

乳腺癌分子分型用荧光分子影像探针

岳秀丽¹, 戴志飞^{2*}

(1. 哈尔滨工业大学环境学院, 黑龙江 哈尔滨 150090;

2. 北京大学未来技术学院生物医学工程系, 北京 100871)

【摘要】目前, 乳腺癌的临床诊断就是结合病理类型和分子分型(免疫组化)。该方法是有创的, 而且不能原位、实时地展现关键生物分子与临床关键信息之间的关系。本文介绍了利用分子影像技术对乳腺癌进行分子分型检测的最新研究进展。荧光成像灵敏度高, 且不过分依赖图像分析, 只需相应的荧光分子探针, 即可实时、定量或半定量、多通道地得到肿瘤组织分子分型信息。因此, 研制安全高效、组织穿透力强的近红外荧光分子探针是未来荧光成像技术和乳腺癌分子分型研究的重点。

【关键词】乳腺癌分子分型; 分子影像; 荧光探针; 纳米探针; 多光谱荧光成像

中图分类号: R445, R737.9

文献标识码: A

文章编号: 2096-8965(2021)02-0072-07

Fluorescence molecular imaging probes for molecular classification of breast cancer

Yue Xiuli¹, Dai Zhifei^{2*}

(1. School of Environment, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, Heilongjiang, China;

2. Department of Biomedical Engineering, College of Future Technology, Peking University, Beijing 100871, China)

【Abstract】At present, clinical diagnosis of breast cancer is based on the combination of pathological types and molecular typing (immunohistochemistry). Yet, it is invasive and unable to show the relationship between key biological molecules and clinical key information in situ and in real time. This paper introduces the latest research progress of molecular classification of breast cancer using molecular imaging technology. Fluorescence imaging has high sensitivity and does not rely too much on image analysis. Thus, molecular classification information of breast cancer can be obtained in real time and multi-channel, quantitatively or semi quantitatively by using the corresponding fluorescent probes. Therefore, the development of safe and efficient near-infrared fluorescent molecular probes with strong tissue penetration is the focus of future fluorescence imaging technology and molecular classification of breast cancer.

【Keywords】Molecular classification of breast cancer; Molecular imaging; Fluorescent probe; Nanoprobe; Multispectral fluorescence imaging

乳腺癌是威胁全球女性健康最常见的恶性肿瘤之一。2018年, 全球乳腺癌的发病率高达11.6%, 新增患者约210万例^[1]。我国乳腺癌的发病率与死亡率在全球中处于较低水平, 却分别占据我国女性

恶性肿瘤的第一位与第二位^[2]。乳腺癌的诊疗技术发展迅速, 但是治疗失败以及肿瘤复发仍是导致乳腺癌患者死亡的主要原因。研究发现, 对于同一分期或相同病理类型的乳腺癌患者, 其生存期及对放

基金项目: 国家自然科学基金(82071980); 国家重点研发计划(2016YFA0201401)

通讯作者: 戴志飞(1968-), 男, 湖南人, 博士生导师, 主要从事分子影像和纳米医学的研究。E-mail: zhifei.dai@pku.edu.cn

化疗的敏感度都存在明显差异, 主要是因为乳腺癌是一类高度异质性肿瘤^[3], 不同的亚型对其临床诊断、治疗方案的选择、药物疗效的评估以及预后判断产生不同程度的影响。因此, 迫切需要发展高灵敏的肿瘤异质性检测技术以实现乳腺癌的个体化治疗。

1 乳腺癌分子分型具有重要的临床指导意义

传统上乳腺癌的病理分型主要根据大体形态、组织学和细胞生物学等特征。在患者被确诊为乳腺癌后, 医生将依据组织病理检查结果进一步确定乳腺癌的类型, 然后综合运用其它辅助检查手段进行分期, 指导对乳腺癌患者的治疗。医生一般根据TNM分期系统对乳腺癌进行分类和综合治疗^[4]。它在某种程度上可揭示乳腺癌的生物学特征, 但是临床实践表明, 同一治疗方案对同一病理类型和同一分期的乳腺癌患者的疗效及预后差异十分明显。这有力地说明在乳腺癌发生发展的演变过程中所蕴含的一些重要信息还不能采用TNM系统全面地展现出来。因此, 这种基于普通病理形态学的分型对临床指导意义有限, 不能有效指导个体化治疗和靶向药物的筛选。

乳腺癌具有高度异质性的特征。有些乳腺癌病理形态相同, 但因其分子遗传学改变, 在分子水平上高度异质, 导致其预后和疗效呈现很大的差异。因此, 以基因表达特征结合肿瘤形态学的分子分型概念更能精确地反应乳腺癌的生物学行为。精准的乳腺癌分子分型对判断其肿瘤组织学来源、鉴别肿瘤组织学亚型、预测肿瘤转移与复发的风险, 以及制定个体化治疗策略等具有重要意义。乳腺癌分子分型基于基因表达谱和基因芯片, 利用高通量分析技术, 依据分子遗传学和分子生物学特征, 判断预后。因此, 医生们可以依据每一位乳腺癌患者的分子分型制定更具针对性的个体化、系统性的治疗方案。

