

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.13.012

SNFYMPL 荧光探针和共聚焦显微内镜在胃癌诊断中的应用 *

刘少鹏 郑立跃 康晓宇 潘阳林 郭学刚[△]

(第四军医大学西京消化病医院肿瘤生物学国家重点实验室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:探讨荧光探针 SNFYMPLGGGSK-FITC 与胃癌组织的结合能力,预测其在胃癌诊断中的应用价值。**方法:**收集我院 2015 年 6 月至 10 月收治的 48 例胃癌患者手术切除的肿瘤和癌旁组织,使用异硫氰酸荧光素 FITC 标记的线性七肽 SNFYMPL 及无关序列肽探针对其冰冻切片进行荧光染色,通过共聚焦激光扫描显微镜 CLSM 检测其结合能力,并与组织病理结果对比。**结果:**SNFYMPLGGGSK-FITC 对胃癌组织荧光染色的阳性率为 81.25 % (39/48),明显优于无关序列肽探针的 14.58 % (7/48),差异有统计学意义($P < 0.001$)。SNFYMPLGGGSK-FITC 对癌旁组织荧光染色的阳性率为 27.08 % (13/48),明显低于对胃癌组织荧光染色阳性率,差异有统计学意义($P < 0.001$)。**结论:**FITC 标记的 SNFYMPL 短肽探针与胃癌组织较强结合能力,图像组织分辨率好,可以作为共聚焦激光显微内镜在胃癌诊断的潜在靶向分子进一步研究。

关键词:SNFYMPL;短肽探针;共聚焦显微内镜;胃癌

中图分类号:R735.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2017)13-2450-03

Application of SNFYMPL Fluorescence Probe in Diagnosis of Gastric Cancer Using Confocal Laser Endomicroscopy*

LIU Shao-peng, ZHENG Li-yue, KANG Xiao-yu, PAN Yang-lin, GUO Xue-gang[△]

(State Key Laboratory of Cancer Biology, Xijing Hospital of Digestive Diseases, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the binding capacity of fluorescent probe SNFYMPLGGGSK-FITC to gastric cancer tissue, and its applying potential in the diagnosis of gastric cancer. **Methods:** 48 pairs of gastric cancer tissues and adjacent non-tumor tissues of operation-resected in our hospital from June to October in 2015 were collected. FITC labelled oligopeptide SNFYMPL and unrelated sequence peptide probe were used to stain their cryosections. The binding capacity were examined with confocal laser scan microscope (CLSM). Pathological result were used as the standard control. **Results:** The positive ratio of SNFYMPLGGGSK-FITC stained gastric cancer tissues was 81.25 % (39/48), while the unrelated sequence peptide probe had a much lower positive ratio (14.58 %, 7/48) ($P < 0.001$). The positive ratio of SNFYMPLGGGSK-FITC stained adjacent non-tumor tissues was also much lower (27.08 %, 13/48) ($P < 0.001$). **Conclusions:** FITC labelled oligopeptide SNFYMPL had high affinity with gastric cancer tissues, and could be a potential targeting molecule for the application of confocal laser endomicroscopy in the diagnosis of gastric cancer.

Key words: SNFYMPL; Oligopeptide probe; Confocal laser endomicroscopy; Gastric cancer

Chinese Library Classification(CLC): R753.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)13-2450-03

前言

共聚焦激光显微内镜(confocal laser endomicroscopy, CLE)是近年来兴起的新型内镜检查技术,最高放大 1000 倍,可以提供组织和细胞层面的视野^[1],相比传统白光内镜,在诊断胃肠道粘膜微小病变时具有明显优势。CLE 与荧光探针结合(P-CLE)更能提高组织分辨率,为诊断提供方便^[2-4]。相比抗体,荧光标记的短肽探针具有免疫原型低、组织渗透快、质膜穿透性好、半衰期短和造价便宜等优点^[5-7]。

线性七肽 SNFYMPL 是用 Barrett 食管高级别上皮内瘤变

和食管腺癌细胞,通过噬菌体肽库技术和全细胞差减筛选法筛选出的新型靶向肽^[8,9]。由于胃癌和食管腺癌相似的组织来源,我们希望探索该肽链在胃癌诊断中的应用价值。

本研究中,我们尝试使用异硫氰酸荧光素 FITC 标记 SNFYMPL 制成试验荧光探针,对胃癌手术切除组织行荧光染色,通过共聚焦激光扫描显微镜 CLSM 检测荧光染色结果,发现 SNFYMPL 与胃癌组织切片中的肿瘤组织具有高度亲和性,取得了满意效果。

