

文章编号: 0258-7025(2009)10-2566-05

激光诱导荧光技术在体探测裸鼠腹膜胃癌播散

马 君¹ 张奚宁¹ 徐 明¹ 毛伟征² 郑荣儿¹

(¹ 中国海洋大学光学光电子实验室, 山东 青岛 266100; ² 青岛大学医学院附属医院普外科, 山东 青岛 266003)

摘要 以腹膜接种人胃癌细胞 SGC-7901 的裸鼠为胃癌腹膜播散的动物模型, 模拟外科手术, 在体探测不同种植期的裸鼠腹膜癌结节及正常腹膜组织的激光诱导自体荧光光谱, 对比各组光谱形态, 采用层次聚类分析和判别分析方法进行分类。结果表明, 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)荧光峰强度随肿瘤细胞生长时间的增加而降低, 而原卟啉 IX 峰逐渐升高; 当类间距离的测度方法选择为欧氏距离平方, 分类数取 3 时, 可有效区分正常组、肿瘤细胞种植时间较长和较短的肿瘤组的在体荧光光谱。激光诱导自体荧光(LIAF)技术可辅助提高手术中转移癌的判断准确性。

关键词 激光光谱; 胃癌播散; 激光诱导自体荧光; 裸鼠; 聚类分析; 判别分析

中图分类号 Q631; R735.2 文献标识码 A doi: 10.3788/CJL20093610.2566

Detection of Gastric Cancer Peritoneal Dissemination in Nude Mouse Model by Laser-Induced Fluorescence Spectroscopy in Vivo

Ma Jun¹ Zhang Xining¹ Xu Ming¹ Mao Weizheng² Zheng Ronger¹

¹ Optics and Optoelectronics Laboratory, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266100, China

² Department of General Surgery, Medical College Hospital, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266003, China

Abstract The nude mice which were injected with the human gastric cancer cells (SGC-7901) in their peritoneums were chosen as the animal models of gastric cancer peritoneal dissemination in our research. The laser-induced autofluorescence spectra of these mice which were in different tumor planting periods and the normal counterpart were taken in vivo during the simulated surgeries. The spectra of different tissue types were compared and classified by clustering analysis and discriminate analysis. The results indicate the intensities of reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) are gradually decreasing while the one of Protoporphyrin IX (PpIX) are increasing with the growing of the cancer cell. The distinguish of the normal group and the tumor groups with different growth times of cancer cells is quite obvious when the measure method of interclusters and cluster number were set to square euclidean distance and 3, respectively. The technology of laser-induced autofluorescence (LIAF) may help to increase the accuracy of distinguishing the carcinoma metastaticum during surgeries.

Key words laser spectroscopy; gastric cancer peritoneal; laser-induced autofluorescence; nude mouse; cluster analysis; discriminant analysis

1 引 言

腹膜播散是胃癌扩散的主要形式, 手术中准确判定腹膜转移及程度是医生选择手术方式的重要依据, 然而凭肉眼判断准确性不高, 传统冰冻病理检查耗时、有创伤。自体荧光探测是近年来受到普遍关注的对肿瘤进行诊断的一种方法^[1~3], 它通过分辨光谱间差异来区分正常及不同程度癌变的组织, 对

提高手术中判断转移癌的准确性、减少活检对患者的创伤有较重要的意义。随着近年来研究的进展, 荧光光谱探测已经由早期对离体组织的研究转向在体探测。其中, 比较有代表性的是将内窥镜和荧光光谱技术相结合进行在体探测, 以期取代活检。2003 年, Mayinger 等^[4]利用内窥镜对正常与癌变的结肠组织进行在体激光诱导自体荧光(Laser-

