

# ALA-PDT 治疗 Fischer 344 大鼠颅内 9L 胶质瘤的实验研究

张雪鹏<sup>1</sup> 孙影<sup>2</sup> 赵霞<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 河北联合大学附属医院肿瘤外科, 河北 唐山 063000  
<sup>2</sup> 河北联合大学基础医学院病理学教研室, 河北 唐山 063000  
<sup>3</sup> 河北联合大学冀唐学院外科学实验室, 河北 唐山 063300

**摘要** 观察新型光敏剂 5-氨基乙酞丙酸(ALA)介导的光动力学疗法(PDT)治疗 Fischer 344 大鼠 9L 胶质瘤的效果并探讨其作用机制。20 只雄性 Fischer 344 大鼠颅内种植 9L 脑胶质瘤细胞后, 随机分为对照组、PDT 治疗组(40 J/cm<sup>2</sup>组、80 J/cm<sup>2</sup>组和 120 J/cm<sup>2</sup>组)。接种 9L 细胞 7 天后治疗组接受相应的 ALA-PDT 治疗。治疗后第 7 天处死所有动物, 通过 Hematoxylin-Eosin(H-E)染色法检测颅内肿瘤的生长情况; 利用免疫组化法检测肿瘤细胞的增殖活性(Ki67)和 TUNEL 法测定肿瘤细胞的凋亡。结果表明利用不同能量的 ALA-PDT 治疗后大鼠的生存状态明显改善, 脑胶质瘤的体积减小, 其治疗效果在一定范围内随着能量的增大而增强, 但 80 J/cm<sup>2</sup> 和 120 J/cm<sup>2</sup> 的治疗效果基本相同。通过对肿瘤细胞增殖和凋亡的检测发现, ALA-PDT 对细胞的增殖无影响, 但可诱导肿瘤细胞的凋亡。ALA-PDT 通过诱导肿瘤细胞的凋亡可有效治疗脑胶质瘤。

**关键词** 医用光学; 光动力学疗法; 5-氨基乙酞丙酸; 脑胶质瘤

中图分类号 TN249; R739.41 文献标识码 A doi: 10.3788/LOP49.111701

## Experimental Study of ALA-PDT in Fischer 344 Rats with Orthotopic 9L Glioma

Zhang Xuepeng<sup>1</sup> Sun Ying<sup>2</sup> Zhao Xia<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Surgical Oncology, Affiliated Hospital, Hebei United University, Tangshan, Hebei 063000, China

<sup>2</sup> Department of Pathology, Elementary Medical College, Hebei United University, Tangshan, Hebei 063000, China

<sup>3</sup> Laboratory of Surgery, Jitang College, Hebei United University, Tangshan, Hebei 063300, China

**Abstract** The study is to observe the effect of photodynamic therapy (PDT) mediated with new photo sensitizer (5-aminolevulinic acid, ALA) in Fischer 334 rats with 9L glioma glioma and explore its mechanisms. Twenty Fischer 334 rats are implanted 9L cells to brain and randomly subjected to no treatment and PDT treatment (40, 80, 120 J/cm<sup>2</sup>). After 7-day implantation, rats with PDT treatment are injected ALA at the dose of 300 mg/kg and then receive PDT treatment for 3 h, respectively. All animals are sacrificed after 7-day PDT treatment and the tumor size is measured by Hematoxylin-Eosin (H-E) staining. Immunohistochemical staining for Ki67 and TUNEL staining are used to detect the proliferation of tumor cells and apoptosis, respectively. Different doses of ALA-PDT treatment significantly improves the decreased living status induced by glioma, and significantly reduces gliomas size. These effects depend on the dosage of PDT in some range, but between the two high doses (80 J/cm<sup>2</sup> and 120J/cm<sup>2</sup>), the therapeutic effect has no significantly difference. By detection of tumor cell proliferation and apoptosis respectively, ALA-PDT treatment can lead apoptosis of tumor cells but has no effect on cell proliferation. ALA-PDT can suppress the development of glioma by induction of apoptosis of tumor cells.