2 对乳腺癌分子标记物的精准识别将有利于临床上对乳腺癌的分子分型

目前, 在临床上已建立3种完善的乳腺癌分子生物学指标, 分别为雌激素受体 (Estrogen Receptor, ER)、孕激素受体 (Progesterone Receptor, PR)、人类表皮生长因子受体-2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2, HER-2)。2011年 St. Gallen 共识根据基因水平确定了乳腺癌的分子分型标准, 即按

照ER、PR、HER-2三种受体和细胞增殖标志Ki-67的存在与否将乳腺癌分为Luminal A型、Luminal B型、HER-2过表达型和三阴型等四种临床病理亚型。Luminal A型的分子表型为激素受体呈阳性 (ER+和/或PR+), HER-2阴性, Ki-67较低 (<14%)。Luminal B型又分为Luminal B (HER-2 阴性) 型和Luminal B (HER-2 阳性) 型。Luminal B (HER-2 阴性) 型表现为ER+或PR+, HER-2-, Ki-67 > 14%; Luminal B (HER-2 阳性) 型表现为ER+或PR+, HER-2+; HER-2过表达型的分子表型为ER-, PR-, HER-2+; 三阴型则表现为ER-, PR-, HER-2-。因此, 实现对ER、PR、HER-2三种分子标记物的精准识别将有利于临床上对乳腺癌的分子分型^[5]。

乳腺癌分子分型指导下的个性化治疗已成为常态。在所有乳腺癌中最常见的分子亚型是Luminal A型, 发病率为44.5%~69.0%, 早期乳腺癌比较多, 预后最好, 化疗效果不好, 但内分泌治疗效果很好, 且复发风险较低。在老年乳腺癌患者中Luminal B型较多, 它对内分泌治疗依然有效, 且预后较好, 但它对化疗的敏感性不太好, 且没有显著集中的临床分期。HER-2阳性常见于乳腺癌晚期患者, 恶性程度高, 呈现腋窝淋巴结转移的特征, 预后差。内分泌治疗无效, 化疗效果较好, 以HER-2为靶点利用赫塞汀进行靶向治疗已在临床上得到广泛应用。三阴性乳腺癌的发病率为17.1%, 多见于晚期、年轻和绝经前的女性患者, 具有内分泌治疗无效、化疗效果较好、易复发转移、预后最差等特点^[6]。根据基因表达的不同对乳腺癌进行分子分型, 比早期的病理分型能更合理地反映乳腺癌肿瘤组织的生物学行为, 对解决肿瘤的异质性、合理地分期、设计最佳治疗方案和准确地判断预后具有重要价值。

3 分子影像将为肿瘤在体分子分型提供强有力的检测手段

2000年, Perou等人用包含8102个人类基因/克隆的互补DNA (cDNA) 芯片, 对65个乳腺癌标本进行分析检测, 并以乳腺导管腔上皮细胞、基底细胞/肌上皮细胞和其它一些细胞系作对照, 通过研究其基因表达方式的特征, 发现同一种肿瘤在不同个体之间的基因表达存在一定的差异, 但是某些配对样本之间的基因表达基本一致。也就是说, 乳

腺癌化疗前后及其原发灶和淋巴结转移灶之间的基因表型基本一致, 说明了乳腺癌的基因表型相对稳定。这些具有一致性的基因亚群被分为ER+和ER-两大组, 从而开创了利用基因表达谱对乳腺癌进行分子分型研究的先例^[7]。然而, 基因芯片的制作对标本的要求很高, 过程相当复杂, 约有10%的肿瘤不能分型。而且, 实验重复性较差, 利用不同的基因芯片平台对一些肿瘤进行分子分型得出的结果不一致, 标准难以统一, 故很难用于临床。

为了解决上述问题, Carey等人尝试了利用免疫组化法来替代基因表达谱对乳腺癌进行分子分型^[8]。免疫组化法和基因芯片技术的分子分型结果不完全一致, 却能大致反映各分子亚型的临床特征, 灵敏度和特异度分别为76%和100%, 且操作简单, 因此目前临床上基本用免疫组化法对乳腺癌进行分子分型。但是, 由于免疫组化法具有单色性, 不能进行多通路的分子分型分析; 而且是半定量和主观的, 导致不同观察者之间的结论差异较大。

随着基因组学技术的发展, 与乳腺癌相关的基因分子陆续被发现^[9-11], 使我们更详细地了解与不同类型乳腺癌发展相关的遗传缺陷, 为开展乳腺癌临床试验的设计提供了依据。但是, 目前测序技术的价格仍较高, 难以普及应用, 且分子分型的高端仪器设备并非普通医疗机构临床检验的常规设备。

