

文章编号:1005-6947(2005)03-0218-03

· 综述 ·

# 荧光光谱和图像技术在肿瘤学应用中的发展

张波 综述 张阳德 审校

(中南大学湘雅医院 卫生部肝胆肠外科研究中心, 湖南长沙 410008)

**摘要:** 荧光光谱和图像技术随着生物医学光子学的发展而飞速发展, 为肿瘤诊断和治疗提供了一种新途径。笔者综述了荧光光谱和图像技术在肿瘤学应用中的发展过程, 并分别总结了荧光光谱和图像技术的特点及应用优势。

**关键词:** 肿瘤/诊断; 荧光光谱, 图像技术; 综述文献

**中图分类号:** R730.44

**文献标识码:** A

荧光光谱和图像技术应用于生物材料鉴别已有几十年历史, 荧光显微镜、荧光分光光度计、流体血细胞计数分类计等已成为常规的临床应用技术<sup>[1]</sup>。而对于它在肿瘤学上的应用直到20世纪80年代才得到快速发展。众所周知, 肿瘤患者的预后与手术时肿瘤发展的程度密切相关, 早癌患者的5年生存率往往是晚癌患者的几倍甚至几十倍。对于早癌, 尤其是发生于表面黏膜层的空腔脏器的早期病变, 一直缺乏有效的检测手段<sup>[2]</sup>。临床的需要使荧光光谱和图像技术随着激光、光谱、显微以及光纤等生物医学光子学技术的发展得以飞速发展。激光诱导荧光光谱及图像技术成为一项新的研究课题, 为肿瘤诊断和治疗提供了一种新途径。

## 1 发展背景

Policard<sup>[3]</sup>早在1924年就首次报道了在紫外和蓝光照射下观察到肿瘤荧光; 1942年, Auler<sup>[4]</sup>等在动物服用外源性卟啉后观察到肿瘤的红色荧光; Moo

re<sup>[5]</sup>于1948年第一个进行了使用荧光素来提高在体检测和识别脑肿瘤荧光能力的研究。到20世纪50年代, 人们发现了血卟啉能在肿瘤细胞内积累的特性, 予以开发利用, 随后血卟啉衍生物(HpD)作为肿瘤定位媒介, 被用于包括食道、呼吸道和子宫颈等不同器官中癌的定位。这些早期工作研究的都是非内镜下的晚期癌症, 因而获得了较好的荧光可见性。1976年, Kelly等<sup>[6]</sup>首先报道了膀胱镜下观察膀胱肿瘤的HpD荧光, 结果显示荧光太弱而难以直接观察到, 于是Profio<sup>[7]</sup>等开始了用光电探测器来检测肿瘤荧光的研究, 并取得一定的进展。Dougherty<sup>[8]</sup>是最早用血卟啉衍生物作为辅助剂来进行光动力学和动物模型研究的学者。与此同时, Alfano<sup>[9]</sup>和Yang<sup>[10]</sup>等多个科研小组开始了激光诱导动物及人类不同肿瘤荧光的在体和离体研究。随后Malik<sup>[11]</sup>和Krieg-nair<sup>[12]</sup>等用氨基乙酰丙酸(ALA)进行了光动力治疗的初始研究, 并提出用ALA诱导产生的内源性原卟啉IX的荧光来诊断膀胱癌。由此可见, 荧光技术已经对肿瘤诊断和光动力学治疗产生了重大影响。

## 2 荧光诊断技术

目前, 荧光诊断方法主要有两种。一种是自体荧光诊断法(Auto-fluorescence), 即在激光激发组织体后,

处于激发态的生物分子通过能量弛豫过程发出的光, 即所谓激光诱导的组织自体荧光。与相应的正常组织相比, 异常组织的物理、化学特性均发生变化, 因而对应的自体荧光光谱存在特异性差异, 也就是说自体荧光光谱的特异性差异反映了病变组织的特异性。基于这个原理, 就可以通过探测组织体的自体荧光光谱来判断病变组织存在与否。另一种是药物荧光诊断法(Drug-fluorescence), 由于自体荧光诊断法所能收集到的荧光信号大多较弱且特征不明显, 为了进一步提高激光诱导荧光诊断法的灵敏度, 在诊断前预先给患者注入一定剂量的荧光增敏剂, 一段时间后在病变组织和正常组织间形成显著的浓度差, 此时用激光照射, 病变组织将发射出较强且具有特征峰的荧光。

