

消化系肿瘤内镜下分子成像的研究进展

李方, 李楠

李方, 河北北方学院研究生院 河北省张家口市 075000

李楠, 中国人民解放军第309医院消化内科 北京市 100091

李方, 河北北方学院消化内科研究生, 主要从事消化系肿瘤的
临床及基础研究。

作者贡献分布: 本文综述由李方完成; 李楠审校。

通讯作者: 李楠, 教授, 主任医师, 博士生导师, 100091, 北京
市海淀区黑山扈甲17号, 中国人民解放军第309医院消化内
科. 41183309@qq.com

收稿日期: 2015-06-04

修回日期: 2015-09-14

接受日期: 2015-09-21

在线出版日期: 2015-11-28

Endoscopic molecular imaging of gastrointestinal tumors

Fang Li, Nan Li

Fang Li, Graduate School of Hebei North University,
Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China

Nan Li, Department of Gastroenterology, the 309th
Hospital of Chinese PLA, Haidian District, Beijing 100091,
China

Correspondence to: Nan Li, Professor, Chief Physician,
Department of Gastroenterology, the 309th Hospital of
Chinese PLA, Jia 17 Heishanhu Road, Haidian District,
Beijing 100091, China. 41183309@qq.com

Received: 2015-06-04

Revised: 2015-09-14

Accepted: 2015-09-21

Published online: 2015-11-28

Abstract

In China, the incidence and mortality of

gastrointestinal cancers are high, and early
diagnosis is the key to improving the survival
rate. In recent years, endoscopic molecular
imaging in tumor diagnosis with its unique
advantages has attracted more and more
attention. With the rapid development of
molecular biology, the mechanism of tumor
occurrence and development has been
gradually elucidated. The advent of fluorescent
labeled molecular probes and targeted binding
to molecular targets of gastrointestinal tumors
makes it possible achieve real-time endoscopic
molecular diagnosis of digestive tract tumors,
which has a significant impact on tumor
targeted therapy. In this paper, we review the
progress in endoscopic molecular imaging of
digestive tract tumors.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights
reserved.

Key Words: Digestive tract tumors; Molecular
imaging; Digestive endoscopy

Li F, Li N. Endoscopic molecular imaging of
gastrointestinal tumors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi*
2015; 23(33): 5333-5341 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/5333.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i33.5333>

摘要

在我国, 胃肠道肿瘤发病率和病死率居恶性
肿瘤前列, 早期诊断是提高存活率的关键。
近年来, 内镜下分子成像在肿瘤诊断方面以
其独特的优势受到了越来越多的关注。随着
分子生物学的快速发展, 肿瘤发生发展的机
制逐渐探明, 研究者利用荧光标志分子探针,
靶向结合于消化系肿瘤中的分子靶点, 使得

背景资料

消化系肿瘤早期
形态改变不明显,
现有内镜检查手
段极易漏诊, 其早
期诊断仍是临床
上的难点。由于肿
瘤发生过程中分
子变化早于形态
学改变, 对肿瘤标
志物的分子成像,
便成为实现消化
系肿瘤早期诊断
的突破口。

同行评议者

李瑜元, 教授, 广
州市第一人民医
院内科

■ 研发前沿

表皮生长因子受体是研究较为深入的肿瘤标志分子, 在很多肿瘤中都有表达, 是目前研究最多的靶点, 且已有用于临床的报道, 但仍需更多大样本量的临床验证。

在内镜下实时对消化系肿瘤进行分子诊断成为可能, 同时对肿瘤的靶向治疗也可产生一定影响。本文就消化系肿瘤内镜下分子成像的研究进展作一综述。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 消化系肿瘤; 分子影像; 消化内镜

核心提示: 肿瘤在发生发展过程中会产生很多生物标志分子, 研究者利用荧光标记分子探针, 靶向结合于消化系肿瘤中的分子靶点, 在内镜下便可观察到探针与肿瘤标志物的特异性结合, 从而实现对肿瘤的早期诊断。

李方, 李楠. 消化系肿瘤内镜下分子成像的研究进展. 世界华人消化杂志 2015; 23(33): 5333-5341 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/5333.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i33.5333>

0 引言

在我国, 胃肠道肿瘤发病率和病死率居恶性肿瘤前列, 早期诊断是提高存活率的关键^[1]。目前被公认为消化系肿瘤诊断的“金标准”依然是消化内镜结合病理活检^[2]。但现有内镜技术对消化系可疑区域的观察主要是依靠其形态学改变, 对于早期形态改变较小的肿瘤, 普通内镜很容易漏诊^[3]。因此, 为了提高消化系肿瘤尤其是早期肿瘤及癌前病变的诊断成功率, 急需一种新的检查手段出现, 内镜下分子成像以其独特的优势理所当然受到了越来越多的关注。

分子影像学是应用影像学技术在细胞和分子水平上对活体生物过程进行定性和定量研究。与传统影像学不同, 分子影像学着眼于探测构成疾病基础的分子异常, 而不是对最终结果进行成像^[4]。这为疾病的早期诊断带来了新的希望。

肿瘤是由于多个基因异常变化和过度表达引起的复杂连续的过程, 过程中多种体内外因子通过不同机制参与。随着现代分子生物学快速发展, 尤其是基因组学、蛋白组学及相关技术的进展, 很多在肿瘤发生发展过程中出现的相关生物分子已经陆续被发现。与形态改变不同, 分子水平的变化是伴随着肿瘤的发生而产生的^[5]。因此, 我们可以将靶向分子用荧光标记连接构建特异性探针, 通过探针与肿瘤标志

分子的特异结合, 利用现有内镜技术实现对肿瘤标志分子的显像, 从而为肿瘤的早期诊断甚至是靶向治疗提供依据。该技术主要由3部分构成, 即消化内镜设备、标记荧光和特异性分子探针。鉴于内镜下分子成像的优越性, 近年来关于该方面的研究逐渐增多, 本文就近些年消化内镜分子影像在各类消化系肿瘤研究中的最新进展作一综述。