总之, 基于基因芯片、免疫组化和基因组学等检测手段的乳腺癌分子分型方法均存在明显的不足, 都只能对肿瘤发生发展过程中的一些关键分子进行定性和半定量的研究, 而且不能实时原位地展现关键分子和临床信息之间的相互关系, 故较难准确地揭示肿瘤进展演变的过程, 在宏观形态上综合评估肿瘤侵袭行为。更重要的是, 这些技术都需要从体内提取肿瘤细胞或组织标本并加以处理, 损失了原发肿瘤的三维信息, 而且有创的检测手段可能导致肿瘤的转移^[12]。

与传统的基因芯片和免疫组化技术相比, 分子影像学技术可以在活体状态下在细胞、基因和分子水平上, 无创、实时、动态、多组分、定量、长时程成像, 反映乳腺癌相关生物学分子的变化, 可探查肿瘤组织中细胞和分子水平的表达异常, 并结合生物信息学技术, 提取和分析成像信息, 为肿瘤分子分型、疾病病程的在体监测、基因治疗的在体示踪、药物疗效的在体评价、个体化诊疗提供了新的技术支撑平台。最近一项研究表明: 利用¹⁸F标记

的小分子探针对EGFR突变状态进行PET成像, 实现了实时、定量检测, 对筛选EGFR靶向治疗优势人群, 优化临床靶向药物治疗方案, 评价分子靶向疗效, 以及在分子水平进行预后判断具有重要意义^[13]。因此, 将分子影像技术用于乳腺癌分子分型有助于克服基因芯片和免疫组化技术面临的技术难题。

4 多光谱荧光成像技术为乳腺癌分子分型提供了高灵敏在体快速检测方法

目前, 临床常用的分子影像技术包括MRI、超声、CT、PET、荧光等。MRI具有高软组织对比分辨力、无放射伤害等优点。有文献报道, 在MRI造影模式下, 4种乳腺癌分子亚型中每一种都具有特定的异质动力学参数^[14]。然而, MRI扫描时间长, 设备和检查费用较昂贵, 体内有金属物时禁用, 使其在乳腺癌分子分型检测中受到一定的限制。超声是一种方便、经济、无放射性损害的成像方式, 是目前临床上最常用的诊断乳腺癌的影像学技术之一。超声图像特征与乳癌分子分型之间具有明显的相关性, 为乳腺癌的诊断、治疗、预后提供了丰富的依据。但是, 超声结果容易受机器设备、操作人员的经验、技术水平等多方面影响, 从而发生漏诊或误诊。CT成像具有扫描速度快、分辨率高、检查不易受周围脏器如肺、骨骼等影响的优点, 与PET成像联用同样可以对乳腺癌的分子分型进行预测^[15]。然而CT与PET成像检测较贵, 且有电离辐射, 短时间内不宜多次对病人使用。

利用超声、MRI、CT图像检测乳腺癌分子分型的研究更多地依赖于图像分析, 利用计算机技术分析获取图形特征, 再与病理结果相比较, 才能得到图像与分型的对应关系。Guo等人发现肿瘤不同的分级和受体状态都会影响到超声图像的表现^[16]。激素受体阳性(ER+, PR+)、HER-2-的患者超声图像为不规则形状、边界模糊、后方回声衰减。相比之下, 三阴性乳腺癌的超声图像多缺乏典型的恶性超声征象, 往往表现为规则、局限性的边界, 与乳腺良性肿瘤的超声图像不易区分, 需引起足够重视。Holli-Helenius等人利用MRI纹理分析可以区分Luminal A型和Luminal B型^[17]。研究人员结合了纹理分析和肿瘤体积分析来对这两种ER+的乳腺癌进行区分。结果表明, 通过测量随机性、复杂性或平滑性以及均匀性等纹理特征, 可以区分Luminal A型和Luminal B型。MRI图像的纹理特征直接

或间接地反映了肿瘤潜在的生长模式, 因此, 对肿瘤方案的决定、治疗期间的监测和随访具有重要意义。

与超声、MRI、CT不同的是, 荧光成像灵敏度高, 选择性好, 不需要过分依赖图像分析, 只需要设计相应的荧光分子探针, 即可实时、定量或半定量、多通道地得到肿瘤组织的分子分型信息。2011年, 荷兰莱顿大学的学者首次将荧光分子影像技术应用于临床, 该研究利用叶酸受体靶向的荧光分子实现了对直径小达0.1 mm的肿瘤的识别, 体现了荧光分子影像在体内应用时具有高灵敏度的巨大优势^[18]。但是, 该研究中所用分子探针的荧光在可见光范围内, 组织穿透力有限。为了提高组织穿透力, 该课题组将近红外荧光染料和叶酸类似物通过共价键连接, 得到了新的荧光分子探针, 命名为OTL38, 目前已经进入临床三期试验。近红外光的优点在于其穿透组织更深, 与专用的成像系统结合, 使组织表面下的肿瘤可视化。LI-COR公司研发了IRDye®系列近红外荧光染料, 可与单克隆抗体等多种靶分子偶联形成分子探针, 并开展了18项I期/II期临床试验, 结果表明荧光分子成像在肿瘤在体诊断中比其它成像模式具有明显的优势^[19]。

