

氩激光激发自体荧光诊断口腔癌的适用性研究

杨 栋 曾超英

(厦门大学抗癌研究中心, 361005)

提要: 用一种快速检测活体组织荧光光谱的技术, 分析人口腔的恶性肿瘤、癌前病变、良性疾患和各种正常组织的氩激光激发自体荧光光谱, 讨论以卟啉峰为特征诊断恶性肿瘤时, 某些假阳性、假阴性病例产生的原因和鉴别的方法。

关键词: 氩激光, 口腔癌, 自体荧光

Analysis on the clinical applicability of laser excited autofluorescence spectra for oral cancer diagnosis

Yang Dong, Zeng Chaoying

(Cancer Research Center, Xiamen University, Xiamen)

Abstract: Using a new diagnostic system composed of an argon laser, optical multi-channel analyzer and fiber optics, the authors have detected the autofluorescence spectra with porphyrin specific peaks from all of twenty three cases of oral cancers and seven out of eight premalignant lesions as well as from some benign tissues. The cases of false positive and negative diagnosis are described and the identification for them are discussed.

Key words: argon laser, oral cancer, autofluorescence

近年来, 有人尝试将激光激发自体荧光光谱分析法应用于口腔癌的检查 and 定位上^[1~3]。这项诊断方法的依据是, 恶变组织的自体荧光光谱中含有卟啉荧光光谱的特征峰型, 即在 630 nm 处显示一较大的峰, 在 700 nm 处显示一较小的峰, 而这种峰型是正常组织的自体荧光光谱所没有的。但在迄今所见的报道中, 未对假阳性和假阴性病例作出具体描述。

作者用一种快速检测分析活体组织荧光光谱的技术, 对 71 例口腔肿瘤患者和 500 余例正常人进行氩激光激发自体荧光检查, 结果除在 23 例癌肿和 7 例癌前病变上见到卟啉特征外, 还在正常舌面、牙垢和血卟啉病患者的粘膜上发现相同的卟啉特征。本文报道所得的结果, 同时讨论这项新技术对口腔癌诊断的适用性。

一、测量装置和分析方法

1.1 荧光测量系统

荧光检测分析系统由氩离子激光器、光导纤维和 OMA III 光学多道分析仪构成 (图 1)。

氩激光器工作在 514.5 nm 波长单线上, 激光束经单芯光纤传导至检查面, 输出功率约 50 mW。检查面发出的荧光用光纤采集并送入 OMA III 光学多道分析仪检测和分析。在荧光采集光纤和多色仪间插入一块截止在 550 nm 以下波段的滤光片, 用来吸收信号中的激发光成分, 有利于提高信噪比并防止 OMA 探头的光过载。诊断过程中为满足白光观察或荧光监测

的不同需要而进行的光源变换, 以及荧光光谱数据采集和处理的触发, 集中受控于一只脚踏开关, 由实施检查的医生操作。在临床应用中, 该系统通常仅需 0.1 s 的曝光时间, 便可获得一帧信噪比良好的谱图。

1.2 荧光数据分析方法

以往对肿瘤荧光光谱的分析是通过对谱图的直接观察作出的, 因此分析结果中往往含有主观判断上的误差, 且难于实现对成片可疑区的连续快速搜索。为解决这个问题, 作者采用一种新的数据处理方法。该方法用卟啉荧光强度 I_s 和总荧光强度 I 的比值 I_s/I 作为表征组织恶变特异性的指标。如果我们只考虑卟啉荧光主特征峰所处的区间 $[\lambda_1, \lambda_2]$, 则 I_s/I 值可由下式决定^[4]:

$$I_s/I = \alpha [I_c - k(I - \alpha I_c)] / I_c \quad (1)$$

式中 I_c 是光谱曲线 $\phi(\lambda)$ 与连接 $(\lambda_1, \phi(\lambda_1))$ 和 $(\lambda_2, \phi(\lambda_2))$ 两点的直线段所包围的面积(以下简称荧光校正强度), α 是内源性卟啉荧光光谱在区间 $[\lambda_1, \lambda_2]$ 上的强度和校正强度的比值, 而 k 是一个由正常粘膜的自体荧光(由非卟啉荧光物质所贡献)决定的修正因子, 且有

$$k = I_{oc} / (I_o - \alpha I_{oc}) \quad (2)$$

这里 I_o 和 I_{oc} 分别表示正常粘膜在区间 $[\lambda_1, \lambda_2]$ 上的荧光强度和荧光校正强度。

应用 OMA III 专用微机系统软件的数据处理功能, 可对 I_s/I 值进行实时监测, 取样速率最高可达每秒 20 次。本文取 $\lambda_1 = 624 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 644 \text{ nm}$, $\alpha = 1.9$, $k = -0.020$, 则 I_s/I 值的变动范围为 0~1。

