

· 实验研究 ·

荧光腹腔镜下小鼠胃癌可视化成像的实验研究^{*}刘长旭 贺 余 刘 昶^{**}

(哈尔滨医科大学附属第四医院普外科, 哈尔滨 150001)

【摘要】 目的 探讨荧光腹腔镜下小鼠胃癌可视化成像在鉴别肿瘤和正常组织中的价值。 **方法** 共 20 只 3~4 周龄, 体重 20 g 裸鼠。2 只裸鼠右后肢皮下注射 0.2 ml 高表达 HER-2 基因的 NCI-N87 胃癌细胞悬液用于观察背部成瘤情况, 1 周后当瘤体直径达 1 cm 左右进行下一步实验观察。将 0.2 ml 高表达 HER-2 基因的 NCI-N87 胃癌细胞悬液注射于 12 只裸鼠胃黏膜下, 建立裸鼠胃癌模型。将量子点与 HER-2 的单抗结合制作量子点纳米荧光探针。将 12 只胃癌模型裸鼠分为 A、B 组, 每组 6 只, A 组裸鼠尾静脉注射量子点纳米荧光探针 100 μ l 与裸鼠胃癌模型进行体内结合, B 组裸鼠尾静脉先注射 HER-2 单克隆抗体再注射量子点纳米荧光探针 100 μ l, C 组 6 只正常生长的裸鼠尾静脉直接注射量子点纳米荧光探针 100 μ l。最后利用改装后的荧光腹腔镜分别以 15、30 min 和 1、2、4、8、12、24、30 h 时间点观察不同时期裸鼠体内胃癌组织及其他部位的荧光显像, 标本送检。 **结果** 裸鼠肿瘤成功, 胃癌组织在荧光腹腔镜下完成可视化成像, 荧光探针结合后稳定性良好, 荧光强度在 1 h 后达到峰值, 30 h 后荧光消失。发光组织病理切片证实为胃癌组织, 免疫组化证实该组织高表达 HER-2 蛋白。 **结论** 量子点纳米荧光探针性质稳定, 荧光强度 1 h 达到峰值, 然后逐渐衰减, 荧光腹腔镜下可清晰看到高表达 HER-2 的 NCI-N87 胃恶性肿瘤的边界和周围组织及淋巴结的转移情况。

【关键词】 量子点; 胃癌; 荧光腹腔镜; 裸鼠

文献标识: A 文章编号: 1009-6604(2020)04-0349-05

doi: 10.3969/j.issn.1009-6604.2020.04.015

Experimental Study on Fluorescent Laparoscopic Visualization of Gastric Cancer in Mice Liu Changxu, He Yu, Liu Chang.

Department of General Surgery, Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China

Corresponding author: Liu Chang, E-mail: changliu72@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the value of fluorescent laparoscopy visual imaging of gastric cancer to differentiate tumor from normal tissue in mice. **Methods** A total of 20 nude mice aged 3-4 weeks and weighing 20 g were used. Two nude mice were injected subcutaneously with high expression of HER-2 gene of NCI-N87 gastric cancer cell fluid 0.2 ml in the right lower extremity to observe the tumorigenesis of the back. One week later, when the tumor diameter reached about 1 cm, the next experimental observation was carried out. The gastric cancer model of nude mice was established by injecting 0.2 ml NCI-N87 gastric cancer cell solution with high expression of HER-2 gene into gastric mucosa of 12 nude mice. The quantum dot (QD) was combined with the monoclonal antibody of HER-2 to make the quantum dot nano fluorescence probe. The gastric cancer models of 12 nude mice were divided into two groups: group A and group B, 6 mice in each group. In the group A, 100 μ l QD nanofluorescent probe was injected into the tail vein of nude mice, and in the group B, 100 μ l HER-2 monoclonal antibody (0.5 μ mol/L) was injected into the tail vein of nude mice, and then 100 μ l QD nanofluorescent probe was injected. In the group C, six normal nude mice were injected with 100 μ l QD nanofluorescence probe directly into the tail vein. Finally, the modified fluorescence laparoscopy was used to observe the fluorescence imaging of gastric cancer tissues and other parts in nude mice at 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h and 30 h respectively. Finally, the samples were sent for examination. **Results** Successful tumor growth was achieved in nude mice. The visual imaging of gastric cancer tissue under fluorescent laparoscopy was completed, with good stability. The fluorescence intensity reached the peak after 1 h, and the fluorescence disappeared after 30 h. The pathological section of luminescent tissue proved to be gastric cancer tissue, and immunohistochemistry confirmed the high expression of HER-2 protein in this tissue. **Conclusions** The properties of the quantum dots nanofluorescence probe are stable. The fluorescence intensity reaches the peak after 1 h, and then attenuates gradually. The fluorescent laparoscopy can clearly see the boundary of high expression of HER-2 gene of NCI-N87 gastric cancer and the metastasis of the surrounding tissue and lymph nodes.

