 5-b'] dithiophene 1, 1, 5, 5-tetraoxide for targeted photodynamic therapy and *in vivo* two-photon fluorescence bioimaging [J]. *Advanced Functional Materials*, 2018, 28(13): 1870087.
- [82] Qin W, Zhang P F, Li H, et al. Ultrabright red AIEgens for two-photon vascular imaging with high resolution and deep penetration [J]. *Chemical Science*, 2018, 9(10): 2705-2710.
- [83] Qi J, Sun C W, Li D Y, et al. Aggregation-induced emission luminogen with near-infrared-II excitation and near-infrared-I emission for ultradeep intravital two-photon microscopy [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(8): 7936-7945.
- [84] Collins H A, Khurana M, Moriyama E H, et al. Blood-vessel closure using photosensitizers engineered for two-photon excitation [J]. *Nature Photonics*, 2008, 2(7): 420-424.
- [85] Cao H Q, Yang Y, Qi Y F, et al. Intraparticle FRET for enhanced efficiency of two-photon activated photodynamic therapy [J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2018, 7(12): e1701357.
- [86] Gu B, Wu W, Xu G, et al. Precise two-photon photodynamic therapy using an efficient photosensitizer with aggregation-induced emission characteristics [J]. *Advanced Materials*, 2017, 29(28): 1701076.
- [87] Shih A Y, Blinder P, Tsai P S, et al. The smallest stroke: occlusion of one penetrating vessel leads to infarction and a cognitive deficit [J]. *Nature Neuroscience*, 2013, 16(1): 55-63.
- [88] Frederiksen P K, McIlroy S P, Nielsen C B, et al. Two-photon photosensitized production of singlet oxygen in water [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, 127(1): 255-269.
- [89] Shen X Q, Li L, Chan A C M, et al. Water-soluble conjugated polymers for simultaneous two-photon cell imaging and two-photon photodynamic therapy [J]. *Advanced Optical Materials*, 2013, 1(1): 92-99.
- [90] Wu W B, Bazan G C, Liu B. Conjugated-polymer-amplified sensing, imaging, and therapy [J]. *Chem*, 2017, 2(6): 760-790.
- [91] Wu W B, Mao D, Xu S D, et al. Polymerization-enhanced photosensitization [J]. *Chem*, 2018, 4(8): 1937-1951.
- [92] Wang S W, Chen H, Liu J, et al. NIR-II light activated photosensitizer with aggregation-induced emission for precise and efficient two-photon photodynamic cancer cell ablation [J]. *Advanced Functional Materials*, 2020, 30(30): 2002546.
- [93] Kenry, Duan Y, Liu B. Recent advances of optical imaging in the second near-infrared window [J]. *Advanced Materials*, 2018, 30(47): e1802394.
- [94] Zhu S J, Herraiz S, Yue J Y, et al. 3D NIR-II molecular imaging distinguishes targeted organs with high-performance NIR-II bioconjugates [J]. *Advanced Materials*, 2018, 30(13): e1705799.
- [95] Wan H, Yue J, Zhu S, et al. A bright organic NIR-II nanofluorophore for three-dimensional imaging into biological tissues [J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 1171.
- [96] Horton N G, Wang K, Kobat D, et al. *In vivo* three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain

- [97] Kobat D, Horton N G, Xu C. *In vivo* two-photon microscopy to 1.6-mm depth in mouse cortex[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2011, 16(10): 106014.
- [98] Wang S W, Liu J, Feng G X, et al. NIR-II excitable conjugated polymer dots with bright NIR-I emission for deep *in vivo* two-photon brain imaging through intact skull [J]. *Advanced Functional Materials*, 2019, 29(15): 1808365.
- [99] Dobos A, Steiger W, Theiner D, et al. Screening of two-photon activated photodynamic therapy sensitizers using a 3D osteosarcoma model[J]. *The Analyst*, 2019, 144(9): 3056-3063.
- [100] Karges J, Kuang S, Maschietto F, et al. Rationally designed ruthenium complexes for 1- and 2-photon photodynamic therapy[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 3262.
- [101] Zhou Z X, Liu J P, Rees T W, et al. Heterometallic Ru-Pt metallacycle for two-photon photodynamic therapy [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(22): 5664-5669.
- [102] Sun C L, Li J, Wang X Z, et al. Rational design of organic probes for turn-on two-photon excited fluorescence imaging and photodynamic therapy[J]. *Chem*, 2019, 5(3): 600-616.
- [103] He X J, Bo S T, Gao M, et al. Stereotactic photodynamic therapy using a two-photon AIE photosensitizer [J]. *Small*, 2019, 15(50): e1905080.

## Recent Advances in Two-Photon Excited Photodynamic Therapy

Wang Shaowei, Lei Ming\*

MOE Key Laboratory for Nonequilibrium Synthesis and Modulation of Condensed Matter, Shaanxi Province  
Key Laboratory of Quantum Information and Quantum Optoelectronic Devices, School of Physics,  
Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, Shaanxi, China