1 消化内镜

随着科技的迅速发展及交叉渗透, 几十年来, 各种内镜新技术、新理念也相继出现, 如放大内镜、窄带成像技术(narrow band imaging), 智能分光比色技术(fuji intelligent chromo endoscopy)、自体荧光内镜(autofluorescence imaging)、激光共聚焦内镜(confocal laser endomicroscopy, CLE)和高分辨率显微内镜(high-resolution endomicroscopy, HRE)等。但归根结底, 他们都是由普通光学内镜发展而来。在这些新型内镜之中, CLE和HRE属于高分辨率内镜, 而其余则属于宏观内镜^[6]。目前的研究热点主要集中在CLE。他的原理类似于激光共聚焦显微镜, 可以使内镜下的组织结构放大1000倍, 从而使得内镜医师在内镜观察的同时对患者实时进行组织病理学诊断成为可能^[7]。如果再配合荧光分子成像, 其效果则相当于实时进行免疫组织化学检查。因此, 他的出现将会极大地影响消化系早期肿瘤及癌前病变的诊断和监测。目前, 共聚焦显微内镜系统共有3种。一种被称为整合型共聚焦显微内镜(endoscope-integrated CLE)。他是将微型共聚焦激光显微镜整合于传统内镜的头端而成, 图像的扫描速度为0.8帧/s(1024像素×1024像素)或1.6帧/s(1024像素×512像素)。每次扫描光学层面厚度为7 μm, 侧面分辨率为0.7 μm, 扫描深度为0-250 μm^[8]。另一种是探头型共聚焦显微内镜(probe-based CLE)。他能够通过多数的消化内镜的活检通道进行观察, 虽然在图像分辨率和扫描深度方面稍有逊色, 但其图像扫描速度明显快于前者。他能通过拼接邻近图像的方式实时生成一幅“镶嵌图案”, 使观察者的视野范围更为扩大^[9]。还有一种动物研究小型共聚焦系统(fluorescence *in vivo* endomicroscopy 1)是Optiscan公司新近开发的一种便携式内窥式

共聚焦成像系统, 是专为模拟人类疾病的动物模型研究设计而成^[10]。但是高分辨率内镜的缺陷是视野较小, 因此研究者将高分辨率内镜和宏观内镜集成在一起, 可以自由切换。在镜检时, 先使用宏观内镜对可疑病变部位进行定位, 再使用高分内镜进行亚细胞水平的观察, 由此达到优势互补。

2 标记荧光

与其他成像方法相比, 光学分子影像具有高通量、高分辨率、高灵敏度、低成本、使用方便等优点^[11]。但在可见光区(400-700 nm)光学成像技术会受到组织中内源性物质(氧、胆红素、无氧血红蛋白和水等)的吸收、散射等影响, 降低了可见光的穿透力。

近些年来, 近红外(near-infrared)荧光的出现在一定程度上克服了这个难题。近红外技术具有多种优势, 他的波长范围是700-900 nm, 为人们最早发现的非可见光区域。在近红外区域, 组织的吸收、散射和自发荧光背景都比较低, 近红外光源能在生物组织内达到最大穿透深度, 并能进行深层组织成像, 因而称此波段范围为“近红外组织透明窗口”^[12]。目前已有多种近红外荧光染料用于体外和在体的肿瘤探测的研究, 如Cy5.5、Cy7、IRDye 800CW及近红外荧光量子点等。

3 分子探针

分子成像的最重要环节是制备能够特异性结合细胞或细胞间质分子靶点的探针。目前所使用的探针主要包括抗体、抗体片段、短肽、适体和小分子等, 而这其中应用最多的当属抗体和短肽。

3.1 抗体 抗体属于免疫球蛋白, 在其轻链和重链的可变区各存在3个互补决定区(complementarity-determining region, CDR), 该区的氨基酸序列高度可变, 可以轻易地实现与抗原决定簇的互补结合, 因此抗体具有很高的特异性和亲和力。目前对于抗体的研究已经非常成熟, 很多抗体已经商品化并应用于临床, 所以研究者首先想到的就是利用抗体来制备分子探针。但抗体分子量较大, 导致穿过黏膜较慢, 体内代谢速度缓慢, 半衰期较长, 难以清除, 且造价昂贵, 不易大量制备, 所以研究者也在不断尝试开发新型分子探针以弥补抗体的

不足。

3.2 抗体片段 抗体片段是抗体被水解后得到的Fab段, 他保留了能够与抗原特异性结合的CDR, 但分子量却比抗体小。由于抗体片段去除了Fc段, 降低了抗体免疫原性, 增加了通过性, 大大提高了在体内的药代动力学特性, 但其制备相对于抗体来说更加复杂, 价格也要昂贵^[13]。

3.3 多肽 多肽分子量较抗体片段更小, 能够迅速到达靶点累积, 且造价低廉, 易于大量合成, 易于循环清除, 毒性和免疫原性也较低, 在与靶点的结合中有良好的灵敏度及亲和力, 所以多肽现在是很多学者进行分子影像研究的理想探针^[14]。目前多肽的获取主要依靠噬菌体展示技术。噬菌体肽库展示技术是一种非常成熟的多肽筛选手段, 其主要原理是将编码外源多肽的基因序列插入噬菌体编码衣壳蛋白的基因中, 使外源性的融合蛋白展示在病毒颗粒的表面。一个成熟肽库可包含超过 10^{10} 个不同多肽序列, 从而可以实现针对肿瘤相关配体高通量筛选^[15]。大量表达不同肽序的噬菌体与肿瘤细胞、组织或抗原进行结合, 多次洗脱后最终可获得最具特异性的肽段。

3.4 适体 适体是一段小的单链DNA或RNA片段, 是通过配体指数富集法系统演化技术在体外反复的筛选而成。由于具有独特的三维结构, 所以具有较高的亲和性和特异性^[16]。与多肽相似, 由于其分子量小, 同时免疫原性低、易于修饰、无毒、靶向范围广, 使他成为细胞检测、靶向诊断、分子影像等很多临床应用的理想分子^[17]。Sefah等^[18]筛选出专门针对结肠癌细胞的适体, 经荧光标记后在共聚焦显微镜检测出该适体与结肠癌细胞有较高的特异性和亲和力, 而在正常结肠细胞及非结肠的癌细胞则没有发现特异性结合, 证实其成为探针的潜在性, 但遗憾的是目前还没有用于体内试验的研究。