乳腺癌的高度异质性决定了单色成像用于乳腺癌分子分型的局限性。尤其是针对乳腺癌异质性分析这种复杂问题, 更加注重标志物分子表达的研究, 传统的单色标记成像已远不能满足研究需求。随着分子影像技术和高光谱图像解混技术的快速发展, 利用多种荧光染料分子标记不同生物分子, 即使有显著的光谱重叠, 通过光谱解混技术也能将每种生物分子的光学信号一一分离出来, 从而产生多光谱成像技术。利用多光谱荧光成像技术能够消除生物体自发荧光对体内荧光成像的影响, 提高诊断的灵敏度和准确性, 消除光谱重叠的干扰。通过同时标记多个生物分子, 利用多光谱荧光成像技术可实时监测生物体内复杂的标志物表达和信号转导等生物过程, 提供了深入了解分子环境异质性的可能性^[20]。因此, 可以利用多种光谱不重叠的荧光探针, 分别连上特定分子标记物的抗体, 通过抗原-抗体特异性结合, 使每个探针归巢到对应的分子标记物, 实现同时对多种特定分子标记物的荧光成像。Koyama等人利用多色荧光探针同时对三种不同的肿瘤进行荧光成像, 实现了基于多种标记物的分子分型^[21]。在小鼠体内同时接种了三种不同肿瘤: HER-1 (A431细胞)、HER-2 (NIH3T3/HER-2+

细胞)、以及白细胞介素-2受体 α -亚基受体 (IL-2R α ; SP2/Tac细胞)。在肿瘤建立后, 注射三种荧光标记的单克隆抗体的混合物: 西妥昔单抗-Cy5 (靶向HER-1)、曲妥珠单抗-Cy7 (靶向HER-2)、达珠单抗-AlexaFluor700 (靶向IL-2R α)。24小时后对小鼠进行荧光成像, 用三滤波器组在不同的激发光下能清楚地区分A431、NIH3T3/HER-2+、SP2-Tac三种肿瘤。与单滤波器组相比, 三滤波器组减少了背景信号, 显著增加了信号/背景比, 从而显著改善了每种受体靶向的区分度。因此, 利用不同荧光波长的分子探针, 通过活体多光谱荧光成像, 可以扣除组织自体荧光并进行多重荧光团成像, 从而增强信噪比, 实现乳腺癌分子分型。

5 迫切需要研制安全高效的近红外荧光分子探针

荧光分子影像技术的发展除了需要先进的成像设备外, 还需要发展安全高效的分子探针。尽管已经拥有各种性能优异的荧光分子影像设备, 但其性能尚未充分发挥出来, 关键是缺少安全高效的荧光分子影像探针。

小分子荧光探针存在代谢快、成像时间短、靶向效果差等缺点。纳米材料具有易修饰、血液循环时间长、被动靶向肿瘤等特点, 为研制新型的荧光分子探针提供了思路和方法。利用纳米材料容易修饰的特点, 可以将针对特定分子标记物的抗体连接到纳米荧光探针上, 通过高通透性和滞留效应 (Enhanced Permeation and Retention Effect, EPR) 在肿瘤组织高浓度富集并成像, 指示相应分子标记物的表达情况。量子点已在肿瘤分子成像、细胞成像和在体成像研究中取得重要进展。Yezhelyev等设计了连接不同抗体的多色量子点, 在细胞和组织水平上分别对五种乳腺癌相关的分子标记物 (ER、PR、HER-2、EGFR、mTOR) 进行了定量分析。ER、PR、HER-2受体的定量结果与免疫组化等方法基本保持一致, 表明基于荧光分子探针的技术非常适合体外肿瘤生物标志物的分析^[22]。然而, 由于潜在的安全性问题, 目前关于量子点的研究仍局限在细胞和动物水平。因此, 需要研制更加安全高效的荧光纳米探针以实现临床转化应用。

荧光成像技术利用光作为成像的信息源, 传统荧光探针的发射波长大多位于可见光波段 (350~700 nm), 而生物组织在此可见区对光的散射和吸

收均很高, 故成为生物体内荧光成像的主要障碍。相反, 近红外光(700~1 700 nm)可穿透的生物组织的距离大, 组织散射较低, 自发荧光干扰小, 可进行深层组织的成像, 且不会对生物组织和细胞产生光损伤。特别是与近红外一区(NIR-I, 700~900 nm)相比, 近红外二区(NIR-II, 900~1 700 nm)荧光成像具有更长发射波长, 更低组织散射和自发荧光, 导致更深的探测深度和更高的空间分辨率, 在活体荧光成像中具有广阔的应用前景^[23]。近年来, 近红外荧光技术不断取得突破, 各种性能优异的NIR-I和NIR-II成像系统研制成功, 具有很好的临床应用潜力。但存在的主要瓶颈有: 缺少安全性高、亮度高、组织穿透能力强、细胞损伤小、生物体自发荧光干扰小的近红外荧光探针。因此, 世界各地正在抓紧研制更加安全高效的近红外荧光探针以实现乳腺癌在体多光谱荧光成像分子分型。

