

文章编号: 0258-7025(2009)10-2662-04

紫光 LED 激发孟加拉红诊断早期口腔肿瘤

郑龙江 胡远婷* 田广军

(燕山大学测试计量技术及仪器河北省重点实验室, 河北 秦皇岛 066004)

摘要 采用 405 nm 发光二极管(LED)作为激发光源,选用孟加拉红(RB)作为光敏剂,可对早期口腔肿瘤进行诊断。正常的口腔黏膜不会被孟加拉红染色,而当口腔产生癌前病变或者生成肿瘤时,孟加拉红就会将病变部位染色。通过光谱测量可知,被染色病变部位的特征荧光光谱波长范围为 570~600 nm,而正常口腔组织的特征荧光光谱中心波长约在 480 nm。当癌前病变发展成恶性肿瘤之后,其特征荧光光谱发生改变,在 630 nm 和 690 nm 处各有一个典型的卟啉峰。以此为依据并结合光致荧光技术,采用荧光比例法,可以对口腔癌前病变进行诊断,灵敏度和特异性分别可达到 95% 和 92.5%。这种无创、快速、早期的诊断方法,可以显著提高口腔癌患者的存活率。

关键词 光谱学;荧光诊断;比例法;口腔肿瘤;孟加拉红

中图分类号 O433 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/CJL20093610.2662

Purple LED Induced Rose Bengal to Diagnose Early Oral Tumor

Zheng Longjiang Hu Yuanting Tian Guangjun

(Hebei Key Laboratory of Measurement Technology and Instrumentation,
Yanshan University, Qinhuangdao, Hebei 066004, China)

Abstract 405 nm LED was chosen as excitation source, Rose Bengal (RB) was used as photosensitizer, early oral tumor can be detected. Normal oral mucosa can not be dyed by Rose Bengal, oral precancerous lesions or tumors can be dyed by RB. It is known that characteristic fluorescence spectroscopy of lesions which were dyed ranged from 560 nm to 600 nm through spectral measurement, however normal oral cavity has special fluorescence peak around 480 nm. When precancerous lesions become malignant tumor, the special fluorescence spectroscopy was changed. Typical fluorescence peaks of porphyrin appeared at 630 nm and 690 nm. Combined with the technology of light induced fluorescence and the method of fluorescence ratio, oral precancerous lesions can be diagnosed, the sensitivity and specificity can arrive 95% and 92.5%. This is a non-invasive, quick and early diagnosis method. It increases survival rate of oral cancer patients remarkably.

Key words spectroscopy; fluorescence diagnosis; ratio; oral tumor; Rose Bengal

1 引言

恶性肿瘤是目前导致人类死亡的主要原因之一,其中口腔恶性肿瘤的发生率较高,位居全身恶性肿瘤的第6位。口腔恶性肿瘤,大多位于暴露部位,并具有病程短、进展快、恶性程度高等特点。早期可无明显症状,有时易被误诊为慢性炎症、溃疡病、牙病或肉芽组织增生等,而待症状明显时,癌肿多半已到中晚期,给根治带来困难。因此,认识口腔恶性肿瘤的早期症状和癌前期表现,对预防和早期诊断及

治疗有非常重要的意义^[1]。目前针对口腔癌的诊断手段仍以组织活检为主,然而组织活检既有创,又比较费时,容易延误病情^[2]。荧光光谱诊断技术^[3]具有无创、快速、灵敏准确等特点,因此可用于肿瘤的早期诊断,该项技术的发展在肿瘤诊断上的应用已引起国内外研究人员的重视。

目前应用荧光光谱技术诊断肿瘤的方法主要有两种:一是利用生物组织的自体荧光光谱进行诊断^[4~7],利用正常组织和病变组织的特征荧光光谱

收稿日期:2009-07-03;收到修改稿日期:2009-08-10

基金项目:国家自然科学基金(20577038)资助项目。

作者简介:郑龙江(1966—),男,博士,教授,主要从事光学传感及其应用方面的研究。E-mail:zhenglj@ysu.edu.cn

* 通信联系人。E-mail:rain1201@tom.com

不同来进行诊断;一是药物荧光光谱诊断法^[8~10],利用作为光敏剂的药物在肿瘤组织中滞留的原理,在病人使用光敏剂一段时间之后,接受相应波长的光照,根据记录下来的荧光特性来进行肿瘤的诊断^[11,12]。本实验采用药物荧光光谱诊断法对早期口腔肿瘤进行诊断。