3.5 小分子 一些小分子, 例如叶酸、凝集素等, 他们的受体在多种肿瘤细胞表面可能高表达, 也可成为靶向探针。由于他们是正常饮食中的成分, 安全性较高, 而且价格便宜、易于大量制备, 所以也具有作为探针的优势^[19]。

4 内镜下分子成像的研究

在肿瘤发生发展过程中产生的很多特异分子

■ 相关报道

很多研究者报道了在不同内镜下经荧光标记的探针(抗体、多肽、适体等)与肿瘤相关分子的特异性结合。部分研究者还采用了近红外荧光和多分子靶点策略, 少数研究已经应用于临床。

■ 创新盘点

分子影像的核心是分子探针与靶点的特异性结合, 目前肿瘤分子靶点有一部分已经被发现, 但仍有很多未知的分子靶点, 本文从已知靶点和未知靶点两方面对目前该领域的研究进行了归纳。

标志物已经被发现, 这些标志物经荧光标记后可以作为已知靶点进行疾病诊断, 同时还可以通过高分辨率内镜对疾病的分子特征进行鉴别, 甚至可以用于预测患者对药物的反应性, 以便针对不同患者疾病的分子特征实施个体化治疗。而对于未知的分子靶点, 则可以进行疾病的诊断。

4.1 基于肿瘤细胞已知分子靶点的研究

4.1.1 癌胚抗原: 在恶性肿瘤的诊断中, 癌胚抗原(carcino-embryonic antigen, CEA)是重要的指标之一, 尤其是在结肠癌患者, 血清学的检测已经用于临床, 并被证实CEA表达的升高是结直肠癌复发的重要标志^[20]。Keller等^[21]经普通结肠内镜对结肠息肉患者病变黏膜表面直接喷洒荧光标记后的CEA抗体, 在患者体内通过荧光内镜观察。最终, 在所有无溃疡或出血的病变中, 荧光内镜CEA分子成像检出结直肠癌变的特异性为100%, 敏感性约78.6%, 准确性为89.3%。这是首例使用消化内镜进行分子成像的报道, 取得了让人惊喜的结果, 也为后来的研究者进行内镜下分子成像的研究奠定了基础。

4.1.2 血管内皮生长因子: 肿瘤血管生成是肿瘤生长、转移必不可少的过程, 而血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)则是最有效的促血管生长因子。Foersch等^[22]用荧光标记VEGF抗体分别应用于*Apc*基因突变小鼠、小鼠种植瘤模型和结肠癌患者手术样本, 通过CLE清晰观察到VEGF在胞浆的分布。取所有在体CLE观察到的肿瘤组织行免疫组织化学观察, 2种检查结果表现出很好的相关性。除了VEGF这个被广泛探索的靶点, 白细胞分化抗原105(cluster of differentiation 105, CD105)也是一个和肿瘤血管生成相关的重要靶点。和VEGF相比, CD105可以被增殖的内皮细胞以更高的倍数选择性表达^[23]。Yang等^[24]利用抗CD105单克隆抗体偶联近红外荧光染料(IRDye 800CW), 在荷乳腺癌小鼠体内和体外均观察到该探针与CD105的特异性结合, 这是第一次在体对CD105的近红外影像研究, 对胃肠道肿瘤的CD105荧光标记检查有一定的指导作用。

4.1.3 表皮生长因子受体: 表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)是研究较为深入的肿瘤标志分子, 他是原癌基因

*C-erb-B1*的表达产物。研究^[25]表明, EGFR的异常表达, 可激活与肿瘤增殖、分化相关的基因, 在肿瘤的形成和发展过程中起着重要作用。因此, EGFR成为很多研究者进行分子成像研究的靶点。

Goetz等^[26]用高表达或低表达EGFR人结肠癌细胞系建立了68只荷人结肠癌小鼠模型, 注射荧光标记的EGFR抗体后, 发现显示荧光强度在不同表达水平的荷瘤鼠模型之间有显著差异。在此基础上, Liu等^[27]进一步在患者体内进行了尝试。他将荧光标记EGFR抗体局部喷洒于37例结直肠癌患者体内, 利用CLE在患者体内进行分子成像, 结果在18例(共19例)结直肠癌患者和12例(共18例)结肠腺瘤患者体内观察到EGFR特异荧光信号。该实验是第1次将EGFR内镜下分子成像技术应用于临床, 表明用荧光标记EGFR抗体探针在体内实时对结肠癌病变进行辨别是可行的, 具有很积极的意义。Hoetker等^[28]用荧光标记EGFR诊断性抗体和治疗性抗体(西妥西单抗)构建探针, 经CLE在荷人胃癌动物模型体内观察到西妥西单抗组和诊断性抗体组荧光强度均有明显的增加, 并且还可以通过CLE在亚细胞水平观察到EGFR的分布。与上述研究者不同, Nakai等^[29]选择猪作为模型, 通过CLE把异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记抗EGFR和凋亡抑制蛋白survivin抗体喷洒或黏膜下注射到食管和胃黏膜, 结果不但观察到在食管和胃黏膜上的EGFR和survivin与靶点的结合, 而且还顺利对其进行了体内定位。

4.1.4 人表皮生长因子-2: 人表皮生长因子-2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)同样是表皮生长因子受体家族成员之一, 是结合在细胞膜表面的受体酪氨酸激酶, 参与导致细胞生长和分化的信号传导途径。*HER2*基因的扩增和蛋白的过表达参与了包括食管腺癌在内的多种肿瘤的发生。Realdon等^[30]采用食管空肠吻合术建立巴雷特食管相关的食管腺癌大鼠模型, 注射荧光标记HER2抗体进行分子影像, 经CLE观察证明了高表达的HER2是该食管腺癌模型的典型分子标志物, 靶向HER2在体对食管癌进行检查具有可行性。

为了增加检测的灵敏性和特异性, Barrett等^[31]用近红外荧光(Cy5.5, Cy7)分别标记抗

EGFR-1(HER1)和EGFR-2(HER2)单克隆抗体,混合后注入高表达EGFR-1和EGFR-2的小鼠种植瘤模型体内,与此同时,研究者还使用了放射性核素标记单抗进行对比.结果无论是体内还是体外,均可在各自光谱范围检测到荧光信号,表现出较核素成像的优越性.为了保证试验的真实性,课题组还进行了荷单个瘤小鼠模型的盲诊,结果准确率100%(40/40).该试验技术对于结肠癌的分型诊断有一定帮助.

