



· 综 述 ·

荧光成像技术在口腔癌诊疗中的应用及进展

许弘弢, 黄小娟, 郑重阳, 张志愿

上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔颌面头颈肿瘤科, 上海交通大学口腔医学院, 国家口腔医学中心, 国家口腔疾病临床医学研究中心, 上海市口腔医学重点实验室, 上海市口腔医学研究所, 中国医学科学院口腔颌面再生医学创新单元, 上海 200011

[摘要] 口腔癌治疗目前面临的主要临床问题是术后复发和转移。如何提高手术切除效率、改善患者预后是实现口腔癌根治的关键。荧光成像技术作为辅助性手段应用于口腔癌的诊断和治疗, 能够以非侵入、无辐射的方式提供实时、超高分辨率的影像学资料, 达到术前肿瘤识别诊断、术中肿瘤边界确定及术后癌床检查的效果, 有助于降低复发率、提高患者生存率和生存质量。本文就应用于口腔癌临床和基础研究的代表性荧光探针及其特点、局限性和应用前景予以综述。

[关键词] 口腔癌; 荧光成像技术; 荧光探针; 诊断

中图分类号: R739.85 文献标志码: A DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2023.09.008

Development and progress of fluorescence imaging technology in diagnosis and treatment of oral cancer XU Hongtao, HUANG Xiaojuan, ZHENG Chongyang, ZHANG Zhiyuan (Department of Oral and Maxillofacial-Head & Neck Oncology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; College of Stomatology, Shanghai Jiao Tong University; National Center for Stomatology; National Clinical Research Center for Oral Diseases; Shanghai Key Laboratory of Stomatology; Shanghai Research Institute of Stomatology; Research Unit of Oral and Maxillofacial Regenerative Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Shanghai 200011, China)

Correspondence to: ZHANG Zhiyuan, E-mail: zhzy0502@126.com.

[Abstract] The main clinical problems in treatment of oral cancer are tumor recurrence and metastasis after surgery. To improve the efficiency of resection and the prognosis of patients is a key to curing oral cancer. Fluorescence imaging, as an adjuvant in the diagnosis and treatment of oral cancer with no invasion and radiation, can provide real-time and ultrahigh-resolution graphics for preoperative tumor diagnosis, intraoperative tumor margin determination and postoperative tumor bed checking, which can help reduce the recurrent rate, enhance the survival rate and improve the life quality of patients. This article reviewed several typical fluorescent probes and discussed their characteristics, limitations and application prospects in clinic or research for oral cancer.

[Key words] Oral cancer; Fluorescence imaging technology; Fluorescent probe; Diagnosis

在全球范围内, 恶性肿瘤已经成为主要的死亡原因之一, 据统计, 口腔癌在全身恶性肿瘤发病率中居第6位, 其中90%为口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)^[1-2]。目前, 治疗OSCC的主要手段是手术彻底切除原发肿瘤, 但切除后仍有相对较高的复发率且患者

预后较差, 局部复发率为25%~50%, 5年生存率为64.8%^[2]。

现阶段术前肿瘤定位时, 判断是否有局部或远处淋巴结转移主要依靠计算机体层成像(computed tomography, CT)、正电子发射体层成像(positron emission tomography, PET)及磁

基金项目: 国家自然科学基金(82002853); 上海市口腔疾病临床医学研究中心(19MC1910600); 上海市临床重点专科(shslczdzk 01601); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2019-I2M-5-037); 浙江省医药卫生科技计划项目(2020KY939)。

第一作者: 许弘弢(ORCID: 0000-0003-3660-284X), 硕士。

通信作者: 张志愿(ORCID: 0000-0001-8569-7326), 博士, 教授, E-mail: zhzy0502@126.com。

共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI) 等大型设备, 但这些设备对肿瘤组织的灵敏度和特异度还有待提高, 并且这些设备不能在术中实现实时定位引导切除。目前术中定位肿瘤切除范围的手段非常有限, 主要依赖术者的视诊和触诊, 但这种缺乏依据而只基于经验的判断太过主观。通常采用术中快速冷冻切片病理学检查对癌床边缘进行检查, 但作为一种耗时耗力的评估手段, 能否准确地评估癌床状态、减少复发率颇有争议^[3]。

