

· 综述 ·

光学分子内窥镜技术在泌尿外科的研究新进展

庞建智¹ 杨晓峰² 王东文²

【摘要】 光学分子内窥镜技术是一种新兴的生物医学影像技术,它以光学分子探针的靶向标记为基础,通过荧光成像来识别可疑病灶和肿瘤组织。相比传统内窥镜,该技术更易发现肉眼难以识别的可疑病灶,并可在图像引导下精确活检和切除。尽管该技术在泌尿外科的应用尚处于起步阶段,但因其具有较高的检测灵敏度、特异性和分辨率,可在细胞和分子水平对靶标实时成像等优点,近年来发展十分迅速。本文综述了光学分子内窥镜诊疗技术在膀胱镜检查、肾部分切除术和根治性前列腺切除术中的发展现状,并对靶向特异性分子探针的研究现状作了简要介绍。

【关键词】 光学分子; 影像; 内窥镜; 泌尿外科

微创外科是指以最小的侵袭或损伤达到最佳外科疗效的一种新的外科技术^[1]。内窥镜、腹腔镜、机器人手术等微创技术不仅是微创外科的重要组成部分,也是泌尿外科疾病诊断与治疗的重要手段。然而,传统的内镜技术是通过白光反射进行成像,只能对病变组织的非特异性变化如表面形态和颜色进行检测,而对病变早期微小或扁平状病灶难以识别^[2]。例如,膀胱镜只能观察膀胱内部结构的表面部分,而对早期病变及深层结构不能有效识别,并且对一些扁平状及微小肿瘤的识别和定位比较困难。在对癌症患者实施腹腔镜手术治疗的过程中,术者只能通过白光反射来区分肿瘤组织和正常组织,这样往往会导致肿瘤组织的不完全切除或者正常组织的过度切除^[3],最终达不到理想的治疗效果。因此,在疾病的早期诊断与治疗方面传统的内镜技术有其固有的局限性。尽管随着3D腹腔镜技术和机器人手术的发展和革新,手术的治疗效果得到了很大的改善^[4],但仍然没有改变术者只能依靠白光反射的视觉效果对病灶进行识别和评估的现状。最新研究表明光学分子影像学技术能够从分子水平靶向识别肿瘤细胞^[5]。为此本文将内窥镜光学成像和内窥镜光学分子成像技术在泌尿外科的研究现状综述如下。

一、光学分子影像学基本原理

光学分子影像技术是一种发展迅速的生物医学影像技术,它可以利用生物自体荧光或外源性荧光示踪剂在细胞和分子水平上对体内特定生物过程进行实时的定性和定量研究^[6]。与磁共振、核素成像等传统影像技术相比,光学分子成像技术具有无创性、实时性和高敏感性等优点。近几年来,光学分子成像技术已经应用于原发灶及转移灶的识别^[7-8]、手术切缘^[9]和组织灌注的评估^[10-11]等术中导航技术的临床前研究中。

二、光学分子影像内窥镜技术

2010年Goetz等^[12]首次将光学分子影像学理论引入消化内窥镜,开启了采用内窥镜技术在分子水平诊断和治疗肿瘤疾病的新时代。光学分子内窥镜技术是一种以光学分子探针的靶向标记为基础,通过荧光成像来实现对可疑病灶和肿瘤组织的识别的手段。相较于传统内窥镜,光学分子内镜检查易于发现肉眼难以识别的可疑病灶,并可在图像引导下精确活检,对提高早期癌的检出率具有重要意义。Muguruma等^[13]对光学分子内窥镜技术的现状和未来进行了全面细致的分析与展望,认为随着敏感性和靶向特异性探针的研究和发展,光学分子内窥镜

DOI :10.3877/cma.j.issn.1674-3253.2015.03.017

基金项目 国家自然科学基金项目(81172444)