荧光诊断技术主要分为荧光光谱技术和荧光图像技术两类。目前自体荧光诊断法以光谱分析为主, 因为不便于采用图像处理方式, 因此在检查过程中不宜病变位置的定位。而在药物荧光诊断法中可以单独采用图像和非图像处理方式, 甚至可以两者同时配合使用, 可准确地对病变所在位置定位, 并根据检查结果立即进行活检或治疗, 操作十分方便。但无论是哪种方法, 它们都需要依靠荧光光谱分析或图像处理技术来得到对诊断的有用信息。

收稿日期:2004-12-09;

修订日期:2004-12-27。

**作者简介:**张波(1971-), 女, 湖南浏阳人, 中南大学湘雅医院卫生部肝胆肠外科研究中心主治医师, 主要从事超声与内镜诊断方面的研究。

**通讯作者:**张波 电话:0731-4327177 (0), 13007429128(手机); E-mail: zhangbo928@sina.com。

## 2.1 荧光光谱技术

光谱技术的基本原理就是利用病变组织与周围正常组织之间光学对比的差异从荧光的强度、光谱的形状、荧光强度比率等方面来表现。激发光源常用的有经滤光的弧光灯、脉冲激光或连续的强度调制激光等,且不论何种光源都要尽量减小信噪比。大多数基于光纤的脉冲式光谱仪都用氮激光或氦泵浦染色激光做光源,其典型的脉冲能量为几十微焦,纳秒级的脉冲持续时间和几十赫兹的重复率。对于光谱检测,荧光采集可与光源共用一根光纤,也可以用多根隔离光纤组成的光纤束。检测时多采用直接与组织接触的点检测<sup>[13,14]</sup>,这种方式可以减少背景光对荧光光谱的干扰,荧光强度较高,但是对组织的压力可能改变局部的血流状态,使接收谱产生畸变。当然,谱畸变在小面积照射时可能是由于边缘效应引起的,在大面积照射时则有可能是由于组织光学吸收或散射各向异性造成的。在点光谱检测中,荧光信号与探测面积上的荧光辐射强度成正比,一个单色扫描仪可以提供完整的荧光发射谱,而滤波设备给出的是离散的谱带,因此,光二极管阵列与色散光谱仪配合可以实现对发射谱的快速采集<sup>[14]</sup>。在点光谱仪中,对于一个给定的激发波长,可以记录大范围的发射谱,对于另外的激发波长可以进行快速重复,因此可以将不同的荧光激发波长和检测带宽结合起来,应用各种比较增强的谱分析技术来提高诊断的灵敏性和特异性。

从早期的离体研究开始,至今已经推出了一些内镜下进行荧光光谱检测的成熟的时基系统,主要有连续式和脉冲式两大类。前者始于20世纪70年代,Kelly等率先研究了用HpD在内镜下进行支气管癌点检测的荧光系统,后来被陆续应用于膀胱、支气管和食道等器官。90年代又报道了2种基于滤光后的弧光灯/单色仪来提供可调节激发波长的系统。一种是采用多色仪和增强二极管阵列,在内镜下

对上消化道和呼吸道进行自体荧光光谱和光敏剂的药代学研究<sup>[15~18]</sup>;另一种采用冷却的CDD探头、多色仪和激发单色仪,对膀胱、食道、气管等进行光漂白的在体研究<sup>[19,20]</sup>。同时有报道在膀胱和口腔对原卟啉IX荧光成像时进行谱荧光测量系统。脉冲式仪器始于90年代,主要是通过各种方法来实现改变或提供多个激发波长,以便获取更多反映组织生物特性的光谱信息。Schomacker<sup>[21,22]</sup>等采用氮染料激光和OMA系统研究卟啉及组织自体荧光;Ramanujam等<sup>[23,24]</sup>用两合氮分子激光检测系统对子宫颈癌前病变进行检测和鉴别;Glanzmann等使用的研究系统中,用600Ps的单氮分子染料激光与超高速扫描照相机一起耦合到光谱仪,可得到详细的瞬态谱。

## 2.2 荧光图像技术

其原理与光谱技术相同,激发光源常用的也是经滤光的弧光灯、脉冲激光或连续的强度调制激光等。但它的图像采集光纤与光源传输光纤必须隔离,它对组织的照射方式主要为非接触式,即将传输光纤与组织保持一定的距离,这种方式1次可以扫描较大的面积,但荧光强度较弱,容易受到背景光的干扰。在图像系统中,可以从一个或多个发射波长带获取二维的组织荧光强度分布图像。因此对于低强度的荧光,需要采用增强型CCD,以便在激发脉冲后进行快速的门控制。在荧光亮度和对比度很高时,也可采用非增强型摄像机或直接肉眼观察。