4.1.5 胃癌相关抗原MG7: MG7是由西京医院消化病医院实验室首先发现的一种特异性较高的胃癌相关抗原.研究^[32]表明, MG7抗原在胃癌组织中的表达率高达94%,在胃癌患者血清中的检出率为83.6%.正常胃黏膜上皮细胞不表达MG7抗原^[33]. Li等^[34]利用荧光标记MG7抗体与胃黏膜的MG7抗原特异结合,通过CLE进行观察实现了胃癌的体内分子成像.他们不但验证了CLE对胃癌荷瘤鼠活体成像的可行性,而且还在此基础上前瞻性地实施了对新鲜的人胃癌组织和相同患者的非癌组织的CLE分子成像观察.虽然该实验的临床价值仍需进一步在患者体内研究来验证,但目前的研究结果已初步确定了在CLE辅助下对胃癌患者进行活体诊断的可行性.

4.1.6 蛋白酶: 在肿瘤的侵袭及血管生成机制中,蛋白酶起到非常重要的作用,因此也可以作为消化系统肿瘤分子诊断的理想靶点.目前已经有几种蛋白酶在试验中展现了他们的价值:(1)基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs), MMPs可以破坏上皮组织的基底膜,从而使癌细胞侵犯邻近组织. Yoon等^[35]使用近红外荧光标记MMPs激活探针检测结肠癌,结果显示近红外荧光强度和从腺瘤发展到腺癌的各个分期有很明显关联.因为肿瘤分子表达具有不均一性,所以多分子靶点策略有可能提高肿瘤检测的特异性. Oh等^[36]用MMP9和MMP14抗体分别结合红光和黄光量子点,分别单体注入和同时注入荷结肠腺瘤小鼠模型体内,在多通道荧光内镜下可观察到2种MMP抗体与靶点的特异结合荧光,证明了该探针与结肠腺瘤细胞的特异结合,并经组织学检查证实;在同时注入2种分子探针的小鼠模型体内,重叠率为67.7%±8.4%.实验中,虽然探针与靶点的结合有效地显示了对肿瘤的检测,但2处假阴性的出现提示了2种探针可能还是不

够的,更多的分子靶点也许会提高肿瘤检测的灵敏性.所以该课题组研究人员还计划选用其他的探针如EGFR、HER2等做进一步研究. Park等^[37]用近红外荧光量子点与MMP9、MMP14或CEA结合,通过内镜在荷瘤小鼠模型体内、结肠腺瘤切片及人新鲜结肠腺瘤组织观察.通过互补和交叉重叠信号提供的影像同样证明了多靶点的优越性;(2)组织蛋白酶(cathepsin, Cat),除了MMP外, Cat也参与肿瘤的侵袭. Cat B就是其中一种. Alencar等^[38]在小鼠种植瘤模型中使用近红外荧光标记的可激活探针对其进行检测,成功观察到探针被激活后形成的荧光影像.瘤背景比为8.86,而在对照组为1.56,与该酶在肿瘤组织和健康组织的表达相符.在另一个研究中, Ding等^[39]制备了CatB和MMPs激活的近红外荧光探针,注射入动物模型体内后,经荧光分子断层成像系统成功检测到腺癌和增生区域酶的活性,但该实验并没有使用荧光内镜,因此尚需进一步结合荧光内镜的研究,若能进一步取得成功,应用于临床后将有可能提高对胃癌的诊断成功率.

4.1.7 TF抗原: TF(Thomsen-Friedenreich)抗原属于黏蛋白型肿瘤相关糖抗原.他在结肠癌过度表达,在正常结肠微量表达或不表达,他的增加与肿瘤的侵袭及转移有关. Sakuma等^[40]在研究中使用TF抗体探针用于原位荷结直肠癌大鼠模型,在荧光内镜下展示了很好的特异性.另外,研究中还进一步发现该探针可以报告在化疗时随着肿瘤消退TF表达的动态变化,说明该探针不仅能用于早期诊断,还能报告化疗时肿瘤的反应.

4.1.8 多聚糖: 研究证明,多聚糖在胃癌、结肠癌、胰腺癌中都有改变,所以多聚糖有可能成为分子成像的靶点.凝集素是糖识别蛋白,可以特异与多聚糖结合. Bird-Lieberman等^[19]研究者将荧光标记小麦胚芽凝集素(wheat germ agglutinin, WGA)探针体外应用于切除的食管样本,经荧光内镜成功观察到普通内镜检查没有发现的瘤变区.不过该研究所用探针相比前面所提有些区别,因为他的结合是减少的,但是这种结合减少可以使我们对所有未结合区域进行活检,从而可以降低临床的误诊几率.

随着对一些肿瘤标志分子的研究越来越深入,他们在肿瘤发生和发展过程中的作用也

应用要点

内镜下分子影像可以实现在内镜检查的同时进行分子诊断,避免有创活检,缩短诊断时间,将会为消化系统肿瘤尤其是早期肿瘤的诊断和治疗带来新的希望,但该领域的研究多数只用于动物体内,仍需要更多临床大样本研究.