二、结果和讨论

2.1 恶性肿瘤和正常粘膜荧光光谱分析

图 2 给出 1 例左下牙龈鳞癌患者肿瘤上和正常牙龈粘膜上的自体荧光光谱, 并给出从正常粘膜区到病损区的 I_s/I 扫描曲线。可以看到, 在恶性肿瘤的自体荧光光谱中含有卟啉荧光光谱的特征峰型, 而正常粘膜的荧光光谱在同一区间上却表现得相当“平滑”。 I_s/I 扫描曲线表明肿瘤侵犯区和正常区在卟啉荧光贡献上存在着大的差别。这种差别正是激光自体荧光诊断法赖以区分恶变组织与良性组织的主要判据。在其他 22 例口腔癌患者的病灶上, 也测到含有卟啉特征峰的自体荧光光谱, 它们的 I_s/I 值均高于 0.20(表 1)。以上病例都经活组织检查证实, 其中 2 例可辨识的损害直径仅 3 mm 左右。而在 454 例正常人口腔粘膜(舌面除外)上测到的 I_s/I 值, 未见有高于 0.10 的。

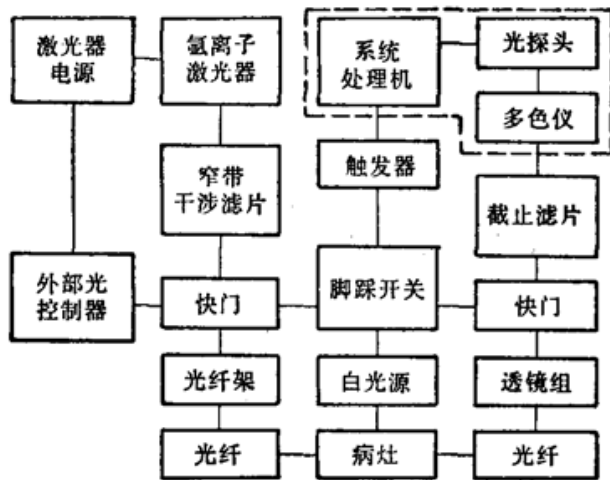


图 1 荧光测量装置示意图

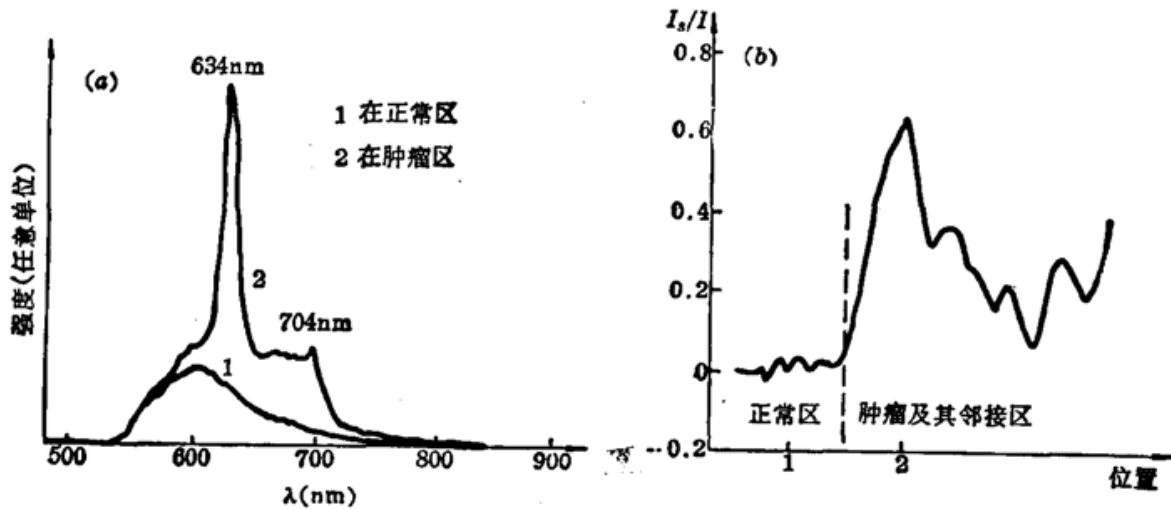


图2 对1例牙龈鳞癌患者(男,55岁)的氩激光激发自体荧光检测
(a) 肿瘤和正常粘膜的荧光谱; (b) 从正常区到肿瘤侵犯区的 I_s/I 扫描曲线

表1 23例口腔癌患者的自体荧光检查结果

组织学分类	肿瘤位置	例数	I_s/I
鳞 癌	口 底	2	0.44, 0.24
	舌 腹 舌 侧	7	0.31, 0.42, 0.43, 0.30 0.29, 0.63, 0.82
	牙 龈	2	0.71, 0.54
	口 咽	1	0.80
	颊粘膜	5	0.38, 0.33, 0.63, 0.27, 0.86
	硬 腭	1	0.23
腺 癌	口 咽	1	0.59
恣 黑	硬 腭	1	0.72
软骨肉瘤	上颌窦	1	0.88
基底细胞癌	鼻皮肤	1	0.26
恶性混合瘤	牙 龈	1	0.32

