

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2001.05.13

血卟啉单甲醚激光诱发荧光光谱区分肺癌组织和正常支气管组织

王伟 孙玉鸮 周乃康 李辉 郑梦利 李峻亨 刘小兵

【摘要】 目的 探讨应用国产新型光敏剂血卟啉单甲醚(HMME)激光诱发荧光光谱分析方法诊断肺癌的可行性。方法 15例肺癌患者肺切除前3小时静脉注射HMME 2.5 mg/kg,使用三倍频YAG激光(波长355 nm)和光学多道分析仪(OMA)对切除的癌组织和正常支气管组织行激光诱发荧光光谱测定。43个检测点均行病理检查。结果 15例患者术后48小时后接受阳光照射,无一例发生皮肤光过敏副作用。肺癌组织的荧光强度($31\,446 \pm 5\,017$)显著低于正常支气管组织($75\,430 \pm 8\,908$) ($P < 0.001$)。正常支气管组织光谱在长波段580~600 nm处有一个小坪($I_{580\text{nm}}/I_{600\text{nm}} = 1.081 \pm 0.090$),而肺癌组织则平滑下降($I_{580\text{nm}}/I_{600\text{nm}} = 1.260 \pm 0.157$)。肺癌组织于 $623.4 \text{ nm} \pm 1.6 \text{ nm}$ 处有一明显的特征峰(即药物峰)。以 $I_{580\text{nm}}/I_{600\text{nm}}$ 比值为判据,诊断肺癌的敏感性、特异性和符合率分别为80.0%、73.9%和76.7%;以药物峰斜率为判据,诊断肺癌的敏感性、特异性和诊断符合率分别为95.0%、91.3%和93.0%。结论 新型光敏剂血卟啉单甲醚(HMME)激光诱发荧光光谱能够区分肺癌和正常支气管组织,与激光诱发自体荧光相比,能够提高诊断肺癌的敏感性、特异性和符合率。

【关键词】 血卟啉单甲醚 激光诱发荧光 光谱 肺肿瘤 判据

【中图分类号】 R734.2

Spectroscopic differentiation between normal bronchial and lung cancer tissues by laser-induced fluorescence (LIF) with intravenous injection of hematoporphyrin monomethyl ether (HMME) * WANG Wei, SUN Yu'e, ZHOU Naikang, LI Hui, ZHENG Mengli, LI Junheng, LIU Xiaobing. * Department of Thoracic Surgery, Naval General Hospital of PLA, Beijing 100037, P. R. China

【Abstract】 Objective To study the feasibility of laser-induced fluorescence (LIF) spectroscopy with intravenous injection of a new agent, hematoporphyrin monomethyl ether (HMME), in the diagnosis of lung cancer. **Methods** Fifteen patients with lung cancer were administrated HMME 2.5 mg/kg intravenously three hours before lobectomy. Surgical specimens were collected for examination of LIF spectrum. The LIF spectra of normal bronchial and lung cancer tissues were measured with a detecting system which consists of an YAG laser (wavelength 355 nm) and an optical multichannel analyzer (OMA). The pathological examination was performed in each specimen. **Results** The fluorescence intensity of the lung cancer tissues ($31\,446 \pm 5\,017$) was much lower than that of the normal bronchial tissues ($75\,430 \pm 8\,908$) ($P < 0.001$). There was a flat spectrum in the normal bronchial tissues at the wavelength from 580 to 600 nm ($I_{580\text{nm}}/I_{600\text{nm}} = 1.081 \pm 0.090$), but the cancer tissue spectrum showed a smoothly descending profile ($I_{580\text{nm}}/I_{600\text{nm}} = 1.260 \pm 0.157$). A remarkable characteristic peak (drug peak) located at the $623.4 \text{ nm} \pm 1.6 \text{ nm}$ in the lung cancer spectrum. Using the criterion of $I_{580\text{nm}}/I_{600\text{nm}}$, the sensitivity, specificity, and accuracy of the diagnosis for lung cancer were 80.0%, 73.9%, and 76.7%, respectively, and were 95.0%, 91.3% and 93.0% respectively according to the criterion of the slope of the drug peak. **Conclusion** The LIF spectroscopy following intravenous injection of the new photosensitizer HMME can differentiate lung cancer from normal bronchus and can increase the sensitivity, specificity and the accuracy comparing to the laser-induced auto fluorescence in the diagnosis of lung cancer.