作者单位 030001 太原,山西医科大学第一临床医学院泌尿外科¹; 030001 太原,山西医科大学第一医院泌尿外科²

通讯作者 杨晓峰,Email yxfylq@163.com

技术将在许多疾病特别是肿瘤疾病的早期诊断和治疗中发挥重要作用。

三、泌尿系统肿瘤靶向特异性分子探针的研究

目前,应用于泌尿外科研究的荧光示踪剂大多为非靶向特异性分子探针。包括 5-氨基乙酸丙酯(5-Aminolevulinic Acid, ALA)及其酯类衍生物氨基酮戊酸己酯(Hexylaminolevulinate, HAL)、荧光素、吲哚菁绿(Indocyanine Green, ICG)、金丝桃素等^[14]。此类探针针对靶标缺乏特异性,目标-背景信噪比较低,成像效果较差。因此,一些对靶标具有高特异性及亲和性且作用机制明确的靶向特异性分子探针被广泛研发。此类探针的核心部分为靶向基团,包括抗体、多肽和小分子化合物,而由小分子多肽制备的探针靶向性最为理想,称之为导向肽(homing peptide, HP)。目前,泌尿系统的导向肽见表 1。

Zitzmann 等^[15-16]利用体外噬菌体展示技术筛选得到可与人前列腺癌细胞系 DU-145 特异性结合的多肽 DUP-1,并证明其可与前列腺癌细胞在体内和体外发生有效结合,而与正常细胞结合的亲和力很低。Zhang 等^[17]的研究结果表明导向肽 REA 可与成熟的前列腺癌细胞发生特异性结合,而导向肽 AGR 只与癌前病变组织的淋巴管特异性结合。这使肿瘤疾病超早期诊断成为可能。Zhang 等^[18]采用一珠一肽法制备得到的导向肽 PLZ4 不仅可选择性与膀胱移行细胞癌细胞系结合,并且可与人源原发性膀胱癌细胞发生特异性结合。临床试验表明,PLZ4 可与膀胱癌患者尿液中的肿瘤细胞发生特异性结合,而不与正常的尿路上皮细胞结合。膀胱肿瘤导向肽 NS 具有类似的研究结论^[19]。赵扬等^[20]制备了以 NS 为载体的异硫氰酸荧光素-六氨基己酸-CSNRDARRC 光学分子探针(fluorescein isothiocyanate-6 aminocaproic acid-CSNRDARRC probe, FIuo-ACP),经实验表明 FIuo-ACP 与膀胱肿瘤细胞的结合率与探针剂量线性相关、与膀胱肿瘤的恶性程度成正比。FIuo-ACP 尿液脱落细胞学检测技术已经应用到膀胱肿瘤的无创诊断和随访中^[21]。同时,本研究小组筛选获得中国人 BIU-87 浅表性膀胱肿瘤细胞系的肿瘤导向肽

CSSPIGRHC,初步研究表明该导向肽靶向性和特异性更强。随着内窥镜荧光成像技术在泌尿外科应用中的不断研究与发展,肿瘤靶向特异性分子探针,特别是导向肽将具有显著的临床使用价值。

四、内窥镜荧光成像技术在泌尿外科的应用

1. 膀胱镜检查

ALA 诱导荧光膀胱镜(亦称光动力学诊断, photodynamic diagnosis, PDD)可以检测到传统膀胱镜不易发现的微小病变、不典型增生和原位癌^[22]。将 PDD 技术应用于经尿道膀胱肿瘤切除术(transurethral resection of bladder tumors, TURBT)中可使膀胱肿瘤组织切除更加彻底,减少肿瘤残余,有效降低肿瘤的复发率和进展速度,提高无瘤生存期^[23-24]。由于 PDD 的特异性相对较低,假阳性较高^[25],一些克服 ALA 特异性较低, PpIX 降解过快的新技术已经出现。François 等^[26]制备了 ALA 树枝状大分子复合物,这种复合物可减慢 ALA 的水解速度,延长体内存留时间,能够持续合成 PpIX,使荧光持续时间>24 h,而且可使 PpIX 的组织渗透深度增加。这种树枝状大分子复合物可以代替单纯的 ALA 成为一种新的荧光示踪剂。Yan 等^[27]应用纳米沉淀技术制备载有 ALA 的纳米粒子,研究表明 ALA 纳米粒子对膀胱癌细胞有光动力杀伤效应。另有研究认为,利用金丝桃素诊断非肌层浸润性膀胱癌及原位癌的敏感性和特异性均高于 ALA^[28],然而金丝桃素溶于水后会发生聚集而丧失光谱特性和肿瘤特异性。Vandepitte 等^[29]所制备的具有良好水溶性的聚乙烯吡咯烷酮-金丝桃素(PVP-hypericin)可在恶性病灶产生高于良性组织 3.5 倍的聚集,具有更高的肿瘤特异性。因此, PVP- 金丝桃素有望成为一种新的非肌层浸润性膀胱癌的光动力治疗剂。