依托于荧光探针的荧光成像技术可以作为一种补充性手段用于肿瘤的诊疗过程。荧光探针经光照激发后会在富集处发射耀眼的荧光信号, 经仪器捕捉后即形成荧光影像, 具有极高的分辨率 (微米级), 并可以与裸眼影像结合。除此之外, 荧光成像所需的设备便携可移动, 不会遮挡手术视野, 不会打乱既有工作流程, 这些特点使得术中实时荧光成像引导切除成为可能。荧光成像技术也可以与CT、PET、MRI及术中快速冷冻切片病理学检查等手段结合使用, 弥补现阶段术前诊断、术中定位及术后检查等环节的不足, 有助于降低复发率、提高患者生存率和生存质量。

1 荧光成像简介

荧光是一种光致发光的现象, 其原理为荧光分子吸收外界光源照射的能量, 使得荧光分子从基态跃迁到能量较高的激发态, 之后荧光分子会通过释放光子产生荧光的形式再次回到基态。通常, 这一过程是由高能 (短波) 的入射光激发荧光分子后产生低能 (长波) 的荧光, 其中波长的变化被称为斯托克斯位移, 可以在很大程度上影响荧光成像的效果。荧光成像系统通过捕捉靶区特定波长范围的荧光并将其集成至显示器就可以在术中实现实时荧光成像。

早在1944年, 荧光成像技术就已经在临床诊疗中使用^[4]。近期, 随着材料科学的发展、多学科联合的深入, 使得荧光成像成为一种极具潜力的辅助技术。与CT、PET及MRI等常规的成像方式相比, 荧光成像作为一种非侵入性的成像方式, 不会产生电离辐射、放射性损伤等不良反应, 却能提供实时可视化、超高分辨率的影像

资料。

与影像学和组织病理学等传统诊断方式相比, 荧光探针能够在细胞、分子水平上进行诊断, 有更高的灵敏度和特异度。荧光探针可以根据激发/发射光的波长进行分类, 即可见光区 (390~700 nm)、近红外一区 (near infrared region- I, NIR- I: 700~900 nm) 和近红外二区 (NIR- II: 900~1 700 nm)。本文针对这3个分区中代表性的荧光探针及其在口腔肿瘤诊疗过程中的应用及进展进行论述。

2 可见光区荧光探针的应用

传统荧光探针的激发/发射光的波长通常位于可见光区, 其中荧光素钠 (sodium fluorescein, NaFL)、亚甲基蓝 (methylene blue, MB) 和5-氨基乙酰丙酸 (5-aminolevulinic acid, 5-ALA) 获得了美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 的认证, 在临床和基础研究中被广泛使用。

2.1 荧光素

NaFL经静脉注射后通过非特异性的微血管渗漏作用在微血管系统紊乱的肿瘤组织中滞留; 早在1948年, NaFL就在脑瘤手术中使用^[5], 后来也被用于眼科血管造影^[6]及探查口腔肿瘤^[7]等。Qaiser等^[7]为了研究NaFL探查口腔癌的灵敏度和特异度, 通过局部喷涂方式进行了包含100名研究对象的横断面研究, 病理学检查发现其中58例具有口腔癌或异常增殖, 局部喷涂NaFL后显示荧光阳性的患者有56例, 灵敏度为96.6%; 在剩余42名健康者中有20名荧光阳性、22名阴性, 特异度为52.4%, 不能将炎症组织与肿瘤组织有效区分。

异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 也属于荧光素家族, 常用于疾病机制研究中, Annexin V能够与细胞早期凋亡时细胞膜上出现的靶点特异性结合, FITC与Annexin V偶联使得细胞凋亡可视化。Du等^[8]使用Annexin V-FITC荧光探针研究口腔鳞癌细胞中miR-221上调是否会导致阿霉素抵抗的产生, 结果显示, 抑制miR-221表达并使用阿霉素后荧光强度较之前有明显提升, 即肿瘤细胞凋亡增多, Annexin

V-FITC荧光探针将细胞凋亡程度与荧光强度相联系, 从而可获得更直观的数据。

2.2 MB

MB为多功能荧光探针^[4], 最初在1944年用于乳腺癌的诊断, 除此之外还可作为光动力治疗(photodynamic therapy, PDT)材料^[9]、组织病理学染料^[10]。MB对口腔前哨淋巴结探查有极高的灵敏度, Vishnoi等^[10]用MB作为组织病理学染料对94例患者进行前哨淋巴结活检, 显示其鉴定率高达93.61%。MB荧光的波峰均在可见光范围内, 因此其荧光穿透深度浅、背信比低, 这些特点极大地影响了其在口腔肿瘤诊断方面的应用。