【Key words】 Hematoporphyrin monomethyl ether, HMME Laser-induced fluorescence, LIF Spectrum
Lung neoplasms Criterion

作者单位:100037 北京 海军总医院胸外科(王伟、李辉);解放军总医院胸外科(孙玉鸮、周乃康、郑梦利);激光科(李峻亨);病理科(刘小兵)

激光诱发荧光(LIF)诊断恶性肿瘤有两种方法,即激光诱发自体荧光(laser-induced autofluorescence, LIAF)和激光诱发药物荧光(laser-induced drug fluorescence,

LIDF)^[1,2]。LIAF 具有无损伤、无副作用、无需服用或注射光敏药物等独特优点,较适于作为临床普查和早期诊断的一种手段^[3,4]。但由于组织自体荧光强度十分微弱,因此在光学多道分析仪使用之前,很难从自体荧光寻找判据,故用自体荧光诊断肿瘤的特异性和准确性相对较低。LIDF 可克服以上自体荧光的缺点,其最大的优势在于肿瘤组织光谱中具有光敏剂的药物峰,即强度明显高于蓝绿色自体荧光的红色特征峰,而正常组织中因光敏剂排泄较快,无特征峰或特征峰强度较弱,故 LIDF 诊断肿瘤的准确性明显高于 LIAF。这是多数作者认为用 LIF 诊断肺癌应使用光敏剂的原因^[5,6]。LIDF 面临的最大问题是光敏剂的光毒副作用。在光动力疗法中广泛应用的光敏剂——血卟啉衍生物(HpD)和光敏素(Photoprin II)具有导致皮肤光过敏的副作用,注射后需避光 4~6 周,故目前应用 HpD 和 Photoprin II 诊断肺癌的已较少。本实验使用新型国产光敏剂血卟啉单甲醚(HMME)对部分离体肺癌标本进行了 LIDF 光谱分析,得出了区分肺癌组织和正常支气管组织的可靠数据,并大大消除了以往血卟啉衍生物(HpD)的光毒副作用,显示了 LIDF 在肺癌诊断中的优越性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 荧光检测系统 激发光源采用北京理工大学光电生物系提供的三倍频 YAG 激光器,波长 355 nm,脉冲宽度 10 ns,单脉冲输出能量 10 mJ,重复频率 5 Hz,以同轴石英光纤传导激光并收集荧光,经多色仪进入多光道分析仪(OMA III),计算机分析计算并存储打印。示意图见参考文献 3。

1.1.2 血卟啉单甲醚(HMME) 由上海第二军医大

学 532 药物研究所提供,纯度 98.04%,生产批号 980225,规格 10 mg/只,10 ml/只。

1.1.3 标本收集 15 例拟行肺叶切除的肺癌患者标本切除前约 3 小时静脉注射 HMME 2.5 mg/kg,标本切除后 1 小时内行荧光光谱测定,术后患者避阳光直射 48 小时。

1.2 方法

1.2.1 荧光光谱收集 测定部位为肿瘤组织和正常支气管壁,每一标本的以上部位至少测定 1 条光谱曲线。15 例标本共测定 43 条曲线。每测定一条光谱曲线后,立即在该部位标记。全部曲线测量完毕后,标本送病理科,在标记处取材,行组织病理学检查。43 个检测点经病理检查证实为癌组织 20 个,正常支气管粘膜 23 个。

1.2.2 数据处理方法 用 Graftool 软件将每条光谱曲线进行峰值归一化处理和平滑化处理,然后计算出每条曲线峰值所在的波长位置、峰值强度、580 nm 和 600 nm 处的荧光强度以及 623 nm 附近的药物峰强度,求其均值及标准差,并用 *t* 检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 HMME 的光敏作用 15 例患者术后 48 小时后接受阳光照射,无一例发生皮肤光过敏。

2.2 肺癌与正常支气管组织自体荧光光谱特征 结果显示每条光谱曲线均包含了自体荧光和药物荧光两种成分。肺癌组织光谱既有自体荧光,又有药物荧光,而大部分正常支气管组织的光谱中无药物峰出现,故仅为自体荧光。自体荧光光谱特征表现在主峰波长、主峰相对荧光强度及 580 nm 和 600 nm 处的荧光强度比方面的差异,肺癌组织和正常支气管组织的比较见表 1。