1 材料和方法

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81370585);第四军医大学科技发展基金计划(4174122286)

作者简介:刘少鹏(1992-),硕士研究生,主要研究方向:胃癌新型内镜诊断,E-mail: 11019367776@163.com

[△] 通讯作者:郭学刚(1962-),博士生导师,教授,主要研究方向:内镜微创治疗,E-mail: xuegangguo@gmail.com

(收稿日期:2016-11-29 接受日期:2016-12-23)

1.1 材料

线性七肽 SNFYMPL 在 C 端添加一个 -GGGSK 连接体以消除空间位阻^[6],后标记 FITC 分子成为荧光探针,该探针和无关序列肽探针 GGGAGGGAGGGK-FITC 均购买自上海吉尔生化公司,并经公司检测,纯度均在 95 %以上;DAPI 购买自 Sigma 公司;免疫组化试剂盒购买自中山金桥公司;倒置显微镜和共聚焦激光显微镜均由实验室购买自 Olympus 公司。

1.2 组织冰冻切片的荧光染色和 HE 染色

本院 48 例胃癌病人手术切除的肿瘤组织及相应的癌旁组织,做快速冰冻连续切片,进行组织切片的荧光染色。具体步骤如下:附有冰冻切片的载玻片以 10 %甲醛固定 15 min,PBS 洗 2 次,每次 5 min;室温下山羊血清封闭 1 h,倾去血清;浸于玻璃支架槽中,两种荧光探针浓度均调整为 10 nmol/L,避光条件下染色 1 h;避光条件下用 PBST 漂洗 3 次,每次 5 min;避光下 DAPI(1:200 专用稀释液稀释)复染 15 min,PBST 洗 2 次,每次 5 min。防淬灭剂覆盖封片,使用共聚焦激光显微镜观察。每例样本均进行 HE 染色,由病理科医生做出诊断,作为比较标准。

1.3 组织荧光染色结果的评价

肿瘤组织的荧光染色结果由两位有分子影像相关课题研究经验的技师分别评价。采用与免疫组化相对应的半定量分级方式^[7],根据荧光强度无荧光(0 分),淡荧光(1 分),适中荧光(2 分),强荧光(3 分);根据细胞荧光染色比例进行评分:<5 %比例

荧光(0 分),5-25 %比例荧光(1 分),26-50 %比例荧光(2 分),51-75 %比例荧光(3 分),>75 %比例荧光(4 分);最终得分为染色强度得分与染色面积得分的乘积,最终得分 ≤ 3 分视为荧光染色阴性,最终得分>4 分视为荧光染色阳性。肿瘤组织 HE 染色结果由消化病理科医生诊断并发报告。

1.4 统计学分析

实验结果均使用 SPSS 19.0 进行统计学分析。SNFYMPLGGGSK-FITC 对胃癌组织和癌旁组织的荧光染色阳性率比较使用四格表资料的 χ^2 检验,两种探针对胃癌组织的荧光染色阳性率比较使用配对四格表资料的 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

SNFYMPLGGGSK-FITC 与组织切片中的肿瘤细胞结合主要在细胞膜和细胞质,正常细胞较少结合荧光(图 1)。胃癌组织中 SNFYMPLGGGSK-FITC 荧光染色阳性率为 81.25 % (39 / 48),癌旁组织中 SNFYMPLGGGSK-FITC 荧光染色阳性率 27.08 % (13/48),差异有统计学意义($P<0.001$)(表 1)。

无关序列肽探针 GGGAGGGAGGGK-FITC 对胃癌组织的荧光染色阳性率为 14.58 % (7/48),显著低于 SNFYMPLGGGSK-FITC,差异有统计学意义($P<0.001$)(表 2)。无关序列肽探针对癌旁组织的荧光染色阳性率为 4.16 % (2/48)。