图像处理系统也分为连续式和脉冲式。连续式:1970年,Profio<sup>[7]</sup>和同事们首次将内镜图像系统引入荧光检测,以滤波后的汞弧光做光源,用图象增强器来放大微弱的血卟啉衍生物的荧光。随后Kato等采用相似的方法用滤波后的硅增强型摄像机成像。1986年,Profio<sup>[25]</sup>为了增强荧光的对比度,在两个谱窗中分别有序地观察对应于HpD荧光的红色区域和对应于组织自体荧光的绿色区域,然后将两者组合到一起进行图象处理和显示。

为了增强荧光图像的对比,另一种可供选择的技术是用多波长激发的方法。Baumgartner<sup>[26]</sup>等将氦离子激光器进行改进以交替发出紫光和蓝光,服用HpD后用增强型摄像机对600~700nm的荧光成像,通过适当的尺度和压缩方法将自体荧光从图像中剔除。脉冲式:相对连续式具有3个优点:脉冲与门控结合消除背景白光的干扰;经过延时使自体荧光衰减,提高外源性荧光的对比度;可对荧光寿命进行成像。在内镜下的初期研究是Kohl等<sup>[23~29]</sup>进行的基于荧光物质寿命差异的图像系统,但直到目前为止,用时域方法确定肿瘤边界的图像系统仍处于动物实验阶段。另一种是频域方法的研究,图像被分离到两个谱窗,一个是激发光的反向散射光作为相参考信号;一个是荧光,其相位延迟取决于荧光寿命。

目前已有2个商业化的内镜荧光图像系统:D-Light和LIFE系列。D-Light系统的激发波长范围为375~440nm,通过特殊的滤波和处理可以获得高彩色对比度的荧光图像。在该系统中,荧光系统与常规白光系统可以自由选择。LIFE系统以437nm的蓝光作为激发光源,荧光通过490~569nm的绿色荧光和630nm以上的红色荧光这两个隔离的通道检测,经处理后显示图像,在LIFE系统中,荧光检测与常规内镜可以通过光源自由切换。

## 3 结束语

短短的几十年,荧光诊断技术已经得到飞速发展,部分仪器已成功应用于临床诊断中。随着激光技术、光纤技术及组织光学研究的进一步深入,不管是荧光光谱技术还是荧光图像技术,它们各自还有非常广阔的发展空间,同时因为它们诊断方面各有优势,如果两者能有机结合,甚至与其它光学技术交叉运用,那么它在肿瘤诊断和其它临床领域中的发展优势是不可限量的。为此,应该继续进行

