

◆ 综述

Application progresses of optical molecular imaging techniques in cancer

LIU Fan, SUN Lei, YU Jianbo*

(Department of Pathology, Affiliated Hongqi Hospital of Mudanjiang Medical University, Key Laboratory of Tumor Prevention and Treatment of Heilongjiang Province, Mudanjiang 157011, China)

[Abstract] The molecular imaging technology is a kind of imaging technology which displays the microstructure of tissue, cell and sub-cellular level in vivo. It has the characteristics of real-time, noninvasive, accurate and sensitive, and can be used for early screening and diagnosis of tumor at the cellular and molecular level. Following the development of bioluminescence and fluorescence imaging, optical molecular imaging technology is making rapidly progression. The application of optical molecular imaging technology in cancer was reviewed in the paper.

[Key words] Molecular imaging; Optical imaging; Tumor; Bioluminescence; Nanoprobe

DOI:10.13929/j.1003-3289.201611145

光学分子影像学技术在肿瘤中的应用进展

刘 凡, 孙 蕾, 于建渤*

(牡丹江医学院附属红旗医院病理诊断中心, 黑龙江省肿瘤疾病防治重点实验室, 黑龙江 牡丹江 157011)

[摘 要] 分子影像学技术是一种在活体状态下从微观上显示组织、细胞及亚细胞水平的影像技术, 具有实时、无创、精准及灵敏等特点, 可在细胞和分子水平进行肿瘤早期筛查和诊断。随着生物发光与荧光成像技术的进步, 光学分子影像学技术快速发展。本文就光学分子影像学技术在肿瘤中的应用进展进行综述。

[关键词] 分子影像学; 光学成像; 肿瘤; 生物发光; 纳米探针

[中图分类号] R445 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-3289(2017)09-1417-04

光学成像是一种采用生物发光和荧光进行活体动物体内成像的一种技术。生物发光是用荧光素酶基因标记细胞, 利用其产生的蛋白酶与相应底物发生生物化学反应, 最终产生光学信号。荧光是利用荧光报告基因(GFP、RFP)、荧光染料(Cyt、dyes)或量子点(quantum dots, QDs)以及上转换稀土纳米粒子等标记细胞内的核酸或特殊蛋白后进行的成像^[1-2]。两者均需利用灵敏的光学检测系统, 直接监控生物活体内

基因和细胞变化, 观测肿瘤的生长、侵袭和转移等动态变化过程^[3]。光学分子影像学技术作为分子影像学的重要组成部分, 近年来已广泛应用于多个领域, 如药物开发、临床实践等^[4-5]。本文对光学分子影像学技术在肿瘤的早期诊断、辅助治疗、判断预后以及监测复发方面进行综述。

1 光学分子影像学技术在肿瘤早期诊断中的应用

光学成像技术通过对同一组实验对象在不同时间点进行记录, 示踪观察同一目标(即标记的细胞及基因)的变化。荧光成像在肿瘤早期诊断中发挥实时、非侵入式、特异性跟踪与探测的功能^[6]。荧光分子探针作为一类标记化合物分子能够与某一特定生物分子(如蛋白质、DNA、RNA)或细胞发生特异性靶向结合, 实现体内和体外影像学示踪, 反映在体或离体靶向生物分子的量和功能, 可直接快速无创地测量小鼠体内

[基金项目] 国家自然科学基金(81271628)。

[第一作者] 刘凡(1990—), 女, 河南驻马店人, 在读硕士。研究方向: 肿瘤分子影像学。E-mail: 1062428910@qq.com

[通信作者] 于建渤, 牡丹江医学院附属红旗医院病理诊断中心, 黑龙江省肿瘤疾病防治重点实验室, 157011。

E-mail: jianboyu2001@vip.sina.com

[收稿日期] 2016-11-29 **[修回日期]** 2017-06-15

的原位瘤和转移瘤,即使微小转移灶也能被检测到(可检测到活体内约 102 个转移的癌细胞),并对肿瘤治疗中瘤细胞的变化进行实时监测和评估^[7]。

Burggraaf 等^[8]成功地研制出一种水溶性荧光分子探针——GE-137,该探针由 26 个氨基酸环肽与荧光青花染料牢固结合而形成,可与人类酪氨酸激酶 c-Met 高度亲合;利用结肠癌微小息肉样病变常伴 c-Met 高水平表达的特点,在肠癌患者进行结肠镜检查前经静脉注入 GE-137,使其在微小息肉样癌变部位与靶点 c-Met 高度密集结合,通过荧光青花染料的高度聚集发出可见荧光,辅助发现普通结肠镜检查不能发现的微小病灶(直径 5 mm)。

