

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.13.004

新型近红外荧光探针 MHI85 在胆道系统成像的实验研究*

王志东¹ 姬媛媛^{2Δ} 陈海燕² 惠博¹ 杨正安¹ Choi Hak Soo³

(1 西安交通大学第二附属医院干四病区老年消化外科 陕西 西安 710004;

2 西安交通大学第二附属医院科研中心实验室 陕西 西安 710004;

3 美国哈佛大学医学院附属麻省总医院戈登医学影像中心 波士顿 MA 02114 美国)

摘要 目的:观察一种新型近红外荧光探针 MHI85 在器官中的成像特点,寻找特异性的器官成像荧光探针,为手术提供帮助。**方法:**用海洋光学测量系统检测近红外荧光探针 MHI85 的吸光度和荧光强度,分析其光学特点。随后将近红外荧光探针 MHI85 注射到 CD-1 小鼠体内,4 小时后观察小鼠体内腹腔、胆囊和胆管、离体小鼠腹部脏器的近红外荧光成像情况。并测量离体脏器的信号背景比(SBR)。**结果:**近红外荧光探针 MHI85 最大吸收峰值和荧光峰值分别在 690 nm 和 713 nm,说明其发光谱在 700 nm 左右,且成像稳定。利用小动物活体成像系统发现,近红外荧光探针 MHI85 在小鼠胆囊、胆囊管、左右肝管、肝总管可见明显荧光信号。心、肺、肝、胰、脾、肾、十二指肠、小肠均无荧光信号,而胆囊中可见明显的荧光信号。离体脏器 SBR 结果显示,胆囊的 SBR 明显高于其他脏器。**结论:**近红外荧光分子探针 MHI85 对胆囊及胆道系统具有良好的靶向性,且成像清晰、定位准确。

关键词:近红外荧光;成像;胆囊;胆道

中图分类号:R445; R322.48; R339.19+1 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2019)13-2419-05

Study of a Novel Near Infrared Fluorescence Probe MHI85 in Imaging of Biliary Tract*

WANG Zhi-dong¹, JI Yuan-yuan^{2Δ}, CHEN Hai-yan², HUI Bo¹, YANG Zheng-an¹, Choi Hak Soo³

(1 Geriatric Digestive Surgery, The Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710004, China;

2 Scientific Research Center, The Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710004, China;

3 Department of Radiology, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, MA 02114, USA)

ABSTRACT Objective: To observe the imaging characteristics of a novel near-infrared fluorescence probe MHI85 in organ, and to search for specific organ imaging, so as to provide help for surgery. **Methods:** The optical properties of MHI85 was analyzed using an Ocean Spectrophotometer. The biodistribution and targeting was monitored in the CD-1 mouse 4 h post-injection of MHI85 using the Fluorescence-Assisted Resection and Exploration (FLARE™) real-time intraoperative imaging system. And intraoperative imaging of abdominal cavity, gallbladder and biliary tract, resected organs was observed. Signal-to-background ratio (SBR) was calculated by comparing the signals of major organs against surrounding muscle. **Results:** The emission spectrum of MHI85 was at 700 nm, and imaging was stable. Real-time live-body imaging effectively reported the dynamic process of the biodistribution and clearance of MHI85 *in vivo*. And the signal of MHI85 targeting on gallbladder, gallbladder duct, left and right hepatic duct and hepatic duct of mouse was obviously strong at 4 h post-injection. There was no fluorescence signal in the heart, lung, liver, pancreas, spleen, kidney, duodenum and small intestine, while there was obvious fluorescence signal in the gallbladder. SBR of isolated organs was measured, indicating that the SBR of gallbladder was significantly higher than that of other organs. **Conclusions:** Near infrared fluorescence molecular probe MHI85 can be used as targets for imaging of gallbladder and biliary tract system because of its clear imaging and accurate localization.