收稿日期: 2009-07-21; 收到修改稿日期: 2009-08-24

基金项目: 山东省自然科学基金(Y2006G23)和青岛市科技发展计划(08-1-3-31-jch)资助课题。

作者简介: 马 君(1963—), 女, 硕士, 教授, 主要从事激光光谱学、激光生物医学和计算机模式识别等方面的研究。

E-mail: majun@ouc.edu.cn(中国光学学会会员号: S040111602S)

induced autofluorescence, LIAF) 光谱研究, 发现两类组织的胶原蛋白及卟啉荧光峰的强度存在差异。2006 年, Hariri 等^[5]利用附有光学相干层析与激光诱导荧光系统的内窥镜, 对建立在鼠类模型上的人结肠直肠癌进行在体研究, 发现在结肠腺瘤组织的激光诱导荧光光谱中出现 680 nm 的荧光峰。2007 年, Courrol 小组以雄性 SCID 鼠做肾细胞癌模型, 用荧光探测的方法对该模型的卟啉进行检测, 发现肿瘤血液中卟啉荧光团的荧光强度高于正常血液^[6]。

本文在前期离体胃癌组织激光诱导自体荧光光谱特性研究的基础上^[7,8], 对以腹膜接种人胃癌细胞 SGC-7901 的裸鼠为胃癌播散的动物模型, 进行全麻剖腹的模拟外科手术, 在体探测肿瘤组不同生长期的裸鼠腹膜癌结节及对照组正常腹膜组织的激光诱导荧光光谱。采用层次聚类 and 判别分析的方法对光谱进行分类, 为将来研制高效准确的“胃癌腹膜播散探测器”, 在临床上协助医生手术中实时准确地鉴别和诊断打下实验基础。

2 材料与方 法

2.1 人胃癌裸鼠模型分组

12 只雄性裸鼠中随机选 2 只作为对照组; 剩余每只腹腔内注入 SGC-7901 人胃癌细胞 5×10^6 个, 按种植时间长短, 分成不同生长期的肿瘤组。具体分组情况为: F 组为正常对照组; A~E 组为肿瘤组, 人胃癌细胞裸鼠体内生长天数分别为 20, 16, 12, 8, 4 天。

2.2 在体荧光探测系统

实验系统如图 1 所示, 采用 InGaN 半导体激光器 (Coherent 公司) 作为光源, 波长为 405 nm, 功率 20 mW, 由 Y 型光纤中单芯激发光纤分支传导进入

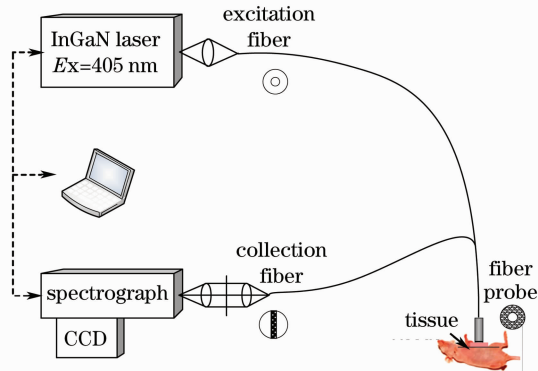


图 1 LIAF 实验系统图

Fig. 1 System of the LIAF experiment

光纤探头。探头垂直接触组织表面, 顶部包裹 2 mm 厚石英光学片, 以固定探测距离并防止其被组织体液污染。探头内部中心为单芯激发光纤, 周围环绕 200 根收集光纤, 用于收集组织回向散射光。收集光纤在与光谱仪的相连处排列成与光谱仪狭缝宽度相当的线状结构, 将散射光耦合到光谱仪。用 SpectraPro 2500i 型光谱仪 (Acton 公司) 分光, 狭缝宽度 100 μm , 光栅刻痕密度 150 g/mm, 闪耀波长 500 nm。信号分光后由 SPEC-10:400B 型 CCD (Charge Coupled Device, Princeton Instrument 公司) 进行光电转换, 随后输入计算机, 由 Winspec 软件记录。