【Key Words】 Quantum dots; Gastric cancer; Fluorescent laparoscopy; Nude mice^{*} 基金项目: 哈尔滨医科大学附属第四医院特别资助项目 (HYDSYTB201911)^{**} 通讯作者, E-mail: changliu72@163.com

胃癌是常见的恶性肿瘤,预后较差。我国是胃癌高发国家,发病和死亡数均约占世界的 50%^[1]。尽管医学水平在不断进步,腹腔镜胃癌根治术也日趋成熟^[2,3],但由于淋巴管是胃癌转移的常见途径,如果淋巴清扫不彻底,极易发生复发与转移^[4],腹腔镜手术胃癌的复发率、转移率较开腹手术并未显著下降^[5]。

人表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor 2, HER-2)蛋白在胃癌组织中高表达,且胃癌的原发灶与转移的淋巴结中 HER-2 蛋白所表达的状态具有高度的一致性^[6,7],因此,HER-2 可以为胃癌的靶向治疗提供良好的依据^[8]。量子点作为新兴的纳米荧光探针材料,因优良的光学特性被广泛地应用于生物学标记^[9,10]。若将 HER-2 作为胃癌的治疗靶点,利用量子点纳米荧光探针对其进行标记,癌肿范围以及转移的淋巴结便可以准确地被标记出来。利用改装后的荧光腹腔镜直视下根据组织散发的荧光更好地辨认肿瘤及转移的淋巴结,还可以显示常规腹腔镜难以觉察的其他组织转移,最终可以在术中荧光导航辅助下精准切除肿瘤。Metildi 等^[11]进行小鼠胰腺肿瘤的荧光腹腔镜成像,Murayama 等^[12]应用 5-盐酸氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid, 5-ALA)标记人体胃癌进行荧光腹腔镜下分期。本研究旨在找到能与胃癌组织特异性结合的荧光探针,在术中实时观察肿瘤形态,为肿瘤精准切除提供导航辅助。

1 材料与方法

1.1 实验材料

胃癌细胞株 NCI-N87 购买于武汉普诺赛生命科技有限公司。由量子点和 HER-2 单克隆抗体结合制成的量子点纳米荧光探针由杭州纳晶科技有限公司提供,裸鼠(18~22 g)购买自北京维通利华实验动物技术有限公司[批文号:SCXK(京)2016-0006]。

1.2 组建荧光腹腔镜系统

以 Olympus 公司 VISERA OTV-S190 作为主机,匹配 VISERA CLV-S190 光源和 OEV262H 显示器,使用天津博朗科技发展有限公司腹腔镜镜头(直径 2.7 mm)作为观察裸鼠腹腔的成像设备,与主机连接,在镜头与光源线连接处安置一个特制滤光片(FU-532LGP-Y7,深圳市富喆科技有限公司),该滤光片滤光波长范围 450~500 nm,符合量子点纳米荧光探针的激发波长要求,连接光源,荧光腹腔镜系统初步组建完成。