Key words: Near-infrared fluorescence; Imaging; Gallbladder; Biliary tract

Chinese Library Classification(CLC): R445; R322.48; R339.19+1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)13-2419-05

前言

近红外荧光成像技术,是一种新型的光谱成像手段,已成为目前分子影像学发展的新方向。近红外荧光探针中 700-900 nm

光谱段能够有效消除生物组织的光吸收,去除荧光干扰,强组织穿透力和对生物机体无光损伤等优点而受到研究人员的广泛关注^[1]。近年来,近红外荧光染料吲哚菁绿(indocyaninegreen, ICG)已经被临床上用来指导肝脏手术,通过增强的荧光信号确

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81201925, 81001588);陕西省重点研发计划(2017SF313);

西安交通大学第二附属医院人才培养专项科研基金资助项目(RC(GG)201502)

作者简介:王志东(1978-),博士,副主任医师,研究方向:消化道肿瘤的基础和临床研究,电话:029-87679386, E-mail: xawzd@163.com

Δ 通讯作者:姬媛媛,博士,副研究员,研究方向:消化道肿瘤发生发展的分子机制及靶向治疗, E-mail: jiyuanyuan1234@163.com

(收稿日期:2018-12-30 接受日期:2019-01-25)

定肝脏肿瘤的大小,并在手术切除中更好的确定肿瘤的边界,有利于减少或避免其他脏器损伤^[2-3]。近红外荧光成像技术不仅在肿瘤的早期诊断和治疗中具有广阔的应用前景,而且在术中器官成像中的作用也不容忽视,可用以减少手术并发症的发生^[4-6]。MHI85 是由美国哈佛大学附属麻省总医院 Choi 教授研发的一种新型近红外荧光探针,通过 ChemDraw Professional 软件分析其化学特性(表 1),具有较高的荧光量子产率、较高的摩尔吸光系数、较好的生物相容性等,正是由于具有 MHI85 特异性强、靶向性好、无毒性等优点,故而本研究拟利用动物实验初步探讨近红外荧光探针 MHI85 在术中胆道系统成像中的应用,为今后的临床应用及推广提供一定的理论依据。

表 1 近红外荧光的化学特性

Table 1 The chemical property of near-infrared (NIR) fluorophores MHI85

Name	Value
Exact Mass	727.95
LogD at 7.4	4.38
TPSA	114.99
HBD	2
HBA	7
Total Charge	1
Refractivity	220.81
Rotatable Bond	13
SB pKa	2.66
SA pKa	-0.94

1 材料与方法

1.1 主要试剂

近红外荧光探针 MHI85 由美国哈佛大学医学院附属麻省总医院 Choi 教授提供(图 1)。二甲基亚砜(DMSO)和牛血清白蛋白(BSA)购自美国 Sigma 公司。

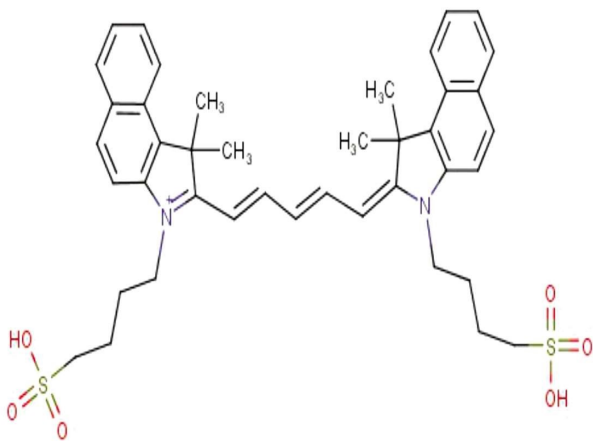


图 1 近红外荧光 MHI85 的化学结构

Fig.1 The chemical structure of NIR fluorophores MHI85

1.2 实验动物

4 周龄 CD-1 小鼠,体重 25-30 g,雄性,3 只,均购自西安交通大学医学部实验动物中心。普通动物房饲养,室温为 20-25 ℃,相对湿度为 30-70%,光照时间为 12-24 h,黑暗时间为 10-12 h,1 只/笼,自由饮水,为避免食物的影响,给予特殊白食。

1.3 实验仪器

海洋光学测量系统(Ocean Optics)及小动物活体成像系统(FLARE)。

1.4 实验方法

首先将 MHI85 溶解于 DMSO 中,配成储存浓度为 10 mM,然后避光保存。取 2 μL 的储存液加入 198 μL 的 10% BSA 溶液中,终溶液的浓度为 100 μM。利用海洋光学测量系统对 MHI85 的吸光度和荧光强度进行检测。随后用动物气体麻醉系统将 3 只 CD-1 小鼠同时进行麻醉,并将 100 μL (10 nmol)的 MHI85 从小鼠眼眶的内眦静脉快速注入,观察小鼠的一般情况直至苏醒。4 小时后,进行后续实验,观察 MHI85 在体内的代谢及分布,确定其是否在胆道系统成像。利用 Image J 软件对 3 只小鼠离体脏器的荧光值分别进行测量,取平均值。