表 1 15 例患者肺癌与正常支气管组织自体荧光光谱特征($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The regularity of auto-fluorescence of lung cancer and normal bronchus in 15 patients($\bar{x} \pm s$)

Tissue	No. of specimens	Principal peak wavelength(nm)	Fluorescence intensity (a. u.) [△]	I _{580nm} /I _{600nm}
Normal bronchus	23	467.2 ± 4.5	75 430 ± 8 908	1.081 ± 0.090
Lung cancer	20	463.6 ± 4.9	31 446 ± 5 017	1.260 ± 0.157
P value	-	>0.05	<0.001	<0.001

△:The relative fluorescence intensity set up by the OMA system, can be expressed by arbitrary units (a. u.)

2.3 肺癌与正常支气管组织药物荧光光谱特征(图 1) 肺癌于 623.4 nm 处有一明显的特征峰(即药物峰),而正常支气管组织则平滑下降,无特征峰出现。药物峰起始位置为 615.6 nm ± 2.5 nm,峰值位置为

623.4 nm ± 1.6 nm。

2.4 区分肺癌和正常支气管组织的判据

2.4.1 自体荧光判据 以正常支气管、肺癌组织的 I_{580nm}/I_{600nm} 比值均值加、减一倍标准差,分别制定出判

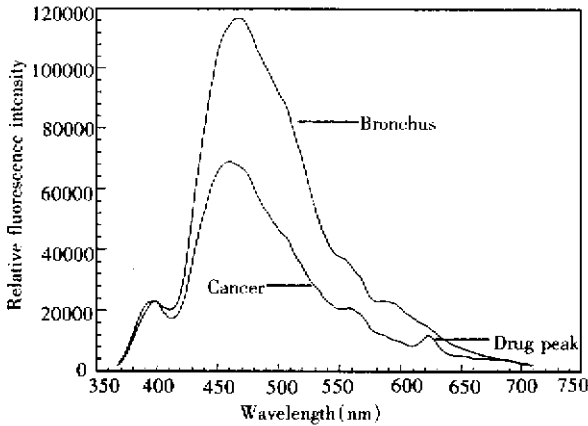


图 1 1 例肺鳞癌患者的正常支气管组织和肺癌组织的激光诱发药物荧光光谱

Fig 1 The laser-induced drug fluorescence spectrum of normal bronchus and lung cancer tissues from a patient with squamous cell carcinoma of the lung

断标准 $S_1 = 1.081 + 0.090 = 1.171$ 、 $S_2 = 1.260 - 0.157 = 1.103$ 。设置 $S = (S_1 + S_2) / 2 = 1.137$ 为区分肺癌组织和正常支气管组织的域值,若 $I_{580nm} / I_{600nm} \geq 1.137$ 则为肺癌, < 1.137 则为正常支气管组织。在经病理证实的 20 例肺癌组织中, $I_{580nm} / I_{600nm} \geq 1.137$ 的有 16 个,在经病理证实的 23 例正常支气管组织中, $I_{580nm} / I_{600nm} < 1.137$ 的有 17 个。由此得出自体荧光判断肺癌的敏感性、特异性和准确性分别为 80.0% (16/20)、73.9% (17/23) 和 76.7% (33/43)。

2.4.2 药物荧光判据 药物峰是曲线在下降过程中形成的一个向上的波峰。由于光敏剂剂量较小或某些病例敏感性不一,使有些药物峰形成较微弱。而斜率是最能表达曲线的升降规律或运行趋势微弱变化的一种方法^[7]。因此我们以 615.6 nm \pm 2.5 nm 处(肺癌组织药物峰起始部位)到 623.4 nm \pm 1.6 nm 处(药物峰值)这一波段的斜率作为判据,若斜率为正值则判断为正常支气管组织,而斜率为负值则判断为肺癌。斜率 = $[(\lambda + K) - \lambda] / K$, $K = 623.4 - 615.6 = 7.8$ (nm),故斜率 = $[(\lambda + 7.8) - \lambda] / 7.8$ 。药物峰斜率为 -0.026 ± 0.030 ,而正常支气管组织相同波段斜率为 0.016 ± 0.008 。在经病理证实的 20 个肺癌组织中,斜率为负值的有 19 个,而在经病理证实的 23 例正常支气管组织中,斜率为正值的有 21 个。由此得出药物荧光判断肺癌的敏感性、特异性和准确性为 95.0% (19/20)、91.3% (21/23) 和 93.0% (40/43)。

