

多光子显微技术在乳腺肿瘤微环境预后预测研究中的应用进展

徐顺武^{1,2}, 何佳佳², 席刚琴², 李连煌², 韩侠辉², 郑莉琴^{2*}, 陈建新^{2**}

¹福建技术师范学院电子与机械工程学院, 福建 福清 350300;

²福建师范大学光电与信息工程学院医学光电科学与技术教育部重点实验室, 福建省光子技术重点实验室, 福建 福州 350007

摘要 长期以来, 乳腺癌的发病率占据全球女性恶性肿瘤发病率的首位。国际癌症研究机构最新发布的 2020 年全球癌症负担数据显示, 乳腺癌在全球发病数超过了肺癌, 成为全球第一大癌。多光子显微技术(MPM)是基于激光与生物组织相互作用发生的多光子激发荧光和谐波等非线性光学效应的一种先进医学成像技术。多光子显微技术不但在成像分辨率上具有与组织病理学分辨率相当的优势, 而且具有无标记、免切片、光学层析成像、反映细胞的功能代谢信息、三维靶向消融能力、较低的光漂白与光损伤、高成像对比度等优势。因此, 多光子显微技术在医学病理诊断, 特别是肿瘤病理诊断临床转化的基础研究和应用研究领域一直受到广泛的关注。详细阐述了多光子显微技术在乳腺肿瘤微环境预后预测研究中的应用进展, 并展望了其未来发展前景。

关键词 医用光学; 多光子显微技术; 乳腺癌; 肿瘤微环境; 预后预测

中图分类号 0437

文献标志码 A

doi: 10.3788/LOP202259.0617013

Application Progress of Multiphoton Microscopy in Prognostic Prediction of Breast Tumor Microenvironments

Xu Shunwu^{1,2}, He Jiajia², Xi Gangqin², Li Lianhuang², Han Xiahui², Zheng Liqin^{2*},
Chen Jianxin^{2**}

¹*School of Electronic and Mechanical Engineering, Fujian Polytechnic Normal University, Fuqing, Fujian 350300, China;*

²*Key Laboratory of Optoelectronic Science and Technology for Medicine of Ministry of Education, Fujian Provincial Key Laboratory for Photonics Technology, College of Photonic and Electronic Engineering, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350007, China*

Abstract Breast cancer has historically ranked number one in the global incidence of malignant tumors in women. The latest International Agency for Research on Cancer by the World Health Organization shows that breast cancer has surpassed lung cancer as the leading type of cancer worldwide. Multiphoton microscopy (MPM) is an advanced medical imaging technique based on nonlinear optical effects, such as multiphoton excited fluorescence and harmonic generation, occurring owing to laser interactions with biological tissues. MPM offers the advantage of a resolution comparable to digital histopathology as well as requires no labeling or sectioning while providing three-dimensional optical imaging that reflects the metabolic function information of cells, three-dimensional targeted ablation

收稿日期: 2021-12-24; 修回日期: 2022-01-06; 录用日期: 2022-01-17

基金项目: 国家自然科学基金(82171991)、中央引导地方科技发展专项资金(2020L3008)、福建省自然科学基金(2020J01839、2020J01154)、福建省科技创新联合基金(2019Y9101)

通信作者: *lqzheng@fjnu.edu.cn; **chenjianxin@fjnu.edu.cn

capability, low photobleaching and photodamage, and a high imaging contrast. Therefore, MPM has garnered considerable research interest locally and globally in the field of basic and applied research in medical pathological diagnosis, particularly in the clinical translation of tumor pathological diagnosis. Herein, the application progress of MPM in the prognostic prediction of breast tumor microenvironments is introduced in detail and its future development prospects are presented.

Key words medical optics; multiphoton microscopy; breast cancer; tumor microenvironment; prognosis and prediction

1 引言

多光子显微技术(MPM)是基于激光与生物组织相互作用发生的多光子激发荧光和谐波等非线性和光学效应的一种先进医学成像技术。1931年,美国物理学家 Maria Goeppert-Mayer 在她的博士论文中提出双光子激发荧光概念。1990年,美国康奈尔大学 Denk 等^[1]首次实现了双光子成像。1997年,美国伯乐(Bio-Rad)公司首次制造出商业化的多光子激光扫描显微镜。多光子激光扫描显微镜一经问世,就在生物医学领域表现出越来越重要的作用。目前,全球显微镜著名品牌企业德国 Zeiss 和 Leica、日本 Olympus 和 Nikon 的多光子激光扫描显微镜产品不断推陈出新。

多光子显微技术不但在成像分辨率上具有与组织病理学分辨率相当的优势,而且具有无标记、免切片、光学层析成像、反映细胞的功能代谢信息、三维靶向消融能力、较低的光漂白与光损伤、高成像对比度等优势。因此,多光子显微技术在医学病理诊断,特别是肿瘤病理诊断临床转化的基础研究和应用研究领域一直受到国内外研究小组的关注^[2-8]。德国、中国、美国、法国、澳大利亚、巴西、日本、意大利、瑞典、新加坡、匈牙利、加拿大等国家,美国康奈尔大学、美国麻省理工学院、美国伊利诺伊大学、美国耶鲁大学、新加坡国立大学、新英格兰大学科学技术学院、日本大阪大学、德国耶拿大学等国际著名的科研机构,相继利用多光子显微技术开展了在脑肿瘤、乳腺肿瘤、卵巢癌、结直肠癌、肝癌、食管癌、胃癌、皮肤

癌、膀胱癌、胆囊癌、肾肿瘤、肺癌、胰腺肿瘤、前列腺癌、宫颈癌等多达 15 种人体器官的肿瘤医学诊断研究。这些研究提取了多种定性定量的肿瘤多光子诊断特征,如细胞增多、细胞核多形性、细胞核质比、细胞氧化还原比、微血管增生、坏死、胶原沉积、胶原束方向、胶原纤维结构、胶原纤维密度、癌细胞的占据、肌束间距、胶原含量变化和方向改变、血管壁厚度、癌细胞出现、基底膜缺失、淋巴细胞浸润和血管畸形等。大量的研究表明,多光子显微技术在术中和术后肿瘤病理学诊断、肿瘤放疗评估、肿瘤靶向消融和肿瘤预后等应用领域具有巨大潜在的医学应用价值。本文详细阐述了多光子显微技术在乳腺肿瘤微环境预后预测研究中的应用进展,并展望了其未来发展前景。