纳米荧光粒子通常由量子点、荧光高分子纳米微球和二氧化硅纳米粒子等构成,在上转换激光的激发下,在特定激发区间发出荧光^[4,7]。Wang 等^[9]利用肿瘤血管生成和肿瘤酸性微环境的特性,研发出一种无需特殊基因型或蛋白表型的纳米探针——超敏 pH (ultra-pH sensitive, UPS)纳米探针,探针由 3 部分构成:①可调性灵敏 UPS 反应内核,可对 0.25 范围内的 pH 值变化发生反应,主要在 pH 值 6.5~6.8 区间发生反应;②具有从绿色到近红外(500~820 nm)激发区间的系列荧光团,该多色设计方案支持同时检测多种类型的肿瘤;③细胞表面受体与纳米探针结合的靶点,有利于探针信号在内吞的细胞器扩增。通过 UPS 纳米探针检测小鼠 A549 肺癌移植瘤模型,纳米探针可被肿瘤新生血管和细胞外基质较低的 pH 值迅速激活,在激光激发下发出荧光信号,有助于区分正常组织和肿瘤组织,并识别新肿瘤转移灶。

人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)可与荧光染料结合形成探针,从而识别裸鼠移植瘤中的人类来源肿瘤细胞。Suemizu 等^[10]利用 IVIS Xenolight™ CF770 试剂盒,将近红外大分子与抗人 HLA 抗体相耦联,构建近红外荧光抗 HLA 探针,并以小牛血清和甘氨酸为对照,利用肿瘤组织通透和滞留效应,检测人源性肿瘤裸鼠移植瘤,结果发现结肠癌、非小细胞肺癌和胰腺癌细胞系(HCT-116、LC11-JCK 和 BxPC-3)建立的裸鼠肿瘤模型均可很好地成像,其中注入 90 μg 的探针剂量时成像效果最佳,40 min 是最佳成像时间点,且深部组织的荧光穿透能力优于自体荧光 tdTomato 转染成功的裸鼠肿瘤模型,证实此异体移植瘤检测体系有较广泛的应用价值。

蛋白酶家族包含约 560 个成员,参与调节正常生理状态,可在多种肿瘤疾病时发生明显变化。Edging-

ton 等^[11]研究设计基于酶作用底物的探针(充当被蛋白酶加工的底物)和基于酶活性的探针(充当蛋白酶的直接共价抑制剂),两类探针可用于分析多种疾病模型中蛋白酶的活性,将患病时机体出现的蛋白酶作为功能性成像靶点,利用该蛋白酶的小分子抑制剂设计成靶向活性蛋白酶探针,促使靶点酶相关的肿瘤细胞发出荧光,最终促使活细胞甚至整个生物体可视化,达到诊断肿瘤的目的。

2 光学分子影像学技术在肿瘤治疗中的应用

光学分子成像技术在肿瘤治疗研究方面有重要的作用,如肿瘤辅助治疗、肿瘤术中成像和肿瘤靶向药物传递,同时还可通过成像反映肿瘤的侵袭程度,对患者预后进行准确评估^[12-14]。近期,工程化的整联蛋白结合 Knottin 肽作为脑肿瘤成像剂引起研究者的关注。Moore 等^[15]将 Knottin 肽 EETI 2.5F 标记到存在整合素的脑瘤细胞上,流式细胞术验证结合到光学成像探针的 EETI 2.5F 整联蛋白(整联蛋白已经被鉴定为分子成像应用和干预性治疗的潜在靶标),结果证实 EETI 2.5F 以高亲和力结合 Med1-MB 肿瘤细胞;后经裸鼠尾静脉注射荧光 AF680-EETI 2.5F 进行脑肿瘤成像,结果发现实验组与对照组探针均可快速经肾清除,降低非靶器官中背景荧光水平,并实现颅内活体成像,且发现 AF680-EETI 2.5F 的肿瘤成像与探针特异性结合密切相关,可为动物模型中的无创肿瘤检测和监测提供参考。