■名词解释

互补决定区: 为抗体Fab段上的与抗原决定簇特异结合的区域, 该区的氨基酸序列可以根据抗原决定簇的不同而改变, 从而轻易地实现与抗原决定簇的互补结合;

噬菌体肽库展示技术: 将多肽的外源基因与噬菌体的基因融合, 以融合蛋白的形式呈现在噬菌体的表面, 导入了各种各样外源基因的一群噬菌体, 就构成一个噬菌体展示库。当用一个蛋白质筛查时, 就会与其有相互作用的某个外源肽相结合, 从而分离出展示库里的某个特定的噬菌体;

配体指数富集法: 用靶物质与体外单链寡核苷酸库混合, 洗掉未与靶物质结合的核酸, 分离与靶物质结合的核酸分子, 以此为模板进行PCR扩增, 进行重复的筛选与扩增, 与靶物质有高亲和力的DNA或RNA就会分离出来, 且纯度越来越高(>90%左右)。

逐渐明了, 很多靶向肿瘤标志分子的药物已经被开发出来并商品化, 如作用于EGFR的西妥昔单抗和帕尼单抗, 靶向HER2的曲妥珠单抗及抗VEGF单克隆抗体贝伐珠单抗等已广泛用于肿瘤的化疗过程中。相对于传统的化疗药物, 靶向药物具有特异性强, 目的性高, 对周围组织损伤小的特点。然而, 有些肿瘤对个体化治疗要求很高, 只有关注患者的肿瘤特征, 依据肿瘤的分子标志物, 个体化的合理的选择药物, 才有可能延长患者生存期, 使患者真正获益^[41]。因此, 我们同样可以利用这些药物和分子靶点特异结合的特性, 经荧光标记后, 通过内镜实时观察患者对该药物治疗的反应性, 适时调整治疗方案, 从而实现肿瘤的个体化治疗。Hoetker等^[28]经CLE在荷人胃癌动物模型体内观察到, 西妥昔单抗组和诊断性抗体一样具有结合于靶点的特性。证明了经内镜观察药物与靶点之间相互作用的可行性。Goetz等^[42]用荧光标记西妥昔单抗, 注射入小鼠移植瘤模型, 结果不但可以用CLE观察到荧光标记, 同时相对于对照组, 在对该药敏感的细胞系模型, 会有更强的荧光, 同时减慢肿瘤进展, 有更长的生存时间, 表明可以对该药物治疗的早期反应进行预测。这是第一次在分子水平用CLE对药物的反应性进行预测试验, 但至今尚未有用于临床研究。在另一个研究中, Sakuma等^[40]使用TF抗体探针用于原位荷结肠癌大鼠模型, 不但检测出该抗体与TF抗原的特异性结合, 而且, 研究者还进一步发现该探针可以报告在化疗时随着肿瘤消退TF表达的动态变化, 说明该探针除用于早期诊断, 对化疗时肿瘤的反应也有报告作用。

4.2 基于肿瘤细胞未知分子靶点的研究 噬菌体肽库展示技术的成熟使得研究者筛选出很多特异性结合于靶细胞的多肽, 虽然多肽的结合靶点并未明确, 但通过与靶细胞特异性结合荧光的检测, 完全可以进行疾病的诊断, 所以多肽作为新颖的分子探针用于识别细胞表面特异靶点有广阔的前景。目前已经有一些学者利用这一技术开发了多种短肽探针并成功用于分子成像的研究。

Kelly等^[43]通过噬菌体肽库技术筛选合成了对结肠癌细胞具有高亲和力的短肽CPIEDRPLM, 在近红外荧光Cy5.5标记后注入荷人结肠癌小鼠模型体内, 经内镜观察到该短

肽与结肠癌组织结合后的荧光, 提示了对结直肠癌诊断的可行性。Liu等^[44]尝试将FITC标记GEBP11和对照探针后, 分别注入原位和皮下荷胃癌小鼠模型, 结果在CLE下, 注射FITC-GEBP11组都成功显像, 而对照组没有观察到荧光信号。CLE所获得的结果和免疫荧光显微镜观察的结果之间有很好的关联性。Li等^[45]将多肽SNFYMPL荧光标记后应用于内镜下切除的异型增生样本, 结果证明该肽段具有靶向癌前黏膜荧光成像的潜力。Sturm等^[46]在此基础上做了进一步尝试。他们选取了25位受试者, 局部应用荧光标记多肽探针后, 经CLE观察发现食管癌荧光强度要比巴雷特食管和鳞状上皮强3.8倍, 灵敏度75%, 特异性97%, 表明可以将该探针在内镜下用于食管腺癌的早期检测。这是第1次将多肽用于人体的荧光分子影像研究, 对指导食管肿瘤组织活检和早期诊断有积极意义。研究^[47]所采用的一些方案也为以后更多研究向临床过渡提供了参考。此后该课题组再次筛选出多肽ASYNYDA, 荧光标记后用于患者, 结果证明在高级别瘤变区较巴雷特食管区有较强荧光。Liu^[48]使用噬菌体肽库技术筛选了七肽QPIHPNNM, 并设置短肽YTTNKH作为对照, 用近红外荧光Cy5.5标记后局部应用于基因工程自发腺瘤小鼠模型末端结肠。结果该探针和对照组短肽的平均靶背景比分别为 3.42 ± 1.30 和 1.88 ± 0.38 , $P = 0.007$ 。表明该探针对于结直肠腺瘤有很好的特异性。Miller等^[49]在另一项针对结肠癌前病变的多肽探针检测实验中使用了转基因小鼠来获得自然发生的息肉模型, 以具有癌变风险的腺瘤样息肉为靶点, 同时以增生性息肉模型作为对照。噬菌体肽库的筛选选择在模型小鼠体内进行, 凭借此获得更符合实际结合情况的探针QPIHPNNM, 结果证实体内筛选探针在体内验证中表现了良好的结合性。该课题组^[50]又淘汰了短肽AKPGYLS, 以三赖氨酸为核合成四聚体, 设置单体和三赖氨酸核心对照, 分别用近红外荧光Cy5.5标记后, 局部应用于基因工程形成的结肠腺瘤小鼠模型。结果显示, 多聚体结合亲和性是单体48倍, 虽然多聚体分子量较单体高, 但多聚体实现与HT29细胞结合时间比单体快了1倍; 同时, 在成像方面多聚体平均靶背景比达到单体2倍; 表明肽多聚体既达到了抗体的亲和性又保持短肽的特性, 在临床诊

