

· 论著 ·

双光子显微成像技术在胃癌中的研究*

1. 北京大学深圳医院消化内科 (广东 深圳 518036)

2. 安徽医科大学 (安徽 合肥 230031)

凌 艳¹ 李 曦¹ 何兴桢²

【摘要】目的 胃癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,内镜是诊断胃癌的主要手段,但仍有缺陷,有必要寻找一条安全和准确的检查方法。方法 选取2015年5月至2017年6月在我院行内镜检查胃癌和正常对照组各20例,采用双光子荧光显微技术对胃癌患者和对照组进行研究,以明确这种无创技术对胃癌疾病诊断的意义。结果 胃癌组和对照组双光子荧光显微成像无论在腺体结构和细胞形态上均有显著差异。结论 双光子荧光显微成像技术在一定程度上有助于胃癌的诊断。

【关键词】胃癌;双光子显微成像技术

【中图分类号】R735.2

【文献标识码】A

【基金项目】深圳市医疗卫生三名工程,项目编号:SZSM201512034,北京大学第三医院张洪君主任护理团队;深圳市科技计划项目,JCYJ20150403091443326

DOI: 10.3969/j.issn.1009-3257.2018.04.009

The Value of Two-photon Excitation Fluorescence Imaging in Diagnosis of Gastric Cancer*

LING Yan, LI Xi, HE Xing-zhen. Department of Gastroenterology, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen 518036, Guangdong Province, China

【Abstract】Objective Gastric cancer (GC) is one of the most common malignant tumors in the world. Endoscopy is the main method for the diagnosis of gastric cancer. But it also has some defects. It is necessary to find a more safer and more accurate examination method. Methods 20 GC patients and 20 healthy volunteers were involved. These people underwent gastroscopy in our hospital during May 2015 to June 2017. Two-photon excitation fluorescence imaging was used to observe value of this technique in diagnosis of gastric cancer. Results There were significant differences between the two groups in both the structure and cellular morphology of the gastric cancer group and the control group. Conclusion Two-photon excitation fluorescence imaging is helpful for the diagnosis of gastric cancer

【Key words】Gastric Cancer; Two-photon Excitation Fluorescence Imaging

胃癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,是危害全世界人类健康的重大疾病,其病死率在癌症患者中高居第二位。在中国,胃癌病死率仍呈现逐年上升趋势^[1-2]。其发病率和死亡率仍居各类恶性肿瘤前列。通过胃镜取得组织进行病理检查是目前诊断胃部良恶性疾病的最重要方法,被认为是金标准。但是胃镜在诊断胃部疾病过程中仍然存在以下的缺点,比如少数患者会因为活检而引起胃大出血,还有部分患者内镜考虑肿瘤,但活检未取到肿瘤组织,需反复多次取活检,增加病人痛苦。因此有必要寻找一条安全和准确的检查方法,从而更好的帮助临床医生明确诊断。我们拟采用双光子显微技术对胃癌患者进行研究,以明确这种无创技术未来是否能够有助于胃癌疾病诊断。

1 材料和方法

1.1 病例收集 选取2015年5月至2017年6月在我院行内镜检查胃癌和正常对照组各20例,胃癌患者选择:内镜下诊断胃癌并且最终经过通过活检或手术取得胃癌组织,病理诊断明确为胃腺癌的20名患者(男14,女6),平均年龄(64.8±7.6)岁;健康者选择:在我院行内镜检查,内镜正常,无患其他严重器质性疾病,且病理诊断正常的患者20名(男11,女9),平均年龄(49.7±10.0)岁。

1.2 实验方法 我们采用自行搭建的双光子显微成像系统进行人体组织的离体双光子成像研究。该系统采用钛蓝宝石飞秒激光器作为激发光源,激发波长选择750nm。激发光通过一对检流计振镜栅