2 多光子显微技术原理和乳腺肿瘤微环境重要组分的多光子显微成像

多光子显微技术在生物医学领域的应用主要基于双光子激发荧光(TPEF)和二次谐波(SHG)这两种非线性光学效应。双光子激发荧光^[9]是一个三阶非线性吸收过程,一个荧光分子或者原子同时吸收两个相同频率的光子,吸收过程中,处于基态的电子先被一个光子激发到中间“虚能态”,再被另一个光子激发到末态激发态,也就是说,吸收相同频率的两个光子后被激发至高能级,经过一定的弛豫时间后,处于激发态的电子自发跃迁回到基态,同时辐射出一频率略小于两倍入射光频率的光子而发出荧光,能级图如图 1(a)所示。多光子激发荧光

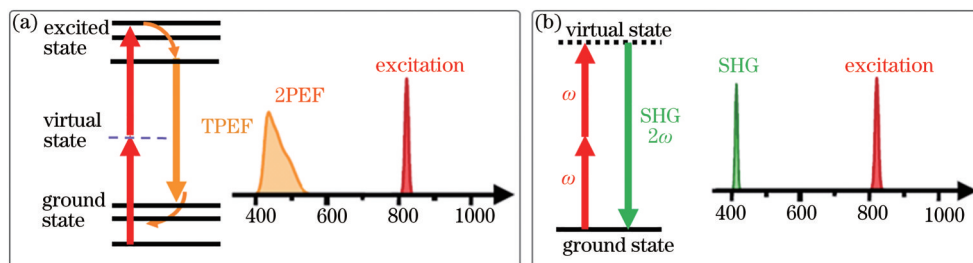


图 1 非线性光学效应能级图。(a) 双光子激发荧光; (b) 二次谐波

Fig. 1 Energy level diagrams of nonlinear optical effect. (a) Two-photon excitation; (b) second harmonic generation

需要超快、高能量类型的激光光源(例如飞秒、皮秒激光器)来提供足够高的能量来满足分子或原子一次吸收多个光子的需要。

二次谐波是一种二阶非线性光学现象,也称为“倍频”,能级图如图 1(b)所示。它是指具有相同频率的两个光子与非线性介质相互作用后,其输出光子频率为入射光子频率二倍,输出的二倍频光波被称为二次谐波。在二次谐波产生的过程中,一个处于基态的电子吸收了两个相同频率的光子被激发到虚能态,然后在虚能态释放出一个倍频的光子后再回到基态^[10-11]。二次谐波与介质的二阶极化率有关,而二阶极化率与介质本身的特性有关,可以反映介质的电子态,分子的对称性、旋向及排列等,从而反映介质的微观结构特性,可作为一种灵敏的组织材料特性指标。二次谐波产生是有条件的:1)入射光应是高强度的相干光;2)介质具有非中心对称结构。

乳腺组织内包含着纤维结缔组织组成的间质和乳腺的小叶导管系统所组成的实质,乳腺导管和小叶^[12]位于间质中。正常乳腺导管由基底膜、内层(腺腔面)的上皮细胞层和外层(基底面)的肌上皮细胞层组成。正常小叶由数量不等的末端闭合的终末小导管(腺泡)组成,每个腺泡有典型的双层结构。小叶腺泡埋陷于疏松的、富含纤维血管的小叶

内间质中,其中含有数量不等的淋巴细胞、浆细胞、巨噬细胞和肥大细胞,构成间质的细胞包括各种白细胞、成纤维细胞、肌成纤维细胞和内皮细胞。

乳腺癌约 70% 源于导管的柱状上皮细胞,5% 发生于腺泡,发生于腺泡和乳管周围结缔组织的癌变是乳腺肉瘤。乳腺导管癌从导管增生开始,随后发展为原位癌和浸润性癌,最后发展为转移性疾病。导管增生阶段的表现是乳腺腔上皮细胞不同程度的分化,增生细胞小而一致,核一般呈圆形,分布均匀,其细胞群结构特征为厚度一致的僵硬细胞桥或拱形结构;导管原位癌阶段的表现是肿瘤性导管内病变,上皮细胞增生显著,细胞具有轻度到重度的异型性,局限于乳腺导管-小叶系统内增生,未突破基底膜;浸润性导管癌阶段的表现是癌细胞突破导管基底膜侵入周围间质,其特征是明显的细胞多形性和核异型性,肿瘤细胞开始侵犯乳腺周围组织并迁移到远处的器官,最终导致转移。导管原位癌向浸润性癌转变过程中,肌上皮细胞、炎症细胞、间质细胞是疾病进展的潜在驱动因素,当肌上皮细胞表型改变时,其与基质炎症细胞、肌成纤维细胞一起破坏导管结构,将肿瘤细胞释放到周围基质中。肿瘤微环境指由肿瘤细胞、内皮细胞、巨噬细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞、免疫细胞及细胞外基质等共同构成的肿瘤发生、发展和转移的局部稳态环境,如图 2 所示。

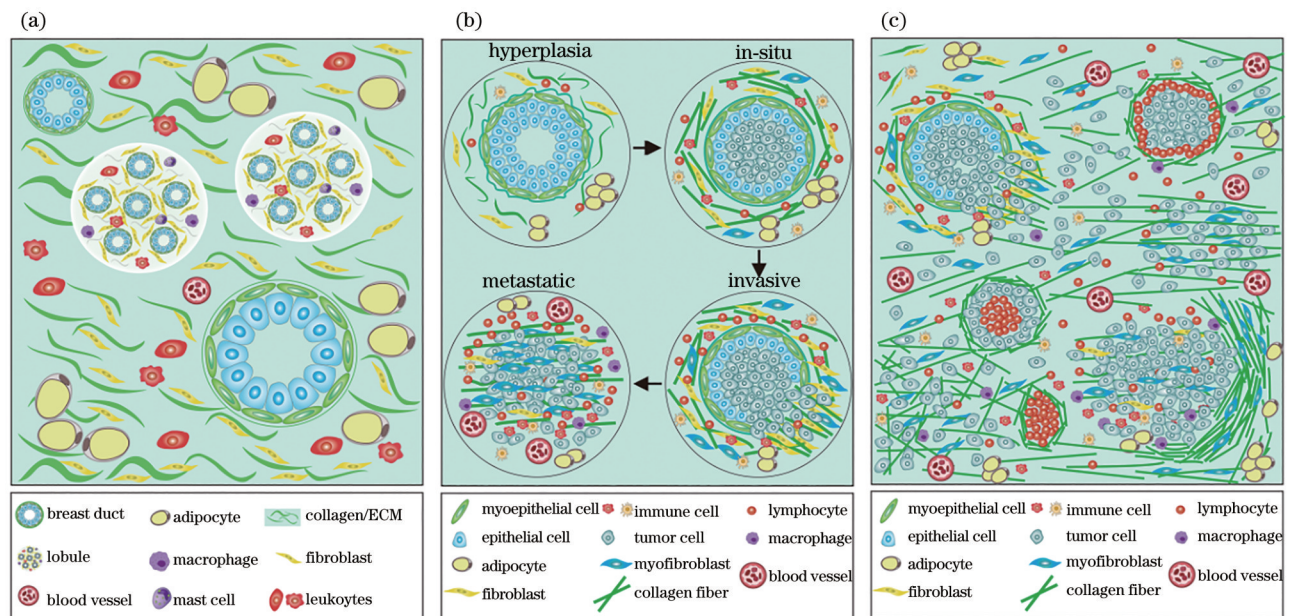


图 2 乳腺肿瘤进展及肿瘤微环境变化示意图。(a)正常乳腺组织及周围微环境;(b)乳腺肿瘤进展过程;(c)浸润性乳腺肿瘤周围微环境

Fig. 2 Schematic diagram of breast tumor progression and tumor microenvironment changes. (a) Normal breast tissue and surrounding microenvironment; (b) breast tumor progression process; (c) surrounding microenvironment of invasive breast tumor