断和治疗方面较短肽单体展现了更好的前景, 希望尽快有临床方面的研究。

5 结论

分子影像技术是近十年新兴的一项技术, 他是根据分子表达的变化而不是宏观形态的改变来诊断疾病^[51]。消化内镜检查是消化系统疾病最直观的检查方法, 在消化系统疾病的诊疗中发挥至关重要的作用, 但对形态改变较小的病变容易漏诊, 且存在引发出血、穿孔等并发症的潜在风险。内镜下分子影像将内镜和分子影像的优势相结合, 既可以提高准确性, 避免有创活检, 缩短诊断时间, 还有可能预测患者对治疗的反应。他的出现在一定程度上克服了普通白光内镜的限制, 将会为消化系肿瘤尤其是早期肿瘤的诊断和治疗带来新的希望, 为患者带来福音。但该领域的研究尚处在起步阶段, 且多数研究还只用于动物体内, 虽已有部分基于临床的试验, 但样本量较少, 仍需要临床大样本试验来验证。多分子靶点策略可以提高肿瘤检测的特异性, 但目前研究较少。为了提高成像的深度, 很多学者已经将近红外技术用于研究中, 但近红外荧光探针的安全性、稳定性、生物相容性等仍待深入研究。同时, 内镜下分子影像所需要的人才储备、技术条件、高昂的费用也是这项技术服务于临床前必须解决的问题。因此, 该技术在广泛应用于临床之前仍有很长路要走。我们有理由相信, 随着进入该领域的研究者不断增多, 该技术在活体动物体内的应用会日益成熟, 并有望为消化系肿瘤的早期诊断、预后判断、疗效监测提供新方法。而随着基因探针等新型探针的开发, 实现灵敏度更高, 特异性更强的检测也将可以预见。

6 参考文献

- 1 李延青. 共聚焦内镜在胃肠道肿瘤早期诊断中的应用. 中国实用内科杂志 2008; 28: 238-240
- 2 李益农, 陆星华. 消化内镜学. 北京: 科学技术出版社, 2004: 125-126
- 3 Heresbach D, Barrioz T, Lapalus MG, Coumaros D, Bauret P, Potier P, Sautereau D, Boustière C, Grimaud JC, Barthélémy C, Sée J, Serraj I, D'Halluin PN, Branger B, Ponchon T. Miss rate for colorectal neoplastic polyps: a prospective multicenter study of back-to-back video colonoscopies. *Endoscopy* 2008; 40: 284-290 [PMID: 18389446 DOI: 10.1055/s-2007-995618]
- 4 Kircher MF, Willmann JK. Molecular body imaging: MR imaging, CT, and US. Part I. principles. *Radiology* 2012; 263: 633-643 [PMID: 22623690 DOI: 10.1148/radiol.12102394]
- 5 Yentz S, Wang TD. Molecular imaging for guiding oncologic prognosis and therapy in esophageal adenocarcinoma. *Hosp Pract* (1995) 2011; 39: 97-106 [PMID: 21576902 DOI: 10.3810/hp.2011.04.399]
- 6 Choi KS, Jung HY. Confocal laser endomicroscopy and molecular imaging in barrett esophagus and stomach. *Clin Endosc* 2014; 47: 23-30 [PMID: 24570880 DOI: 10.5946/ce.2014.47.1.23]
- 7 王丹丹, 刘冰熔. 早期食管癌内镜诊断新进展. 世界华人消化杂志 2012; 20: 34-40
- 8 Kiesslich R, Goetz M, Vieth M, Galle PR, Neurath MF. Confocal laser endomicroscopy. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2005; 15: 715-731 [PMID: 16278135]
- 9 杨黎, 戈之争. 共聚焦显微内镜在消化道早期肿瘤诊断中的作用. 国际消化病杂志 2009; 29: 420-423
- 10 刘君, 李延青. 显微内镜分子成像技术在结直肠癌及其癌前病变中的研究进展. 胃肠病学杂志 2010; 15: 626-628
- 11 Cheng K, Cheng Z. Near infrared receptor-targeted nanoprobe for early diagnosis of cancers. *Curr Med Chem* 2012; 19: 4767-4785 [PMID: 22873665]
- 12 Jiang W, Singhal A, Kim BYS, Zheng J, James T, Rutka, Wang C, Warren CW. Chan. Assessing near-infrared quantum dots for deep tissue, organ, and animal imaging applications. *J Assoc Lab Autom* 2008; 13: 6-12 [DOI: 10.1016/j.jala.2007.09.002]
- 13 Hoppin J, Orcutt KD, Hesterman JY, Silva MD, Cheng D, Lackas C, Rusckowski M. Assessing antibody pharmacokinetics in mice with in vivo imaging. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 337: 350-358 [PMID: 21317355 DOI: 10.1124/jpet.110.172916]
- 14 Joshi BP, Wang TD. Exogenous Molecular Probes for Targeted Imaging in Cancer: Focus on Multimodal Imaging. *Cancers (Basel)* 2010; 2: 1251-1287 [PMID: 22180839 DOI: 10.3390/cancers2021251]
- 15 Schirrmann T, Meyer T, Schütte M, Frenzel A, Hust M. Phage display for the generation of antibodies for proteome research, diagnostics and therapy. *Molecules* 2011; 16: 412-426 [PMID: 21221060 DOI: 10.3390/molecules16010412]
- 16 Wang J, Li G. Aptamers against cell surface receptors: selection, modification and application. *Curr Med Chem* 2011; 18: 4107-4116 [PMID: 21838694]
- 17 Pei X, Zhang J, Liu J. Clinical applications of nucleic acid aptamers in cancer. *Mol Clin Oncol* 2014; 2: 341-348 [PMID: 24772298]
- 18 Sefah K, Meng L, Lopez-Colon D, Jimenez E, Liu C, Tan W. DNA aptamers as molecular probes for colorectal cancer study. *PLoS One* 2010; 5: e14269 [PMID: 21170319 DOI: 10.1371/journal.pone.0014269]
- 19 Bird-Lieberman EL, Neves AA, Lao-Sirieix P, O'Donovan M, Novelli M, Lovat LB, Eng WS, Mahal LK, Brindle KM, Fitzgerald RC. Molecular imaging using fluorescent lectins permits rapid endoscopic identification of dysplasia in Barrett's esophagus. *Nat Med* 2012; 18: 315-321 [PMID: 22623690 DOI: 10.1148/radiol.12102394]