田捷等^[16]建立荷肝癌小鼠模型,利用复合荧光介孔硅球纳米粒子探针(ICG/MSN-RGD)主动靶向标记肿瘤细胞和肿瘤周边新生血管,模拟临床肿瘤光学手术导航检测,采用靶向探针与光学成像系统的协同作用,可清晰显示肿瘤边界,避免多切或误切,期间小鼠生存状况无异常,表明该探针生物安全性较好,可增加微小肿瘤检出率、减少手术切缘肿瘤组织残存率。同时,可根据术中荧光成像显示的肿瘤边界和肿瘤侵袭情况判断患者的预后。van Dam 等^[17]针对晚期卵巢上皮癌开展术中体内荧光成像辅助确定手术切除边缘;根据 90%~95%的卵巢上皮癌表达叶酸受体(folate receptor- α , FR- α),而正常卵巢上皮和卵巢良性肿瘤不表达的特点,将叶酸与异硫氰酸荧光素相耦联,以 FR- α 为靶点进行标记,结果表明 FR- α 成像平均 10 min,成像过程不影响手术进程,4 例卵巢上皮癌患者中 3 例成功成像并显示出清晰的肿瘤边界,手术切缘可以精确到 1 mm,另外 5 例卵巢良性肿瘤和 1 例交界性卵巢瘤均不成像。Xin 等^[18]成功地将 PLGA

脂纳米颗粒与 ICG 染料和叶酸有机地结合(简称 FA-RIPNPs),该颗粒平均体积为 92.8 nm,可通过叶酸介导而被细胞内吞,既具备抗肿瘤药物传递作用,也具备肿瘤荧光成像的作用。针对胶质瘤 U87 细胞株进行体外和成瘤后体内研究,表明该颗粒可通过凋亡途径发挥 81.4% 的抑瘤效果,同时具备很好的荧光成像作用。Muhanna 等^[19]研究卟啉脂蛋白纳米颗粒的应用价值,将纳米粒子与光动力治疗法相结合,成功地将鼠头颈鳞癌肿瘤模型肿瘤细胞的凋亡率从 7.1% 提高至 73.2%,达到治疗的目的。

3 光学分子影像学技术在肿瘤预后判断中的应用

Miyashiro 等^[20]将荧光探针靛青绿(diagno-green, ICG)通过内镜穿刺方法注射到 3 例胃癌患者肿瘤周边组织,成像发现 3 例患者尚未发生前哨肿瘤淋巴结转移,且术后随访证实患者均无淋巴结转移,表明荧光探针 ICG 具有较好的治疗指导和预后判断的作用。Manny 等^[21]对 60 例前列腺癌患者进行荧光增强自动前列腺根治切除术(fluorescence-enhanced robotic radical prostatectomy, FERRP),先向每叶前列腺注射荧光 ICG,10 min 后可清晰看到前列腺发出明亮的绿色荧光,而闭孔神经、血管束和精囊均未见荧光;30 min 后可见前哨淋巴结发出荧光。FERRP 在注射荧光物质后特定时间内可有效识别前列腺癌组织并指导手术,保护尿道末端神经血管束,提高手术的安全性。

Muhanna 等^[19]采用 VX2 兔口腔癌模型研究卟啉脂蛋白纳米颗粒的应用价值,通过该纳米颗粒的靶向标记,荧光成像和 PET/CT 均可清晰地观察到从肿瘤原发灶至局部淋巴结的转移路径,并可识别未知的复发肿瘤灶,有助于判断口腔癌的预后。Atallah 等^[22]成功地建立裸鼠原发性头颈鳞状细胞癌,采用近红外成像手术引导设备对裸鼠的肿瘤进行手术切除,实验组和对照组的裸鼠肿瘤分级无显著差异,近红外成像的探针靶点是癌细胞高表达的整合素 $\alpha_v\beta_3$ 。通过近红外成像监测,肿瘤残余体积小于 185 μm ,术后随访分析表明裸鼠的无瘤生存率比对照组高 50%。

4 光学分子影像学技术在肿瘤复发监测的应用

Yumoto 等^[23]利用亲脂性荧光染料 DiD 标记前列腺癌细胞株,采用流式细胞仪筛选高表达 DiD 和低表达 DiD 的癌细胞,发现低表达 DiD 癌细胞的有丝分裂指数相对更高,且发现 DiD 对正常细胞代谢、生长和凋亡均无影响。因此,利用 DiD 荧光染料可探索前列腺癌细胞休眠机制、识别其潜在的复发倾向。Chan