乳腺肿瘤微环境中重要组分无需外源性染色剂,在超快、高能量、相干的飞秒激光光源激发下就能产生较强的双光子激发荧光和二次谐波信号。肿瘤微环境中肿瘤细胞、淋巴细胞、脂肪细胞、巨噬细胞、坏死细胞等细胞质中的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)和黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)具有较强的双光子激发自体荧光信号。血管壁中的弹力蛋白同样具有较强的双光子激发自体荧光信号。组织细胞外基质胶原纤维中的胶原蛋白和神经组织中的微管蛋白由于具有非中心对称结构,极易产生较强的二次谐波信号。以 Zeiss 公司生产的 LSM880 META 共焦扫描显微系统为例,在 20 倍物镜、视场

角为 $512 \text{ pixel} \times 512 \text{ pixel}$ (对应的面积是 $425.1 \mu\text{m} \times 425.1 \mu\text{m}$)、每个像素对应的实际尺寸是 $0.830 \mu\text{m}$ 、获得图像中的每个像素所需时间为 $7.2 \mu\text{s}$ 的多光子显微成像条件下,图 3 为获得的肿瘤微环境中肿瘤细胞、胶原纤维、淋巴细胞、巨噬细胞、微血管、脉管瘤栓、脂肪细胞和神经组织等主要组分的多光子显微成像,图中第 1 行是肿瘤微环境中主要组分的 H&E 染色图像;第 2~4 行分别是相应的 SHG、TPEF、叠加的 SHG/TPEF 图像。因此,多光子显微技术在乳腺肿瘤微环境重要组分成像过程中的诸多优势,使得多光子显微技术在乳腺癌的高空间分辨成像和预后预测上的应用成为可能。

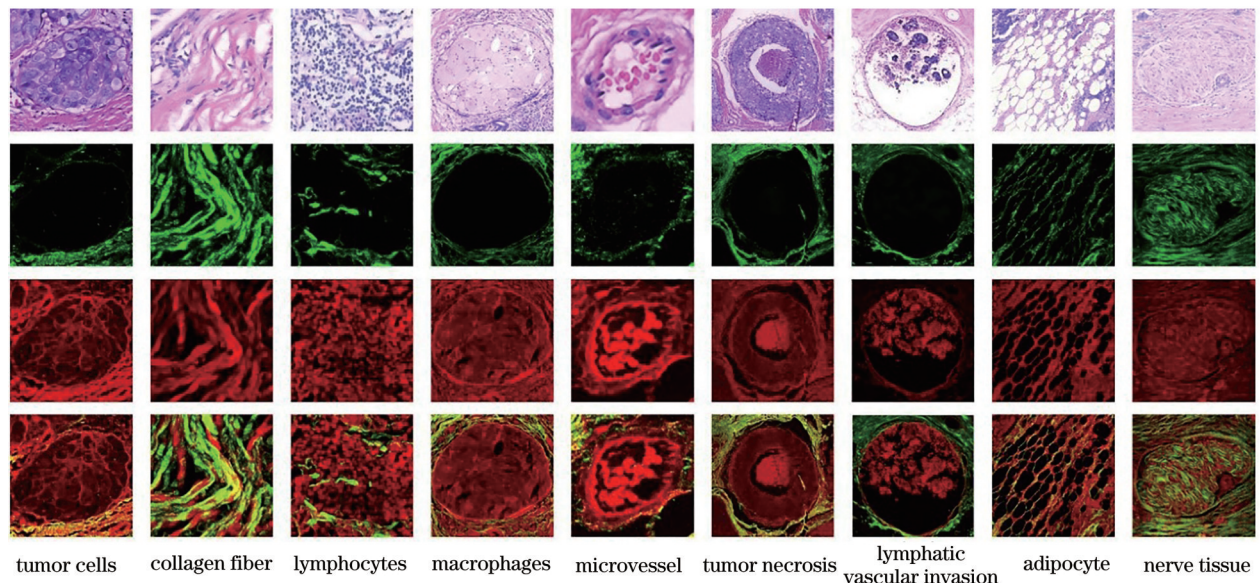


图 3 肿瘤微环境中主要组分的多光子图像

Fig. 3 Multiphoton microscopy images of main components in tumor microenvironment

3 乳腺肿瘤微环境细胞外基质胶原纤维多光子诊断特征的预后预测作用

肿瘤微环境中的细胞外基质^[13]在肿瘤进展过程中经历了相当大的结构变化,包括纤维连接蛋白、蛋白多糖和胶原纤维的降解、沉积、交联和硬化,细胞外基质沉积和重塑创造了一个重组的微环境,通过破坏细胞极性和细胞之间的粘附及增强生长因子信号来促进肿瘤进展。胶原纤维^[14]作为细胞外基质中最丰富的成分,渐进式细胞外基质重构在肿瘤侵袭前沿产生以间质胶原显性化为典型特征的形态学变化,对肿瘤细胞生物学包括基因表达、细胞分化、增殖、迁移和治疗反应有显著影响。乳腺组织中正常上皮结构周围的胶原通

常是卷曲和光滑的,在肿瘤发生发展过程中,乳腺肿瘤微环境中的胶原纤维随着肿瘤进程的发展而重组,肿瘤周边胶原的排列会出现各种形态的变化,从而更有利于肿瘤细胞的扩散与转移。采用多光子显微技术对胶原纤维进行多光子显微成像,关于乳腺肿瘤微环境胶原纤维与乳腺癌患者预后的相关研究主要从以下两个方面开展:1)直接从多光子显微图像上分析肿瘤微环境胶原纤维的形态特征,建立与患者预后关系;2)利用计算机辅助图像分析方法,提取胶原纤维特征,建立与患者预后关系。