新的光学成像技术还包括窄谱成像(narrow band imaging, NBI)拉曼光谱(raman spectroscopy, RS),光学相干断层扫描成像(optical coherence tomograph, OCT)共聚焦激光显微内镜(confocal laser endomicroscopy, CLE)和虚拟膀胱镜(virtual cystoscopy, VC)等。但上述成像技术大多基于组织

表 1 前列腺癌和膀胱癌导向肽一览表

| 名称 | 多肽序列 | 长度 | 年份 | 肿瘤类型 | 噬菌体库 | 参考文献 |
|-------|-----------------|----|------|------|-----------|------|
| DUP-1 | FRPNRAQDYNTN | 12 | 2005 | 前列腺 | Ph.D-12 | [15] |
| G1 | IAGLATPGWSHWLAL | 15 | 2006 | 前列腺 | M13-fUSE5 | [16] |
| REA | CREAGRKAC | 9 | 2006 | 前列腺 | CX7C T7 | [17] |
| AGR | CAGRRSAYC | 9 | 2006 | 前列腺 | CX7C T7 | [17] |
| NS | CSNRDARRC | 9 | 2007 | 膀胱 | CX7C T7 | [18] |
| PLZ4 | CQDGRMGFC | 9 | 2012 | 膀胱 | OB0C | [19] |

的病理学改变进行成像,无法对影响肿瘤的蛋白酶等特异分子的活性或相关大分子生物学特性进行显像,因而特异性相对较低,假阳性率较高^[30-33]。例如,将OCT应用于膀胱镜检查可以对膀胱壁浅层结构进行横断面显像,提供肿瘤浸润深度的信息。但炎症病变可能导致OCT检查假阳性,而且其对肌层浸润性膀胱癌的诊断可靠性也有限^[34]。NBI能提供比传统膀胱镜更好的病变成像和灵敏度,但其检测假阳性率较高,能否有效降低肿瘤复发率尚需进一步验证^[35]。VC通过模拟光学膀胱镜并结合计算机技术对可能存在病变的膀胱区域进行横断面图像三维重建,可以无创、快速、高分辨率地诊断膀胱早期病变,但不能诊断扁平的原位癌^[36]。

Pan等^[31]利用异硫氰酸荧光素(FITC)标记抗CD47抗体,将其注入膀胱全切除术后的膀胱标本腔内,用蓝光膀胱镜对感兴趣区进行成像并进行病理学验证。结果表明,蓝光膀胱镜下CD47的检测敏感度和特异度分别高达82.9%和90.5%。认为CD47在非肌层浸润和肌层浸润性膀胱癌的表达相同,可以作为一个检测膀胱癌的标志。

2. 肾部分切除术

肾部分切除术是早期无症状性小肾癌患者的首选治疗手段。然而,术中热缺血时间与术后肾功能损害程度密切相关,肿瘤组织与正常肾实质组织的准确识别是肿瘤能否完全切除并直接影响治疗效果的关键因素^[37]。