1.3 裸鼠胃癌模型的制备

将 20 只 3~4 周龄,体重 20 g 左右的裸鼠在无

特定病原体(specific pathogen free, SPF)级动物饲养间饲养 3~5 d 后进行实验。取 2 只裸鼠,用 1 ml 注射器吸取配制好的胃癌细胞悬液 0.2 ml,固定裸鼠,在裸鼠右后肢进针,针尖斜面向上,确定位置合适后缓慢推进全部胃癌细胞悬液,皮下形成皮丘,拔针后用医用棉球按压针眼数秒以确保液体全部进入,放回笼内,裸鼠皮下肿瘤完成。取 12 只裸鼠,每只肌肉注射舒泰 1 mg 给予全身麻醉,观察无麻醉反应后,在裸鼠腹中线旁约 0.2 cm 处取切口开腹后,充分游离暴露胃部,将同等剂量的胃癌细胞悬液注射于胃黏膜下,注意不要将细胞悬液漏入腹腔,关闭腹腔,缝合皮肤,碘伏棉球消毒后敷料固定,待其清醒后放入笼内继续饲养,裸鼠胃内肿瘤种植完成。余 6 只为健康裸鼠。由于胃内接种不便于观察成瘤情况,可以每日观察裸鼠的背部成瘤情况进行初步对照,1 周后当瘤体直径达到 1 cm 左右即可进行下一步实验观察。

1.4 动物分组和实验操作

将 12 只胃内种植胃癌细胞的裸鼠模型分为 A、B 组(每组 6 只),正常生长的健康裸鼠作为 C 组。将浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 的量子点荧光探针从 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出,用 PBS 溶液稀释 20 倍^[13],使浓度变为 0.05 $\mu\text{mol/L}$,避光保存,用于尾静脉注射备用。1 ml 注射器吸取稀释后的量子点纳米荧光探针 100 μl 推入 A 组裸鼠尾静脉, B 组裸鼠尾静脉先缓慢推入 100 μl 0.5 $\mu\text{mol/L}$ Her-2 基因自身抗体进行抗体封闭,1 h 后于尾静脉推入同 A 组完全相等剂量的量子点荧光探针。向 C 组正常生长的裸鼠尾静脉同样推入相等剂量的荧光探针,观察 15 min 左右待探针完全进入血液循环并与肿瘤相结合后将裸鼠进行全身麻醉(舒泰 1 mg/只,肌肉注射),麻醉全程注意裸鼠保暖。将裸鼠固定于操作台上,下腹正中开一约 0.2 cm 切口,钩镊提起腹壁,将改装后的荧光腹腔镜设备进入裸鼠腹腔观察,在胃区及周围脏器和淋巴结进行集中照射,激发探针使其发光,随即将光源亮度调至最低,观察有无发光区域。根据前期实验结果,量子点荧光探针的荧光强度呈现抛物线变化,1 h 后荧光强度达到最高,以后逐渐衰减,30 h 后荧光全部消失,我们按照 15、30 min,1、2、4、8、12、24、30 h 时间点进行观察研究。观察结束后,将裸鼠全部处死,解剖裸鼠,将发光组织进行切片处理,送检切片行 HE 染色和免疫组化,以证实发光组织是否为胃癌组织,以及是否高表达 HER-2 蛋白。

2 结果

A 组裸鼠注射探针后在白光和荧光腹腔镜下成像对比,白光下虽然亮度足够,但不易观察到肿瘤的

位置,降低光源亮度后,发荧光的肿瘤可以清晰地辨认出来(图 1)。B 组裸鼠由于提前注射单克隆抗体,抗体与肿瘤结合,导致探针无法聚集于癌肿部位,荧光腹腔镜下未见明显发光(图 2)。C 组裸鼠由于体内未种植胃癌细胞,探针经尾静脉入血后无法大量聚集,腹腔镜下未见其发光(图 3)。如图 4 所示,A、B、C、D 分别为被探针标记的胃癌组织在 1、4、8、12 h 后荧光显像,随着时间的延长量子点荧光探针的荧光强度在逐渐减弱。将裸鼠处死后解剖胃部,取发光组织切片进行 HE 染色,镜下证实发光组织即为胃癌(图 5)。将发光的胃癌组织切片进行细胞角蛋白免疫组化染色,证实该胃癌高表达 HER-2 蛋白(图 6)。