1.5 统计学方法

所有数据以均数 ± 标准差表示。统计方法用 SPSS16.0 软件进行多样本单因素方差分析或学生 t 检验。 $P < 0.05$ 认为有显著性差异。

2 结果

2.1 近红外荧光 MHI85 的光学特性

近红外荧光 MHI85 由小动物活体成像系统中 700 nm 光谱的激发,曝光时间为 100 ms,1.5 mL Eppendorf 管中 MHI85 溶液发出明亮的荧光,结果显示,近红外荧光 MHI85 发光谱在 700 nm,且成像稳定。海洋光学测量系统对 MHI85 的吸光度和荧光强度进行检测,其最大吸收峰值和荧光峰值分别在 690 nm 和 713 nm (图 2)。

2.2 近红外荧光 MHI85 注射 4 小时后小鼠腹腔显影情况

注射近红外荧光 MHI85 4 小时后小鼠腹腔脏器中胆囊显示明显的荧光信号,除肠腔有微弱荧光信号之外,其余腹部脏器无明显的荧光信号。上述结果说明,近红外荧光 MHI85 主要的显影的靶器官是胆囊(图 3)。

2.3 近红外荧光 MHI85 注射 4 小时后小鼠胆囊和胆管显影情况

为了进一步观察胆囊和胆管的显影情况,我们利用小动物活体成像系统将胆囊和胆道系统进行局部放大,发现胆囊有更加明亮的,密度均匀的荧光信号。更重要的是,胆囊管、左右肝管、肝总管也可见明显荧光信号(图 4)。

2.4 近红外荧光 MHI85 注射 4 小时后小鼠腹部脏器离体显影情况

我们将小鼠腹部主要脏器分离之后,观察并测量它们的荧光信号,同时计算出各自的信号背景比(SBR)。心、肺、肝、胰、脾、肾、十二指肠、小肠均无荧光信号,而胆囊中可见明显的荧光信号。统计学结果也证实胆囊的 SBR 明显高于其他脏器。以上结果充分说明,近红外荧光 MHI85 主要在胆囊及胆管系统显影(图 5)。