6 靶向乳腺癌的荧光分子影像探针的设计与构建

近红外菁染料IRDye800CW是对吡啶菁绿(Indocyanine Green, ICG)进行结构优化后得到的近红外荧光团, 由于在其多甲川链中引入了苯氧醚桥连的刚性环己烯环, 使其比ICG具有更好的光稳定性及更少的分子间聚集。利用N-羟基琥珀酰亚胺(N-Hydroxysuccinimide, NHS)基团修饰IRDye800CW上的羧基, 即可与抗体活性基团共价结合。贝伐珠单抗是一种靶向血管生成因子(Vascular Endothelial Growth Factor-A, VEGF-A)的人源化单克隆抗体, 已用作临床抑制肿瘤的药物, 具有很好的安全性和肿瘤靶向效果。利用贝伐珠单抗靶向修饰的IRDye800CW可对乳腺癌进行分子分型, 以及术中荧光导航, 相关临床试验(NCT01508572)正在进行^[24]。然而, 抗体的分子量通常大于100 kDa, 使得荧光探针难以均匀地渗入肿瘤内部, 且由于EPR效应引起探针在炎症等部位的非特异性滞留和摄取。

整合素 $\alpha v\beta 3$ 在肿瘤新生血管中广泛高表达, 是肿瘤诊断和治疗的重要靶点。利用以 $\alpha v\beta 3$ 为靶点的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)多肽偶联荧光染料, 可构建乳腺癌分子分型用荧光分子探针。Choi等人设计了两性离子型近红外荧光团ZW800-1, 它的结构与IRDye800CW相似, 也包括甲川链中间的一个苯氧醚桥连的刚性环己烯基团。

但是, ZW800-1分子的净电荷为零, 因此显著地减少了ZW800-1分子在肝脏的滞留和非特异性结合, 并快速地通过肾脏清除。将环精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(cRGD)多肽与ZW800-1共价连接(cRGD-ZW800-1), 静脉注射肿瘤动物模型后, 信噪比高达17.2, 而cRGD-IRDye800CW和cRGD-Cy5.5的信噪比分别为5.1和2.7^[25]。

Whitley等人设计了蛋白酶激活的荧光探针LUM015, 主要由GGRK肽、QSY21猝灭剂、Cy5荧光团和聚乙二醇多聚链(mPEG)组成^[26]。GGRK肽是组织蛋白酶的特异性底物, 可使Cy5荧光发色团和猝灭剂QSY21之间保持合适的间距。QSY21和Cy5分别和GGRK的N端和赖氨酸的氨基共价结合。LUM015的荧光处于淬灭状态, 当被组织蛋白酶裂解后, 猝灭剂被释放, Cy5荧光恢复。Cy5荧光团上偶联的mPEG可增加释放的荧光基团的整体分子量, 抑制其在组织中快速扩散, 从而延长成像时间, 并可显著改善荧光探针的溶解度和药代动力学。I期临床试验证明, LUM015具有良好的耐受性, 在体外手术标本中可很好地区分乳腺癌组织与正常组织(NCT01626066)。在另一项临床试验中, 使用注射剂量0.5 mg/kg, LUM015可实时识别术中残留的乳腺癌病灶, 平均信噪比为4.70(NCT03321929)^[27]。

肿瘤细胞内微环境中谷胱甘肽(Glutathione, GSH)的浓度远高于正常组织(100~1 000倍)。Mo等设计了GSH响应的双硫键双菁染料共轭体探针(ss-diCy5和ss-diNH800CW), 前者由两个水溶性Cy5分子通过双硫键连接, 后者则由两个NH800CW分子通过双硫键偶联^[28]。在正常组织和血液中, 双硫键双菁染料共轭体的荧光几乎淬灭。当被肿瘤组织摄取后, 肿瘤细胞中高浓度的GSH还原其二硫键, 共轭体断裂, 荧光恢复。在小鼠乳腺癌4T1肿瘤模型中, 两种双菁染料共轭体都被证明能在肿瘤部位恢复荧光信号, 实现对肿瘤的特异性荧光成像。

利用穿膜肽可携带多种活性物质进入至细胞内。基于可激活的细胞穿膜肽(Activatable Cell-Penetrating Peptide, ACPP), Tsien等人设计了Cy5/Cy7比率型荧光探针AVB-620^[29]。当AVB-620的连接臂被人类乳腺癌细胞中高度表达的基质金属蛋白酶MMP2或MMP9裂解后, 发卡结构被破坏, 细胞穿膜肽携带Cy5进入细胞, 而与多聚阴离子的掩蔽