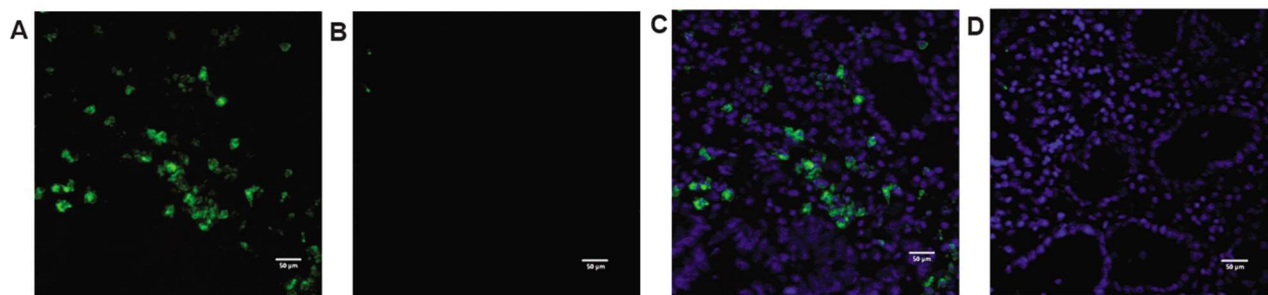


图 1 SNFYMPLGGGSK-FITC 与胃癌组织和癌旁组织中的结合情况

A&C SNFYMPLGGGSK-FITC 对胃癌组织染色结果呈阳性(A 仅 FITC 信号),B&D SNFYMPLGGGSK-FITC 对癌旁组织染色结果成阴性(B 仅 FITC 信号)。

Fig.1 Fluorescent images of SNFYMPLGGGSK-FITC stained gastric cancer tissues and adjacent non-tumor tissues. A&C a positive binding in GC tissue (A is FITC-only image). B&D a negative binding in adjacent GC tissue (B is FITC-only image). Scale bar, 50 μ m.

表 1 SNFYMPLGGGSK-FITC 对胃癌组织和癌旁组织荧光染色的比较

Table 1 Comparison of the binding of GC tissues and adjacent GC tissues with SNFYMPLGGGSK-FITC

Groups	Case	Positive	Negative	χ^2	P-value
Gastric cancer tissues	48	39	9	28.364	<0.001
Adjacent non-tumor tissues	48	13	35		

表 2 SNFYMPLGGGSK-FITC 和 GGGAGGGAGGGK-FITC 对胃癌组织荧光染色的比较

Table 2 The compare between the binding of SNFYMPLGGGSK-FITC and GGGAGGGAGGGK-FITC with GC tissues

Groups	Case	Positive	Negative	χ^2	P-value
SNF*-FITC	48	39	9	28.265	<0.001
GGG*-FITC	48	7	41		

3 讨论

近年来,虽然胃癌在世界很多地区的发病率明显降低,但

仍然是患病率第五位和死亡率第三的肿瘤^[10]。东亚地区是胃癌的高发地区,目前我国胃癌居于恶性肿瘤发病的第三位,每年死亡近 30 万人^[11,12]。胃癌病人 5 年生存率与分期密切相关,早

诊断早治疗是提高病人生存率的关键手段。普通白光内镜诊断早期胃癌较为困难,对内镜医生的经验要求较高。新型内镜技术,如自体荧光内镜和窄带成像内镜日渐在临床上推广应用,但其临床意义仍然受到诊断特异性不够高和依赖结构形态等限制^[13-15]。

CLE 是近年来兴起的新型内镜检查技术,在诊断胃肠道粘膜微小病变上具有明显优势。CLE 与荧光探针结合(P-CLE)实现特定靶分子的成像,可以在在体情况下检测分子表型的异常,并能提高组织分辨率,为诊断提供方便,已在国内外消化道肿瘤和良性疾病的相关研究中广泛应用^[16-20]。目前,相关研究使用的探针一般为荧光标记的抗体和短肽,相比抗体,荧光标记的短肽探针相比抗体,具有诸多优点。

线性七肽 SNFYMPL 是用 Barrett 食管腺癌细胞系,通过噬菌体肽库技术和全细胞差减筛选法筛选出的新型靶向肽。在该研究中,其亲和力在食管腺癌组织中也得到了验证^[9]。由于食管腺癌和胃癌都由肠上皮化生恶变而来,细胞表型有一定同源性,我们设想该短肽可能与胃癌组织有较强结合能力,也可用于胃癌诊断的相关研究。

本研究中,我们收集本院 2015 年 6 月至 10 月间 48 例胃癌病人手术切除的肿瘤和癌旁组织,使用 FITC 标记的线性七肽 SNFYMPL 及无关序列肽探针对其冰冻切片进行荧光染色,通过共聚焦激光扫描显微镜 CLSM 检测其结合能力。结果显示 SNFYMPLGGGSK-FITC 与组织切片中的肿瘤细胞结合主要在细胞膜和细胞质。肿瘤组织中 SNFYMPLGGGSK-FITC 染色阳性率为 81.25 %(39/48),显著高于对照肽。同时,癌旁组织中 SNFYMPLGGGSK-FITC 染色阴性率达 72.92 %(35/48),表明 FITC 标记的 SNFYMPL 短肽探针与胃癌组织较强结合能力,并有较好特异性,可以作为共聚焦激光显微内镜在胃癌诊断的潜在靶向分子做进一步研究。