2.2 正常舌面和牙垢荧光光谱分析

对547人的调查表明,在绝大多数人的舌面上,可测到含有卟啉特征峰的自体荧光光谱。同一舌面不同位置的 I_s/I 值可有很大的不同,通常在舌面中后部较高,而在舌尖和舌缘部较低,且不存在明确的对称分布规律(图3)。在不同舌面上, I_s/I 最高值也可有大的差异,高者接近于1,低者则接近于0。这一发现说明,对于舌面肿瘤的诊断,自体荧光光谱分析法是不可靠的或者不适用的。至于在正常人舌面上为什么会存在内源性卟啉物质的高度聚集,以及此种聚集水平所包含的临床意义,仍有待于我们作进一步探讨。但令人感兴趣的是,可利用舌面荧光对内源性卟啉含量水平的提示,判断一个患者的自体荧光检查有否出现假阴性的可能。1例上颌窦鳞癌患者根治术后愈合面的自体荧光和 PSD-007 荧光检查 I_s/I 数据分别为:舌面: <0.03 , 上鼻甲: 0.04, 创面中心: 0.01, 创面下缘: 0.00 和上鼻甲: 0.16, 创面中心: 0.19, 创面

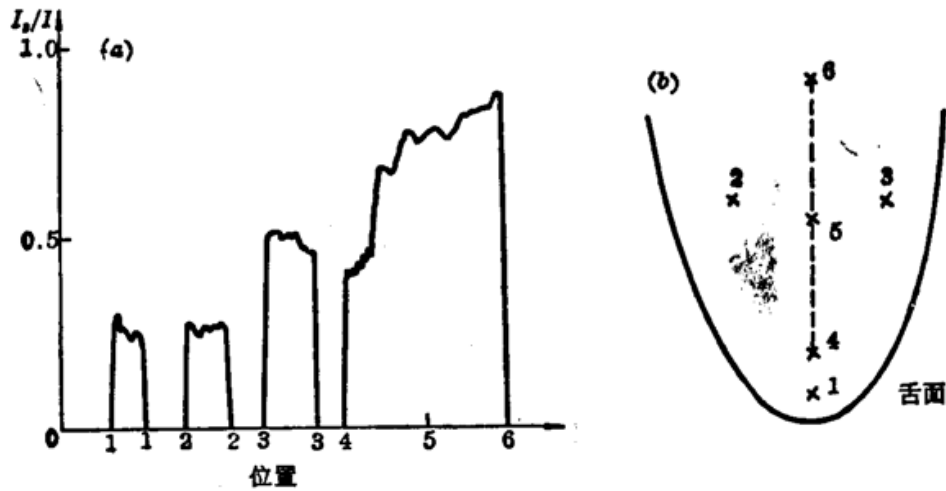


图3 对1例31岁女子正常舌面的氩激光自体荧光光谱检测
(a) 在舌面不同区域的 I_s/I 扫描曲线; (b) 扫描路线(点)示意图

下缘: 0.50。在自体荧光检查中, 未发现创面及其周围有阳性点, 但由于该患者舌面荧光的 I_s/I 值接近于0, 不能排除恶性组织的存在, 所以接着做药物荧光检查, 结果在创面下缘见到强阳性点, 活检证实该位置有鳞癌浸润。

除舌面外, 牙垢的荧光谱也带有强的卟啉特征峰, 因此在牙龈肿物的荧光检查中, 应注意避开其影响。

2.3 血卟啉病患者口腔粘膜荧光光谱分析

在2例红细胞生成性原卟啉病患者的口腔粘膜上, 测出含有卟啉特征峰的自体荧光谱。但这种假阳性易于鉴别, 因患者口内不同区域均示较高的 I_s/I 值。比如, 在其中1例患者的左颊、右颊和口底粘膜上测出的 I_s/I 值分别为0.28、0.20和0.31。而通常情况下, 只有粘膜的恶变区才显示高的 I_s/I 值。另外, 在此类患者的血液样品上, 可测到强的卟啉荧光峰。两患者的指尖全血 I_s/I 值分别为0.55和0.89, 而正常人为0.04。