肽连接的Cy7则无法进入细胞,导致Cy5/Cy7荧光比率显著增加。与基于绝对荧光强度的传统成像相比,这种比率成像受成像条件影响较小。目前正在开展Ⅱ期临床试验,以评估AVB-620乳腺癌手术中肿瘤检测的准确性(NCT03113825)。

NIR-II肿瘤荧光成像可显著增加成像的深度并提高成像信噪比。CH1055是首个供电子基团-受电子-供电子(D-A-D)结构的小分子NIR-II荧光探针,它以苯并双噻二唑(BBTD)为受电子基团,以三苯胺为供电子基团。Zhou等将靶向乳腺癌细胞表面核仁素的靶向多肽F3与CH1055偶联,制备得到可主动靶向乳腺癌的NIR-II荧光探针CH1055-F3。该探针可以对移植和自发性乳腺癌特异性显影,并成功引导了小鼠自发乳腺癌的手术切除^[30]。为了进一步提高D-A-D型小分子探针在水溶液中的荧光量子产率,Zhang等用3,4-乙烯二氧噻吩(EDOT)代替三苯胺作为供电子基团制备了IR-E1荧光分子探针,使水分子与共轭骨架之间的相互作用显著减少,从而使IR-E1在水溶液中的荧光量子产率提高至0.7%。进一步引入电子屏蔽基团(S)-烷基链取代苄基,以减少分子间聚集导致的荧光淬灭效应,并用PEG修饰,得到水溶性探针IR-FEP,在水溶液的荧光量子产率提高到2%,并成功实现了小鼠乳腺癌的高信噪比荧光成像^[31]。

纳米粒子具有显著的信号放大功能,因此荧光纳米探针引起了人们的广泛的兴趣。Phillips等研制了粒径小于10 nm的超小靶向荧光核壳二氧化硅纳米粒子(C dots),由交联Cy5的二氧化硅内核和表面修饰了短聚乙二醇(PEG)链(Mw~500)外壳组成。它不仅可快速地通过肾脏代谢清除,而且能均匀地渗入肿瘤组织。C dots中的Cy5在交联后成为相对刚性的结构,呈现出比游离Cy5更好的光稳定性,荧光强度增加2倍以上。此外,将环精氨酸-甘氨酸-天门冬氨酸-酪氨酸(cRGDY)靶向肽与PEG链偶联,获得了一种以整合素为靶点的荧光探针cRGDY-PEG-Cy5.5-C dots。临床试验证实,cRGDY-PEG-Cy5.5-C dots有很好的安全性,对乳腺癌具有很好的靶向成像效果^[32]。

Gao等人研制了一种对肿瘤酸性pH响应的聚合物胶束荧光纳米探针PEG-b-P(EPA100-r-ICG1)(商品名为ONM-100)^[16]。在pH > 6.9时,该聚合物在缓冲液中自组装形成稳定胶束结构,ICG聚集于胶束核心,荧光淬灭。当pH < 6.9时,

胶束分解成单体,ICG分开,荧光恢复。因此,在血液(pH7.4)中,ONM-100荧光信号淬灭;而在肿瘤酸性微环境中,ONM-100的近红外荧光恢复。在针对乳腺癌等模型的临床前研究中,ONM-100表现出优异的肿瘤检测特异性。在对ONM-100的临床试验中,肿瘤检测平均信噪比为3.7,病人皆表现出良好的耐受性^[33]。

荧光结合其他影像技术的多模态探针也取得了很好的研究进展。Liu等利用两种互补配对的荧光菁染料构建了多色纳米泡^[34]。炎症区域的髓过氧化物酶与底物鲁米诺反应发出蓝光。利用这种纳米泡,通过生物发光能量共振转移及荧光能量共振转移,成功将鲁米诺反应发出的蓝光转换为近红外光,从而成功实现了对肿瘤等深部炎症组织的高灵敏的荧光成像,以及对乳腺癌转移瘤的荧光/超声双模态成像。

新的医疗改革正稳步提升人们对高精度医学检测技术的需求,为分子影像探针快速发展奠定了坚实的基础。分子影像探针的研制与临床转化不仅需要临床医学的引导,基础生物医学的支撑,还需要化学、材料、仪器科学、影像科学和信息科学等多个学科的交叉融合,以及一个理工医结合和产学研一体化的研发团队。通过协同攻关,自主创新,相信在不久的将来,我国将在荧光分子影像探针领域取得新的突破,实现实时、动态、精准、无创的乳腺癌分子分型。

参考文献

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] 国家癌症中心. 2018年全国最新癌症报告[R]. 北京, 2018.
- [3] HUNTER K W, AMIN R, DEASY S, et al. Genetic insights into the morass of metastatic heterogeneity[J]. Nat Rev Canc, 2018, 18(4): 211-223.
- [4] TOPALIAN S L, TAUBE J M, ANDERS R A, et al. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy[J]. Nat Rev Canc, 2016, 16(5): 275-287.
- [5] The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours[J]. Nature, 2012, 490(7418): 61-70.