2 材料和方法

2.1 光敏剂选择

目前临床上使用的光敏剂药物大多是血卟啉衍生物以及目前应用较为广泛的 5-氨基乙酰丙酸(5-ALA),用药后需避光 48~72 h,这给患者带来很大的不便^[13~15]。为了避免光敏剂的光毒性作用,实验采用孟加拉红(RB)作为光敏剂,其化学名为四氯四碘荧光素二钠,为荧光素的衍生物,是一种蒽醌类染料,亦是一种光敏剂。目前,有研究表明 RB 染色可辅助口腔鳞状细胞癌及癌前恶变的早期诊断。RB 试剂现已用于人体眼科及肝胆疾病的诊断,安全可靠,还可用作食用色素。在眼科应用时,RB 试剂能使脱落、坏死及变性的角膜上皮细胞着色,RB 染色也被用于确定角膜结合膜肿瘤的边界范围。陈汉正等^[16]发现 RB 染色较深的病变发生恶变的可能性较大。杜格非等^[17]用 RB 试剂盒染色法诊断口腔癌前病变恶变和口腔癌,敏感度为 93.9%,特异度为 73.7%,比甲苯胺蓝染色效果好,其阴性似然比为 0.082,提示 RB 染色对于排除口腔恶性病变具有特别重要的辅助诊断价值。但是这种方法应用比色板比色分度,主观性较强,易于受光线和经验的影响出现偏差。因此采用荧光光谱诊断技术,针对口腔癌前病变进行诊断,以减少其主观因素的影响。

2.2 实验装置

目前大多数研究人员均以氙灯为激发光源进行荧光光谱的诊断^[18],405 nm 发光二极管(LED)虽然功率小于氙灯,但是也能够达到诊断的要求并且可以大大地降低成本。实验选择功率为 0.5 W 的大功率 405 nm LED 作为激发光源,其中心波长为 405 nm,半峰全宽为 17 nm。荧光光谱诊断系统主要由激发光源和荧光探测系统两部分组成,其整体结构如图 1 所示,由激励源为 LED 供电,LED 发出的光经过透镜聚焦成一个直径约为 0.5 cm 的光斑照射到待测组织上,诱导组织发出荧光。由于荧光强度大大低于激发光的强度,为了排除激发光的影响,在接收荧光的光纤前放置一个反射 405 nm 光的二向色镜(汇博光学, $T/R=80/20$)。接收到的荧光经

过光纤传输到与计算机连接的光谱仪中,测量出的荧光光谱就可以在计算机上直接显示出来。

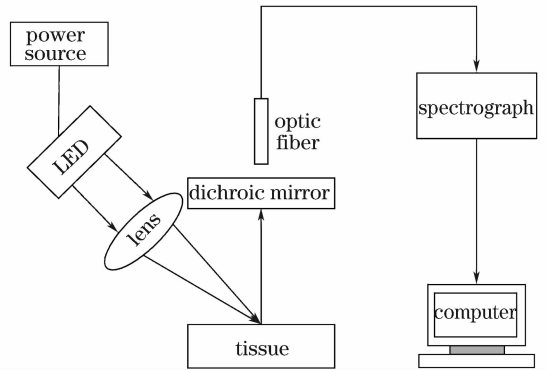


图 1 荧光光谱诊断仪示意图

Fig. 1 Diagram of fluorescence spectroscopy diagnosis instrument

2.3 荧光光谱测量

以金黄地鼠作为实验动物模型,使用质量分数为 0.5% 的二甲基苯丙蒽(DMBA)诱导口腔肿瘤形成,从第 3 周口腔内出现炎症开始进行荧光光谱测量,直至第 8 周口腔中形成肿瘤。口腔癌前病变根据其发展趋势可分为炎症、典型性增生和不典型性增生 3 个阶段。每次测量时在致癌部位涂上质量分数为 0.1% 的 RB 溶液,20 min 后用生理盐水冲洗,肉眼观察可发现正常组织不会被 RB 溶液染色,而病变组织会被染成红色,且病变程度越严重,染色程度越深。通过光谱测量可知,正常组织的特征荧光光谱的中心波长约在 480 nm,而被染色的病变组织其特征荧光光谱波长范围为 570~600 nm,且随着病变程度的加深,其荧光光谱强度增强。