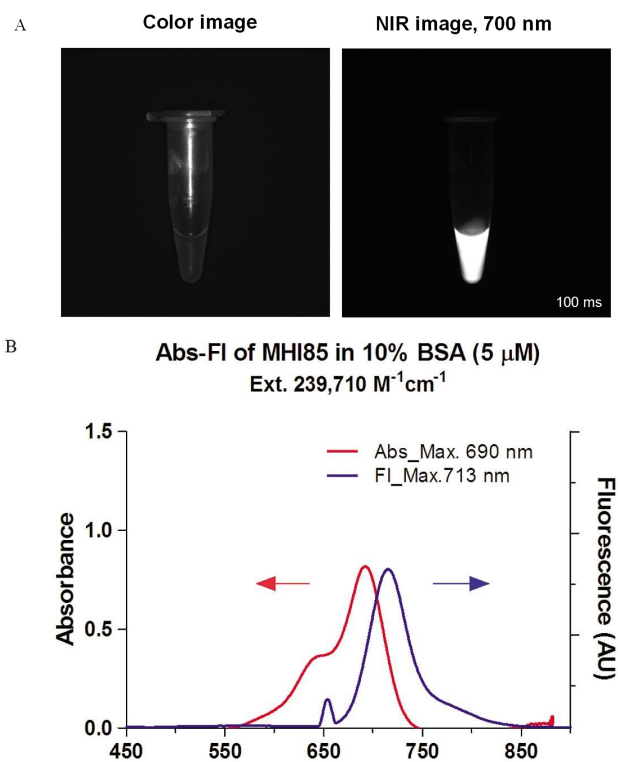


Fig. 2 The optical property of NIR fluorophores MHI8

3 讨论

分子影像学是以肿瘤关键分子靶点作为识别及干预目标,借助注入体内的特异性分子探针和高灵敏影像设备,在活体状态下对分子靶点进行成像的新技术。由于其具备在体、原位、直观及可定性定量的优点,它使肿瘤分子水平的早期发现、精确诊断、靶向治疗及疗效监测成为可能,从而成为解决肿瘤分子诊疗问题的重要手段。因此,分子影像学被认为是 21 世纪最前沿的学科之一^[7,8]。近红外荧光成像技术作为一种新型的光谱成像手段,已成为目前分子影像学发展的新方向。由于其具有较强的组织穿透力,较低的荧光背景,以及实时、无创、体外连续动态监测等优势,在肿瘤标记、炎症成像、干细胞示踪成像等领域已得到广泛应用^[9-11]。近红外荧光探针或染料由于具有敏感、无创、良好的组织对比、实时显像、价格相对便宜等优点而备受关注。目前,一些近红外荧光染料已经被应用于临床。尤其,ICG 是一种已被美国 FDA 批准用于临床诊断的近红外荧光探针,由于其较好的荧光特性和较高的生物相容性,已被广泛应用于肝功能代谢评价、干细胞标记成像、临床血管造影以及前哨淋巴结显影等^[12]。近红外荧光成像的关键技术是实现荧光染料的研究,使其具有较高的荧光量子产率、较高的摩尔吸光系数、较好的生物相容性,以及在复杂的生物体中实现良好的荧光稳定性和较高的荧光特异性等^[13]。近红外荧光探针 MHI85 有更高的标记效率和荧光强度,生物代谢安全性高、成像方法简便易行等优点,更为重要的是,MHI85 具有明显的胆道系统显影的特性,还发现与人类不同之处在于,小鼠胆囊管开口于右肝管,说明其的器官特异性好,靶向性强,有可能为肝胆外科手术治疗提供新思路和新方法。

对于肝胆外科医生而言,在术中特别是腹腔镜胆囊切除术

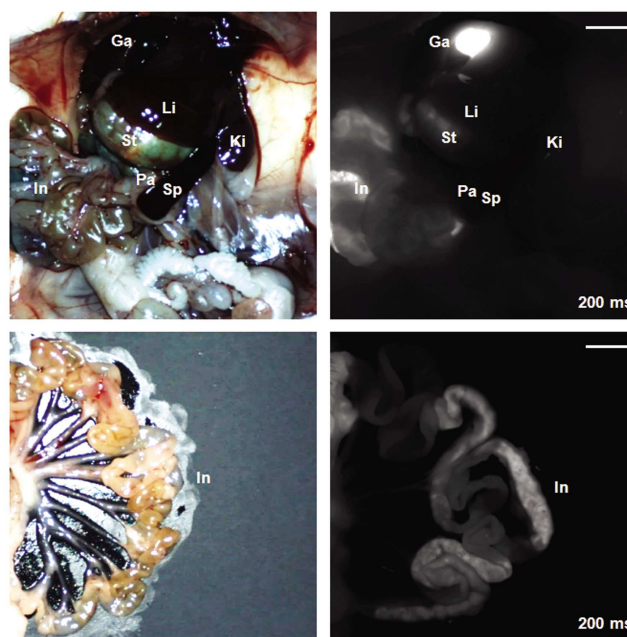


图 3 近红外荧光 MHI85 注射 4 小时后小鼠腹腔显影

注:Ga,胆囊;Ki,肾脏;Li,肝脏;Pa,胰腺;Sp,脾脏;In,小肠;St,胃。n=3。标尺为 1 cm。曝光时间为 200 ms。

Fig.3 Intraoperative imaging of abdominal cavity at 4 h post-injection. MHI 85 was injected intravenously into the CD-1 mouse, and the NIR fluorescence image was observed at 4 h post-injection. Abbreviations used are: Ga, Gallbladder; Ki, kidney; Li, liver; Pa, pancreas; Sp, spleen; In, intestine; St, stomach. n=3. Scale bars = 1 cm. Exposure time = 200 ms.