- [6] KWA M, MAKRI S A, ESTEVA F I. Clinical utility of gene-expression signatures in early stage breast cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(10): 595-610.
- [7] PEROU C M, SØRLIE T, EISEN M B, et al. Molecular portraits of human breast tumours[J]. *Nature*, 2000, 406 (6797): 747-752.
- [8] HAMMERL D, MASSINK M P G, SMID M, et al. Clonality, antigen recognition, and suppression of CD8+ T cells differentially affect prognosis of breast cancer subtypes[J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26 (2): 505-517.
- [9] NIK-ZAINAL S, DAVIES H, STAAF J, et al. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences[J]. *Nature*, 2016, 534 (7605): 47-54.
- [10] PEREIRA B, CHIN S F, RUEDA O M, et al. The somatic mutation profiles of 2 433 breast cancers refine their genomic and transcriptomic landscapes[J]. *Nat comm*, 2016, 7: 11479.
- [11] MICHAILIDOU K, LINDSTRÖM S, DENNIS J, et al. Association analysis identifies 65 new breast cancer risk loci[J]. *Nature*, 2017, 551 (7678): 92-94.
- [12] GARRIDO-CASTRO A C, LIN N U, POLYAK K. Insights into molecular classifications of triple-negative breast cancer: improving patient selection for treatment[J]. *Canc Discov*, 2019, 9(2):176-198.
- [13] SUN X L, XIAO Z Y, CHEN G Y, et al. A PET imaging approach for determining EGFR mutation status for improved lung cancer patient management[J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10 (431): ean8840.
- [14] YAMAGUCHI K, ABE H, NEWSTEAD G M, et al. Intratumoral heterogeneity of the distribution of kinetic parameters in breast cancer: comparison based on the molecular subtypes of invasive breast cancer[J]. *Breast Canc*, 2015, 22 (5): 496-502.
- [15] MIYAKE K K, NAKAMOTO Y, KANAO S, et al. Journal club: diagnostic value of (18)F-FDG PET/CT and MRI in predicting the clinicopathologic subtypes of invasive breast cancer[J]. *AJR Amer J Roentgenol*, 2014, 203 (2): 272-279.
- [16] GUO Y, HU Y Z, QIAO M Y, et al. Radiomics analysis on ultrasound for prediction of biologic behavior in breast invasive ductal carcinoma[J]. *Clin Breast Cancer*, 2018, 18 (3): e335-e344.
- [17] HOLLI-HELENIUS K, SALMINEN A, RINTA-KIIKKA I, et al. MRI texture analysis in differentiating luminal A and luminal B breast cancer molecular subtypes - a feasibility study[J]. *BMC Med Imaging*, 2017,17(1): 69.
- [18] VAN DAM G M, THEMELIS G, CRANE L M A, et al. Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor- α targeting: first in-human results[J]. *Nature Med*, 2011, 17 (10): 1315-1319.
- [19] HONG G, ANTARIS A, DAI H, et al. Near-infrared fluorophores for biomedical imaging[J]. *Nat Biomed Eng*, 2017, 1, 0010.
- [20] KOBAYASHI H, LONGMIRE M R, CHOYKE P L. Polychromatic in vivo imaging of multiple targets using visible and near infrared light[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65 (8): 1112-1119.
- [21] KOYAMA Y, BARRETT T, HAMA Y, et al. In vivo molecular imaging to diagnose and subtype tumors through receptor-targeted optically labeled monoclonal antibodies[J]. *Neoplasia*, 2007, 9(12): 1021-1029.
- [22] YEZHELYEV M, AL-HAJJ A, MORRIS C, et al. In situ molecular profiling of breast cancer biomarkers with multicolor quantum dots[J]. *Adv Mater*, 2007, 19: 3146-3151.
- [23] ANTARIS A, CHEN H, CHENG K, et al. A small-molecule dye for NIR-II imaging[J]. *Nat Mater*, 2016, 15 (2): 235-242.
- [24] LAMBERTS L E, KOCH M, DE JONG J S, et al. Tumor-specific uptake of fluorescent bevacizumab-IRDye800 CW microdosing in patients with primary breast cancer: a phase I feasibility study[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23 (11) : 2730-2741.
- [25] CHOI H S, NASR K, ALYABYEV S, et al. Synthesis and in vivo fate of zwitterionic near-infrared fluorophores[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*,2011, 50(28), 6258-6263.
- [26] WHITLEY M J, CARDONA D M, LAZARIDES A L, et al. A mouse-human phase I co-clinical trial of a protease-activated fluorescent probe for imaging cancer[J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(320): 320ra4.
- [27] SMITH B L, GADD M A, LANAHAN C R, et al. Real-time, intraoperative detection of residual breast cancer in lumpectomy cavity walls using a novel cathepsin-activated fluorescent imaging system[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2018, 171(2): 413-420.
- [28] MO S, ZHANG X T, HAMEED S, et al. Glutathione-responsive disassembly of disulfide dicyanine for tumor imaging with reduction in background signal intensity[J]. *Theranostics* 2020, 10(5): 2130-2140.
- [29] JIANG T, OLSON E S, NGUYEN Q T, et al. Tumor imaging by means of proteolytic activation of cell-penetrating peptides[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(51) :17867-17872.