3 讨论

胃癌是全球范围内较为常见的恶性肿瘤,患病率和死亡率一直居高不下^[14],许多患者在确诊时即已处于晚期。胃癌由于复发转移导致难以根治,肿瘤准确切除以及转移淋巴结的清扫可以使复发转移率大大降低。目前,手术是治疗胃癌的主要手段。随着医学水平的进步,腹腔镜胃癌根治术已经广泛被应用^[15],尽管创伤小,术后恢复快^[16],在手术过程中仍无法对癌肿位置进行准确判断,常常需要联合胃镜或者术前定位,使胃癌的切除不够精准。本研究利用量子点荧光探针能与胃癌细胞结合并发光的特性,组建量子点荧光腹腔镜系统,能够术中实时观察癌肿部位以及是否有其他脏器及淋巴结转移,为胃癌的精准治疗提供理论基础与实践支持。

HER-2 在胃癌组织中的高表达为荧光腹腔镜的靶向治疗提供新的思路。HER-2 在很多癌症中存在高表达或过表达,如乳腺癌、结直肠癌、膀胱癌及卵巢癌等,在胃癌中也同样存在过表达^[17],而且通常会导致预后不良。本研究选用高表达 HER-2 的 NCI-N87 胃癌细胞进行培养,将生长状态良好的细胞接种于裸鼠体内。量子点由于独特的荧光特性,已逐渐应用于生物医学研究中^[18]。相比于其他有机染料(如 5ALA、ICG),量子点激发光谱宽,荧光时间长、强度高^[19],在活体生物成像方面具有很大的优势。本研究选用硒化镉(CdSe)作为内部核心结构,外部包裹硫化锌(ZnS)制成量子点,结合 HER-2 单克隆抗体制备成量子点纳米荧光探针。利用硫化锌作为外壳既可以减少镉离子的释放,也可以避免量子点发生氧化,减少自由基的产生^[20],从而进一步减轻量子点的毒性。将该探针与胃癌细胞进行体内结合,再利用荧光腹腔镜设备进行观察,即可对量子点荧光探针的光学特性以及荧光腹腔镜的优势进行进一步验证。

在 NCI-N87 细胞的培养过程中,细胞的生长速度较快,复苏后第 1 天即可铺满培养瓶底部。传代几次后,将生长状态良好的细胞注射于裸鼠胃壁内,为保证成瘤率,建议将胃癌细胞悬液注射于裸鼠胃大弯侧,近胃窦处,注射完后用 4-0 小儿胃肠外科丝线缝合皮肤。此方法操作简单,安全性高,但由于肿瘤种植于胃内不便于观察是否成瘤以及瘤体大小,而且成瘤周期长,成瘤率也比组织块法低^[21],所以在裸鼠右后肢皮下以同法种植进行对照观察,这样可以证实胃癌细胞的活性。且一旦悬液接种法成瘤失败,可以解剖裸鼠皮下的肿瘤进行组织块包埋法使实验顺利进行。Sprague 等^[22]研究表明将细胞悬液与胶原溶液混合共同注射于裸鼠体内可提高成瘤率。在上述操作中,均要严格遵守无菌原则,在 SPF 级动物饲养间内的通风橱中进行,避免裸鼠发生切口感染等并发症。