2.5 自体荧光判据与药物荧光判据的差别 图 2 是两个判据的散点图,每个组织(检测点)对应的横坐标

为自体荧光判据,而纵坐标为药物荧光判据。图中癌组织(三角)和正常支气管组织(圆圈)均经病理证实,垂直线表示自体荧光判据诊断标准 1.137,水平线为药物荧光判据 0 线。由图中可见,在经病理证实的 20 个肺癌组织中,不符合自体荧光判据 (< 1.137) 的有 4 个,假阴性为 20.0% (4/20);不符合药物荧光判据(正值)的仅有 1 个,假阴性为 5.0% (1/20)。在经病理证实的 23 个正常支气管组织中,不符合自体荧光判据 (≥ 1.137) 的有 6 个,假阳性为 26.1% (6/23);不符合药物荧光判据(负值)的仅有 2 个,假阳性为 8.7% (2/23)。

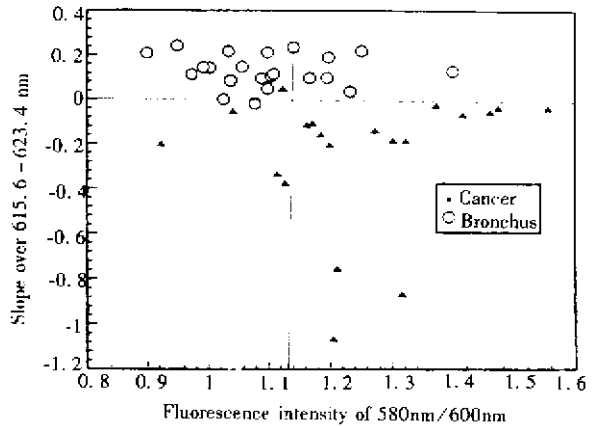


图 2 两种方法所得结果的散点图

Fig 2 Scatter plot of the results according to the two kinds of methods

3 讨论

血卟啉单甲醚 (HMME) 是近几年由第二军医大学研制的一种单体卟啉,为提纯产品,是一种结构明确、肿瘤光动力学效应强、毒性低及单一成分肿瘤光化学诊治剂^[8,9],属国产第三代产品。解放军总医院已将其试用于消化道癌及癩红斑痣的治疗并取得了理想的结果^[10]。本实验是国内首次将其用于肺癌激光诱发荧光诊断的研究上。结果显示患者注药后仅需避光 48 小时,无一例皮肤光过敏副作用的发生,说明了 HMME 避光时间短的优点。

实验证明 15 例患者给药后的检测结果满意。在 20 条肺癌曲线中均出现了 HMME 的药物特征峰。表明 HMME 具有与其它光敏剂相同的特性,即能选择性地吸收并滞留于肺癌组织中,而在正常支气管组织中吸收较少且排泄较快,故在一定时间内肺癌组织中的 HMME 浓度高于周围正常支气管组织, HMME 被特定波长的激光激发后能产生特征性的红色荧光(药物特

征峰),从而使正常支气管组织与肺癌组织区分开来。

为了得到血卟啉单甲醚药物特征峰的最大值,陈文晖等^[8]等做了一系列研究,发现当激发光波长为 395 nm 时,效果最好,此时荧光光谱出现两个很明显的药物峰,主峰位于 620 nm 左右,次峰位于 685 nm 左右(血卟啉衍生物 HpD 的特征双峰一般位于 630 nm 和 690 nm^[11])。由于我们的光谱采集系统采用 355 nm 激光做光源,波长短于 HMME 的最佳激发波长,达不到对此种药物的最大激发效率,故 685 nm 附近的特征峰没有明显的显示,但在 623 nm 左右仍可看到血卟啉单甲醚的特征荧光峰,充分说明了 HMME 用于肺癌诊断的优越性,见图 1。正常支气管组织光谱曲线中无特征峰出现,说明 HMME 在 3 小时内已基本从支气管组织排泄完毕。

从图 1 还可看出,光敏药物对人肺组织的自体荧光光谱特征并不产生影响,因此我们可以利用自体荧光和药物荧光两者同时进行诊断。但是,实验结果表明以药物峰斜率为判据作出的诊断准确性为 93.0%,而以自体荧光 I_{580nm}/I_{600nm} 比值为判据作出诊断的准确性为 76.7%,前者优于后者。

