



· 专家述评与论著 ·

## 新型荧光靶向哨淋巴结示踪剂的验证研究

丛斌斌<sup>1,2</sup>, 刘治国<sup>2,3</sup>, 孙 晓<sup>1,2</sup>, 曹晓珊<sup>1,2</sup>, 邱鹏飞<sup>1,2</sup>, 王春建<sup>1,2</sup>, 张朝蓬<sup>1,2</sup>, 田崇麟<sup>1,2</sup>,  
吴 爽<sup>1,2</sup>, 王永胜<sup>1,2</sup>

1. 山东省肿瘤防治研究院 (山东省肿瘤医院) 乳腺病中心, 山东 济南 250117;
2. 山东第一医科大学 (山东省医学科学院), 山东 济南 250062;
3. 山东省肿瘤防治研究院 (山东省肿瘤医院) 核医学科, 山东 济南 250117

**[摘要]** **背景与目的:** 示踪剂是前哨淋巴结活检的关键, 传统荧光示踪剂无法靶向哨淋巴结且荧光强度弱。探寻一种近红外荧光强度更大、穿透力更好的新型增强近红外荧光示踪剂聚甲川菁染料分子Cy754, 并将其与利妥昔单抗 (rituximab, Rit) 结合形成新型近红外荧光靶向示踪剂Cy754-Rit。**方法:** 化学合成新型增强近红外荧光示踪剂Cy754, 检测其相对分子质量、激发光谱、吸收光谱等, 将其与Rit进行直接偶联。测定Cy754-Rit标记率, 检测新型示踪剂中单抗分子完整性和免疫活性。采用近红外成像仪将Cy754-Rit与吲哚菁绿 (indocyanine green, ICG)-Rit的荧光强度作比较, 检测其安全限度, 通过前哨淋巴结动物模型验证其前哨淋巴结的定位特性, 并与Cy754、ICG-Rit、核素进行对比。**结果:** Cy754的相对分子质量为818, 激发波长为740 nm, 发射波长为760 nm。直接偶联并纯化的Cy754-Rit保持了分子完整性和免疫活性。Rit上的Cy754标记率为100%。Cy754-Rit的荧光强度优于ICG-Rit ( $3.08 \times 10^{10}$  vs  $6.56 \times 10^8$ )。透析纯化后的新型增强靶向示踪剂中未检测到细菌和热原。实验动物局部注射, 观察2周后, 局部及全身无红肿也无皮疹, 无死亡。Rit与Cy754偶联的最佳的物质的量比为1:80。Cy754-Rit能够准确地定位前哨淋巴结, 其定位特性与核素相似, 但发射荧光穿透力优于ICG-Rit (14.3 mm vs 13.2 mm)。**结论:** Cy754-Rit的制备工艺简便、高效、无放射性, 其荧光强度较传统荧光靶向示踪剂明显增强。经动物模型局部注射能够准确地定位到前哨淋巴结, 显像清晰稳定, 穿透力好, 但仍需临床试验进行相关验证。

**[关键词]** 前哨淋巴结; 靶向示踪剂; 利妥昔单抗; 聚甲川菁染料; 淋巴显像

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2020.03.004

中图分类号: R737.9 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2020)03-0179-07

**The validation study of a new fluorescence-target tracer for sentinel lymph node biopsy** CONG Binbin<sup>1,2</sup>, LIU Zhiguo<sup>2,3</sup>, SUN Xiao<sup>1,2</sup>, CAO Xiaoshan<sup>1,2</sup>, QIU Pengfei<sup>1,2</sup>, WANG Chunjian<sup>1,2</sup>, ZHANG Zhaopeng<sup>1,2</sup>, TIAN Chonglin<sup>1,2</sup>, WU Shuang<sup>1,2</sup>, WANG Yongsheng<sup>1,2</sup> (1. Breast Cancer Center, Shandong Cancer Hospital and Institute, Jinan 250117, Shandong Province, China; 2. Shandong First Medical University and Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, Shandong Province, China; 3. Department of Nuclear Medicine, Shandong Cancer Hospital and Institute, Jinan 250117, Shandong Province, China)

Correspondence to: WANG Yongsheng E-mail: wangysh2008@aliyun.com

**[Abstract]** **Background and purpose:** Tracer is the key to sentinel lymph node biopsy, but the traditional fluorescence tracer could not target at sentinel lymph node with weak intensity. A new near-infrared fluorescence tracer polymethylene cyanine dye Cy754 with stronger permeability and intensity was synthesized and combined with rituximab (Rit) to produce a new near-infrared fluorescence-target tracer Cy754-Rit. **Methods:** The new near-infrared fluorescence tracer Cy754 was synthesized by chemical method, and the basic parameters including molecular weight, absorption and emission spectra were tested. The molecule of Cy754 was combined directly with Rit to produce Cy754-Rit. The Cy754-Rit was analyzed for labeled rate, molecular integrity, and molecular immune activity. The fluorescence intensity of Cy754-Rit was compared with indocyanine green (ICG)-Rit by using near-