裸鼠种瘤 7 d 后,裸鼠背部肿瘤直径已经达到 1 cm,少数已达 2 cm,甚至出现破溃。根据前期实验表明,此时胃内肿瘤的直径可以达到 0.5 cm,可以进行实验观察。由于荧光探针中含有镉离子,所以我们将其稀释 20 倍以减轻毒性反应,尾静脉注射后观察 15 min,裸鼠无明显不良反应发生,同时在此期间,也可以让荧光探针充分进行血液循环,与胃癌组织进行有效的结合。麻醉选用诱导时间短,安全性高且不抑制呼吸肌的全身麻醉药物^[23],同时麻醉过程中应注意裸鼠的保暖,在裸鼠下面可以放置纱布,防止热量散失过快。腔镜进入后可以清晰地观察到裸鼠的腹腔脏器,但胃部形态无明显异常,在白光照射下无法准确地判断出肿瘤的具体位置,在胃区和周围脏器、淋巴结进行充分照射,激发探针发出荧光,然后将光源亮度调至最低,可以看到小鼠胃部出现较为明显的荧光。B、C 组由于探针无法聚集,并未出现荧光显像,验证前期实验中量子点荧光探针无法结合正常胃组织的结论,同时也排除 A 组假阳性的可能。由于量子点半衰期长,所以我们注射探针后在不同时间点进行了荧光强度的观察。可以看到 15 min 后荧光强度逐渐增高,在 1 h 时可以看到发光的肿瘤组织荧光强度很高,肿瘤的部位、大小以及形状均可以较好的辨认出来,同时也可以在这个时间点判断有无其他脏器或淋巴结的转移;4 h 后荧光强度开始衰减,但仍能较清晰地看见肿瘤的形态;8 h 后荧光强度继续减弱,12 h 后肿瘤组织的荧光仍未消失,足以满足一台腹腔镜胃癌手术的时间需要,直到 30 h 后荧光才全部消失,而且可以证实荧光探针可以在裸鼠体内与胃癌组织稳定结合。观察完成后对裸鼠进行解剖,取发光组织进行病理学检查及免疫组化检测,证实发光组织即为与探针结