2.3 在体荧光光谱采集及病理检验方法

取 1 mL 质量分数为 5% 的盐酸氯胺酮与 4 mL 生理盐水混合后, 制成用于裸鼠麻醉的麻醉剂。每只裸鼠腋下注射该麻醉剂 0.6 mL, 待其进入麻醉状态后置于样品台固定。行剖腹手术, 翻开腹膜发现: E 组: 生长期为 4 天, 肉眼未见肿瘤; D 组: 生长期为 8 天, 偶可见小结节; C 组: 生长期为 12 天, 见 1 mm 左右米粒状结节; A, B 组: 生长期分别为 16, 20 天, 肿瘤个数增多, 大小不一。总之, 种植时间越长, 肿瘤腹膜播散程度越严重。每只裸鼠选择腹膜不同位置或结节处采集光谱多条, 6 组裸鼠共得光谱 52 条。切取光谱探测处腹膜组织送病理检验, 确定腹膜结节的性质。

3 实验结果与分析

对每条光谱进行去背景、平滑及面积归一化处理, 以消除噪声、激发光能量及荧光收集效率波动等对其的影响。

3.1 腹膜组织的在体激光诱导自体荧光光谱

在归一化光谱基础上, 分别对每一组裸鼠光谱取平均, 得各组平均光谱如图 2(a) 所示。分析可得: 450~530 nm 荧光区中, 6 组样本的主峰均位于约 489 nm 处, 源于还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADH); 530~600 nm 区域存在由于血色素的吸收而形成的 578 nm 荧光峰; 600~700 nm 范围的卟啉类物质荧光区, 出现由血卟啉衍生物产生的 615 nm 荧光峰及原卟啉 IX (Protoporphyrin IX, PpIX) 位于 635 nm 的第一荧光峰^[9]。各肿瘤组与对照组的差谱 [图 2(b)] 更有效地反映了肿瘤组与对照组在光谱形态上的差异: 相对于对照组, 各肿瘤组荧光峰的相对强度随肿瘤生长时间的增加而发生变化。其中 489 nm 处, 肿瘤组光谱相对强度小于零, 即肿瘤组荧光峰强度小于对照组强度, 且 A 组

光谱差值最大,E组差异最小;615 nm处,肿瘤组与对照组的荧光峰强度差值大于零,且差值由E组到A组逐渐增大;635 nm处,除E组外的肿瘤组与对

照组的差值在零值以上,D组差值在零值附近,差值由C组到A组逐渐增大。

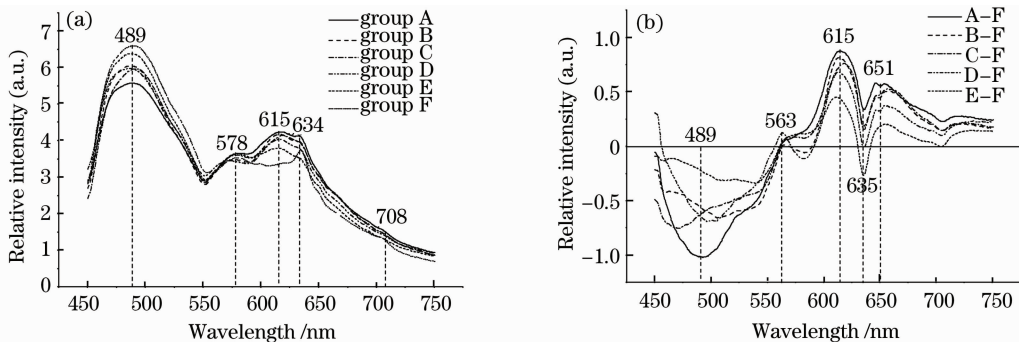


图 2 (a) 腹膜组织的各组平均光谱;(b) 肿瘤组与对照组的差谱

Fig. 2 (a) Mean spectra of each group; (b) difference spectra of the tumour groups and control group