通过持续性的光谱测量并结合临床生物组织活体观察对比,采用荧光光谱比例法^[19],确定出一个

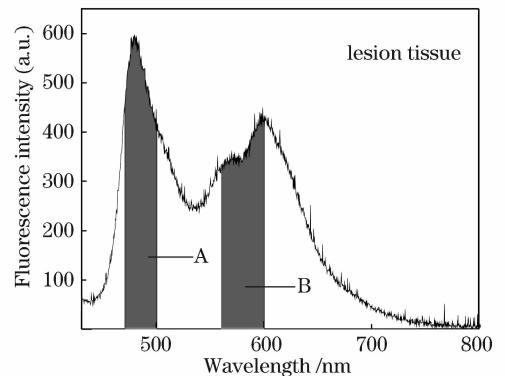


图 2 使用 RB 溶液后的口腔病变处荧光光谱及(1)式示例说明

Fig. 2 Fluorescence spectra of lesion tissue after application of RB and explanation of parameter in Eq. (1)

参数 Q 来判定病变程度

$$Q = S_B/S_A, \quad (1)$$

式中 S_B 表示 560~600 nm 荧光曲线下的面积, S_A 表示以 485 nm 的荧光峰为中心, 宽度为 30 nm 的荧光曲线下的面积。图 2 是在口腔病变处涂上 RB 溶液后测得的荧光光谱。

3 荧光光谱分析及数据处理

在 20 只金黄地鼠口腔颊囊内分别涂抹质量分数为 5% 的 DMBA, 第 3 周后颊囊中有炎症产生, 动物模型建立。第 5 周时病变发展为典型性增生, 可观察到口腔黏膜表面有异常增生, 且黏膜产生褶皱不光滑。第 6~7 周时, 病变继续发展为不典型性增生, 肉眼可观察到有白斑生成。第 8 周开始, 口腔癌前病变发展成为癌症, 有肿瘤生成, 并且逐渐增大。

从第 3 周开始对金黄地鼠进行荧光光谱监测, 并进行病理分析。图 3 所示为肿瘤发展的 3 个阶段的荧光光谱以及口腔癌形成之后的荧光光谱。

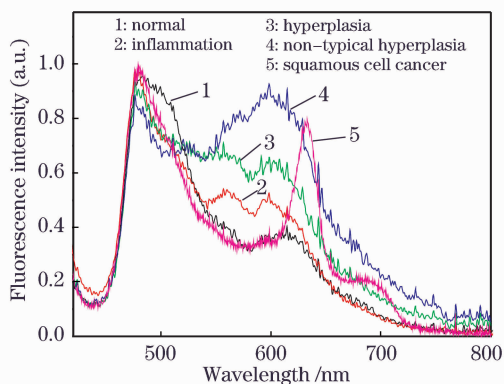


图 3 口腔肿瘤病变各阶段的荧光光谱

Fig. 3 Fluorescence spectra of different stages of oral cancer

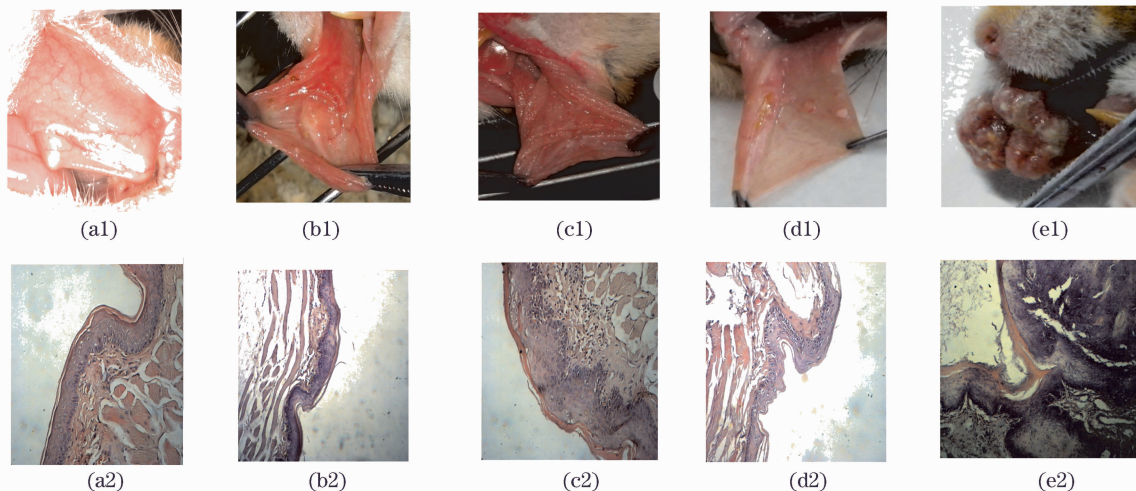


图 4 口腔正常组织、病变组织和肿瘤组织的照片及病理片。(a) 正常;(b) 炎症;(c) 典型增生;(d) 不典型增生;(e) 肿瘤

Fig. 4 Dried photos and pathology of normal oral tissue, lesion and tumor

(a) normal tissue; (b) inflammation; (c) typical hyperplasia; (d) non-typical hyperplasia; (e) tumor tissue