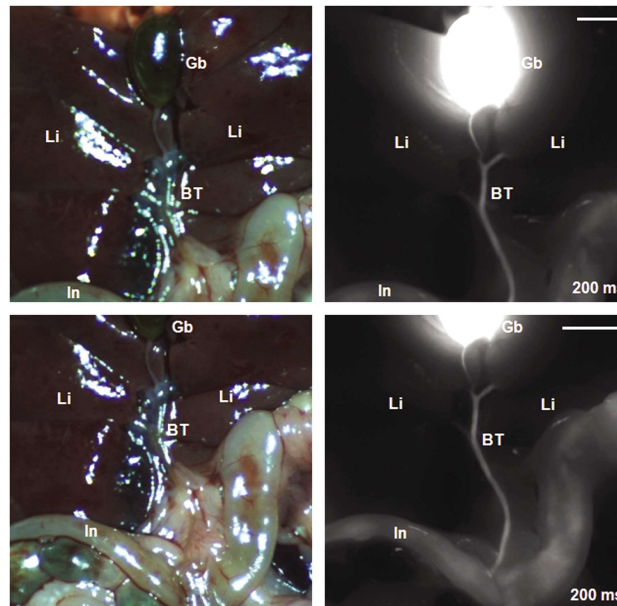


图 4 近红外荧光 MHI85 注射 4 小时后小鼠胆囊和胆管显影

注:BT,胆管;Gb,胆囊;Li,肝脏;In,小肠;St,胃。n=3。标尺为 1 cm。曝光时间为 200 ms。

Fig.4 Intraoperative imaging of gallbladder and biliary tract at 4 h post-injection. MHI 85 was injected intravenously into the CD-1 mouse, and the NIR fluorescence image was observed at 4 h post-injection. Abbreviations used are: BT, Biliary Tract; Gb, Gallbladder; Li, liver; In, intestine; St, stomach. n=3. Scale bars = 1 cm. Exposure time = 200 ms.

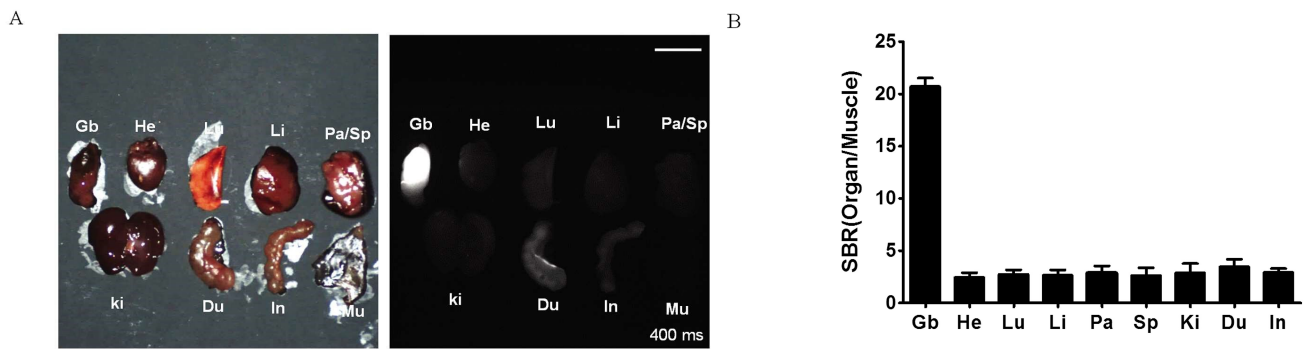


图5 近红外荧光 MHI85 注射 4 小时后小鼠腹部脏器离体显影

Fig.5 In vivo biodistribution and clearance of MHI85 at 4 h post-injection. MHI 85 was injected intravenously into the CD-1 mouse, and the NIR fluorescence image was observed at 4 h post-injection

注:A) 离体器官显影。B) 离体器官信背比。Gb, 胆囊; He, 心脏; Du, 十二指肠; In, 小肠; Ki, 肾脏; Li, 肝脏; Lu, 肺脏; Mu, 肌肉; Pa, 胰腺; Sp, 脾。n=3。标尺为 1 cm。曝光时间为 400 ms。

Note: A) Intraoperative imaging of resected tissues/organs. B) Signal-to-background ratio (SBR) of each organ against muscle (Mu). SBR was calculated by comparing the signals of major organs against surrounding muscle. Abbreviations used are: Gb, Gallbladder; He, Heart; Du, duodenum; In, intestine; Ki, kidneys; Li, liver; Lu, lungs; Mu, muscle; Pa, pancreas; Sp, spleen. n=3. Scale bars = 1 cm. Exposure time = 400 ms.