同行评价

内镜下分子成像技术近年进展很快, 本文综述相关文献, 有助于普及和推广。

- 22245781 DOI: 10.1038/nm.2616]
- 20 吴涛, 徐亮. CEACAM1、CEACAM6在肿瘤中的作用研究进展. *临床合理用药* 2015; 8: 171-174
- 21 Keller R, Winde G, Terpe HJ, Foerster EC, Domschke W. Fluorescence endoscopy using a fluorescein-labeled monoclonal antibody against carcinoembryonic antigen in patients with colorectal carcinoma and adenoma. *Endoscopy* 2002; 34: 801-807 [PMID: 12244502]
- 22 Foersch S, Kiesslich R, Waldner MJ, Delaney P, Galle PR, Neurath MF, Goetz M. Molecular imaging of VEGF in gastrointestinal cancer in vivo using confocal laser endomicroscopy. *Gut* 2010; 59: 1046-1055 [PMID: 20639250 DOI: 10.1136/gut.2009.202986]
- 23 Takahashi N, Haba A, Matsuno F, Seon BK. Antiangiogenic therapy of established tumors in human skin/severe combined immunodeficiency mouse chimeras by anti-endoglin (CD105) monoclonal antibodies, and synergy between anti-endoglin antibody and cyclophosphamide. *Cancer Res* 2001; 61: 7846-7854 [PMID: 11691802]
- 24 Yang Y, Zhang Y, Hong H, Liu G, Leigh BR, Cai W. In vivo near-infrared fluorescence imaging of CD105 expression during tumor angiogenesis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2011; 38: 2066-2076 [PMID: 21814852 DOI: 10.1007/s00259-011-1886-x]
- 25 de Melo Maia B, Fontes AM, Lavorato-Rocha AM, Rodrigues IS, de Brot L, Baiocchi G, Stiepcich MM, Soares FA, Rocha RM. EGFR expression in vulvar cancer: clinical implications and tumor heterogeneity. *Hum Pathol* 2014; 45: 917-925 [PMID: 24746196 DOI: 10.1016/j.humpath.2014.01.015]
- 26 Goetz M, Ziebart A, Foersch S, Vieth M, Waldner MJ, Delaney P, Galle PR, Neurath MF, Kiesslich R. In vivo molecular imaging of colorectal cancer with confocal endomicroscopy by targeting epidermal growth factor receptor. *Gastroenterology* 2010; 138: 435-446 [PMID: 19852961 DOI: 10.1053/j.gastro.2009.10.032]
- 27 Liu J, Zuo X, Li C, Yu T, Gu X, Zhou C, Li Z, Goetz M, Kiesslich R, Li Y. In vivo molecular imaging of epidermal growth factor receptor in patients with colorectal neoplasia using confocal laser endomicroscopy. *Cancer Lett* 2013; 330: 200-207 [PMID: 23220286 DOI: 10.1016/j.canlet.2012.11.044]
- 28 Hoetker MS, Kiesslich R, Diken M, Moehler M, Galle PR, Li Y, Goetz M. Molecular in vivo imaging of gastric cancer in a human-murine xenograft model: targeting epidermal growth factor receptor. *Gastrointest Endosc* 2012; 76: 612-620 [PMID: 22771099 DOI: 10.1016/j.gie.2012.05.013]
- 29 Nakai Y, Shinoura S, Ahluwalia A, Tarnawski AS, Chang KJ. Molecular imaging of epidermal growth factor-receptor and survivin in vivo in porcine esophageal and gastric mucosae using probe-based confocal laser-induced endomicroscopy: proof of concept. *J Physiol Pharmacol* 2012; 63: 303-307 [PMID: 22791645]
- 30 Realdon S, Dassie E, Fassan M, Dall'Olmo L, Hatem G, Buda A, Arcidiacono D, Diamantis G, Zhang H, Greene MI, Sturniolo GC, Rugge M, Alberti A, Battaglia G. In vivo molecular imaging of HER2 expression in a rat model of Barrett's esophagus adenocarcinoma. *Dis Esophagus* 2015; 28: 394-403 [PMID: 24708360 DOI: 10.1111/dote.12210]
- 31 Barrett T, Koyama Y, Hama Y, Ravizzini G, Shin IS, Jang BS, Paik CH, Urano Y, Choyke PL, Kobayashi H. In vivo diagnosis of epidermal growth factor receptor expression using molecular imaging with a cocktail of optically labeled monoclonal antibodies. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 6639-6648 [PMID: 17982120]
- 32 Jin B, Wang X, Jin Y, Xia W, Chen B, Liu L, Chen Z, Hong L, Du W, Yan K, Wang H, Yuan D, Hui X, He L, Zhang F, Zhao Y, Wu K, Fan D. Detection of serum gastric cancer-associated MG7-Ag from gastric cancer patients using a sensitive and convenient ELISA method. *Cancer Invest* 2009; 27: 227-233 [PMID: 19235597 DOI: 10.1080/07357900802175609]
- 33 Guo DL, Dong M, Wang L, Sun LP, Yuan Y. Expression of gastric cancer-associated MG7 antigen in gastric cancer, precancerous lesions and H. pylori-associated gastric diseases. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 1009-1013 [PMID: 12439915]
- 34 Li Z, Zuo XL, Li CQ, Zhou CJ, Liu J, Goetz M, Kiesslich R, Wu KC, Fan DM, Li YQ. In vivo molecular imaging of gastric cancer by targeting MG7 antigen with confocal laser endomicroscopy. *Endoscopy* 2013; 45: 79-85 [PMID: 23364839 DOI: 10.1055/s-0032-1325762]
- 35 Yoon SM, Myung SJ, Ye BD, Kim IW, Lee NG, Ryu YM, Park K, Kim K, Kwon IC, Park YS, Park CS, Moon DH, Kim do H, Do MY, Byeon JS, Yang SK, Kim JH. Near-infrared fluorescence imaging using a protease-specific probe for the detection of colon tumors. *Gut Liver* 2010; 4: 488-497 [PMID: 21253297 DOI: 10.5009/gnl.2010.4.4.488]
- 36 Oh G, Yoo SW, Jung Y, Ryu YM, Park Y, Kim SY, Kim KH, Kim S, Myung SJ, Chung E. Intravital imaging of mouse colonic adenoma using MMP-based molecular probes with multi-channel fluorescence endoscopy. *Biomed Opt Express* 2014; 5: 1677-1689 [PMID: 24877024 DOI: 10.1364/BOE.5.001677]
- 37 Park Y, Ryu YM, Jung Y, Wang T, Baek Y, Yoon Y, Bae SM, Park J, Hwang S, Kim J, Do EJ, Kim SY, Chung E, Kim KH, Kim S, Myung SJ. Spraying quantum dot conjugates in the colon of live animals enabled rapid and multiplex cancer diagnosis using endoscopy. *ACS Nano* 2014; 8: 8896-8910 [PMID: 25188899 DOI: 10.1021/nn5009269]
- 38 Alencar H, Funovics MA, Figueiredo J, Sawaya H, Weissleder R, Mahmood U. Colonic adenocarcinomas: near-infrared microcatheter imaging of smart probes for early detection--study in mice. *Radiology* 2007; 244: 232-238 [PMID: 17507718]
- 39 Ding S, Eric Blue R, Chen Y, Scull B, Kay Lund P, Morgan D. Molecular imaging of gastric neoplasia with near-infrared fluorescent activatable probes. *Mol Imaging* 2012; 11: 507-515 [PMID: 23084251]
- 40 Sakuma S, Yu JY, Quang T, Hiwatari K, Kumagai