**Key words** medical optics; photodynamic therapy; 5-aminolevulinic acid; glioma

**OCIS codes** 170.5180; 170.6930; 170.1530; 170.4730

收稿日期: 2012-07-09; 收到修改稿日期: 2012-07-18; 网络出版日期: 2012-08-30

基金项目: 河北省 2011 年留学人员择优资助科技活动项目(冀人社字[2011]226 号)和河北省教育厅科研计划项目(Z2008454)资助课题。

作者简介: 张雪鹏(1971—), 博士, 副教授, 主要从事肿瘤的综合治疗方面的研究。E-mail: syzxp@sina.com

本文电子版彩色效果请详见中国光学期刊网(<http://www.opticsjournal.net>)

# 1 引言

光动力学疗法(PDT)是利用光敏剂特异地滞留于肿瘤组织内,用特定波长的光激发这些光敏剂产生光化学反应,从而靶向破坏肿瘤组织。因此,光敏剂的选择在 PDT 的治疗中至关重要。目前在临床上广泛使用的光敏剂是血卟啉制剂(HpD),但 HpD 有很多不足之处,如皮肤光毒性很大,治疗后患者需避光至少 6 周<sup>[1]</sup>。5-氨基乙酰丙酸(ALA)是新一代的光敏剂,其本身没有光敏活性,只有转变成血红素合成过程中的产物——原卟啉 IX(PpIX)才具有光敏作用。ALA 给药方便安全,而且在体内无毒性作用,其引起的皮肤过敏作用只需 2 天即可被消除。目前,ALA-PDT 以局部或全身给药的方式被广泛用于治疗皮肤癌、食道癌、肺癌和胃肠道癌症,但关于其对脑胶质瘤的治疗作用报道并不多见<sup>[2]</sup>。本研究通过建立 9L/Fischer 344 大鼠原位脑胶质瘤模型,观察 ALA-PDT 治疗大鼠颅内脑胶质瘤的效果并初步探讨其作用机理,为临床治疗提供有效的实验和理论依据。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验细胞

9L 胶质瘤细胞购自美国型培养菌种集(ATCC)。

### 2.2 实验动物

无特定病原体(SPF)雄性近交系 Fischer 344 大鼠,体质量  $250 \text{ g} \pm 25 \text{ g}$ ,购于北京维通利华实验动物中心。

### 2.3 仪器和试剂

脑立体定向仪购自美国 Stoelting 公司;ALA 购自美国 Sigma Chemical 公司;半导体激光器由加拿大 University Health Network 提供,波长  $635 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ ,输出功率  $0 \sim 1 \text{ W}$ ,连续可调;兔抗大鼠 Ki67 的多克隆抗体、生物素标记的羊抗兔二抗、3,3'-二氨基联苯胺(DAB)试剂盒、原位末端转移酶标记(TUNEL)试剂盒购于武汉博士德生物技术公司。

### 2.4 9L 细胞体外培养及接种前准备

9L 胶质瘤细胞于体积分数为 5%的  $\text{CO}_2$ 、温度为  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下,在体积分数为 10%胎牛血清(FBS)的细胞培养基 DMEM 中培养至对数生长期。经胰酶消化后,计数细胞并调整细胞悬液细胞浓度为  $10^8 \text{ mL}^{-1}$ ,经台盼蓝染色检测活细胞比率大于 95%。待种的细胞悬液置于碎冰中保存。

### 2.5 立体定向大鼠脑内接种细胞

20 只 Fischer 344 大鼠氯胺酮( $80 \text{ mg/kg}$ )和甲苯噻嗪( $13 \text{ mg/kg}$ )腹腔注射麻醉后,固定于脑立体定向仪上。头部去毛,常规消毒后沿中线纵向切开头皮约  $1 \text{ cm}$ ,暴露前囟,用直径为  $1 \text{ mm}$  的牙科钻小心钻穿颅骨并切除部分颅骨(直径约为  $5 \text{ mm}$ )。取颅骨开窗的中心(前囟中点前  $1.5 \text{ mm}$ ,矢状缝向右旁开  $2.5 \text{ mm}$ ),以  $10 \text{ } \mu\text{L}$  Hamilton 注射器抽取配好的 9L 细胞悬液  $5 \text{ } \mu\text{L}$  ( $5 \times 10^4$  个细胞),缓慢垂直颅骨进针  $3 \text{ mm}$ ,回退  $0.5 \text{ mm}$ ,以  $1 \text{ } \mu\text{L/min}$  的速度注入细胞悬液,留针  $5 \text{ min}$  后缓慢拔针,用聚氯乙烯膜封闭骨孔,缝合头皮,常规饲养。