综上所述,与对照组比较发现,肿瘤组的 NADH 荧光峰强度低于对照组,且随着肿瘤细胞生长时间的增加,两类光谱在该处强度差值逐渐增大;肿瘤组在卟啉类物质两个峰位处的强度一般大于对照组的强度(除 E 组外),荧光峰的强度差值随肿瘤细胞生长时间的增加逐渐增大。由此可知,随着癌细胞生长时间的增加,NADH 荧光峰强度逐渐降低,而卟啉类物质荧光峰强度逐渐升高。同时,医学研究表明,在组织癌变过程中,NADH 在氧化还原作用下转化,其含量逐渐降低,而癌变组织对卟啉类物质的“滞留”致使其含量逐渐升高。许多荧光光谱研究也说明^[5,10,11],这两种荧光物质的代谢变化在 LIAF 图中表现为 NADH 的荧光峰强度降低,PpIX 的荧光峰强度增强。

3.2 腹膜在体荧光光谱的聚类分析与判别分析

为客观评价正常及不同生长期肿瘤荧光光谱之间的差异,以期达到分析癌细胞播散时间的目的,首先选用无监督情况下的聚类分析对实验所得的 6 组荧光光谱进行比较分类,确定适当的分类数目,随后对所有 52 条荧光光谱按其类别进行判别分析,求出判别函数并给出分类评价。

3.2.1 聚类分析

应用 SPSS13.0 软件,以每组的平均光谱作为样本(case),采用凝聚的 Q 型层次聚类方法,选择组间连接,使得分组后各类的类间距离尽量大。采用不同的类间距离测度方法^[12],设定步长为 1,对上述 6 组样本的平均光谱进行分类。通过与各组肿瘤细胞生长情况比较,当选用欧氏距离平方(Square Euclidean distance)法度量类间距离时,分类结果最佳,分类树状图如图 3 所示。分类数目分别为 2~4 的聚类结果如表 1 所示。若分类数取 2,即可将 6

组实验光谱区分为 2 类,第 1 类包括 A~E 5 个肿瘤组,第 2 类为 F 对照组,即表示可以将对照组与肿瘤组光谱区分开;若分类数取 3,则在上述分类的基础上,进一步将肿瘤组划分为 2 类:肿瘤生长时间较长的 A~C 组聚成一类,生长时间较短的 D,E 组聚成一类;若分类数取 4,则 D,E 组又被分为单独的两类,而 A~C 组没有被进一步地区分。

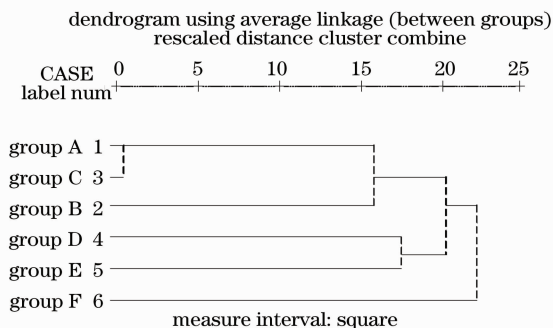


图 3 采用欧式距离平方对 6 组光谱的分类树状图

Fig. 3 Dendrogram that classified 6 set of spectrum, using square euclidean distance method as measure method

表 1 将光谱分为 2,3,4 类的聚类结果

Table 1 Cluster result of the spectra dividing into two, three, four categories

| Case | 4 clusters | 3 clusters | 2 clusters |
|------|------------|------------|------------|
| 1:A | 1 | 1 | 1 |
| 2:B | 1 | 1 | 1 |
| 3:C | 1 | 1 | 1 |
| 4:D | 2 | 2 | 1 |
| 5:E | 3 | 2 | 1 |
| 6:F | 4 | 3 | 2 |

综上所述,当类间距离的测度方法选择为欧氏

距离平方,取合适的光谱间距离,确定分类数为3时,可以区分对照组、生长期分别为长期及短期的肿瘤组的在体荧光光谱。

3.2.2 典则判别分析

由上述分析,将腹膜组织分为3类,则第1类(记为Cancer 1)包含A,B,C 3个肿瘤组,共采集光谱30条;第2类(记为Cancer 2)包含D和E组样本,共采集光谱16条;第3类(记为Normal)为对照组F,包含腹膜光谱6条。应用SPSS13.0软件,采用主要成分分析法(PCA)将高维光谱数据压缩,对52条光谱提取前5个主要成分(PC1~PC5),每个主成分贡献率如图4所示。发现这5个主成分涵盖了97.4%的整体信息,可准确反映光谱特征。