大量的光学基础研究工作和临床实验研究,争取早日设计出性能更优越的临床诊断用的荧光诊断系统。

#### 参考文献:

- [1] Andersson-Engels C. af Klinteberg, K. Svanberg, *et al.* In vivo fluorescence imaging for tissue diagnostics [J]. *Phys Med Biol*, 1997, 42 (5):815-824.
- [2] Nowell PC. Mechanisms of tumor progression [J]. *Cancer Res*, 1986, 46 (5):2203-2207.
- [3] Policard A. Etudes sur les aspects fertés par des tumeurs experimentales examinee a la lumiere de Woods [J]. *C R Soc Biol*, 1924, 91:1423-1425.
- [4] Auler H, Banzer G. Untersuchungen uber die rolle der Porphine bei Geschwulstkranken Menschen and Tieren [J]. *Krebsforsch*, 1942, B(53):65-68.
- [5] Moore GE, Peyton WT, French LA, *et al.* The clinical use of fluorescein in neurosurgery [J]. *Neurosurg*, 1948, 5(4):392-398.
- [6] Kelly JF, Snell JF. Hematoporphyrin derivative a possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder [J]. *Urol*, 1976, 115 (2):150-151.
- [7] Profio AE, Doiron DR. A feasibility study of the use of fluorescence bronchoscopy for localization of small lung tumors [J]. *Phys Med Biol*, 1977, 22(5):949-957.
- [8] Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A, *et al.* Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors [J]. *Cancer Res*, 1978, 38(8):2628-2635.
- [9] Alfano RR, Tata DB, Cordero JJ, *et al.* Laser induced fluorescence spectroscopy from native cancerous and normal tissue [J]. *IEEE J Quant Electron*, 1984, 20(11):1507-1511.
- [10] Yang YL, Ye YM, Li FM, *et al.* Characteristic autofluorescence for cancer diagnosis and its origin [J]. *Lasers Surg Med*, 1987, 7(5):528-532.
- [11] Malik Z, Lugaci H. Destruction of erythroleukaemic cells by photoinactivation of endogenous porphyrins [J]. *Cancer*, 1987, 56(5):589-595.
- [12] Kriegmair M, Baumgartner R, Lumper W, *et al.* Fluorescence cystoscopy following intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid (ALA) [J]. *Urol*, 1993, 149(4):240A.
- [13] Sroka R, Beyer W, Gossner L, *et al.* Pharmacokinetics of 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins in tumor-bearing mice [J]. *Photochem Photobiol*, 1996, B(34):13-19.
- [14] Zaak D, Sroka R, Stocker S, *et al.* Photodynamic Therapy of Prostate Cancer by Means of 5-Aminolevulinic Acid-Induced Protoporphyrin IX - In vivo Experiments on the Dunning Rat Tumor Model [J]. *Urologia Internationalis*, 2004, 72(3):196-202.
- [15] Peng Q, Berg K, Kongshaug JM, *et al.* 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy principles and experimental research [J]. *Photochem Photobiol*, 1997, 65(2):235-251.
- [16] Juzenas P, Iani V, Bagdonas S, *et al.* Fluorescence spectroscopy of normal mouse skin exposed to 5-aminolaevulinic acid and red light [J]. *Photochem Photobiol*, 2001, 61(1):78-86.
- [17] Marcus SL, Sobel RS, Golub AL, *et al.* Photodynamic therapy (PDT) and photo diagnosis (PI) using endogenous photosensitization induced by 5-aminolevulinic acid (ALA): current clinical and developmental status [J]. *Clin Laser Med* 1996, 14(1):59-66.
- [18] Steinbach P, Weingandt H, Baumgartner R, *et al.* Cellular fluorescence on the endogenous photosensitizer protoporphyrin-IX following exposure to 5-aminolevulinic acid [J]. *Photochem Photobiol* 1995, 62(6):887-895.
- [19] Forrer M, Glanzmann T, Bergh H, *et al.* In vivo measurement of fluorescence bleaching of mTHPC in the esophagus and the oral cavity [J]. *Proc SPIE*, 1995, 2627(1):33-39.
- [20] Glanzmann T, Forrer M, Andrejevic S, *et al.* Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin in the hamster cheek pouch tumor model: comparison with clinical measurements [J]. *Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2000, 57(1):22-32.
- [21] Schomacker KT, Frisoli JK, Compton CC, *et al.* Ultraviolet laser-induced auto-fluorescence of colonic tissues: basic biology and diagnostic potential [J]. *Lasers Surg Med*, 1992, 12(1):63-78.
- [22] Pfefer TJ, Schomacker KT, Nishioka NS. Long-term effects of photodynamic therapy on fluorescence spectroscopy in the human esophagus [J]. *Photochem Photobiol*, 2001, 73(6):664-668.
- [23] Ramanujam N, Mitchell MF, Mahadevan A, *et al.* Development of a Multivariate Statistical Algorithm to Analyze Human Cervical Tissue Fluorescence Spectra Acquired In Vivo [J]. *Laser in Surgery and Medicine*, 1996, 19(1):46-62.
- [24] Lubawy C, Ramanujam N. Endoscopically compatible near infrared photon migration probe [J]. *Optics Letters*, 2004, 29(17):2022-2024.
- [25] Profio AE, Balchum OJ, Cartens F. Digital background subtraction for fluorescence imaging [J]. *Med Phys*, 1986, 13(4):717-721.
- [26] Baumgartner R, Fisslinger H, Jochem D, *et al.* A fluorescence imaging device for endoscopic detection of early stage cancer instrumental and experimental studies [J]. *Photochem Photobiol*, 1987, 46(5):759-764.
- [27] Gamarra F, Wagner S, Al-Batran S, *et al.* Kinetics of 5-Aminolevulinic Acid-Induced Fluorescence in Organ Cultures of Bronchial Epithelium and Tumor [J]. *Respiration*, 2002, 69(5):445-450.
- [28] Kohl M, J Neukammer, Sukowski U, *et al.* Imaging of tumors by time delayed laser-induced fluorescence [J]. *Proc SPIE*, 1991, 1525(1):26-34.
- [29] Kohl M, J Neukammer, Sukowski U, *et al.* Delayed observation of laser-induced fluorescence for imaging of tumours [J]. *Appl Phys*, 1993, 56(1):131-138.