等^[24]采用 ICG 成像监测鼻咽癌复发部位的前哨淋巴结。在复发肿瘤周边注射 5 mg ICG 溶液并实时观察周边淋巴结成像,成像时间平均为 288 s,并对成像的淋巴结实施切除;5 例患者共 9 个前哨淋巴结被识别和切除,其中 3 例患者的淋巴结被证实有肿瘤细胞浸润,表明利用 ICG 成像技术监测鼻咽癌复发是可行的。Mueller 等^[25]研发出一种定量可视显微工具,吖啶黄荧光染料可与核酸结合,易于结合肌肉纤维和胶原。该团队针对 34 只鼠肉瘤模型开展研究,在局部肉瘤组织被切除后的空洞部位进行成像验证,8 只鼠在短时间内死亡,余 26 只中 9 只局部复发;结果表明荧光成像检测手段预测复发的敏感度为 78%,特异度为 82%;而使用病理手段预测局部复发的敏感度仅为 29%,特异度为 71%,提示使用定量可视显微手段监测肉瘤复发是一种有效的手段。

5 小结与展望

光学分子影像学技术发展迅速,荧光染料和荧光纳米探针正在广泛应用于临床前研究,针对不同的肿瘤模型和特定的肿瘤生物学状态设计靶向探针成像体系,在肿瘤早期诊断方面显示出其他技术手段不可替代的优势。此外,荧光成像在手术中肿瘤边界定位方面展示出强大的优势,不仅可帮助术者定位肿瘤原发灶的清晰边界,还可辅助发现淋巴道转移的轨迹,指导术者进行淋巴结清扫或保留。光学分子影像学技术在肿瘤靶向治疗、预后分析和监测复发等方面也发挥着重要的作用。但光学分子影像学技术仍存在一些不足,如探针发出的波长范围固定,无法适用于所有肿瘤的检测,光学分子探针与靶点结合时存在非特异性结合,虽然敏感度较高,但导致其特异度降低,仍需深入研究并改进。总之,分子影像学技术的持续发展和临床转化将是实现肿瘤精准治疗的重要途径。

【参考文献】

- [1] Fazel J, Rötzer S, Seidl C, et al. Fractionated intravesical radio-immunotherapy with ^{213}Bi -anti-EGFR-MAb is effective without toxic side-effects in a nude mouse model of advanced human bladder carcinoma. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16(10):1526-1534.
- [2] 唐琴,朱深银,常淑芳,等.两种相变型多功能纳米粒的制备及体外特性比较. *中国介入影像与治疗学*, 2016, 13(10):636-641.
- [3] Napp J, Pardo LA, Hartung F, et al. In vivo imaging of tumour xenografts with an antibody targeting the potassium channel Kv10.1. *Eur Biophys J*, 2016, 45(7):721-733.
- [4] 夏雷,全姬善,朴永男,等.超顺磁性氧化铁纳米粒子在肝癌诊断与治疗中的研究进展. *中国医学影像技术*, 2016, 32(7):