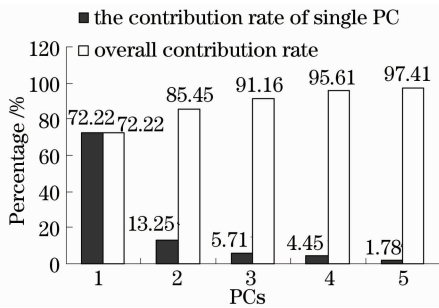


图4 腹膜光谱的主成分贡献率

Fig. 4 Principal components' contribution rate of peritoneal spectrum

1) 判别函数的建立

以光谱的前5个主成分为变量,对52条在体荧光光谱做判别分析,得到未标准化典则判别函数

Function 1:

$$y_1 = 0.16 \times N_{PC1} + 0.93 \times N_{PC2} + 0.95 \times N_{PC3} + 0.24 \times N_{PC4} + 0.08 \times N_{PC5} + 0.09, \quad (1)$$

Function 2:

$$y_2 = 0.25 \times N_{PC1} - 0.67 \times N_{PC2} + 0.58 \times N_{PC3} - 0.08 \times N_{PC4} + 0.51 \times N_{PC5} + 0.03. \quad (2)$$

N_{PC} 表示主成份的量。

由(1),(2)式计算各光谱的判别分数,以典则函数变量 y_1 和 y_2 为横、纵坐标绘制散点图如图5所示。

由图5可知,Cancer 1主要分布在第1,4象限,Cancer 2集中在第2象限,而Normal集中在第3象限。3类光谱中心的坐标分别为1:(0.92,-0.02), 2:(-1.22,0.64)和3:(-1.33,-1.63)。

2) 判别函数的评价

利用判别函数预测分类结果的准确性,回代结果如表2所示。30条来自于A,B,C 3组的光谱,有

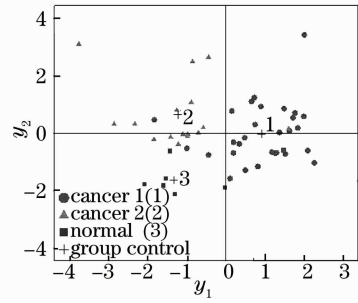


图5 以典则判别函数为坐标的散点图

Fig. 5 Scatterdiagram using canonical discriminant functions as coordinate

28条划分在第1类,2条划分在第2类,准确率为93.3%;D及E组的共16条光谱中,有15条划分在第2类,1条划分在第1类,准确率为93.8%;对照组F的6条光谱中,有5条划分在第3类,1条划分在第1类,其准确率为83.3%。总体的判断正确率为92.3%。

表2 利用判别函数预测分类的结果

Table 2 Classification results according to the distinguish functions

| | | Predicted classification | | |
|-----------------------------|----------|--------------------------|----------|--------|
| | | Cancer 1 | Cancer 2 | Normal |
| Histological classification | Cancer 1 | 28 | 2 | 0 |
| | Cancer 2 | 1 | 15 | 0 |
| | Normal | 1 | 0 | 5 |

4 结 论

对人胃癌腹膜播散的裸鼠模型在体激光诱导自体荧光光谱探测及分析表明,相对于正常组,肿瘤随生长时间的增加,其荧光光谱的NADH荧光峰强度逐渐降低,原卟啉IX第1荧光峰强度逐渐升高。说明在肿瘤细胞繁殖过程中,组织中NADH含量逐渐减少,卟啉类物质含量逐渐增加。对光谱进行聚类分析得到,当类间距离的测度方法选择为欧氏距离平方,分类数取3时,可以将正常组、肿瘤细胞种植时间较长和较短的肿瘤组在体荧光光谱进行有效区分。研究表明,在体激光诱导自体荧光光谱可以反映生物活体的实时状态;且聚类分析可根据样本的自然属性归类,两者的结合可辅助提高手术中转移癌的判断准确性。