Tobis等^[38]将近红外(near infrared, NIR)荧光成像技术应用于机器人辅助肾部分切除术中。术中肿瘤组织及其边缘的荧光强度比正常组织弱,而良性病变(如囊肿)与邻近正常组织的荧光强度相同或较强,然后依次鉴别正常组织中恶性和良性病灶,可实现有效手术切除。尽管NIR荧光成像技术可引导术者较为完整、准确地切除病灶,一定程度上降低了切缘阳性率,但仍需进一步研究和验证。例如,如何对荧光强度进行量化而不仅仅依靠肉眼分辨其强弱以及白光成像的对照研究等。Bjurlin等^[39]对74例肾癌患者行NIR荧光成像辅助机器人肾部分切除术的研究认为,利用NIR成像技术对肿瘤滋养血管和正常组织灌注进行实时成像,可以对肾脏的缺血及灌注情况进行术中实时评估,有效引导术者对肾脏动脉血管的选择性阻断,最大限度的减少肾功能的损害。Harke等^[40]和McClintock等^[41]的研究报道,行NIR荧光成像辅助机器人肾部分切除术可进行选择性肾动脉阻断,实现术中零缺血。该技术安全

有效,能有效降低肾脏热缺血损伤,并可能有助于术后肾功能的保存。

3. 根治性前列腺切除术

根治性前列腺切除术主要用于临床诊断为局限性前列腺癌且预期寿命 ≥ 10 年的患者^[42]。有报道称患者术后尿控情况和勃起功能的恢复与术中膀胱颈尿道末端神经血管束的保护有很大的关联^[43]。

Inoue等^[44]在机器人辅助腹腔镜前列腺根治性切除术中,使用ALA介导的PDD技术对6名患者的22处前列腺手术切缘进行组织活检。结果显示,在体时所有22处活检标本呈荧光阴性,最终的病理检查亦呈荧光阴性,证明该技术能精确引导病灶切除,降低切缘阳性率。Manny等^[45]对60例临床诊断为局限性前列腺癌患者行荧光增强机器人前列腺根治性切除术(fluorescence-enhanced robotic radical prostatectomy, FERRP)。术中向每叶前列腺注射ICG,10 min后可清楚地看到前列腺发出明亮的绿色荧光,而闭孔神经、精囊、输精管和神经血管束未见荧光;30 min后可见前哨淋巴结发出荧光,检测淋巴结转移的灵敏度为100%,特异性为75.4%。研究认为FERRP是安全、有效的,能对尿道末端神经血管束起到一定的保护作用,并可有效识别前列腺癌组织和前哨淋巴结,但对识别淋巴结有无转移并无特异性。

五、光学分子内窥镜技术在泌尿系统应用的前景

内窥镜荧光成像技术大多在组织水平对病灶实现成像,而光学分子内窥镜能够在细胞和分子水平对靶标进行实时成像,具有更高的检测灵敏度、特异性和分辨率。尽管该技术在泌尿系统疾病的研究正处于起步阶段,尚未应用于临床诊断和治疗,但随着肿瘤靶向特异性分子探针研究的不断深入,其在泌尿外科肿瘤的早期诊断和术中准确、完整切除方面将具有巨大的发展潜力和良好的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 王正国. 微创外科新概念[J]. 中华外科杂志, 2002, 40(1): 13-13.
- [2] Ali T, Choyke PL, Kobayashi H. Endoscopic molecular imaging of cancer[J]. Future Oncol, 2013, 9(10): 1501-1513.
- [3] Leblond F, Davis SC, Valdés PA, et al. Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: Review of instruments, methods and applications[J]. J Photochem Photobiol B, 2010, 98(1): 77-94.
- [4] 梁朝朝, 周骏. 3D腹腔镜技术在泌尿外科的初步应用[J/CD]. 中华腔镜泌尿外科杂志:电子版, 2013, 7(6): 413-414.
- [5] Chen ZY, Wang YX, Yang F, et al. New researches and application