由图 3 可以看出, 与正常组织相比, 当口腔处于癌前病变的 3 个阶段时都会被 RB 溶液染色, 而且病变越严重染色程度越强, 则 Q 值越大, 从而可以区分出口腔癌前病变的各个阶段以便治疗。当口腔肿瘤形成时, 其特性荧光光谱发生改变, 在 630 nm 和 690 nm 处出现典型的卟啉峰^[20,21]。图 4 所示为口腔癌前病变各个阶段对应的照片及病理片。

以 20 只金黄地鼠为实验对象, 对每一次的测量结果进行统计, 可以得到诊断口腔病变的 Q 值, 如图 5 所示, 用 I, II, III 分别表示癌前病变的 3 个阶段。当 $Q \leq 0.53$ 时, 口腔为正常组织; 当 $0.53 < Q \leq 0.80$ 时, 口腔黏膜为炎症状态; 当 $0.89 \leq Q \leq 1.09$ 时, 口腔癌前病变发展成为典型增生程度; 当 1.17

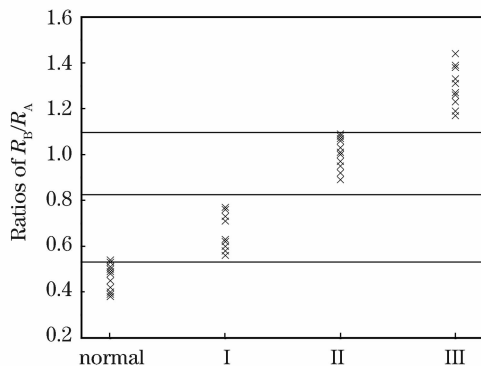


图 5 金黄地鼠口腔颊囊内正常组织和癌前病变的 3 个阶段的 Q 值分散点

Fig. 5 Scattering plot of Q for normal and three steps of oral lesions in hamster buccal cheek pouches

$\leq Q \leq 1.44$ 时, 为不典型增生状态, 灵敏度和特异性分别可达到 95% 和 92.5%。

4 结 论

荧光光谱技术因具有灵敏度高、特异性好的特点, 成为当前医学诊断中一项有效手段受到医生和研究人员的重视。实验将以往的研究成果进行改进, 选用 405 nm LED 作为激发光源, 大大降低了诊断的成本, 而且不会影响诊断的灵敏度。通过实验发现, 孟加拉红具有很好的荧光特性, 可以作为口腔癌前病变诊断用光敏剂, 与常用的卟啉类光敏剂相比, 它不仅能够降低成本, 而且没有光毒性, 患者使用孟加拉红之后不用避光。通过定义一个 Q 值, 可以对口腔癌前病变各阶段进行有效的诊断, 该方法在临床口腔癌前诊断中具有较重要意义。