### 2.6 实验分组

20 只大鼠脑内接种 9L 细胞后随机分为 4 组:对照组、 $40 \text{ J/cm}^2$  组、 $80 \text{ J/cm}^2$  组和  $120 \text{ J/cm}^2$  组,每组 5 只。除对照组外,其余各组大鼠在接种 9L 细胞后第 7 天接受相应能量的 PDT 治疗。治疗后第 7 d 处死所有大鼠,用体积分数为 10%中性福尔马林溶液固定,行 Hematoxylin-Eosin(H-E)染色,免疫组化和 TUNEL 检测。

### 2.7 PDT 治疗

9L 细胞种植后第 7 天,给予 PDT 治疗的大鼠治疗前  $3 \text{ h}$  腹腔注射  $300 \text{ mg/kg}$  ALA,PDT 组的 15 只大鼠按上述方法麻醉、固定后,剪开原切口,去除聚氯乙烯膜, $630 \text{ nm}$  波长的激光照射肿瘤,激光功率为  $100 \text{ mW}$ ,光斑直径为  $7 \text{ mm}$ ,照光时间分别为  $154$ 、 $308$ 、 $462 \text{ s}$ ,对应的能量密度分别为  $40$ 、 $80$ 、 $120 \text{ J/cm}^2$ 。治疗结束后再用聚氯乙烯膜封闭骨孔,缝合头皮,常规饲养。

### 2.8 组织处理及肿瘤体积计算

9L 细胞种植后第 14 天,利用断头器,采取断头法处死所有动物,完整取出脑组织。拟行石蜡切片的标

本用质量分数为 10% 中性甲醛固定后冠状切成 2 mm 厚的组织块。含有脑瘤或术后创腔的组织块常规石蜡包埋。间隔 0.5 mm 连续切片(6  $\mu\text{m}$  厚),行 H-E 染色。光镜下应用 MCID 图像分析软件中的多边形测量工具,在 H-E 染色的切片上勾画脑瘤的病灶范围,记录软件自动计算的相应区域面积,采用面积总和乘以切片间隔厚度的方法计算出脑瘤的体积。

## 2.9 免疫组化及 TUNEL 染色

选取每个动物肿瘤面积最大的组织块,间隔 0.5 mm 连续切片(6  $\mu\text{m}$  厚)2 张,分别行 Ki67 免疫组化染色(DAB 法)和 TUNEL 染色。实验步骤按试剂盒说明书进行。Ki67 以细胞核出现黄色颗粒为阳性。Ki67 指数指 100 个细胞中 Ki67 的阳性细胞数。其计算方法为每张切片于 400 倍镜下肿瘤组织内选定 3 个视野,计算每张切片上的阳性表达百分数即为 Ki67 指数。TUNEL 染色结果计算方法为每张切片于 400 倍镜下肿瘤组织内选定 3 个视野(第个视野面积为 0.076  $\text{mm}^2$ ),计数其中的 TUNEL 染色阳性细胞个数,计算得出每平方毫米内的阳性细胞个数。

## 2.10 统计学处理

采用 SPSS11.0 软件进行统计学处理,测量所得数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,用方差分析检验(ANOVA),并用 Student-Newman-Keuls 法进行两组间均数比较,概率  $P < 0.05$  表示统计学上有显著性差异。

# 3 结果

## 3.1 大鼠生存状态

各组大鼠 PDT 治疗后第 2 天,因手术和 PDT 的创伤导致进食及活动减少,随后逐渐恢复。与对照组比较,各不同能量的 PDT 组的大鼠活动、进食均增加,体重也有增加,80  $\text{J}/\text{cm}^2$  和 120  $\text{J}/\text{cm}^2$  组大鼠的一般状态最佳。