- progress of commonly used optical molecular imaging technology [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014:429198.
- [6] 石立兴, 张继武. 光学分子影像学及其应用[J]. 中国医学影像技术, 2008, 24(12): 2024-2026.
- [7] Bouvet M, Hoffman RM. Glowing tumors make for better detection and resection[J]. Sci Transl Med, 2011, 3(110): 110fs10.
- [8] Sakurai T, Endo M, Shimizu K, et al. Axillary reverse mapping using fluorescence imaging is useful for identifying the risk group of postoperative lymphedema in breast cancer patients undergoing sentinel node biopsies[J]. J Surg Oncol, 2014, 109(6): 612-615.
- [9] Nguyen QT, Olson ES, Aguilera TA, et al. Surgery with molecular fluorescence imaging using activatable cell-penetrating peptides decreases residual cancer and improves survival [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(9): 4317-4322.
- [10] Mücke T, Reeps C, Wolff KD, et al. Objective qualitative and quantitative assessment of blood flow with near-infrared angiography in microvascular anastomoses in the rat model [J]. Microsurgery, 2013, 33(4): 287-296.
- [11] Jafari MD, Lee KH, Halabi WJ, et al. The use of indocyanine green fluorescence to assess anastomotic perfusion during robotic assisted laparoscopic rectal surgery [J]. Surg Endosc, 2013, 27(8): 3003-3008.
- [12] Goetz M, Wang TD. Molecular imaging in gastrointestinal endoscopy[J]. Gastroenterology, 2010, 138(3): 828-833 e1.
- [13] Muguruma N, Miyamoto H, Okahisa T, et al. Endoscopic molecular imaging: status and future perspective [J]. Clin Endosc, 2013, 46(6): 603-610.
- [14] van den Berg NS, van Leeuwen FW, van der Poel HG. Fluorescence guidance in urologic surgery [J]. Curr Opin Urol, 2012, 22(2): 109-120.
- [15] Zitzmann S, Mier W, Schad A, et al. A new prostate carcinoma binding peptide (DUP-1) for tumor imaging and therapy[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(1): 139-146.
- [16] Newton-northup JR, Figueroa SD, Quinn TP, et al. Bifunctional phage-based pretargeted imaging of human prostate carcinoma[J]. Nucl Med Biol, 2009, 36(7): 789-800.
- [17] Zhang L, Giraudo E, Hoffman JA, et al. Lymphatic zip codes in premalignant lesions and tumors [J]. Cancer Res, 2006, 66(11): 5696-5706.
- [18] Zhang H, Aina OH, Lam KS, et al. Identification of a bladder cancer-specific ligand using a combinatorial chemistry approach [J]. Urol Oncol, 2012, 30(5): 635-645.
- [19] Lee SM, Lee EJ, Hong HY, et al. Targeting bladder tumor cells in vivo and in the urine with a peptide identified by phage display[J]. Mol Cancer Res, 2007, 5(1): 11-19.
- [20] 赵扬, 杨晓峰, 郝小强. 多肽 CSNRDARRC 与膀胱癌细胞结合亲和性及其位点的研究[J]. 现代泌尿生殖肿瘤杂志, 2011, 3(2): 105-107.
- [21] Jia XY, Yu Q, Zhang ZH, et al. Targeting bladder tumor cells in voided urine of Chinese patients with FITC-CSNRDARRC peptide ligand[J]. Onco Targets Ther, 2012, 5: 85-90.
- [22] 韦荣超, 吴承耀, 张振声, 等. 膀胱镜检查在膀胱癌诊断的研究进展[J]. 第二军医大学学报, 2012, 33(11): 1257-1259.
- [23] Hungerhuber E, Stepp H, Kriegmair M, et al. Seven years' experience with 5-aminolevulinic acid in detection of transitional cell carcinoma of the bladder[J]. Urology, 2007, 69(2): 260-264.
- [24] Kausch I, Sommerauer M, Montorsi F, et al. Photodynamic diagnosis in non-muscle-invasive bladder cancer: a systematic review and cumulative analysis of prospective studies [J]. Eur Urol, 2010, 57(4): 595-606.
- [25] Otto W, Burger M, Fritsche HM, et al. The enlightenment of bladder cancer treatment: origin and progress of photodynamic diagnosis[J]. Future Oncol, 2011, 7(9): 1057-1066.
- [26] François A, Battah S, MacRobert AJ, et al. Fluorescence diagnosis of bladder cancer: a novel in vivo approach using 5-aminolevulinic acid (ALA) dendrimers[J]. BJU Int, 2012, 110(11 Pt C): E1155-E1162.
- [27] Yan X, Al-hayek S, Huang H, et al. Photodynamic effect of 5-aminolevulinic acid-loaded nanoparticles on bladder cancer cells: a preliminary investigation [J]. Scand J Urol, 2013, 47(2): 145-151.
- [28] Sim HG, Lau WKO, Olivo M, et al. Is photodynamic diagnosis using hypericin better than white-light cystoscopy for detecting superficial bladder carcinoma [J]? BJU Int, 2005, 95(9): 1215-1218.
- [29] Vandepitte J, Van CB, Hettinger K, et al. Biodistribution of PVP-hypericin and hexaminolevulinate-induced PpIX in normal and orthotopic tumor-bearing rat urinary bladder [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2011, 67(4): 775-781.
- [30] Lerner SP, Goh A. Novel endoscopic diagnosis for bladder cancer [J]. Cancer, 2014, Aug 5. doi: 10.1002/cncr.28905, [Epub ahead of print].
- [31] Pan Y, Volkmer JP, Mach KE, et al. Endoscopic molecular imaging of human bladder cancer using a CD47 antibody [J]. Sci Transl Med, 2014, 6(260): 260ra148.
- [32] Von RFC, Lerner SP. New imaging techniques for nonmuscle invasive bladder cancer [J]. Curr Opin Urol, 2014, 24(5): 532-539.
- [33] 杨晓峰, 王东文. 内镜下膀胱肿瘤光学成像诊疗新技术的研究进展[J]. 中华泌尿外科杂志, 2013, 34(7): 550-552.
- [34] 王磊, 王珏. 新型膀胱肿瘤光学诊断技术研究进展[J]. 现代泌尿外科杂志, 2013, 18(2): 201-203.
- [35] Naselli A, Introini C, Bertolotto F, et al. Feasibility of transurethral resection of bladder lesion performed entirely by means of narrow-band imaging[J]. J Endourol, 2010, 24(7): 1131-1134.
- [36] Qu X, Huang X, Wu L, et al. Comparison of virtual cystoscopy and ultrasonography for bladder cancer detection: a meta-analysis [J]. Eur J Radiol, 2011, 80(2): 188-197.
- [37] Springer C, Hoda MR, Fajkovic H, et al. Laparoscopic vs open partial nephrectomy for T1 renal tumours: evaluation of long-term oncological and functional outcomes in 340 patients [J]. BJU Int, 2013, 111(2): 281-288.
- [38] Tobis S, Knopf JK, Silvers C, et al. Robot-assisted and laparoscopic partial nephrectomy with near infrared fluorescence imaging[J]. J Endourol, 2012, 26(7): 797-802.