中,能够准确无误的分辨清楚胆囊管、胆总管、肝总管之间的关系及病变情况,从而避免胆道损伤是每个肝胆外科医生需要认真面对的问题。尽管胆道术前医学成像有磁共振胆胰管成像(MRCP)、腹部彩超、CT等,术前可以对胆道的病变有一定的了解,但是因成像属于静态,仅供术中参考,还不能完全反映术中的解剖位置关系等情况,更不能为外科医生在术中提供更加直观的胆道解剖图像。特别是在严重的胆道炎症、粘连、解剖变异明显的情况下,术中显露和寻找胆囊管、胆总管、肝总管就会变得异常困难,容易出现误伤胆管而对病人造成严重损害,成为肝胆外科医生之痛^[14-16]。目前临床上常用的胆道镜仅用于胆总管切开取石、T管引流术是否有结石残留,而无法应用于不需要打开胆总管的腹腔镜胆囊切除术。术中胆道X线造影也多用于胆总管探查术后,且需要提前预约影像科医师,操作复杂,且对病人及医护人员有放射性损害,也不适合于腹腔镜胆囊切除术^[17-19]。因此,术中开发新的成像方法和技术,既便于术中外科医生的清晰观察和精准切除,更有利于胆囊结石、胆总管结石等患者,有望大幅度降低胆道损伤并发症的发生。而近红外荧光技术的引入和发展,恰好可以有效地避免胆囊手术并发症的发生,尤其是我们发现 MHI85 具有很好的胆道系统靶向性,生物稳定性好,显影清晰,为今后此近红外荧光探针在临床外科手术的应用铺平了道路。

腹腔镜胆囊切除术是临床上肝胆外科医师最常用的手术治疗方法。除了各省市的大医院可以实施该手术以外,目前大部分的县区级医院也逐步开展了腹腔镜胆囊切除术,使得该术式成为开展最广泛的手术之一。随着腹腔镜胆囊切除术的广泛开展,并发症如胆管损伤、动脉损伤以及腹腔脏器损伤等发生率始终较高,约为 0.5%-1%,严重影响到患者的预后及生活质量,甚至成为引发医疗纠纷的重要原因^[20]。据统计,我国每年进行腹腔镜胆囊切除术的病例可以达到数百万例,可见其并发症发生后造成危害的人群数量也不小。因为胆道损伤后,通常存在术中不易识别,即使识别也修复困难,成功修复的病例也有部分发生术后反复的胆管炎、胆汁性肝硬化等,而对病人造成

严重伤害^[21]。由于术中手术者对胆道系统的解剖结构及走行分辨不清楚是发生胆管损伤的常见原因之一。因此,为了实现术中准确判断解剖结构及胆道走行,避免发生严重胆道损伤,更好地指引手术者完成手术,就需要在术中为手术者提供更多的视觉信息。相比于传统术前影像学检查及手术中视觉检查及触诊,活体近红外荧光成像技术由于其高特异性、高分辨率、即时性等检测优势,为精准手术导航技术领域提供了较好的应用前景^[22-24]。本实验中引入了一种新型近红外荧光探针 MHI85,具有荧光特异性强、生物相容性高、标记率高、稳定性好等优点。注射近红外荧光探针 MHI85 4 小时后小鼠腹腔脏器中胆囊及胆管系统发现明显的荧光信号,除肠腔有微弱荧光信号之外,其余腹部脏器并未发现明显的荧光信号。我们考虑肠腔中微弱荧光信号可能是食物的影响,而术前常规的禁饮食可以避免食物信号的干扰。离体脏器荧光信号检测进一步地验证了 MHI85 在胆囊及胆道系统显影的特性。所以本实验证明了近红外荧光分子探针 MHI85 对胆囊及胆道系统具有良好的靶向性,且成像清晰、定位准确。

综上所述,通过对新型近红外荧光探针 MHI85 进一步研发,可能逐步应用于腹腔镜胆囊切除术中,有望降低胆道损伤的发生率,减少术后严重并发症的发生,为精准外科手术治疗提供了一些新的策略,具有良好的开发应用前景。

参考文献(References)

- [1] Owens EA, Henary M, El Fakhri G, et al. Tissue-specific near-infrared fluorescence imaging[J]. *Acc Chem Res*, 2016, 49(9): 1731-1740
- [2] Lim C, Vibert E, Azoulay D, et al. Indocyanine green fluorescence imaging in the surgical management of liver cancers: current facts and future implications[J]. *J Visc Surg*, 2014, 151(2): 117-124
- [3] Lieto E, Galizia G, Cardella F, et al. Indocyanine green fluorescence imaging-guided surgery in primary and metastatic liver tumors [J]. *Surg Innov*, 2018, 25(1): 62-68
- [4] Koller M, Qiu SQ, Linssen MD, et al. Implementation and benchmarking of a novel analytical framework to clinically evaluate tumor-specific fluorescent tracers[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3739