## 3.2 ALA-PDT 对大鼠脑内胶质瘤生长的影响

各组 H-E 染色的切片上均可见肿瘤组织,未见明显出血和坏死。对照组的肿瘤体积为  $103.27 \text{ mm}^3 \pm 8.83 \text{ mm}^3$ ,ALA-PDT 治疗后,40  $\text{J}/\text{cm}^2$  组、80  $\text{J}/\text{cm}^2$  组和 120  $\text{J}/\text{cm}^2$  组的肿瘤体积分别为  $73.93 \text{ mm}^3 \pm 7.55 \text{ mm}^3$ 、 $57.89 \text{ mm}^3 \pm 7.53 \text{ mm}^3$ 、 $48.57 \text{ mm}^3 \pm 6.86 \text{ mm}^3$ (图 1,图中黑色箭头所指为肿瘤)。与对照组比较,40  $\text{J}/\text{cm}^2$  ALA-PDT 明显减小了肿瘤的体积,差异具有显著性( $P < 0.05$ )。与对照组和 40  $\text{J}/\text{cm}^2$  相比,80  $\text{J}/\text{cm}^2$  和 120  $\text{J}/\text{cm}^2$  组的肿瘤体积减少得更明显,差异具有显著性( $P < 0.05$ );但两组间肿瘤体积无统计学差异( $P > 0.05$ )。

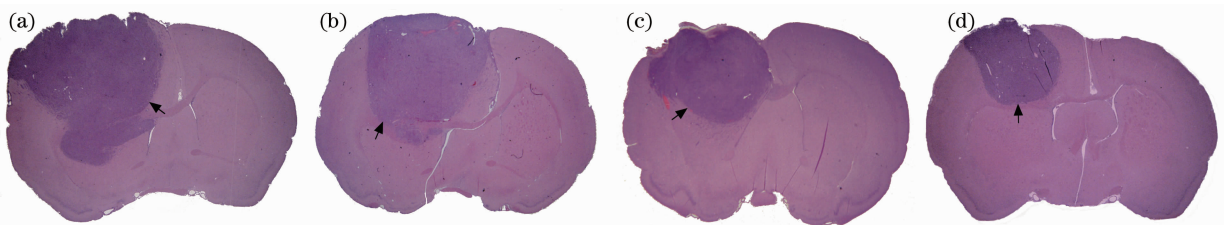


图 1 不同能量 ALA-PDT 照射 7 天后种植 9L 细胞 Fischer 344 大鼠的全脑切片(8 $\times$ )。(a)对照组;  
(b) 40  $\text{J}/\text{cm}^2$ ; (c) 80  $\text{J}/\text{cm}^2$ ; (d) 120  $\text{J}/\text{cm}^2$

Fig. 1 Whole-brain paraffin sections of Fischer 344 rats implanted with 9L cells after 7-day ALA-PDT with different energies (8 $\times$ ). (a) Control group; (b) 40  $\text{J}/\text{cm}^2$ ; (c) 80  $\text{J}/\text{cm}^2$ ; (d) 120  $\text{J}/\text{cm}^2$

## 3.3 不同能量 ALA-PDT 对胶质瘤细胞凋亡的影响

对照组、40  $\text{J}/\text{cm}^2$  组、80  $\text{J}/\text{cm}^2$  组和 120  $\text{J}/\text{cm}^2$  组的 TUNEL 染色阳性细胞数分别为  $(24.15 \pm 8.75) / \text{mm}^2$ 、 $(46.05 \pm 10.32) / \text{mm}^2$ 、 $(74.36 \pm 12.15) / \text{mm}^2$ 、 $(81.64 \pm 14.56) / \text{mm}^2$ (图 2,图中黑色箭头所指为 TUNEL 染色阳性细胞)。与对照组相比,PDT 治疗组的凋亡细胞数明显增加( $P < 0.05$ ),其中 80  $\text{J}/\text{cm}^2$  组和 120  $\text{J}/\text{cm}^2$  组的凋亡细胞数明显多于 40  $\text{J}/\text{cm}^2$  组( $P < 0.05$ ),而 80  $\text{J}/\text{cm}^2$  组和 120  $\text{J}/\text{cm}^2$  组两组间 TUNEL 染色阳性细胞数无统计学差异。这些结果提示 PDT 可通过肿瘤细胞的凋亡来抑制肿瘤的生长。