3.1 从多光子显微图像上分析肿瘤微环境胶原纤维的形态特征

直接从多光子显微图像上分析肿瘤微环境胶原纤维的形态特征主要基于胶原纤维的 SHG 成

像。Han 等^[15]利用胶原纤维通过 SHG 发出的光的偏振性和方向性来确定小鼠乳腺肿瘤模型中的胶原蛋白与健康乳腺脂肪垫间的结构关系。研究表明,产生 SHG 的胶原亚群不受肿瘤间质胶原合成改变的影响,并受到其异常降解环境的保护。并且关于正向和反向传播 SHG 信号的比值(F/B 比值)的定量分析可以监测到整个导管和小叶癌的发展过程中的胶原纤维变化,包括伴随生长、转移和组织形态的变化,Burke 等^[16]的研究说明了 SHG 可以观察到在癌症发展中胶原纤维的变化,而 Natal 等^[17]的研究证明了 SHG 成像可以识别出乳腺癌的类型。Natal 等^[17]对 99 例诊断为组织学特殊类型的浸润性乳腺癌患者和 21 例无特殊类型浸润性乳腺癌的组织切片进行 SHG 成像并评价其胶原参数,研究表明,通过胶原参数可以识别三种主要的乳腺癌组:1)典型的浸润性小叶癌和管状癌;2)无特殊类型浸润性乳腺癌、移行性、浸润性顶浆分泌和微乳头状癌;3)髓样、粘液状和乳头状癌。肿瘤发展过程中的胶原纤维的变化重组则在美国威斯康星大学 Provenzano 等^[18]的工作中展示出来。Provenzano 等^[18]利用多光子显微技术研究了小鼠乳腺肿瘤模型中胶原纤维的重塑过程,研究表明,肿瘤微环境的胶原纤维随着肿瘤进程,由包绕癌灶卷曲的密集型变为随着癌巢的成长被逐渐拉伸、穿过癌灶的线性形态,肿瘤细胞在此重构的线性胶原纤维上快速移动并开始入侵周围基质。研究小组将胶原纤维重塑特征定义为肿瘤相关胶原纤维特征,即 tumor-associated collagen signatures (TACS1-3)。TACS1 是指描述小肿瘤周围区域存在的致密的胶原纤维的特征;TACS2 是指描述随着肿瘤大小的增加,肿瘤周围的胶原纤维在拉伸应力的作用下趋向于拉伸,导致胶原纤维束线性化的特征;TACS3 是指描述胶原纤维垂直于肿瘤边界或者肿瘤上皮表面,为恶性肿瘤细胞沿着纤维间质移动提供路径的特征。Conklin 等^[19]针对无标记福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)组织微阵列(TMA)乳腺癌患者样品开展研究,直接从二次谐波产生的多光子显微病理图像识别 TACS3,通过对 196 例乳腺癌患者的活检组织切片进行 MPM 成像证明了 TACS3 是独立不良预后指标。这些研究表明 SHG 是评价细胞外基质中胶原纤维的一种具有前途的工具,这种方法可能有助于阐明癌症的生物学行为及其分类。Xi 等^[20]进一步利用

MPM 对多中心乳腺肿瘤微环境进行成像,发现当肿瘤微环境中胶原纤维重塑过程 TACS1-3 结束后,离开癌灶的肿瘤细胞在乳腺肿瘤微环境以明显不同的方式入侵周围间质。针对无标记 FFPE 病理白片样品的大面积双光子激发荧光和二次谐波产生的多光子显微病理图像,根据肿瘤细胞和细胞外间质胶原纤维相对空间分布,提取了肿瘤浸润前沿的 5 种多光子诊断特征,作为 TACS1-3 肿瘤相关胶原纤维特征的扩展特征,定义为 TACS4-8,如图 4 所示。TACS4 是指描述胶原纤维的网状分布与连续分布的肿瘤细胞相邻情况的特征,有一个清晰的肿瘤边界。TACS5 是指描述定向分布的胶原纤维的特征,这些胶原纤维可以使肿瘤细胞在没有清晰肿瘤边界的情况下进行单向迁移。TACS6 是指描述排列混乱的胶原纤维的特征,它能使肿瘤细胞在没有清晰肿瘤边界的情况下进行多向迁移。TACS7 是指描述肿瘤侵袭前沿的密集分布的胶原纤维的特征,且前沿基质中基本没有肿瘤细胞。TACS8 则是描述肿瘤侵袭前沿的稀疏分布的胶原纤维的特征,同样,前沿基质中基本没有肿瘤细胞。TACS4-8 显然反映了不同的肿瘤-基质相互作用在导管原位癌到浸润性癌转变(DCIS-to-IBC)后肿瘤发展的侵袭阶段。医学统计分析结果表明,TACS-score 对无病生存期和总体生存期均是独立预后因子,TACS1-8 模型的 0.838 的准确性(AUC)和 7.03 的风险分层能力(HR)最高,超过了 TACS1-3 模型和临床模型。这表明了肿瘤发展时与浸润前沿交界处的肿瘤细胞与细胞外间质胶原纤维相对空间分布的多光子诊断特征对乳腺癌预后预测起到决定作用。值得一提的是,TACS-score 更适合通过临床病理因素分类的高危患者用于 5 年无疾病生存率(DFS)的 AUC 和 HR 诊断评估。

3.2 利用计算机辅助图像分析方法提取胶原纤维特征

计算机辅助诊断(CAD)是一种通过运用计算机、数学、统计学、图像处理与分析等方法,将 CAD 系统直接运用到医学影像训练和构建模型,实现端到端的学习,帮助临床医生进行病理诊断、治疗评估和预后预测等的技术^[21-23]。Falzon 等^[24]利用 SHG 成像对正常和病变乳腺组织中的胶原纤维形态的改变进行定性分析,发现纤维弯曲数量和纤维轮廓有很大差异,同时,采用椭圆傅里叶分析量化胶原