- 1135-1138.
- [5] Cheng H, Chi C, Shang W, et al. Precise integrin-targeting near-infrared imaging-guided surgical method increases surgical qualification of peritoneal carcinomatosis from gastric cancer in mice. *Oncotarget*, 2017, 8(4):6258-6272.
 - [6] Kijanka MM, van Brussel AS, van der Wall E, et al. Optical imaging of pre-invasive breast cancer with a combination of VHHs targeting CAIX and HER2 increases contrast and facilitates tumour characterization. *EJNMMI Res*, 2016, 6(1):1-14.
 - [7] 申宝忠. 分子影像学. 北京: 人民卫生出版社, 2010:122-133.
 - [8] Burggraaf J, Kamerling IM, Gordon PB, et al. Detection of colorectal polyps in humans using an intravenously administered fluorescent peptide targeted against Met. *Nat Med*, 2015, 21(8):955-961.
 - [9] Wang Y, Zhou K, Huang G, et al. A broad nanoparticle-based strategy for tumor imaging by nonlinear amplification of microenvironment signals. *Nat Mater*, 2014, 13(2):204-212.
 - [10] Suemizu H, Kawai K, Higuchi Y, et al. A Versatile technique for the in vivo imaging of human tumor xenografts using near-infrared fluorochrome-conjugated macromolecule probes. *PLoS One*, 2013, 8(12):1-12.
 - [11] Edgington LE, Verdoes M, Bogoy M. Functional imaging of proteases: Recent advances in the design and application of substrate-and activity-based probes. *Curr Opin Chem Biol*, 2011, 15(6):798-805.
 - [12] Liu T, Luo S, Wang Y, et al. Synthesis and characterization of a glycine-modified heptamethine indocyanine dye for in vivo cancer-targeted near-infrared imaging. *Drug Des Devel Ther*, 2014, 8:1287-1297.
 - [13] Cui Y, Zhang C, Luo R, et al. Noninvasive monitoring of early antiangiogenic therapy response in human nasopharyngeal carcinoma xenograft model using MRI with RGD-conjugated ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine*, 2016, 11:5671-5682.
 - [14] 唐琪, 苏丹柯, 金观桥, 等. RGD 双模态探针分子影像学研究进展. *中国介入影像与治疗学*, 2016, 13(9):576-579.
 - [15] Moore SJ, Hayden Gephart MG, Bergen JM, et al. Engineered knottin peptide enables noninvasive optical imaging of intracranial medulloblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(36):14598-14603.
 - [16] 田捷, 董迪, 惠辉, 等. 光学分子影像关键技术及应用研究. *科研信息化技术与应用*, 2016, 7(2):48-65.
 - [17] van Dam GM, Themelis G, Crane LM, et al. Intraoperative tumorspecific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor- α targeting: First-in-human results. *Nat Med*, 2011, 17(10):1315-1319.
 - [18] Xin Y, Liu T, Yang C. Development of PLGA-lipid nanoparticles with covalently conjugated indocyanine green as a versatile nanoplatfrom for tumor-targeted imaging and drug delivery. *Int J Nanomedicine*, 2016, 11:5807-5821.
 - [19] Muhanna N, Cui L, Chan H, et al. Multimodal image-guided surgical and photodynamic interventions in head and neck cancer: From primary tumor to metastatic drainage. *Clin Cancer Res*, 2016, 22(4):961-970.
 - [20] Miyashiro I, Miyoshi N, Hiratsuka M, et al. Detection of sentinel node in gastric cancer surgery by indocyanine green fluorescence imaging: Comparison with infrared imaging. *Ann Surg Oncol*, 2008, 15(6):1640-1643.
 - [21] Manny TB, Patel M, Hemal AK. Fluorescence-enhanced robotic radical prostatectomy using real-time lymphangiography and tissue marking with percutaneous injection of unconjugated indocyanine green: The initial clinical experience in 50 patients. *Eur Urol*, 2014, 65(6):1162-1168.
 - [22] Atallah I, Milet C, Henry M, et al. Near-infrared fluorescence imaging-guided surgery improves recurrence-free survival rate in novel orthotopic animal model of head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 2016, 38(Suppl 1):E246-E255.
 - [23] Yumoto K, Berry JE, Taichman RS, et al. A novel method for monitoring tumor dormancy using fluorescent dye DiD. *Cytometry A*, 2014, 85(6):548-555.
 - [24] Chan JY, Tsang RK, Wong ST, et al. Indocyanine green fluorescence mapping of sentinel lymph node in patients with recurrent nasopharyngeal carcinoma after previous radiotherapy. *Head Neck*, 2015, 37(12):E169-E173.
 - [25] Mueller JL, Fu HL, Mito JK, et al. A quantitative microscopic approach to predict local recurrence based on in vivo intraoperative imaging of sarcoma tumor margins. *Int J Cancer*, 2015, 137(10):2403-2412.

致谢

科研工作的顺利完成离不开他人的帮助,在正文的最后应向对本研究提供过帮助的人致以谢意。致谢的对象包括:对研究工作提出指导性建议者,论文审阅者,资料提供者,技术协作者,帮助统计者,为本文绘制图表者,提供样品、材料、设备以及其他方便者。

致谢必须实事求是,应防止剽窃掠美之嫌,也勿强加于人,如未经允许写上专家、教授的名字,以示审阅来抬高自己。致谢一般要说明被谢者的工作的内容,如“技术指导”、“收集资料”、“提供资料”等。