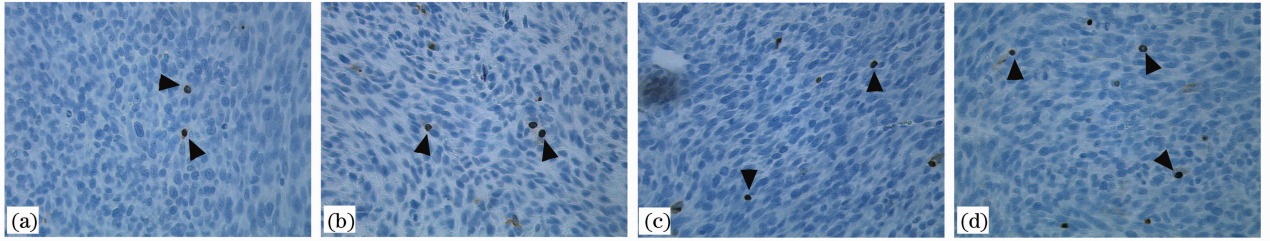


图2 ALA-PDT照射7天后各组肿瘤组织中TUNEL染色图像(400 $\times$ )。(a)对照组；  
(b) 40 J/cm<sup>2</sup>；(c) 80 J/cm<sup>2</sup>；(d) 120 J/cm<sup>2</sup>

Fig. 2 Representative TUNEL staining images in tumor after 7-day ALA-PDT with different energies (400 $\times$ ).

(a) Control group; (b) 40 J/cm<sup>2</sup>; (c) 80 J/cm<sup>2</sup>; (d) 120 J/cm<sup>2</sup>

### 3.4 不同能量 ALA-PDT 照射后肿瘤组织 Ki67 表达情况

对照组、40 J/cm<sup>2</sup>组、80 J/cm<sup>2</sup>组和120 J/cm<sup>2</sup>组的Ki67指数分别为(49.06 $\pm$ 7.87)%、(51.84 $\pm$ 5.96)%、(48.42 $\pm$ 6.58)%、(46.62 $\pm$ 6.02)% (图3,棕色区域为Ki67阳性细胞)。PDT治疗组与对照组的Ki67指数相比,各组间无统计学差异,提示PDT的治疗作用并不是通过抑制肿瘤细胞的增殖来实现的。

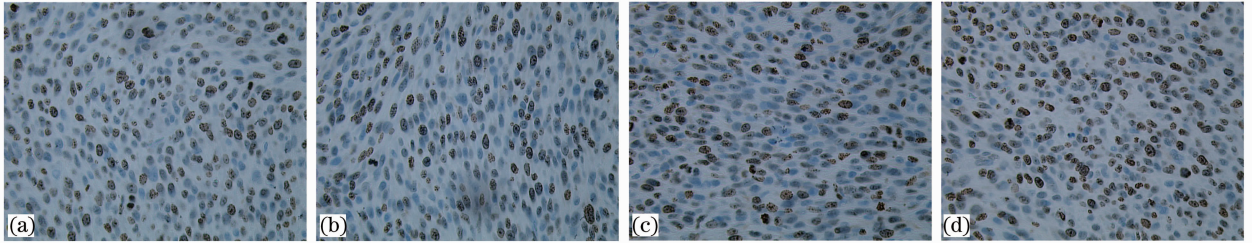


图3 不同能量 ALA-PDT 照射后7天各组肿瘤组织中Ki67的表达(400 $\times$ )。(a)对照组；

(b) 40 J/cm<sup>2</sup>；(c) 80 J/cm<sup>2</sup>；(d) 120 J/cm<sup>2</sup>

Fig. 3 Ki67 immunoreactive positive cells (brown area) in tumor after 7-day ALA-PDT with different energies (400 $\times$ ).

(a) Control group; (b) 40 J/cm<sup>2</sup>; (c) 80 J/cm<sup>2</sup>; (d) 120 J/cm<sup>2</sup>

## 4 讨论

颅内胶质瘤是临床上常见病、多发病。约占成人原发性颅内肿瘤的50%~60%，其主要生物学特性为局部侵袭性生长，因此临床手术难以完全切除，残留的肿瘤细胞是造成肿瘤复发的根本原因，而且术后放、化疗的副反应大，临床预后差，据统计恶性脑胶质瘤的平均生存期不到一年<sup>[3,4]</sup>。因此积极寻找其他的治疗方法，对提高胶质瘤的治疗效果具有重要意义。PDT做为治疗肿瘤的局部治疗方法之一，已应用于脑胶质瘤的治疗。