- [39] Bjurlin MA, Gan M, McClintock TR, et al. Near-infrared fluorescence imaging: emerging applications in robotic upper urinary tract surgery[J]. Eur Urol, 2014, 65(4): 793-801.
- [40] Harke N, Schoen G, Schiefelbein F, et al. Selective clamping under the usage of near-infrared fluorescence imaging with indocyanine green in robot-assisted partial nephrectomy: a single-surgeon matched-pair study[J]. World J Urol, 2013, 32(5): 1259-1265.
- [41] McClintock TR, Bjurlin MA, Wysock JS, et al. Can selective arterial clamping with fluorescence imaging preserve kidney function during robotic partial nephrectomy[J]? Urology, 2014, 84(2): 327-332.
- [42] 王东文, 蔺学铭. 根治性前列腺切除术中保护尿控功能的理论与实践[J]. 现代泌尿外科杂志, 2011, 16(6): 483-486, 504.
- [43] Lowe BA. Preservation of the anterior urethral ligamentous attachments in maintaining post-prostatectomy urinary continence: a comparative study [J]. J Urol, 1997, 158 (6), 2137-2141.
- [44] Inoue K, Ashida S, Fukuhara H, et al. Application of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic diagnosis to robot-assisted laparoscopic radical prostatectomy [J]. Urology, 2013, 82(5): 1175-1178.
- [45] 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[J]. Eur Urol, 2014, 65(6): 1162-1168.

(收稿日期 2014-09-26)

(本文编辑 阮星星 李文标)

庞建智, 杨晓峰, 王东文, 等. 光学分子内窥镜技术在泌尿外科的研究新进展[J/CD]. 中华腔镜泌尿外科杂志: 电子版, 2015, 9(3): 220-224.