2.4 PDT后患者口腔粘膜荧光光谱分析

光动力学治疗(PDT)后患者的口腔粘膜, 可在相当长的一段时间里保持带有卟啉特征峰的荧光光谱。对4例接受过PDT治疗的口腔癌患者所作的测量(表2)表明, 即便到PDT治疗后2至2个半月, 仍可在口内不同位置的正常粘膜或原病损区的新生组织上查到较高的 I_s/I 值。但一般情况下各位置上的 I_s/I 值应较接近, 如果在原病损区或其邻接区上某处见到特别高的 I_s/I 值, 便须考虑局部癌残余的可能性。比如, 患者2原损害区b点的 I_s/I 值高达0.72, 在这一点上取活检就查到癌细胞。

表2 4例口腔癌患者PDT治疗后口内不同位置上的 I_s/I 值测定*

	正常粘膜				PDT治疗区		
	颊	硬腭	软腭	口底	a	b	c
患者1	0.13	0.17	0.12	0.06	0.15	0.16	0.06
患者2	0.19	0.15	0.09	0.09	0.13	0.72	0.25
患者3	0.14	0.08	0.07	0.12	0.09	0.08	0.09
患者4	0.07	0.02	0.00	0.11	0.09	0.03	0.07

* 患者1、2、3、4分别在PDT后54天、69天、82天和136天测定。

2.5 癌前病变和良性疾患荧光光谱分析

对 44 例口腔非癌病变(不含舌面病变)作了自体荧光检查。结果在 8 例中、重度不典型增生(癌前病变)中,有 7 例也显示出高于正常的 I_s/I 值(表 3)。初步观察提示,受检位置的 I_s/I 值与细胞异常增殖程度、供血状况及表面坏死情形均有密切关系。36 例良性疾患,包括 1 例乳头状瘤、1 例基底细胞上皮瘤、10 例慢性溃疡、3 例囊肿、1 例骨髓炎、7 例术后疤痕、3 例扁平苔癣、2 例疣、2 例黑色素痣、3 例血管瘤、1 例脂溢性角化病和 2 例红斑狼疮口唇损害,除 2 例糜烂型扁平苔癣的 I_s/I 值略高于正常(分别为 0.15 和 0.19),其余都低于 0.10。

表 3 8 例中、重度不典型增生病变的 I_s/I 值测定

活 检	位 置	例 数	I_s/I
中度增生	舌 腹	1	0.50
	牙 龈	1	0.65
	口 咽	2	0.32, 0.98
	颊粘膜	2	0.14, 0.09*
重度增生	舌 腹	1	0.42
	硬 腭	1	0.92

* 该患者舌面自体荧光 $I_s/I \approx 0$ 。用浓度 $5\mu\text{g/ml}$ 的 Photofrin II 含漱 10 分钟后 6 小时再测,病变区和正常区的 I_s/I 分别为 0.30 和 0.07。

由此我们得出以下结论。

1. 在氩激光激发自体荧光检测中,癌和癌前病变的 I_s/I 值通常高于 0.20,而正常粘膜(舌面除外)和良性疾患的 I_s/I 值一般则低于 0.10。癌和癌前病变如何区分尚须探讨。

2. 大多数正常舌面的 I_s/I 值也高于 0.20,且其位置分布不具均匀性和对称性,所以舌面肿瘤不宜用自体荧光法诊断。

3. 红细胞生成性原卟啉病和 PDT 后患者的口腔粘膜,也会显示较高的 I_s/I 值,但这两种假阳性易于鉴别。牙垢是造成假阳性的另一原因,因此在牙龈肿物的荧光检查中,应注意避开其影响。

4. 舌面的 I_s/I 值很低者,病变区的自体荧光检查可能出现假阴性结果,必要时应加做药物卟啉荧光检查,以防漏诊。

5. 该方法灵敏、简便、快速,对机体无任何损伤,适宜做较大范围的探查搜索或经常性的追踪观察。在现阶段可作为指导活检的一种有效手段。这对于口腔癌的早期发现和准确定位,以及术后的随访检查,均具有重要价值。

本工作得到厦门市第一医院口腔科曹庆清副主任医师和厦门大学抗癌研究中心王盛丰副主任医师的帮助,谨表谢意。

参 考 文 献

- 1 马宝章 *et al.*, 应用激光, 4(5), 235(1984)
- 2 叶衍铭 *et al.*, 应用激光, 5(3), 134(1985)
- 3 叶衍铭 *et al.*, 中国激光, 14(4), 241(1987)
- 4 杨栋, 厦门大学学报, (自然科学版), 27(6), 700(1988).