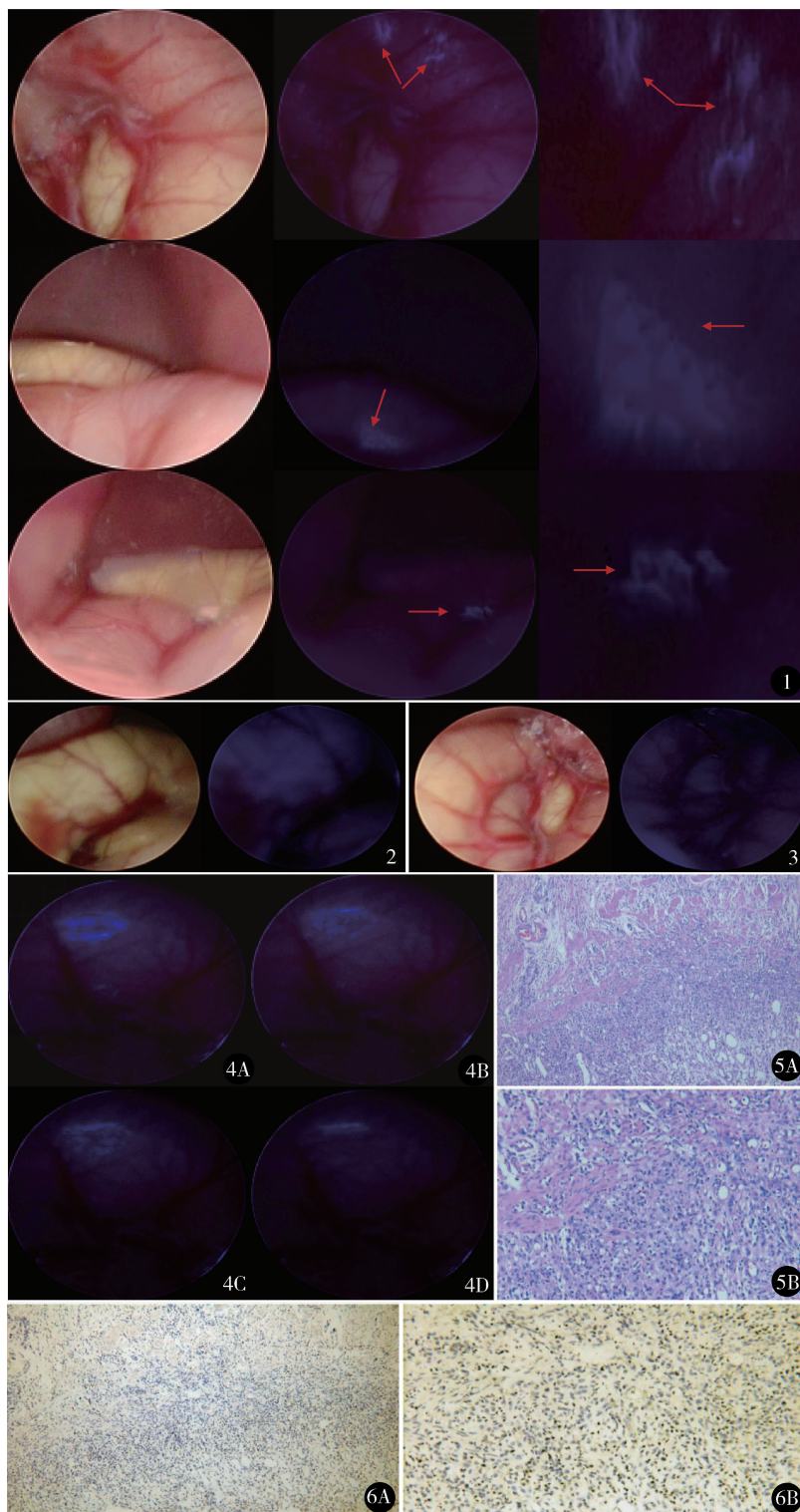


图 1 白光与荧光腹腔镜下胃癌组织的成像比较,荧光状态下肿瘤可以清晰地辨认出来(最后一列为局部放大 3 倍后的成像效果) 图 2 抗体封闭后的胃癌组织成像比较,抗体封闭后荧光腹腔镜下未见明显发光 图 3 正常裸鼠注射探针后胃癌组织的成像比较,由于探针未大量聚集,腹腔镜下未见发光 图 4 胃癌组织的荧光衰减,随着时间延长,荧光强度逐渐减弱,12 h 后荧光强度衰减至 1/3,足以满足一台腹腔镜胃癌手术的时间要求 A. 1 h 后荧光图像;B. 4 h 后荧光图像;C. 8 h 后荧光图像;D. 12 h 后荧光图像(20 h 后荧光完全消失) 图 5 显微镜下胃癌组织革兰氏染色,可见中分化异型腺体(A. $\times 80$;B. $\times 200$) 图 6 显微镜下胃癌角蛋白免疫组化染色,证实为 HER-2 阳性胃癌细胞(A. $\times 80$;B. $\times 200$)

合的胃癌组织且高表达 HER-2 蛋白。

本研究成功应用量子点和 HER-2 单克隆抗体完成荧光探针的制备,并证实其能与高表达 HER-2 蛋白的胃癌组织进行特异性结合,初步完成荧光腹腔镜的改造,制备出合适尺寸和波长范围的玻璃滤光片,使量子点荧光探针成功发光,完成胃癌在量子点荧光腹腔镜下的可视化成像,验证了荧光腹腔镜较普通腹腔镜更容易发现肿瘤组织以及其它不易被察觉的转移。未特异性结合的量子点会进入到其他器官引发毒性效应^[24],主要为肾毒性,虽然有硫化锌作为封盖材料,但是其本身的镉离子毒性也应考虑在内,因此,量子点荧光探针的生物毒性限制其广泛地应用于人体,合适的探针浓度和剂量还需要进一步在实验中探索。如果解决它的毒性问题,必将产生巨大的医疗前景,对量子点荧光腹腔镜应用于胃癌的精准治疗产生推动作用。综上所述,量子点荧光腹腔镜可以为消化道肿瘤患者术中导航精准切除肿瘤、辅助化疗以及判断预后奠定基础,为胃肠道肿瘤的治疗提供新的思路。