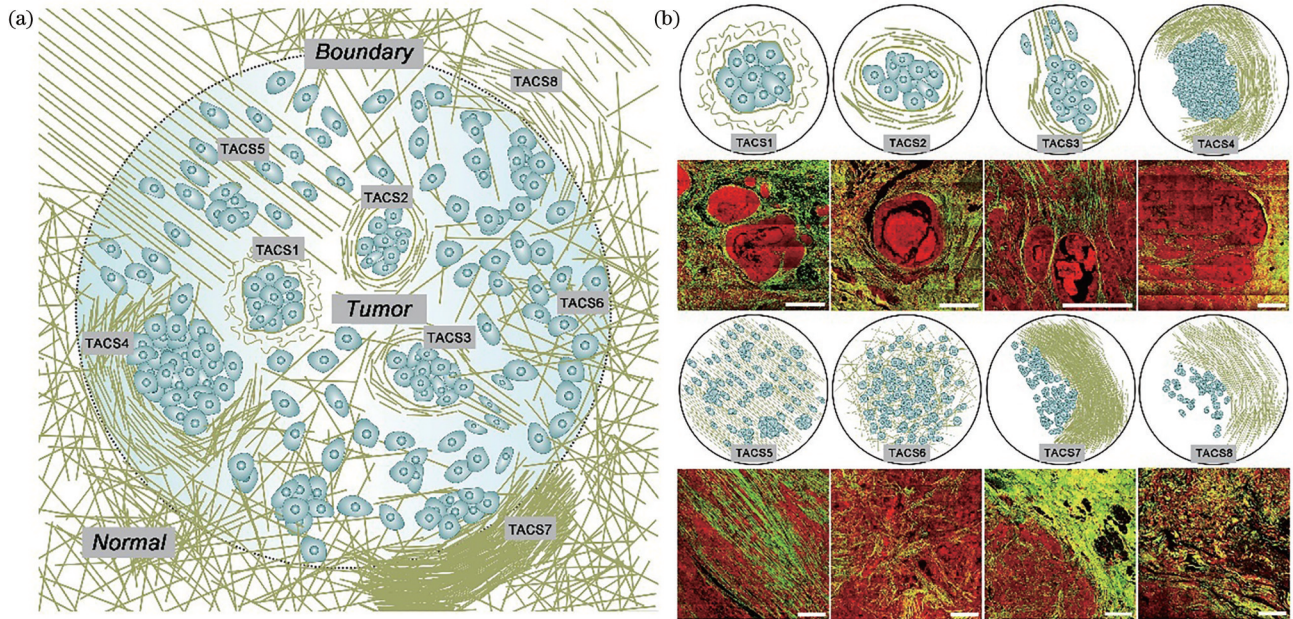


图 4 肿瘤细胞和细胞外间质胶原纤维 8 种相对空间分布模式示意图和对应的 MPM 图像, 标尺为 $500 \mu\text{m}$ ^[20]。

(a) 相对空间分布模式; (b) MPM 图像

Fig. 4 Schematic diagrams of 8 relative spatial distribution patterns of tumor cells and extracellular matrix collagen fibers and corresponding MPM images, scale is $500 \mu\text{m}$ ^[20]. (a) Relative spatial distribution pattern; (b) MPM images

纤维的方向、角度等指标用于区分正常、良性和恶性乳腺肿瘤。但是上述分析存在一定局限性, 需要事先手动排除一些可能干扰的胶原纤维, 如纤维轮廓无法充分分辨, 即会受图像裁剪、残差噪声、其他组织形态对纤维形状的交叉或扭曲等干扰。而 Bredfeldt 等^[25]利用大视场高分辨率显微镜技术、图像处理和监督学习方法, 半自动化地量化胶原纤维排列与相邻肿瘤间质边界的特征 (TACS3), 实现了 TACS 候选生物标志物的半自动采集和分析, 且量化的得分可以准确预测乳腺癌患者的生存期。Majeed 等^[26]利用空间光干涉显微镜, 一种新的可与二次谐波显微镜相比较的无标记的定量相位成像技术, 更快速地提取胶原纤维定向排列信息来反映乳腺疾病良恶性病例的不同分期。而 Natal 等^[27]用 SHG 成像分析管腔型乳腺肿瘤患者的瘤周与瘤内胶原纤维特征差异, 量化了多个胶原纤维特征, 包含胶原数量、结构及均匀性等, 统计分析表明, 较高的瘤内胶原纤维一致性与较高的病理分期和腋窝淋巴结转移有关, 且与较差的无复发生存及总生存相关。Gole 等^[28]采用基于双模式高斯混合模型 (GMM) 的计算机辅助图像分析方法, 针对无标记 FFPE 组织微阵列样品的双光子激发荧光和二次谐波产生的多光子显微病理图像进一步细化胶原纤维特征, 比较

了聚集厚胶原纤维密度和分散薄胶原纤维长度的定量参数对三阴性乳腺癌的无病生存率和总生存率的预后价值。Sprague 等^[29]采用基于 curvelet 变化算法的计算机辅助图像分析方法, 针对 H&E 染色样品的二次谐波产生多光子显微病理图像, 相比上述方法更全面地提取乳腺导管原位癌病变周围胶原纤维的形态特征, 包括胶原纤维长度、宽度、直线度、密度、准直度及与肿瘤/间质边界的角度, 且统计分析表明这些图像特征与乳腺导管原位癌的复发风险相关。Xi 等^[30]采用基于高斯混合模型的分割算法和纤维网络提取算法等的计算机辅助图像分析方法, 针对 TACS1-8 胶原纤维形态学特征、纹理特征、基于灰度共生矩阵特征及小波变换特征等进行提取 (如图 5 所示), 总共提取 142 个 TACS 相应的微观特征 (TCMF), 更全面反映肿瘤微环境中胶原纤维微结构的变化, 并使用最小绝对收缩和选择算子 (LASSO) 回归选择最稳健的特征, 建立了 TCMF-score。研究结果显示, TCMF-score 具有较强的预后性能, 且微观特征 TCMF 与宏观模式 TACS 正好相互补充, TCMF-score 更适合通过临床病理因素分类的低危患者用于 5 年 AUC 和 HR 诊断评估。当两者结合时, TCMF-score + TACS-score 对所有乳腺癌患者都有很好的预后预测能力。