参 考 文 献

- P. G. Mc Andrew. Primary orofacial squamous cell carcinoma: a multicenter nigerian study [J]. *Br. Dent. J.*, 1990, **8**:191~196
- Darren Roblyer, Rebecca Richards-Kortum. Multispectral optical imaging device for in vivo detection of oral neoplasia [J]. *J. Biomed. Opt.*, 2008, **13**(2):024019
- Luo Xiaosen, Ni Xiaowu, Lu Jian *et al.*. Study of fluorescent spectrum of blood induced by lights of different wavelengths [J]. *Chinese J. Lasers*, 2003, **30**(1):92~96
骆晓森, 倪晓武, 陆建等. 不同波长光照射血液诱发的荧光光谱研究[J]. *中国激光*, 2003, **30**(1):92~96
- Chih-Yu Wang, Huihua Kenny Chiang, Chin-Tin Chen *et al.*. Diagnosis of oral cancer by light-induced autofluorescence spectroscopy using double excitation wavelengths [J]. *Oral Oncology*, 1999, **35**:144~150
- Tsuimim Tsai, Hsin-Ming Chen, Chih-Yu Wang *et al.*. In vivo autofluorescence spectroscopy of oral premalignant and malignant lesions; distortion of fluorescence intensity by submucous fibrosis [J]. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2003, **33**:40~47
- Peng Changde, Liu Ying, Lan Xiufeng *et al.*. Research on static fluorescence polarization spectrum of whole blood [J]. *Acta Optica Sinica*, 2006, **26**(10):1543~1548
彭长德, 刘莹, 兰秀凤等. 血液静态荧光偏振光谱研究[J]. *光学学报*, 2006, **26**(10):1543~1548
- Buhong Li, Zhenxi Zhang, Shusen Xie. Steady state and time-resolved autofluorescence studies of human colonic tissues [J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2006, **4**(6):348~350
- Li Buhong, Xie Shusen. Fluorescence spectroscopy and imaging for optical biopsy [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2005, **25**(7):1083~1087
李步洪, 谢树森. 荧光光谱及其成像技术在光活检中的应用[J]. *光谱学与光谱分析*, 2005, **25**(7):1083~1087
- Yu Changqing, Liu Jie, Dou Xiaoming *et al.*. Laser-induced fluorescence analysis of human skin with photosensitizer [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2003, **23**(6):1150~1153
于长青, 刘杰, 窦晓明等. 含有光敏剂的人体皮肤的激光诱导荧光光谱分析[J]. *光谱学与光谱分析*, 2003, **23**(6):1150~1153
- Zhao Jing, Pang Qichang, Ma Ji *et al.*. Main active constituent detection of cortex phellodendri chinensis by spectral imaging technology [J]. *Acta Optica Sinica*, 2008, **28**(12):2288~2291
赵静, 庞其昌, 马骥等. 中药黄柏主要活性成分的光谱成像检测技术[J]. *光学学报*, 2008, **28**(12):2288~2291
- Patricia Soo-Ping Thong, Malini Olivo, Kiang-Wei Kho. Laser confocal endomicroscopy as a novel technique for fluorescence diagnostic imaging of the oral cavity [J]. *J. Biomed. Opt.*, 2007, **12**(1):014007
- Michael Thoms. Detection of intraoral lesion using a fluorescence camera [C]. *SPIE*, 2006, **6137**:613705
- P. Schleier, A. Berndt, K. Zinner *et al.*. ALA-based fluorescence diagnosis of malignant oral lesions in the presence of bacterial porphyrin formation [C]. *SPIE*, 2006, **6139**:613908
- Takehiro Oura, Hideo Tanaka, Yuji Morimoto *et al.*. Sufficient PpIX production for PDT even with short contact time of topically applied 5-ALA in rabbit tongues [J]. *Lasers Med. Sci.*, 2008, **23**:355~360
- Andreas Leunig, Christian S. Betz, Reinhold Baumgartner *et al.*. Initial experience in the treatment of oral leukoplakia with high-dose vitamin A and follow-up 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence [J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2000, **257**:327~331
- Chen Hanzheng, Su Qianqian. The observation of Rose Bengal staining detection in animal leukoplakia lesion and the processing of cancer [J]. *Journal of Comprehensive Stomatology*, 1990, **3**:152~155
陈汉正, 苏倩倩. 孟加拉红染色检查在实验性动物白斑样损害和癌变过程中的动态观察[J]. *口腔医学纵横*, 1990, **3**:152~155
- Du Gefei, Li Chengzhang, Chen Hanzhang *et al.*. Rose Bengal staining in detection of oral precancerous and malignant lesions with colorimetric evaluation: a pilot study [J]. *International Journal of Cancer*, 2007, **120**(9):1958~1963
- Wei Zheng, Malini Olivo, Khee Chee Soo. The use of digitized endoscopic imaging of 5-ALA-induced PPIX fluorescence to detect and diagnose oral premalignant and malignant lesions in vivo [J]. *Publication of the International Union Against Cancer. Int. J. Cancer*, 2004, **110**:295~300
- Lin Qirong, Xie Shusen, Li Buhong *et al.*. Improvement of ratio detection technique using krypton ion laser-fluorescence for lung tissue [J]. *China J. Laser Med. Surg.*, 1997, **6**(3):136~141
林棋榕, 谢树森, 李步洪等. 人肺组织氪离子激光-荧光比率探测法的研究[J]. *中国激光医学杂志*, 1997, **6**(3):136~141
- C. Kurachi, C. R. Fontana, C. A. S. Melo *et al.*. Fluorescence spectroscopy for tongue carcinoma detection; study in animal model [C]. *SPIE*, 2005, **5689**:210~217
- Gao Shumei, Liu Ying, Lan Xiufeng *et al.*. Investigation of visible laser-induced hemoglobin fluorescence spectral characteristics [J]. *Chinese J. Lasers*, 2004, **31**(7):893~896
高淑梅, 刘莹, 兰秀凤等. 可见波段 Ar⁺ 激光诱导血红蛋白荧光光谱特性研究[J]. *中国激光*, 2004, **31**(7):893~896