目前在PDT治疗中，临床上广泛应用的是第一代光敏剂HpD和Photofrin，虽然它们已取得了肯定的疗效，但仍有很多不足之处，如价格昂贵，给药至光照的时间间隔长，皮肤光敏副作用大等<sup>[1,5]</sup>。第二代光敏剂ALA与第一代光敏剂不同，它是一种光敏剂前体物质，只有转变成PpIX才具有光敏作用。ALA是机体许多细胞的正常成分，是血红素的前体，经ALA脱水酶及其他一系列酶促作用，生成PpIX。在正常情况下，机体通过负反馈调节机制严格控制ALA的合成，如果给予大量外源性ALA，代谢旺盛的肿瘤细胞吸收ALA明显增加，产生大量的PpIX，并蓄积在细胞内，经PDT照射后发生光化学学反应，杀伤肿瘤细胞<sup>[6]</sup>。外源性ALA所产生的PpIX在人体内半衰期短，一般ALA进入体内2~4h后组织中PpIX的含量达高峰，6h后逐渐下降，24h后组织中PpIX恢复到用药前水平，所以病人只需避光24~48h，同HPD比较，避光时间大大缩短。而且在此期间病人的血、尿常规及肝功能无明显变化，使用安全。因此ALA-PDT是一种具有良好发展前景的肿瘤治疗或辅助治疗手段<sup>[7]</sup>。目前，ALA-PDT已被应用于治疗多种恶性肿瘤的实验研究，并展示出良好的治疗效果<sup>[2,8]</sup>。在实验中，着重观察了ALA-PDT在照射后的亚急性期对9L脑胶质瘤的治疗作用，结果发现ALA-PDT可以明显地减小肿瘤的体积，尤其以80 J/cm<sup>2</sup>和120 J/cm<sup>2</sup>作用最为明



显,而且实验动物在 PDT 治疗之后一般情况明显优于对照组,形态学在周围正常脑组织中也并未发现出血、坏死等副反应,说明 ALA-PDT 在治疗肿瘤的同时,无明显的副作用。

在 ALA-PDT 治疗的过程中,PpIX 能够产生具有细胞毒性的超氧化物,这些超氧化物直接作用于肿瘤细胞导致细胞死亡。Yamamoto 等<sup>[9]</sup>认为 PDT 导致细胞死亡的途径主要取决于 PDT 治疗过程中所产生的单态氧浓度:高能量的 PDT 产生的单态氧浓度高,引起肿瘤细胞的坏死;低能量 PDT 产生的单态氧浓度不足以造成细胞的坏死,但可诱导细胞的凋亡。研究中三种不同能量的 PDT 照射后第 7 天,治疗区域未观察到明显的坏死,结果显示不同能量的 PDT 照射后均可明显的诱导肿瘤细胞的凋亡,以 80 J/cm<sup>2</sup> 和 120 J/cm<sup>2</sup> 能量的 PDT 治疗作用最为明显。Wakui 等<sup>[10]</sup>报道 ALA-PDT 可抑制大鼠卵巢癌的进展,这种作用与其诱导卵巢浆液性腺癌细胞凋亡有关。Bhowmick 等<sup>[11]</sup>发现 ALA-PDT 通过激活细胞内促凋亡的 JNK 和 P38 $\alpha$  通路,同时抑制了促进细胞存活的 P38 $\beta$  和 ERK1/2 通路,从而导致乳腺癌细胞凋亡。本课题组前期有关 Photofrin-PDT 治疗 9L 脑胶质瘤的研究表明 Photofrin-PDT 通过诱导肿瘤细胞凋亡来抑制肿瘤的生长<sup>[12]</sup>。

肿瘤细胞增殖活性的检测对于判断肿瘤的恶性程度,预见其生物学行为,评估预后及检测治疗效果等方面是很重要的。Ki67 蛋白是一种增殖抗原,出现于细胞周期的 G1、S、G2 和 M 期,而 G0 期的细胞不表达 Ki67 抗原。因此,测定 Ki67 的表达是判断肿瘤细胞增殖的有效指标<sup>[13,14]</sup>。Ki67 免疫组化研究被广泛用于中枢神经系统肿瘤,Ozen 等<sup>[15]</sup>认为 Ki67 染色指数与脑膜瘤的复发及患者的预后有关,Ki67 染色指数越高,患者越容易复发,生存时间越短。本课题组前期研究表明 Photofrin 介导的 PDT 对 9L 胶质瘤细胞的增殖无影响<sup>[12]</sup>。在本实验中,Ki67 免疫组化半定量分析结果显示不同能量的 PDT 治疗 7 天后,与对照组比较,PDT 治疗对肿瘤细胞的增殖无统计学差异。换言之,PDT 并不是通过减少肿瘤细胞的增殖来发挥作用的。