### Abstract

**Significance** Photodynamic therapy (PDT) relies on the administration of photosensitizers (PSs) that are activated by light at a specific wavelength to produce cytotoxic reactive oxygen species (ROS) to kill cancer cells and other pathogens. As a result, photosensitizer, light source, and molecular oxygen are three critical components for PDT. When irradiated by light, good photosensitizers should exhibit strong light absorption, high photo-stability, and efficient ROS generation. To ensure effective light energy delivery to deep-seated diseases, the light source should be capable of penetrating biological tissues. Porphyrin derivatives are currently the majority of clinically approved photosensitizers by the Food and Drug Administration (FDA). Although they are activated by red light ( $\sim 630$  nm) in clinical applications to improve light penetration, this is not the wavelength at which they absorb the most. To improve the light penetration, photosensitizers with absorption in the red and near-infrared (NIR) regions, such as methylene blue and indocyanine green (ICG), were developed. ICG exhibits strong NIR absorption, but it suffers from low ROS generation efficiency, fast body clearance, and poor photo-stability. Furthermore, due to the energy threshold of the PS required to ensure efficient energy transfer from the triplet state to oxygen molecules, developing photosensitizers with long-wavelength absorption is extremely difficult. In comparison to the UV and visible light commonly used in traditional PDT, NIR light penetrates biological tissues much better due to the lower scattering effect. Two-photon excitation is one effective strategy of using NIR light as the light source for PDT in which the PSs are activated by the simultaneous absorption of two NIR photons to produce ROS [Fig. 1(a)]. Because the probability of two-photon absorption is very low for a photosensitizer, light with high peak intensity, such as an ultrafast femtosecond pulsed laser, is used for two-photon excitation. Furthermore, the laser is usually focused to increase the efficiency of two-photon excitation. When compared to one-photon excitation, two-photon absorption occurs only at the focal plane, and the out-of-focus signals are suppressed [Fig. 1(b)], which is due to the square dependence of the two-photon fluorescence intensity on the excitation light power. Two-photon excited PDT (2P-PDT) has considerable promise for high-precision deep tissue theranostics thanks to NIR light excitation and high-order nonlinear optical effects.

**Progress** The efficiency of ROS generation and the two-photon absorption cross-section are two main factors that determine the therapeutic efficiency of 2P-PDT. Traditional photosensitizers, such as porphyrin derivatives and chlorophyll derivatives, have been adopted in a variety of 2P-PDT applications (Fig. 2). Despite efficient ROS generation, their poor water solubility, small two-photon absorption cross-section, and low photo-stability have limited their performance in practical applications. Over the last two decades, new generation PSs have been developed to improve cancer targeting. PSs are linked with antibodies, proteins, and other molecules that are overexpressed on cancer cells to improve selectivity and therapeutic performance. Furthermore, PSs are loaded onto a variety of nanoparticles, including quantum dots, gold-based nanoparticles, and polymer micelles, to build nano-platforms for efficient drug delivery. The intersystem crossing (ISC) process from the singlet excited state to the triplet excited state is critical in the generation of ROS. By incorporating heavy atoms into photosensitizers, such as iridium, ruthenium, iodine, and bromine, the spin-orbit coupling (SOC) can be enhanced, which favors the improvement of the ISC process. Furthermore, reducing



the singlet and triplet energy gaps ( $\Delta E_{ST}$ ) can help to improve the ISC process (Fig. 3). Photosensitizers with donor-acceptor (D-A) structures have been developed in recent years to reduce the  $\Delta E_{ST}$  value by separating the highest occupied molecular orbital (HOMO) and the lowest unoccupied molecular orbital (LUMO). Moreover, the D-A structured molecules also favor a large two-photon absorption cross-section. By adjusting the donor and acceptor moieties, and introducing  $\pi$ -conjugated linkers, their two-photon absorption can be improved due to the enhanced strength of the donor and acceptor, and the extended conjugation length (Fig. 4). Most organic photosensitizers are highly hydrophobic and show reduced ROS generation and fluorescence reduction in an aqueous environment due to an aggregation-caused quenching effect. To address this issue, novel photosensitizers with aggregation-induced emission (AIE) properties have been developed (Fig. 6). The AIE nanoparticle-based PSs performed excellently well in two-photon imaging and 2P-PDT, owing to their enhanced ROS generation and fluorescence intensity in aggregate states as nanoparticle formulations. Due to its specific advantages for deep tissue penetration, 2P-PDT has been used in image-guided precise blood vessel closure *in vivo* (Fig. 7). To improve ROS generation and two-photon absorption in a single photosensitizer molecule, a new concept called polymerization-enhanced two-photon photosensitization was proposed (Fig. 8). Recently, an NIR-II light (1000–1700 nm) activable photosensitizer with greater therapeutic depth than the NIR-I (700–950 nm) excitation was developed (Fig. 9). Even though the action section for 2P-PDT is relatively small, its applications for bulky solid tumor therapy have shown some promise with the advancement of ROS generation and light source (Fig. 10).

**Conclusion and Prospect** 2P-PDT is promising for precise cancer therapy in deep tissues due to the advantages of NIR light excitation and high-order nonlinear optical process. Efforts have been made to improve the ROS generation and two-photon absorption of PSs. Traditional PSs suffer from aggregation-caused quenching problems which are addressed by novel AIE PSs. Compared with one-photon PDT, 2P-PDT should not be focused on the therapy of large solid tumors due to its small action section. 2P-PDT has a lot of potential in basic research applications that require high resolution and precision, such as building a stroke model in mouse brain, precise intracellular ROS activation, selective cancer cell killing *in vivo*, etc. NIR-II excitation should be considered to improve the therapeutic depth of 2P-PDT. However, shifting the absorption of PSs to long-wavelength while maintaining ROS generation efficiency is a challenge. Therefore, future development for 2P-PDT should concentrate on extremely efficient PSs with long-wavelength absorption, NIR-II light excitation, increased two-photon excitation efficiency with a large field, and a single PS molecule capable of both good ROS generation and two-photon absorption capability.

**Key words** medical optics; two-photon; photodynamic therapy; photosensitizer; near-infrared light; aggregation induced emission