- [14] SHON U, KIM M H, LEE D Y, et al. The effect of intradermal botulinum toxin on androgenetic alopecia and its possible mechanism[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2020, 83(6): 1838-1839.
- [15] TAK Y J, LEE S Y, CHO A R, et al. A randomized, double-blind, vehicle-controlled clinical study of hair regeneration using adipose-derived stem cell constituent extract in androgenetic alopecia[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2020, 9(8): 839-849.
- [16] ADIL A, GODWIN M. The effectiveness of treatments for androgenetic alopecia: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2017, 77(1): 136-141.
- [17] RAMOS P M, MCCOY J, WAMBIER C, et al. Novel topical booster enhances follicular sulfotransferase activity in patients with androgenetic alopecia: a new strategy to improve minoxidil response[J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2020, 34(12): e799-e800.
- [18] BARAT T, ABDOLLAHIMAJD F, DADKHAHFAR S, et al. Evaluation of the efficacy and safety of cow placenta extract lotion versus minoxidil 2% in the treatment of female pattern androgenetic alopecia[J]. *Int J Womens Dermatol*, 2020, 6(4): 318-321.
- [19] KERKEMEYER K L, TRINDADE D C L, JERJEN R, et al. Female pattern hair loss in men: a distinct clinical variant of androgenetic alopecia[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2021, 85(1): 260-262.
- [20] LUDWIG E. Classification of the types of androgenetic alopecia (common baldness) occurring in the female sex [J]. *Br J Dermatol*, 1977, 97(3): 247-254.
- [21] KIM M W, SHIN I S, YOON H S, et al. Lipid profile in patients with androgenetic alopecia: a meta-analysis[J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2017, 31(6): 942-951.
- [22] AGAC M T, BEKTAS H, KORKMAZ L, et al. Androgenetic alopecia is associated with increased arterial stiffness in asymptomatic young adults[J]. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 2015, 29(1): 26-30.
- [23] SU L H, CHEN L S, LIN S C, et al. Association of androgenetic alopecia with mortality from diabetes mellitus and heart disease[J]. *JAMA Dermatol*, 2013, 149(5): 601-606.
- [24] ZHANG K, BAI X F, YUAN Z P, et al. Cellular nanofiber structure with secretory activity-promoting characteristics for multicellular spheroid formation and hair follicle regeneration[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12(7): 7931-7941.
- [25] CHEN P, MIAO Y, ZHANG F F, et al. Nanoscale microenvironment engineering based on layer-by-layer self-assembly to regulate hair follicle stem cell fate for regenerative medicine[J]. *Theranostics*, 2020, 10(25): 11673-11689.
- [26] GARZA L A, LIU Y P, YANG Z X, et al. Prostaglandin D2 inhibits hair growth and is elevated in bald scalp of men with androgenetic alopecia[J]. *Sci Transl Med*, 2012, 4(126): 126ra34.

[收稿日期] 2020-12-09

(上接第78页)

- [30] ZHOU H, LI S S, ZENG X D, et al. Tumor-homing peptide-based NIR-II probes for targeted spontaneous breast tumor imaging[J]. *Chin Chem Lett*, 2020, 31(6): 1382-1386.
- [31] YANG Q L, MA Z R, WANG H S, et al. Rational design of molecular fluorophores for biological imaging in the NIR-II window [J]. *Adv Mater*, 2017, 29(12): 201605497.
- [32] PHILLIPS E, PENATE-MEDINA O, ZANZONICOPB, et al. Clinical translation of an ultrasmall inorganic optical-PET imaging nanoparticle probe[J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(260), 260ra149.
- [33] WITJES M, VOSKUIL F, STEINKAMP P, et al. Fluorescence guided surgery using the pH-activated micellar tracer ONM-100: first-in-human proof of principle in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *J Oral Maxillofacial Surgery*, 2019, 77(9): e38.
- [34] LIU R, TANG J, XU Y X, et al. Bioluminescence imaging of inflammation in vivo based on bioluminescence and fluorescence resonance energy transfer using nanobubble ultrasound contrast agent[J]. *ACS Nano* 2019, 13(5): 5124-5132.

[收稿日期] 2020-12-12