## 5 结 论

综上所述,ALA-PDT 可有效治疗脑胶质瘤,其治疗效果在一定范围内随着 PDT 能量的增大而增强。ALA-PDT 可诱导肿瘤细胞的凋亡,但对肿瘤细胞的增殖无影响,因此 ALA-PDT 是通过诱导脑胶质瘤细胞的凋亡而发挥治疗作用的。

## 参 考 文 献

- 1 J. G. Levy. Photosensitizers in photodynamic therapy[J]. *Semin. Oncol.*, 1994, **21**(6 Suppl 15): 4~10
- 2 B. Krammer, K. Plaetzer. ALA and its clinical impact, from bench to bedside[J]. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2008, **7**(3): 283~289
- 3 T. Gupta, K. Dinshaw. Modified optimal fractionation for poor prognosis malignant gliomas: an elusive search[J]. *Acta Oncol.*, 2005, **44**(2): 105~113
- 4 T. Suzuki, S. Izumoto, Y. Fujimoto *et al.*. Clinicopathological study of cellular proliferation and invasion in gliomatosis cerebri: important role of neural cell adhesion molecule L1 in tumour invasion[J]. *J. Clin. Pathol.*, 2005, **58**(2): 166~171
- 5 P. G. Calzavara-Pinton, M. Venturini, R. Sala. Photodynamic therapy: update 2006 part 1: photochemistry and photobiology[J]. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2007, **21**(3): 293~302
- 6 D. I. Schwartz, Y. Gozlan, L. Greenbaum *et al.*. Differentiation-dependent photodynamic therapy regulated by porphobilinogen deaminase in B16 melanoma[J]. *British J. Cancer*, 2004, **90**(9): 1833~1841
- 7 B. Zhao, Y. Y. He. Recent advances in the prevention and treatment of skin cancer using photodynamic therapy[J]. *Expert Rev. Anticancer Ther.*, 2010, **10**(11): 1797~1809
- 8 E. H. Moriyama, S. K. Bisland, L. Lilge *et al.*. Bioluminescence imaging of the response of rat gliosarcoma to ALA-PpIX-mediated photodynamic therapy[J]. *Photochem. Photobiol.*, 2004, **80**(2): 242~249
- 9 J. Yamamoto, S. Yamamoto, T. Hirano *et al.*. Monitoring of singlet oxygen is useful for predicting the photodynamic effects in the treatment for experimental glioma[J]. *Clin. Cancer Res.*, 2006, **12**(23): 7132~7139
- 10 M. Wakui, Y. Yokoyama, H. Wang *et al.*. Efficacy of a methyl ester of 5-Aminolevulinic acid in photodynamic therapy for ovarian cancers[J]. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2010, **136**(8): 1143~1150
- 11 R. Bhowmick, A. W. Girotti. Signaling events in apoptotic photokilling of 5-aminolevulinic acid-treated tumor cells: inhibitory effects of nitric oxide[J]. *Free Radic. Biol. Med.*, 2009, **47**(6): 731~740
- 12 X. Zhang, F. Jiang, S. N. Kalkanis *et al.*. Combination of surgical resection and photodynamic therapy of 9L gliosarcoma in the nude rat[J]. *Photochem. Photobiol.*, 2006, **82**(6): 1704~1711

- 13 N. E. Tzanakis, G. Peros, P. Karakitsos *et al.*. Prognostic significance of p53 and Ki67 proteins expression in Greek gastric cancer patients[J]. *Acta Chir. Belg.*, 2009, **109**(5): 606~611
- 14 M. Klintman, P. O. Bendahl, D. Grabau *et al.*. The prognostic value of Ki67 is dependent on estrogen receptor status and histological grade in premenopausal patients with node-negative breast cancer[J]. *Mod. Pathol.*, 2010, **23**(2): 251~259
- 15 O. Ozen, B. Demirhan, N. Altinors. Correlation between histological grade and MIB-1 and p53 immunoreactivity in meningiomas[J]. *Clin. Neuropathol.*, 2005, **24**(5): 219~224