参考文献

- 1 左婷婷,郑荣寿,曾红梅,等. 中国胃癌流行病学现状. 中国肿瘤临床,2017,44(1):52-58.
- 2 Ohtani H, Tamamori Y, Noguchi K, et al. Meta-analysis of laparoscopy assisted and open distal gastrectomy for gastric cancer. J Surg Res,2011,171(2):479-485.
- 3 Papenfuss WA, Kukar M, Oxenberg J, et al. Morbidity and mortality associated with gastrectomy for gastric cancer. Ann Surg Oncol, 2014,21(9):3008-3014.
- 4 Saito H, Murakami Y, Miyatani K, et al. Predictive factors for recurrence in T2N0 and T3N0 gastric cancer patients. Langenbecks Arch Surg,2016,401(6):823.
- 5 Jianxian L, Changming H, Chaohui Z, et al. A matched cohort study of laparoscopy-assisted and open total gastrectomy for advanced proximal gastric cancer without serosa invasion. Chin Med J (Engl), 2014,127(3):403-407.
- 6 Bozzetti C, Negri FV, Lagrasta CA, et al. Comparison of HER2 status in primary and paired metastatic sites of gastric carcinoma. Br J Cancer,2011,104(9):1372-1376.
- 7 Kochi M, Fujii M, Masuda S, et al. Differing deregulation of HER2 in primary gastric cancer and synchronous related metastatic lymph nodes. Diagn Pathol,2013,8(21):191.
- 8 杨金凤,江军,王秋生,等. 胃癌原发灶和淋巴结转移灶 HER2 表达的临床意义. 实用癌症杂志,2017,32(10):1570-1573.
- 9 Liu Z, Cai W, He L, et al. In vivo biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice. Nat Nanotechnol, 2007,2(1):47-52.

- 10 Weissleder R, Kelly K, Sun EY, et al. Cell-specific targeting of nanoparticles by multivalent attachment of small molecules Nat Biotechnol,2005,23(11):1418-1423.
- 11 Metildi CA, Kaushal S, Lee C, et al. An LED light source and novel fluorophore combinations improve fluorescence laparoscopic detection of metastatic pancreatic cancer in orthotopic mouse models. J Am Coll Surg,2012,214(6):997-1007.
- 12 Murayama Y, Ichikawa D, Koizumi N, et al. Staging fluorescence laparoscopy for gastric cancer by using 5-aminolevulinic acid. Anticancer Res,2012,32(12):5421-5427.
- 13 Gao X, Yang L, Petros JA, et al. In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots. Curr Opin Biotech,2005,16(1):63-72.
- 14 Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics,2012. CA-Cancer J Clin,2015,65(2):87-108.
- 15 Watanabe T, Itabashi M, Shimada Y, et al. Japanese society for cancer of the colon and rectum (JSCCR) guidelines 2010 for the treatment of colorectal cancer. Int J Clin Oncol,2012,17(1):1-29.
- 16 Van Der Pas MH, Haqilind E, Cuesta MA, et al. Laparoscopic versus open surgery for rectal cancer (COLOR II): short-term outcomes of a randomised, phase 3 trial. Lancet Oncol,2013,14(3):210-218.
- 17 Movagharnjad K, Sharbatdaran M, Sheffae S, et al. HER-2/neumarker examination using immunohistochemical method in patients suffering from gastric adenocarcinoma. Int J Mol Cell MED, 2013,2(40):199-203.
- 18 Wang J, Liu R, Liu B. Cadmium-containing quantum dots: current perspectives on their application as nanomedicine and toxicity concerns. Mini Rev Med Chem,2016,16(11):905-916.
- 19 Shi D, Sadat ME, Dunn AW, et al. Photo-fluorescent and magnetic properties of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. Nanoscale,2015,7(18):8209-8232.
- 20 Yan M, Zhang Y, Xu K, et al. An in vitro study of vascular endothelial toxicity of CdTe quantum dots. Toxicology,2011,282(3):94-103.
- 21 张姬怡,李春鸣. 人胃癌裸鼠移植瘤建立的研究概况. 贵州医药, 2016,40(3):319-322.
- 22 Sprague L, Muccioli M, Pate M, et al. Dendritic cells: In vitro culture in two- and three-dimensional collagen systems and expression of collagen receptors in tumors and atherosclerotic microenvironment. Exp cell Res,2014,323(1):7-27.
- 23 Huang X, Li L, Liu T, et al. The shape effect of mesoporous silica nanoparticles on biodistribution, clearance and biocompatibility in vivo. ACS Nano,2011,5(7):5390-5399.
- 24 Wang B, He X, Zhang Z, et al. Metabolism of nanomaterials in vivo: blood circulation and organ clearance. Acc Chem Res,2013,46(3):761-769.

(收稿日期:2019-08-01)

(修回日期:2019-12-17)

(责任编辑:李贺琼)