2.3 5-ALA

5-ALA是血红素合成过程中的中间物质, 在血红素的代谢过程中5-ALA可以转化为具有荧光性质的原卟啉IX。Zheng等^[11]通过局部喷涂5-ALA探查口腔癌及癌前病变, 使用数字化内窥镜探查患者49例, 获得118张病理学切片, 结果显示, 5-ALA用于区分癌前病变组织与正常组织的灵敏度为92%, 特异度为96%, 用于区分肿瘤组织与正常组织的灵敏度为98%, 特异度为96%, 用于区分癌前病变组织与肿瘤组织的灵敏度为98%, 特异度为92%, 可以明确区分肿瘤和炎症。

NaFL、MB和5-ALA等都是有机荧光分子, 生物相容性较好, 能够快速地从体内代谢, 但是在可见光范围内, 组织对光的吸收、散射及反射作用较强, 因此激光的穿透深度及激发的荧光信号强度有限, 成像过程中容易产生背景荧光, 降低了目标组织与正常组织之间的对比度, 使得成像质量受到限制, 而NIR荧光探针的光学特性就在一定程度上避免了这些问题。

3 NIR-I 荧光探针的应用

NIR-I 荧光探针主要包括以吖啶菁绿(indocyanine green, ICG)及其衍生物为代表的菁类有机探针, 早在1970年, ICG就被用于眼科诊断^[12], 是NIR类探针中唯一获得美国FDA批准的荧光探针。菁类化合物分子两端各有一个氮杂环, 两个氮杂环通过碳原子共轭键(多甲川

键)相连接^[13], 是其光学特性的结构基础。

3.1 ICG

ICG为无毒性水溶性探针分子, 在静脉注射后, 可迅速与血浆蛋白相结合并在血管中流动, 癌组织中的微血管结构紊乱, 通透性高, 使得随血流运动的ICG富集, 即实体瘤的高通透性和滞留效应(enhanced permeability and retention effect, EPR), NIR光激发后在富集区域发出明亮荧光, 具有较好的穿透力和信噪比。Pan等^[14]对ICG在口腔肿瘤诊疗过程中所发挥的作用进行了研究, 细胞实验显示, ICG具有极高的生物相容性; 在动物实验中, 48只荷瘤小鼠分为两组各24只, 分别为皮下移植和原位移植模型, 注射ICG后12 h, 所有荷瘤小鼠的肿瘤区域均显示荧光; 在包含20例患者的临床试验中, 注射ICG后6~8 h, 所有肿瘤都显示荧光, 灵敏度为100%, 并且肿瘤区域与癌周正常组织的荧光强度有明显的对比, 术后对癌床进行检查发现4例患者的切缘有ICG荧光残留, 进行病理学检查发现, 2例含有残留癌细胞, 另外2例为假阳性, 假阳性率为50%。

上述研究说明ICG对口腔癌有一定的诊断能力, 但是其对深部软组织边界探查能力不足, 富集效率有待进一步提高且量子产率(quantum yield, QY)较低。因此, 许多团队正在研究将ICG作为荧光基团与其他靶向分子结合及开发其他高QY菁类探针^[15], 以期在癌症诊断、肿瘤边界确认等方面取得突破性进展。

3.2 其他菁类荧光探针

目前, 其他菁类荧光探针中以IRDye800CW应用最为广泛, 可以与单抗体、小分子及肽广泛地结合, 产生靶向荧光效果, 提供超过5 mm的探查深度^[16]。西妥昔单抗-IRDye800CW是第一个被用于口腔肿瘤诊疗的靶向探针^[17], 可以特异性结合肿瘤细胞表面高表达的表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)。Rosenthal等^[18]为测试西妥昔单抗-IRDye800CW的安全性及灵敏度进行了一项包含12例患者的临床试验, 静脉注射不同浓度西妥昔单抗-IRDye800CW悬浊液, 结果显示, 在整个试验

阶段没有出现2级以上不良反应，且荧光探针针对肿瘤细胞有极高的特异度，灵敏度达到100%，证实了临床应用靶向荧光探针的可行性。

上述探针都属于NIR- I，穿透深度、成像精度还可以进一步提升；而组织对NIR- II的光吸收少，引起的光损伤小，同时光的穿透力也更强，有助于荧光成像获得更为清晰的信背比、更精细的空间分辨率。这些特性极大增强了NIR- II 探针针对肿瘤边界的探测能力，因此NIR- II 荧光探针是目前的研究热门。

4 NIR- II 荧光探针的分类及应用

NIR- II 荧光探针主要包括稀土上转换纳米颗粒（upconverting nanoparticle, UCNP）和量子点（quantum dot, QD），具有高达10 mm的组织穿透力^[19]，清晰的信噪比、可靠的空间分辨率等光学特性增强了荧光探针针对肿瘤探查的精确度，但目前在口腔肿瘤诊断和探查方面的研究还比较有限。