值得指出的是,由于本组样本含量较小,我们无法将两种判据结果的准确性、特异性和敏感性等进行统计学处理,因此本组结果仅能提示药物荧光判据好于自体荧光判据的趋势,这应该在今后的工作中继续积累资料,以得出更为准确和客观的结论。

给药后检测的时间是提高诊断率的另一个重要问题。陈文晖等^[8]研究了 HMME 在荷瘤小鼠体内组织中的分布及肿瘤与不同组织间的分布比,发现给药后 3 小时,药物在肿瘤与骨骼肌、皮肤及肺组织间的分布差距最大。肿瘤/骨骼肌、肿瘤/皮肤和肿瘤/肺组织的分布比分别为 12.2、3.0 和 1.7。因此根据 HMME 静脉注射后 3 小时在肿瘤组织中药物浓度相对较高而正常支气管、肺组织中排泄最多、药物浓度相对较低的药代动力学特性,我们采取静脉注射药物后 3 小时切除标本(预计给药后 1.5 小时开胸)。事实上,由于不同患者切除肿瘤所需的手术时间各有长短,故给药时间不可能正好是 3 小时,这是影响光敏药物特征荧光强弱不一的原因之一。实验中 15 例患者注药后到标本

切除的时间为 (2.99 ± 0.42) 小时。

实验中 15 例患者的给药浓度均为 2.5 mg/kg,是 HMME 治疗剂量的半量。HMME 诊断剂量是否还可加大,以使光敏药物成分的荧光强度增大,从而更利于诊断,这在今后的临床实验中需进一步摸索。

本实验首次将国产新型光敏剂血卟啉单甲醚用于肺癌的荧光诊断研究上,初步证实了 HMME 诊断肺癌是可行的,并证明了 HMME 具有选择性肿瘤吸收浓度高、成分单一、光敏化作用强及避光时间短等优点,是一种理想的肿瘤光化学诊治剂。本实验为国产新药血卟啉单甲醚在肿瘤的 LIDF 诊断及光动力治疗方面提供了参考数据。

参 考 文 献

- 1 王伟,孙玉鹞,李峻亨.激光诱发荧光诊断早期肺癌的研究现状.中国激光医学杂志,1999,4(4):247-249.
- 2 郑蔚,谢树森,陆祖康.用激光荧光法诊断和定位早期肺癌.激光与光电子学进展,1998,1(1):29-40.
- 3 王伟,孙玉鹞,周乃康,等.正常肺、支气管组织与肺癌组织的激光诱发荧光光谱.中国激光医学杂志,2000,3(3):147-149.
- 4 王伟,孙玉鹞,周乃康,等.正常肺组织与肺癌组织的激光诱发自体荧光光谱.中华胸心血管外科杂志,2000,16(4):234-256.
- 5 Anthony DJ, Profio AE, Balchum OJ. Fluorescence spectra in lung with porphyrin injection. Photochem Photobiol, 1989, 69(5):583-586.
- 6 Andersson-Engels S, Elner A, Joansson J, et al. Clinical recordings of laser-induced fluorescence spectra for evaluation of tumour demarcation feasibility in selected clinical specialities. Lasers Med Sci, 1991, 6(7):415-424.
- 7 Ramanujam N, Mitchell F, Mahadevan A, et al. In vivo diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia using 337 nm excited laser induced fluorescence. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(10):10193-10197.
- 8 陈文晖,许德余.血卟啉单甲醚在荷瘤小鼠体内的分布.第二军医大学学报,1990,11(2):118-122.
- 9 许德余,陈文晖,张浩,等.光动力治癌新药血卟啉单甲醚(HMME)的研究.中国激光医学杂志,1993,1(1):3-5.
- 10 顾英,李峻亨,王开,等.血卟啉单甲醚用于光动力疗法治疗癩红斑痣的初步临床研究.中国激光医学杂志,1996,2(2):201.
- 11 Sinaasappel M, Sterenborg HJ. Quantification of the hematoporphyrin derivative by fluorescence measurement using dual-wavelength excitation and dual-wavelength detection. Applied Optics, 1993, 32(4):541-547.

(收稿 2000-10-18 修回 2000-11-28)

(本文编辑 李蓓兰)