- [5] Newton AD, Predina JD, Corbett CJ, et al. Optimization of second window indocyanine green for intraoperative near-infrared imaging of thoracic malignancy [J]. *J Am Coll Surg*, 2018, pii: S1072-7515(18): 32159-32158
- [6] Jo D, Hyun H. Structure-inherent targeting of near-infrared fluorophores for image-guided surgery[J]. *Chonnam Med J*, 2017, 53(2): 95-102
- [7] Wang C, Wang Z, Zhao T, et al. Optical molecular imaging for tumor detection and image-guided surgery [J]. *Biomaterials*, 2018, 157: 62-75
- [8] Mankoff DA, Farwell MD, Clark AS, et al. Making molecular imaging a clinical tool for precision oncology: a review [J]. *JAMA Oncol*, 2017, 3(5): 695-701
- [9] Chen G, Tian F, Li C, et al. In vivo real-time visualization of mesenchymal stem cells tropism for cutaneous regeneration using NIR-II fluorescence imaging[J]. *Biomaterials*, 2015, 53: 265-273
- [10] Kim S H, Park G, Hyun H, et al. Near-infrared lipophilic fluorophores for tracing tissue growth [J]. *Biomed Mater*, 2013, 8(1): 014110
- [11] Luo S, Zhang E, Su Y, et al. A review of NIR dyes in cancer targeting and imaging[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(29): 7127-7138
- [12] Guo Z, Park S, Yoon J, et al. Recent progress in the development of near-infrared fluorescent probes for bioimaging applications[J]. *Chem Soc Rev*, 2014, 43(1): 16-29
- [13] Wu IC, Yu J, Ye F, et al. Squaraine-based polymer dots with narrow, bright near-infrared fluorescence for biological applications [J]. *J Am Chem Soc*, 2015, 137(1): 173-178
- [14] Arslan MF, Halilo lu N, Erden A. MR cholangiopancreatography findings of biliary tract complications after liver transplantation[J]. *Turk J Med Sci*, 2018, 48(5): 1006-1012
- [15] Ali Z, Bolster F, Goldberg E, et al. Systemic air embolism complicating upper gastrointestinal endoscopy: a case report with post-mortem CT scan findings and review of literature [J]. *Forensic Sci Res*, 2017, 1(1): 52-57
- [16] Matesan M, Bermo M, Cruite I, et al. Biliary Leak in the Postsurgical Abdomen: A primer to HIDA scan interpretation[J]. *Semin Nucl Med*, 2017, 47(6): 618-629
- [17] 谢京典,徐慧杰,李德满,等. 肝部分切除治疗肝内胆管结石患者术后并发症及影响因素分析 [J]. *现代生物医学进展*, 2017, 17(8): 1544-1546
- [18] Hu JC, Chiu KY, Wang SS, et al. A Modified Application of peritoneal dialysis catheter implantation: a revolution from the laparoscope-to the nephroscope-assisted surgery[J]. *J Endourol*, 2018, 32(6): 502-508
- [19] Rossitto C, Gueli Alletti S, Rotolo S, et al. Total laparoscopic hysterectomy using a percutaneous surgical system: a pilot study towards scarless surgery[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2016, 203: 132-135
- [20] Song S, Jo S. Peritonitis from injury of an aberrant subvesical bile duct during laparoscopic cholecystectomy: A rare case report[J]. *Clin Case Rep*, 2018, 6(9): 1677-1680
- [21] Gupta V, Jayaraman S. Role for laparoscopy in the management of bile duct injuries[J]. *Can J Surg*, 2017, 60(5): 300-304
- [22] 戴海粟, 陈志宇. 肝门部解剖变异与腹腔镜胆囊切除术中胆管损伤[J]. *中华普通外科杂志*, 2017, 32(8): 661-664
- [23] Wang P, Fan Y, Lu L, et al. NIR-II nanoprobe in-vivo assembly to improve image-guided surgery for metastatic ovarian cancer [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2898
- [24] Debie P, Van Quathem J, Hansen I, et al. Effect of dye and conjugation chemistry on the biodistribution profile of near-infrared-labeled nanobodies as tracers for image-guided surgery [J]. *Mol Pharm*, 2017, 14(4): 1145-1153