4.1 UCNP 荧光探针

UCNP经典结构包含基质材料及掺杂在其中的稀土元素。基质材料主要由氟化物构成，可以有效地降低能量损耗，提高发射光强度。稀土元素标志性的原子结构^[20]使其具有特殊的光学特性，常作为上转换发光材料中的敏化剂和激活剂使用。经光激发后，UCNP的3种成分会发生复杂的能态变化，实现反斯托克斯位移发光，即低能量（长波）的光激发而发射高能量（短波）荧光。这一特性使得UCNP具有极高的光稳定性，不易光漂白，并且斯托克位移较大、发射峰的宽度小、峰值高等优点使得其能有效地规避来自激发光及其他荧光的干扰。

如何提高UCNP较低的QY和荧光强度一直是材料学家面临的难题。最近，研究人员发现将UCNP外再包裹一层由基质材料构成的外壳，形成核-壳结构，能够显著提升探针QY并获得比之前高百倍的荧光强度，还可以将发射光调整到NIR- II。Lin等^[21]将核-壳结构UCNP、碳原子（C）、金原子（Au）进行掺杂，得到荧光探针REN@C@Au（UCA），探针表面经过短肽c-MET结合蛋白（c-MET binding

peptide, cMBP）修饰后可以靶向OSCC细胞表面过表达的c-MET蛋白。UCA中主要的激活剂为钕（Nd³⁺），经过NIR光照射后分别在650、1 064 nm处显示发射峰。细胞实验^[21]结果显示，在含有不同浓度UCA的培养基中培养各种肿瘤细胞系都能保持很高的生存率，并且对人舌鳞癌细胞Cal-27的靶向性最高。动物实验^[21]结果显示，经静脉注射后探针能够在病灶处发射明亮的荧光信号，并具有识别微型病灶（3 mm）的能力。

4.2 QD 纳米荧光探针

QD通常由II~VI、III~V或IV~VI族元素组成，通过调整元素及其比例、纳米颗粒大小就可以调整光学特性。除此之外，QD的光学特性十分出色，具有较大的斯托克位移，能够充分排除来自激发光的干扰。窄的发射峰，使其能屏蔽掉环境杂波的影响；强的光稳定性，可以持续激发而荧光强度不会发生衰减。

将QD表面修饰后，它也可与短肽、单抗等靶向分子结合，极大地提高其探查肿瘤组织、划分肿瘤边界的能力。Zhu等^[22]将Ag₂Se与西妥昔单抗结合为西妥昔单抗-Ag₂Se，激发后可在930 nm波长处观察到最大激发峰，QY为7.3%，在异种移植舌鳞癌细胞Cal-27的裸鼠身上进行动物实验，结果显示，静脉注射7 h后可以在肿瘤部位观察到明显荧光，于13 h达到最大强度。

5 小结

荧光成像技术在口腔肿瘤探查、术中引导切除及术后检查癌床等方面都具有良好的表现。可见光区荧光探针虽然有较高的QY、良好的生物相容性，但受制于羸弱的穿透深度和较强的组织反射、吸收，其在临床使用过程中受到极大限制。以ICG为代表的NIR- I 菁类探针是现阶段临床应用和研究中的主要探针，激发后能实现令人满意的穿透深度，并且NIR光能够减少来自组织的散射、吸收及自荧光等影响成像质量的因素。更为重要的是，菁类探针较低的细胞毒性、良好的生物相容性及快速清除的特点使其满足临床转化的首要前提：可靠的安全性。而NIR- II 探针的研发正处于起步阶段，主要有UCNP、QD等，虽

然他们的光学特性更为突出, 但是他们的清除时间长, 在体内复杂环境中引起潜在不良反应的可能性, 并且细胞毒性大, 只能通过对材料表面进行修饰或改性来提高生物相容性。除此之外, 患者及患者肿瘤组织具有异质性, 往往使得靶向探针的效果大打折扣, 今后如何提高其靶向性、实现精准治疗亦是亟待解决的难题。