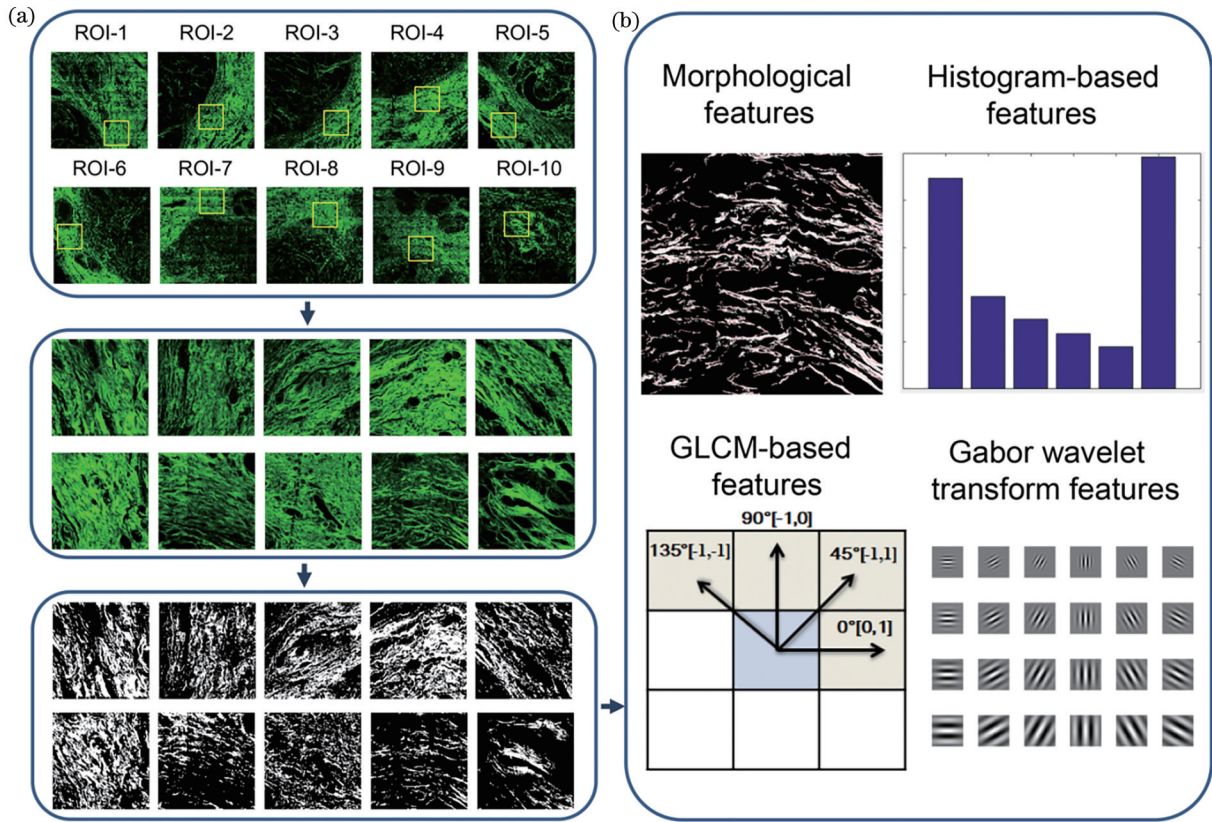


图 5 提取 TACS 相应微观特征(TCMF)的示意图^[30]。(a)感兴趣区域截取示意图;(b) 4 种类型 TCMF 提取示意图

Fig. 5 Schematic of extracting TACS corresponding microscopy features (TCMF)^[30]. (a) Interception of a region of interest; (b) extraction of four types of TCMF

4 乳腺肿瘤微环境肿瘤浸润淋巴细胞多光子诊断特征的预后预测作用

肿瘤浸润淋巴细胞(TILs)是肿瘤微环境的重要组成部分,已有多项研究表明 TILs 与乳腺癌患者预后高度相关。TILs 按分布位置可以分为间质肿瘤浸润淋巴细胞(sTILs)和上皮内肿瘤浸润淋巴细胞(iTILs),前者位于肿瘤间质而不与浸润性癌细胞直接接触,后者则为上皮内或瘤内浸润细胞,与癌细胞直接接触。

2014 年,一直致力于制定 TILs 检测统一标准的国际免疫生物标志物协作组,发表了首部关于 TILs 检测的国际指南^[31],考虑到乳腺癌中 iTILs 的绝对数量较少、存在的区域范围小、分布的异质性明显,且不易通过 H&E 染色法观察,推荐以 sTILs 作为实验研究和临床应用的主要指标。但是, TILs 预后生物标志物的临床转化目前并不乐观, TIL 众多研究者基于最便捷的 H&E 染色病理切片样品,对乳腺癌组织中总体 TILs 浸润程度与患者预后的相关性研究结果显示,高密度 TILs 浸润对 ER 阴性

的三阴性乳腺癌(TNBC)及人表皮生长因子受体 2 (HER2)过表达型乳腺癌有着好的预后,而对 ER 阳性的管腔型患者的预后效果尚无定论^[32-33]。He 等^[34]直接从无标记 FFPE 病理白片样品的双光子激发荧光和二次谐波产生的多光子显微病理图像出发,根据 TILs 与肿瘤细胞、胶原纤维的相对位置将 TILs 重新分为 3 种,即 TILs1-3,如图 6 所示。基于 TILs1-3 三种模式的出现频率,一种评估 TILs 预后价值的新方法被提出,该方法结合岭回归分析给出每个患者的肿瘤浸润性淋巴细胞评分(TILs-score)。医学统计分析结果表明, TILs-score 对 ER 阳性乳腺癌患者具有更强的预后价值。国际免疫生物标志物协作组建议的方法是基于 TILs 的数量评估其预后价值,在 ER 阴性乳腺癌中具有较大的预测潜力。而该小组的研究是基于 TILs1-3 三种模式的出现频率研究其预后价值的,该研究的 TILs-score 模型更适合于评估 ER 阳性乳腺癌的预后。 TILs-score 模型将有望成为 TILs 检测国际指南的补充。

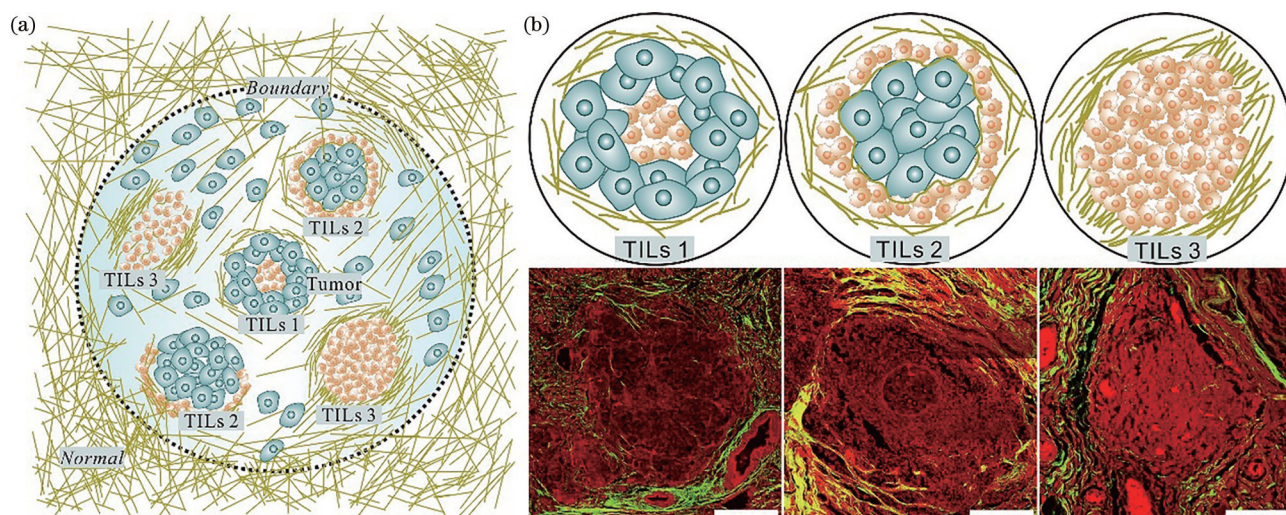


图 6 肿瘤细胞、淋巴细胞和细胞外间质胶原纤维 3 种肿瘤微环境重要组分相对空间分布模式和对应的 MPM 成像, 标尺为 $500 \mu\text{m}$ ^[34]。(a) 相对空间分布模式; (b) MPM 图像