作者简介:凌 艳,女,护理专业,主管护师,主要研究方向:消化内科

通讯作者:李 曦

格式扫描样本平面实现成像,扫描区域大小设置为 $256\mu\text{m}\times 256\mu\text{m}$ 或 $360\mu\text{m}\times 360\mu\text{m}$ 。具体来讲,经过检流计振镜的激发光在通过二向色镜(FF685-Di02, Semrock Inc.)之后,由一个1.0NA的水浸物镜(XLUMPLFLN 20X, Olympus)聚焦到样本上。激发出的双光子激发荧光和二次谐波信号被同一物镜所收集。接着,TPEF/SHG信号经上述二向色镜反射之后,与激发光分离,然后通过一个680nm的短通滤光片(FF01-680/SP-25, Semrock Inc.)消除掉残余的激发光。之后,系统通过光纤束对TPEF/SHG信号进行收集并将其耦合进光谱仪中。光谱仪采用线阵式光电倍增管(photomultiplier tube, PMT)作为探测器,能够记录16个连续的光谱波段,总体光谱探测范围为350~550nm,间隔为12.5nm。因此,该系统可以同时探测TPEF和SHG信号,并通过不同的光谱探测通道实现两者的分离。最后,PMT收集到的信号输入数据采集卡中进行图像重建、显示和存储。此外,系统中采用一个安装在物镜上的步进马达实现深度扫描成像,深度间隔设置为 $5\mu\text{m}$ 。

实验中,我们将样品置于一个自制的透明浅槽中,并加入生理盐水将其淹没,再盖上盖玻片,然后将其置于物镜下方的三维可调节载物台上,调整好位置后通过上述系统进行成像。

我们采用双光子显微成像系统对组织标本每间隔设置为 $5\mu\text{m}$ 扫描成像,进行了分别观测了 $20\mu\text{m}$ 以内, $20\sim 100\mu\text{m}$,大于 $100\mu\text{m}$ 扫描成像特点,并观察了正常和肿瘤标本细胞和组织的成像形态学特点。通过对正常和肿瘤组双光子显微成像形态学结果进行判断,并且与最终病理诊断结果进行比较。

2 结 果

我们采用双光子显微成像系统进行人体胃肠组织的离体双光子成像研究,观察了20例患者和健康者使用该显像系统的观测特点:深度在 $15\mu\text{m}$ 以内92.5%(37/40)的成像清晰度较高,可以较清楚地分辨细胞和腺体结构。少部分显像不清楚,可能由于活检对组织的损伤有关。 $20\sim 100\mu\text{m}$ 成像显示90%(36/40)腺体结构显示清晰,但有一部分细胞可分辨,一部分细胞形态不清晰。 $100\mu\text{m}\sim 200\mu\text{m}$ 以下大致分辨腺体结构,但80%(32/40)显像可见多数细胞形态无法非常清楚观察到。

对照组双光子显微成像特点细胞大小较均一

(100%, 20/20),腺体结构完整,大小正常,光滑且清晰(95%, 19/20)。有1例腺体结构不完整,但细胞大小正常,不排除与取活检时对组织结构损伤有关。肿瘤组双光子显微成像特点,细胞大小明显不均一占95%(19/20),所有肿瘤组均有腺管变形,结构消失,或不规则结构(100%, 20/20)。结果正常组腺体结构正常比例显著高于肿瘤组($P<0.05$)。通过了解双光子显像特点的医生观察双光子显微成像成像图片,发现使用双光子显微成像成像对区分正常胃粘膜和胃癌与病理最终符合率达到100%。

3 讨 论

双光子显微成像技术是非线性显微成像技术的一种,它是基于光学的双光子荧光的非线性效应建立的。由于双光子非线性效应对激发光的光子密度具有高阶依赖特性,导致只有在焦点处的样品才能被激发出信号,所以双光子显微技术具有与生俱来的“光学切片”功能。同时,由于双光子显微技术使用红外激光作为激发光源,减少了光照对生物组织产生的毒性,并增加了探测深度,所以基于双光子的非线性光学显微技术从诞生之初就被认为是研究早期肿瘤发展机制、诊断与了解肿瘤生理机制的最佳工具之一^[3]。基于双光子显微成像技术在国内外正广泛的用于各种的肿瘤研究,例如皮肤^[4]、口腔^[5]、卵巢^[6]、食道^[7]、乳房^[8]等肿瘤。

我们采用自行搭建的双光子显微成像系统可以较为清楚的对胃癌和胃粘膜正常组织进行成像,可以观察到不同层面细胞大小和腺体结构,从而能够有效帮助胃癌和胃正常组织鉴别。我们发现胃癌组织主要表现为腺体不规则,扭曲,大小不一,细胞及细胞核大小不一,而正常组织表现为腺体规则,细胞及细胞核相当较均一,病理科医生在一定程度上了解胃癌双光子显微成像特点后,便可较容易分辨胃癌和正常组织。该技术除了可以观察到细胞和腺体结构外,还可以观察胶原纤维,弹力纤维,胶原束和血管等。这些也可能对胃癌诊断有重要作用。尽管该技术有许多优势,但是也有不足,比如我们在观察中发现随着深度的加深,细胞清晰度明显降低,尽管腺体的结构仍可大致分辨。部分组织显微成像即使在浅层,仍不清晰。此外,我们选取的胃癌患者均为中或晚期病理提示腺癌的患者,对早期胃癌诊断的有效性还有待进一步评估。