参 考 文 献

1 Yang Dong, Zeng Chaoying. Analysis on the clinical applicability of laser excited autofluorescence spectra for oral cancer diagnosis [J]. *Chinese J. Lasers*, 1991, 18(2): 144~148
 杨 栋, 曾超英. 激光激发自体荧光诊断口腔癌的适用性研究

- [J]. 中国激光, 1991, **18**(2): 144~148
- 2 Zheng Wei, Huang Zhiwei, Xie Shusen *et al.*. Intrinsic microscopic fluorescence and imaging of human lung tissues[J]. *Chinese J. Lasers*, 2001, **A28**(7): 669~672
郑蔚, 黄志伟, 谢树森等. 人肺组织内源性显微荧光特性研究[J]. 中国激光, 2001, **A28**(7): 669~672
- 3 Z. Huang, W. Zheng, S. Xie *et al.*. Laser-induced autofluorescence microscopy of normal and tumor human colonic tissue[J]. *International J. Oncology*, 2004, **24**(8): 59~63
- 4 B. Mayinger, M. Jordan, P. Horner *et al.*. Endoscopic light-induced autofluorescence spectroscopy for the diagnosis of colorectal cancer and adenoma [J]. *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2003, **70**(1): 13~20
- 5 L. P. Hariri, A. R. Tumlinson, D. G. Besselsen *et al.*. Endoscopic optical coherence tomography and laser-induced fluorescence spectroscopy in a murine colon cancer model[J]. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2006, **38**(4): 305~313
- 6 L. C. Courrol, F. R. de Oliveira Silva, E. L. Coutinho *et al.*. Study of blood porphyrin spectral profile for diagnosis of tumor progression[J]. *J. Fluorescence*, 2007, **17**(3): 289~292
- 7 Shi Xiaofeng, Ma Jun, Mao Weizheng *et al.*. Applying partial least-squares discriminant analysis on autofluorescence spectra to identify gastric cancer[J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2006, **26**(2): 295~298
史晓凤, 马君, 毛伟征等. 最小二乘法分析自体荧光光谱识别胃癌[J]. 光谱学与光谱分析, 2006, **26**(2): 295~298
- 8 Zhang Xining, Ma Jun, Mao Weizheng *et al.*. Indication property of protoporphyrin IX to the growth of gastric cancer in laser-induced autofluorescence spectra[J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2008, **17**(6): 720~724
张奚宁, 马君, 毛伟征等. 激光诱导荧光光谱中内源性原卟啉 IX 对胃癌生长状态的标示作用[J]. 激光生物学报, 2008, **17**(6): 720~724
- 9 G. Wagnières, W. Star, B. Wilson. In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications [J]. *Photochemistry and Photobiology*, 1998, **68**(5): 603~632
- 10 L. P. Hariri, A. R. Tumlinson, N. H. Wade *et al.*. Ex vivo optical coherence tomography and laser-induced fluorescence spectroscopy imaging of murine gastrointestinal tract [J]. *Comparative Medicine*, 2007, **57**(2): 175~185
- 11 Guo Xingjia, Li Xiaozhou, Xu Shukun *et al.*. Study of autofluorescence spectra of protoporphyrin IX in human serum [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2007, **27**(5): 995~998
郭兴家, 李晓舟, 徐淑坤等. 人体血清中原卟啉 IX 自体荧光光谱研究[J]. 光谱学与光谱分析, 2007, **27**(5): 995~998
- 12 Lu Wendai. SPSS for Windows Statistical Analysis[M]. Beijing: Publishing House of Electronics Industry, 2006. 391, 448, 477
卢纹岱. SPSS for Windows 统计分析[M]. 北京: 电子工业出版社, 2006. 391, 448, 477