Fig. 6 Relative spatial distribution patterns of three important components of tumor microenvironment: tumor cells, lymphocytes and extracellular matrix collagen fibers and corresponding MPM images, scale is $500 \mu\text{m}$ ^[34]. (a) Relative spatial distribution pattern; (b) MPM images

5 总结与展望

乳腺癌具有高度异质性的特点, 乳腺癌患者之间存在明显的个体差异, 对乳腺癌患者进行个体化治疗显得极其重要。而个体化治疗的前提是准确预测乳腺癌的生物学行为, 因此, 发展一项可信度高、重复性好的预后预测系统, 提供量化的预后指数, 对指导个体化的综合治疗、解决乳腺癌临床治疗面临的治疗不足或治疗过度巨大挑战是至关重要的。纵观乳腺癌预测模型的发展史, 乳腺癌预后预测评估系统主要包括:

1) 乳腺癌 TNM 分期系统。以原发肿瘤(T)、区域淋巴结(N)及远隔部位转移(M)为基础的解剖学信息为依据。

2) 乳腺癌组织学分级。以乳腺癌癌细胞形态学和增殖能力相关的肿瘤腺管形成、核的异型性和核分裂 3 个参数为依据。

3) 乳腺癌的分子分型。依据乳腺癌激素状态 ER、PR、HER2 的基因表达信息。

4) 乳腺癌的基因检测方法。与肿瘤细胞周期调控、侵袭、转移及血管形成相关的基因表达谱。

预后预测评估系统“乳腺癌 TNM 分期系统”作为乳腺癌患者预后分期标准, 已经成为世界范围恶性肿瘤临床诊治及预后预测的重要依据。2018 年 1 月 1 日全球正式执行由美国癌症联合委员会出版的第 8 版乳腺癌分期系统, 在 TNM 分期基础上首次

增加了预后预测评估系统 2)~4) 内容, 构建了全新的乳腺癌预后分期评价系统。

此外, 还有已经得到广泛认可, 并已成为乳腺癌评估预后研究参照标准的预后预测系统, 代表性的预后模型, 诺丁汉预后指数(NPI)依据肿瘤大小、淋巴结状态和组织学分级; St. Gallen 国际乳腺癌危险评估体系依据患者肿瘤大小、组织学分级、脉管侵犯、HER2 表达、年龄和淋巴结转移数目等 6 项指标; Adjuvant! Online 计算机评估系统依据患者年龄、肿瘤大小、组织学分级和淋巴结阳性数目、ER 状态和合并疾病等信息。从几种乳腺癌预后预测评估系统来看, 这些模型主要关注了乳腺癌肿瘤细胞的形态学、增殖能力、分子表达, 没有考虑在促进肿瘤的发生、发展、侵袭和转移起到重要作用的肿瘤微环境中主要组分及其相互作用所蕴含对预后的重要信息。因此, 将肿瘤微环境诊断特征纳入预后评估系统已经成为乳腺癌预后预测模型发展的必然趋势。

乳腺组织中存在许多内在成分, 无需外加的外源性染色剂就能产生较强的自体荧光和谐波信号, 如组织中的乳腺导管腺上皮细胞、肌上皮细胞、血管、淋巴细胞、脂肪细胞、巨噬细胞等能通过双光子激发产生较强的自体荧光; 乳腺组织细胞外基质中胶原纤维因其具有非中心对称机构, 而极易产生较强的二次谐波信号。研究显示, 脉管瘤栓的出现就说明肿瘤已进入脉管具有转移的潜能, 有可能发生淋巴管或者血管的转移, 从而转移到远处器官。神

经侵犯是指肿瘤细胞侵入神经鞘三层(神经外膜、神经鞘膜和神经内膜)的任一层,或肿瘤细胞包绕神经周围,当癌细胞浸润到正常神经后会沿着神经生长进而完成转移^[35]。神经侵犯是肿瘤的局部扩散方式之一,对肿瘤的预后判断有重要作用。在一些肿瘤中,癌细胞生长或转移主要发生在富含脂肪细胞的微环境中。事实上,脂肪细胞^[36]是乳腺癌细胞周围最丰富的细胞类型,已有研究表明肿瘤周围脂肪组织有助于乳腺癌细胞侵袭和扩散。肿瘤组织内缺氧是实体肿瘤中非常普遍的现象,与肿瘤快速增长血供不足有关,在肿瘤微环境组织形态学上表现为肿瘤坏死。肿瘤坏死在恶性肿瘤的发生、发展及转移过程中均发挥着复杂作用,相关研究表明,肿瘤坏死^[37]是不良预后因子。

因此,基于肿瘤微环境的乳腺癌预测模型是未来发展方向,采用H&E染色方法和多光子显微成像技术相结合的多模式成像,综合考虑肿瘤微环境重要组分,如肿瘤细胞、胶原纤维、淋巴细胞、巨噬细胞、脉管瘤栓、微血管、坏死、出血、肿瘤细胞侵犯脂肪组织和神经等,不同组分之间相对空间分布的共同作用对肿瘤发生、发展、侵袭和转移的影响,建立以肿瘤微环境重要组分相对空间分布模式特征为生物标志物基础的乳腺癌预后评估系统。同时,发挥计算机辅助的图像分析方法自动识别的优势,为建立的乳腺癌预后评估系统从实验室研究走向临床应用提供切实可行的转化路径。