目前,SNFYMPL 的靶分子尚不明确,影响了对其具体机制的阐释,以及适用的病种和人群的预测。继续使用实验共聚焦内镜模拟对入胃癌组织的鉴别,并完善病人内镜检查过程中的在体实验也将是下一步工作的方向。

参考文献(References)

- [1] Karstensen J, Klausen P, Saftoiu A, et al. Molecular confocal laser endomicroscopy: a novel technique for in vivo cellular characterization of gastrointestinal lesions [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(24): 7794-7800
- [2] Hsiung P, Hardy J, Friedland S, et al. Detection of colonic dysplasia in vivo using a targeted septapeptide and confocal microendoscopy[J]. Nat Med 2008, 14(4): 454-458
- [3] Musquer N, Coquenlorge S, Bourreille A, et al. Probe-based confocal laser endomicroscopy: A new method for quantitative analysis of pit structure in healthy and Crohn's disease patients [J]. Dig Liver Dis, 2013, 45(6): 487-492
- [4] Konda V, Aslanian H, Wallace M, et al. First assessment of needle-based confocal laser endomicroscopy during EUS-FNA procedures of the pancreas (with videos) [J]. Gastrointest Endosc, 2011, 74 (5): 1049-1060

- [5] Sturm MB, Joshi B, Lu S, et al. Targeted imaging of esophageal neoplasia with a fluorescently labeled peptide: first-in-human results[J]. Sci Transl Med, 2013, 5(184): 184ra61
- [6] Hu H, Wang M, Liang C, et al. GX1 targeting delivery of rmh TNF α evaluated using multimodality imaging [J]. Int J Pharm, 2014, 461 (1-2): 181-191
- [7] Liu L, Yin J, Liu C, et al. In vivo molecular imaging of gastric cancer in human-murine xenograft models with confocal laser endomicroscopy using a tumor vascular homing peptide [J]. Cancer Lett, 2015, 356(2 Pt B): 891-898
- [8] Li M, Anastassiades C, Joshi B, et al. Affinity Peptide for Targeted Detection of Dysplasia in Barrett's Esophagus [J]. Gastroenterology, 2010, 139(5): 1472-1480
- [9] Sturm MB, Piraka C, Elmunzer B, et al. In vivo molecular imaging of Barrett's esophagus with confocal laser endomicroscopy[J]. Gastroenterology, 2013, 145(1): 56-58
- [10] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics,2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108
- [11] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132
- [12] 陈万青, 郑荣寿, 曾红梅, 等. 2011 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2015, 24(1): 1-10
Chen Wan-qing, Zheng Rong-tao, Zeng Hong-mei, et al. Report of cancer incidence and mortality in China, 2011 [J]. Chinese Journal of Cancer, 2015, 24(1): 1-10
- [13] Tada K, Oda I, Yokoi C, et al. Pilot study on clinical effectiveness of autofluorescence Imaging for early gastric cancer diagnosis by less experienced endoscopists[J]. Diagn Ther Endosc, 2011, 2011: 419136
- [14] Matsumoto T, Moriyama T, Yao T, et al. Autofluorescence imaging colonoscopy for the diagnosis of dysplasia in ulcerative colitis [J]. Inflamm Bowel Dis, 2007, 13(5): 640-641
- [15] Uedo N, Iishi H, Tatsuta M, et al. A novel video endoscopy system by using autofluorescence and reflectance imaging for diagnosis of esophagogastric cancers [J]. Gastrointest Endosc, 2005, 6 (24): 521-528
- [16] Hayee B, Inoue H, Sato H, et al. Magnification narrow-band imaging for the diagnosis of early gastric cancer: a review of the Japanese literature for the Western endoscopist [J]. Gastrointest Endosc, 2013, 78 (3): 452-461
- [17] Li CQ, Liu J, Ji R, et al. Use of confocal laser endomicroscopy to predict relapse of ulcerative colitis[J]. BMC Gastroenterol, 2014, 14: 45
- [18] Li Z, Zuo XL, Li CQ, et al. In vivo molecular imaging of gastric cancer by targeting MG7 antigen with confocal laser endomicroscopy[J]. Endoscopy, 2013, 45(2): 79-85
- [19] Hoetker MS, Kiesslich R, Diken M, et al. Molecular in vivo imaging of gastric cancer in a human-murine xenograft model: targeting epidermal growth factor receptor [J]. Gastrointest Endosc, 2012, 76(3): 612-620
- [20] Hara H, Takahashi T, Nakatsuka R, et al. A novel approach of optical biopsy using probe-based confocal laser endomicroscopy for peritoneal metastasis[J]. Surg Endosc, 2016, 30(8): 3437-3446