- H, Kao S, Holt A, Erskind J, McClure R, Siuta M, Kitamura T, Tobita E, Koike S, Wilson K, Richards-Kortum R, Liu E, Washington K, Omary R, Gore JC, Pham W. Fluorescence-based endoscopic imaging of Thomsen-Friedenreich antigen to improve early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer* 2015; 136: 1095-1103 [PMID: 25052906 DOI: 10.1002/ijc.29093]
- 41 吴楠蝶, 魏嘉, 刘宝瑞. 胃癌分子靶向治疗的研究进展. *医学研究生学报* 2013; 27: 1318-1321
- 42 Goetz M, Hoetker MS, Diken M, Galle PR, Kiesslich R. In vivo molecular imaging with cetuximab, an anti-EGFR antibody, for prediction of response in xenograft models of human colorectal cancer. *Endoscopy* 2013; 45: 469-477 [PMID: 23580409 DOI: 10.1055/s-0032-1326361]
- 43 Kelly K, Alencar H, Funovics M, Mahmood U, Weissleder R. Detection of invasive colon cancer using a novel, targeted, library-derived fluorescent peptide. *Cancer Res* 2004; 64: 6247-6251 [PMID: 15342411]
- 44 Liu L, Yin J, Liu C, Guan G, Shi D, Wang X, Xu B, Tian Z, Zhao J, Nie Y, Wang B, Liang S, Wu K, Ding J. In vivo molecular imaging of gastric cancer in human-murine xenograft models with confocal laser endomicroscopy using a tumor vascular homing peptide. *Cancer Lett* 2015; 356: 891-898 [PMID: 25449775 DOI: 10.1016/j.canlet.2014.10.036]
- 45 Li M, Anastassiades CP, Joshi B, Komarck CM, Piraka C, Elmunzer BJ, Turgeon DK, Johnson TD, Appelman H, Beer DG, Wang TD. Affinity peptide for targeted detection of dysplasia in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2010; 139: 1472-1480 [PMID: 20637198 DOI: 10.1053/j.gastro.2010.07.007]
- 46 Sturm MB, Joshi BP, Lu S, Piraka C, Khondee S, Elmunzer BJ, Kwon RS, Beer DG, Appelman HD, Turgeon DK, Wang TD. Targeted imaging of esophageal neoplasia with a fluorescently labeled peptide: first-in-human results. *Sci Transl Med* 2013; 5: 184ra61 [PMID: 23658246 DOI: 10.1126/scitranslmed.3004733]
- 47 Sturm MB, Piraka C, Elmunzer BJ, Kwon RS, Joshi BP, Appelman HD, Turgeon DK, Wang TD. In vivo molecular imaging of Barrett's esophagus with confocal laser endomicroscopy. *Gastroenterology* 2013; 145: 56-58 [PMID: 23684943 DOI: 10.1053/j.gastro.2013.05.008]
- 48 Liu Z, Miller SJ, Joshi BP, Wang TD. In vivo targeting of colonic dysplasia on fluorescence endoscopy with near-infrared octapeptide. *Gut* 2013; 62: 395-403 [PMID: 22427239 DOI: 10.1136/gutjnl-2011-301913]
- 49 Miller SJ, Joshi BP, Feng Y, Gaustad A, Fearon ER, Wang TD. In vivo fluorescence-based endoscopic detection of colon dysplasia in the mouse using a novel peptide probe. *PLoS One* 2011; 6: e17384 [PMID: 21408169 DOI: 10.1371/journal.pone.0017384]
- 50 Joshi BP, Liu Z, Elahi SF, Appelman HD, Wang TD. Near-infrared-labeled peptide multimer functions as phage mimic for high affinity, specific targeting of colonic adenomas in vivo (with videos). *Gastrointest Endosc* 2012; 76: 1197-206.e1-5 [PMID: 23022051 DOI: 10.1016/j.gie.2012.07.017]
- 51 Kuipers EJ, Haringsma J. Diagnostic and therapeutic endoscopy. *J Surg Oncol* 2005; 92: 203-209 [PMID: 16299782]

编辑: 于明茜 电编: 都珍珍