参 考 文 献

- [1] Denk W, Strickler J H, Webb W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy[J]. *Science*, 1990, 248(4951): 73-76.
- [2] Aparna D U, Mazumder N. Types of advanced optical microscopy techniques for breast cancer research: a review[J]. *Lasers in Medical Science*, 2018, 33(9): 1849-1858.
- [3] Matsui T, Mizuno H, Sudo T, et al. Non-labeling multiphoton excitation microscopy as a novel diagnostic tool for discriminating normal tissue and colorectal cancer lesions[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 6959.
- [4] Sun T Y, Haberman A M, Greco V. Preclinical advances with multiphoton microscopy in live imaging of skin cancers[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2017, 137(2): 282-287.
- [5] Jain M, Robinson B D, Shevchuk M M, et al. Multiphoton microscopy: a potential intraoperative tool for the detection of carcinoma *in situ* in human bladder[J]. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2015, 139(6): 796-804.
- [6] Zhang Z Y, Wang M X, Liu Z H, et al. Application of second harmonic generation in biomedical imaging[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2020, 47(2): 0207008. 张子一, 王明雪, 刘志贺, 等. 二次谐波在生物医学成像中的应用[J]. *中国激光*, 2020, 47(2): 0207008.
- [7] Pavlova I P, Nair S S, Lundon D, et al. Multiphoton microscopy for identifying collagen signatures associated with biochemical recurrence in prostate cancer patients[J]. *Journal of Personalized Medicine*, 2021, 11(11): 1061.
- [8] Pham T, Banerjee B, Cromeey B, et al. Feasibility of multimodal multiphoton microscopy to facilitate surgical margin assessment in pancreatic cancer[J]. *Applied Optics*, 2020, 59(22): G1-G7.
- [9] Ustione A, Piston D W. A simple introduction to multiphoton microscopy[J]. *Journal of Microscopy*, 2011, 243(3): 221-226.
- [10] Bloembergen N, Pershan P S. Light waves at the boundary of nonlinear media[J]. *Physical Review*, 1962, 128(2): 606-622.
- [11] Guo Y W, Li Y, Ma Z W. Research on symmetry of BaTiO₃ film based on second-harmonic generation technology[J]. *Acta Optica Sinica*, 2021, 41(6): 0619001. 郭雅文, 李源, 马宗伟. 基于二次谐波产生技术的BaTiO₃薄膜对称性研究[J]. *光学学报*, 2021, 41(6): 0619001.
- [12] Rejon C, McCaffrey L. Cell polarity in mammary gland morphogenesis and breast cancer[M]. *Ebnet K. Cell polarity 2*. Cham: Springer, 2015: 187-207.
- [13] Hanahan D, Coussens L M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment[J]. *Cancer Cell*, 2012, 21(3): 309-322.
- [14] Sun Z, Wang S H, Zhao R C. The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment[J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2014, 7: 14.
- [15] Han X X, Burke R M, Zettel M L, et al. Second harmonic properties of tumor collagen: determining the structural relationship between reactive stroma and healthy stroma[J]. *Optics Express*, 2008, 16(3): 1846-1859.
- [16] Burke K, Tang P, Brown E. Second harmonic generation reveals matrix alterations during breast

- tumor progression[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2013, 18(3): 031106.
- [17] Natal R A, Paiva G R, Pelegati V B, et al. Exploring collagen parameters in pure special types of invasive breast cancer[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 7715.
- [18] Provenzano P P, Eliceiri K W, Campbell J M, et al. Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion[J]. *BMC Medicine*, 2006, 4(1): 38.
- [19] Conklin M W, Eickhoff J C, Riching K M, et al. Aligned collagen is a prognostic signature for survival in human breast carcinoma[J]. *The American Journal of Pathology*, 2011, 178(3): 1221-1232.
- [20] Xi G Q, Guo W H, Kang D Y, et al. Large-scale tumor-associated collagen signatures identify high-risk breast cancer patients[J]. *Theranostics*, 2021, 11(7): 3229-3243.
- [21] Sun Y J, Qu Z Y, Li Y H. Study on target detection of breast tumor based on improved mask R-CNN[J]. *Acta Optica Sinica*, 2021, 41(2): 0212004.
孙跃军, 屈赵燕, 李毅红. 基于改进的 Mask R-CNN 的乳腺肿瘤目标检测研究[J]. *光学学报*, 2021, 41(2): 0212004.
- [22] Niu X M, Lü X Q, Gu Y, et al. Breast cancer histopathological image classification based on improved ResNeXt[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2020, 57(22): 221021.
牛学猛, 吕晓琪, 谷宇, 等. 基于改进 ResNeXt 的乳腺癌组织病理学图像分类[J]. *激光与光电子学进展*, 2020, 57(22): 221021.
- [23] Li Z X, Song T, Ge M F, et al. Breast cancer classification from histopathological images based on improved inception model[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2021, 58(8): 0817001.
李赵旭, 宋涛, 葛梦飞, 等. 基于改进 Inception 模型的乳腺癌病理学图像分类[J]. *激光与光电子学进展*, 2021, 58(8): 0817001.
- [24] Falzon G, Pearson S, Murison R. Analysis of collagen fibre shape changes in breast cancer[J]. *Physics in Medicine and Biology*, 2008, 53(23): 6641-6652.
- [25] Bredfeldt J S, Liu Y M, Conklin M W, et al. Automated quantification of aligned collagen for human breast carcinoma prognosis[J]. *Journal of Pathology Informatics*, 2014, 5(1): 28.
- [26] Majeed H, Okoro C, Kajdacsy-Balla A, et al. Quantifying collagen fiber orientation in breast cancer using quantitative phase imaging[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2017, 22(4): 046004.
- [27] Natal R A, Vassallo J, Paiva G R, et al. Collagen analysis by second-harmonic generation microscopy predicts outcome of luminal breast cancer[J]. *Tumour Biology*, 2018, 40(4): 1010428318770953.
- [28] Gole L, Yeong J, Lim J C T, et al. Quantitative stain-free imaging and digital profiling of collagen structure reveal diverse survival of triple negative breast cancer patients[J]. *Breast Cancer Research*, 2020, 22(1): 42.
- [29] Sprague B L, Vacek P M, Mulrow S E, et al. Collagen organization in relation to ductal carcinoma *in situ* pathology and outcomes[J]. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2021, 30(1): 80-88.
- [30] Xi G Q, Qiu L D, Xu S Y, et al. Computer-assisted quantification of tumor-associated collagen signatures to improve the prognosis prediction of breast cancer [J]. *BMC Medicine*, 2021, 19(1): 273.
- [31] Salgado R, Denkert C, Demaria S, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014[J]. *Annals of Oncology*, 2015, 26(2): 259-271.
- [32] Denkert C, von Minckwitz G, Darb-Esfahani S, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy[J]. *The Lancet Oncology*, 2018, 19(1): 40-50.
- [33] Dieci M V, Mathieu M C, Guarneri V, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in two phase III randomized adjuvant breast cancer trials[J]. *Annals of Oncology*, 2015, 26(8): 1698-1704.
- [34] He J J, Fu F M, Wang W, et al. Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes based on the evaluation of frequency in patients with oestrogen receptor-positive breast cancer[J]. *European Journal of Cancer*, 2021, 154: 217-226.
- [35] Catherine L, Gustavo A, Wilks J A, et al. Perineural invasion in cancer: a review of the literature[J]. *Cancer*, 2009, 115(15): 3379-3391.
- [36] D'Esposito V, Liguoro D, Ambrosio M R, et al. Adipose microenvironment promotes triple negative breast cancer cell invasiveness and dissemination by producing CCL5[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(17): 24495-24509.
- [37] Richards C H, Mohammed Z, Qayyum T, et al. The prognostic value of histological tumor necrosis in solid organ malignant disease: a systematic review[J]. *Future Oncology*, 2011, 7(10): 1223-1235.