参考文献

- [1] Park JY,von Karsa L,Herrero R.Prevention strategies for gastric cancer: a global perspective[J].Clin Endosc,2014,47(6):478-489.
- [2] 张雯,王金万.胃癌的流行病学及其分型[J].中国全科医学,2010,13(11):16-17.
- [3] Williams,R.M., D.Piston,and W.Webb,Two-photon molecular excitation provides intrinsic 3-dimensional resolution for laser-based microscopy and microphotochemistry[J].The FASEB journal,1994,8(11):804-813.
- [4] Konig, K.,et al.,Clinical application of multiphoton tomography in combination with high-frequency ultrasound for evaluation of skin diseases[J].Journal of Biophotonics,2010,3(12):759-773.
- [5] Skala, M.C.,et al.,In vivo multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2007,104(49): 19494-19499.
- [6] Williams,R.M.,et al.,Strategies for High-Resolution Imaging of Epithelial Ovarian Cancer by Laparoscopic Nonlinear Microscopy[J].Translational Oncology,2010,3(3):181-194.
- [7] Zhuo,S.M.,et al.,Quantitatively linking collagen alteration and epithelial tumor progression by second harmonic generation microscopy[J].Applied Physics Letters,2010,96(21).
- [8] Provenzano,P.P.,et al.,Nonlinear optical imaging and spectral-lifetime computational analysis of endogenous and exogenous fluorophores in breast cancer[J].Journal of Biomedical Optics, 2008,13(3).

【收稿日期】2017-12-01

(上接第 16 页)

- [2] Girardi E,Palmieri F,Cingolani A,et al.Changing clinical presentation and survival in H IV2associated tubercuolsi after highly active antiretroviral therapy[J].J Acquir Immune Defie Syndr,2001,26 (2):326-331.
- [3] Hong SH,Im JG,Lee JS,et al.High resolution CT findings of miliary tuberculosis[J].J Comput Assist Tomogr,1998,22(2):220-224.
- [4] Andreu J,Mauleon S,Pallisa E,et al.Miliary lung disease revisited[J].Curr Probl Diagn Radiol,2002,31(5):189-197.
- [5] World Health Organization.Programmes and Projects. Tuberculosis.Address TB/HIV,MDR/XDR-TB and Other Challenges,2007,Available from: <http://www.who.int/tb/challenges/hiv/facts/en/> [Accessed 3 July 2009].
- [6] Hansell DM,Bankier AA,MacMahon H,et al.Fleischner Society: glossary of terms for thoracic imaging[J]. Radiology,2008,246(3):697-722.
- [7] Lee JY,Lee KS,Jung KJ,et al.Pulmonary tuberculosis: CT andpathologic correlation[J].J Comput Assist Tomogr,2000,24(5): 691-698.
- [8] Sang-Man Jin,Hyun Ju Lee,Eun-Ah Park,et al.Frequency and predictors of miliary tuberculosis in patients with miliary pulmonary nodules in South Korea:A retrospective cohort study[J].BMC Infectious Diseases,2008,16(8):1-7.
- [9] 余卫业,刘艳,朱文科,等.艾滋病合并粟粒性肺结核的临床特点[J].临床肺科杂志,2008,5(13):537-538.

【收稿日期】2018-06-02

(上接第 18 页)

- [8] 吕志阳,高胜利,李源等.心外膜脂肪组织厚度对冠心病的预测价值[J].实用心脑血管病杂志,2015,29(9):82-83,84.
- [9] Tran,T.,Small,G.,Cocker,M. et al.A single slice measure of epicardial adipose tissue can serve as an indirect measure of total epicardial adipose tissue burden and is associated with obstructive coronary artery disease[J].European heart journal cardiovascular Imaging,2014,15(4):423-430.
- [10] Ju-Hye Chung,Beom-June Kwon,Sang-Wook Song et al.Epicardial adipose tissue: relationship between measurement location and metabolic syndrome[J].International journal of cardiovascular imaging,2014,30(1):195-204.
- [11] Chen,W.J.Y.,Danad,I.,Raijmakers,P.G.et al.Effect of type 2 diabetes mellitus on epicardial adipose tissue volume and coronary vasomotor function[J].The American Journal of Cardiology,2014,113(1):90-97.

【收稿日期】2017-08-16