利益冲突声明: 所有作者均声明不存在利益冲突。

【参 考 文 献】

- [1] ZHENG C Y, ZHANG X Y, WANG L T, et al. Versatile cobalt-glycerate nanoplatforM for MR-guided neoadjuvant phototherapy of oral squamous cell carcinoma [J] . Chem Eng J, 2022, 437: 135476.
- [2] KAIN J J, BIRKELAND A C, UDAYAKUMAR N, et al. Surgical margins in oral cavity squamous cell carcinoma: current practices and future directions [J] . Laryngoscope, 2020, 130(1): 128-138.
- [3] CHIOSEA S I. Intraoperative margin assessment in early oral squamous cell carcinoma [J] . Surg Pathol Clin, 2017, 10(1): 1-14.
- [4] CWALINSKI T, POLOM W, MARANO L, et al. Methylene blue-current knowledge, fluorescent properties, and its future use [J] . J Clin Med, 2020, 9(11): 3538.
- [5] WAQAS M, SHAMIM M S. Sodium fluorescein guided resection of malignant glioma [J] . J Pak Med Assoc, 2018, 68(6): 968-970.
- [6] HARA T, INAMI M, HARA T. Efficacy and safety of fluorescein angiography with orally administered sodium fluorescein [J] . Am J Ophthalmol, 1998, 126(4): 560-564.
- [7] QAISER D, SOOD A, MISHRA D, et al. Novel use of fluorescein dye in detection of oral dysplasia and oral cancer [J] . Photodiagnosis Photodyn Ther, 2020, 31: 101824.
- [8] DU L Z, MA S W, WEN X, et al. Oral squamous cell carcinoma cells are resistant to doxorubicin through upregulation of miR-221 [J] . Mol Med Rep, 2017, 16(3): 2659-2667.
- [9] LE M N, WUERTZ B R, BIEL M A, et al. Effects of methylene blue photodynamic therapy on oral carcinoma and leukoplakia cells [J] . Laryngoscope Investig Otolaryngol, 2022, 7(4): 982-987.
- [10] VISHNOI J R, KUMAR V, GUPTA S, et al. Outcome of sentinel lymph node biopsy in early-stage squamous cell carcinoma of the oral cavity with methylene blue dye alone: a prospective validation study [J] . Br J Oral Maxillofac Surg, 2019, 57(8): 755-759.
- [11] ZHENG W, OLIVO M, SOO K C. The use of digitized endoscopic imaging of 5-ALA-induced PPIX fluorescence to detect and diagnose oral premalignant and malignant lesions *in vivo* [J] . Int J Cancer, 2004, 110(2): 295-300.
- [12] REINHART M B, HUNTINGTON C R, BLAIR L J, et al. Indocyanine green: historical context, current applications, and future considerations [J] . Surg Innov, 2016, 23(2): 166-175.
- [13] SHINDY H A. Fundamentals in the chemistry of cyanine dyes: a review [J] . Dyes Pigments, 2017, 145: 505-513.
- [14] PAN J R, DENG H, HU S Q, et al. Real-time surveillance of surgical margins via ICG-based near-infrared fluorescence imaging in patients with OSCC [J] . World J Surg Oncol, 2020, 18(1): 96.
- [15] LEE Y J, KRISHNAN G, NISHIO N, et al. Intraoperative fluorescence-guided surgery in head and neck squamous cell carcinoma [J] . Laryngoscope, 2021, 131(3): 529-534.
- [16] VAN SCHAİK J E, HALMOS G B, WITJES M J H, et al. An overview of the current clinical status of optical imaging in head and neck cancer with a focus on Narrow Band imaging and fluorescence optical imaging [J] . Oral Oncol, 2021, 121: 105504.
- [17] BHANDARI C, FAKHRY J, EROY M, et al. Towards photodynamic image-guided surgery of head and neck tumors: photodynamic priming improves delivery and diagnostic accuracy of cetuximab-IRDye800CW [J] . Front Oncol, 2022, 12: 853660.
- [18] ROSENTHAL E L, WARRAM J M, DE BOER E, et al. Safety and tumor specificity of cetuximab-IRDye800 for surgical navigation in head and neck cancer [J] . Clin Cancer Res, 2015, 21(16): 3658-3666.
- [19] ZHU S J, TIAN R, ANTARIS A L, et al. Near-infrared-II molecular dyes for cancer imaging and surgery [J] . Adv Mater, 2019, 31(24): e1900321.
- [20] ZHOU J, LIU Z, LI F Y. Upconversion nanophosphors for small-animal imaging [J] . Chem Soc Rev, 2012, 41(3): 1323-1349.
- [21] LIN B, WU J, WANG Y X, et al. Peptide functionalized upconversion/NIR-II luminescent nanoparticles for targeted imaging and therapy of oral squamous cell carcinoma [J] . Biomater Sci, 2021, 9(3): 1000-1007.
- [22] ZHU C N, CHEN G, TIAN Z Q, et al. Near-infrared fluorescent Ag₂Se-cetuximab nanoprobEs for targeted imaging and therapy of cancer [J] . Small, 2017, 13(3).

(收稿日期: 2023-02-01 修回日期: 2023-05-04)