infrared fluorescence detector. The safety limitation was tested. The localization ability of Cy754-Rit was tested in animal model of sentinel lymph node and compared with Cy754, ICG-Rit and radiotracer. **Results:** The molecular weight of Cy754 was 818, and the absorption and emission spectra were 740 nm and 760 nm. The Cy754-Rit was intact and kept the immune activity of Rit. The Cy754 labeled rate of Rit was 100%. The fluorescence intensity of Cy754-Rit was stronger than that of ICG-Rit ( $3.08 \times 10^{10}$  vs  $6.56 \times 10^8$ ). The Cy754-Rit was bacteria- and pyrogen-free, and was safe to body with location injection. The best molarity ratio of Cy754-Rit was 80 : 1. The Cy754-Rit could identify the location of sentinel lymph node which was accorded with the radiotracer and had a stronger permeability than ICG-Rit (14.3 mm vs 13.2 mm). **Conclusion:** The method of producing Cy754-Rit is simple, effective and non-radioactive. The fluorescence intensity of Cy754-Rit is stronger than that of traditional tracer. The Cy754-Rit could identify the location of sentinel lymph node in the animal model of sentinel lymph node but should be validated by clinical trial before its use in clinical practice.

[Key words] Sentinel lymph node; Target tracer; Rituximab; Polymethylene cyanine dye; Lymphoscintigraphy

前哨淋巴结活检 (sentinel lymph node biopsy, SLNB) 是乳腺癌腋窝淋巴结微创的分期技术, 该技术已广泛应用于其他瘤种, 其安全性和准确性已经得到临床试验的验证<sup>[1-4]</sup>。前哨淋巴结 (sentinel lymph node, SLN) 与周围组织对比不明显, 难于直接通过肉眼观察进行区分, 需要借助示踪剂才能进行定位并引导完成SLNB。SLN示踪剂是定位SLN的关键试剂, 然而目前临床应用的SLN示踪剂仍存在诸多问题, 如次级淋巴结显像、放射性损伤和无靶向性等<sup>[5-6]</sup>。为解决这些问题, 本课题组已成功制备了一种安全、无放射性的荧光靶向SLN示踪剂吡菁绿 (indocyanine green, ICG) -利妥昔单抗 (rituximab, Rit), 并对其进行了相关的临床验证, 然而在临床应用过程中发现, 该示踪剂仍存在SLN发射荧光难以穿透较深腋窝组织的缺点<sup>[7]</sup>。为改善ICG-Rit发射荧光的组织穿透力, 本研究通过化学合成得到了一种新型聚甲川菁染料分子Cy754, 其具有更强的发射荧光强度和组织穿透力, 并将Cy754与Rit偶联制备一种新型近红外荧光靶向SLN示踪剂Cy754-Rit, 同时对Cy754-Rit的相关特性进行检测并通过动物模型验证其定位SLN的特性。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

无菌级SD大鼠 (1~3个月龄): 70只, 体重200~220 g, 雌雄各半, 于山东省肿瘤医院中心实验室动物房饲养1周。

鲎试剂 (0.1 mL/支) 购自湛江安度斯生物

有限公司, 双抗体夹心间接酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immune sorbent assay, ELISA) 试剂盒购自上海拜力生物科技有限公司, 胎牛血清购自美国Hyclone公司; 规格异氟醚 (100 mL) 购自山东科源制药股份有限公司, 注射用戊巴比妥钠购自上海上药新亚药业有限公司, 利妥昔单抗注射液 (100 mg/10 mL) 购自瑞士Roche公司, 注射用ICG (25 mg) 购自丹东医创药业有限责任公司, 亚甲蓝注射液 (2 mL : 20 mg) 购自济川药业集团有限公司。核素示踪剂<sup>99m</sup>Tc-硫胶体 (10  $\mu$ Ci, 185 kBq) 由山东省肿瘤医院核医学科制备。

荧光脉管系统成像仪 (MDM-I型荧光脉管系统成像仪) 购自廊坊明德生物医药技术有限公司,  $\gamma$ 探测仪 (Neoprobe 2000) 购自美国Johnson & Johnson公司, PowerPac Basic电泳装置购自美国Bio-Rad公司, 小动物活体三维多模式成像系统 (IVIS Spectrum CT) 购自美国PerkinElmer公司, 显微镜 (BX43) 购自日本Olympus公司。

### 1.2 新型聚甲川菁染料Cy754的制备及检测

新型聚甲川菁染料Cy754的具体合成路线见图1。通过紫外分光光度计检测Cy754样品的最大紫外吸收波长, 荧光分光光度计检测其最大荧光发射波长。

### 1.3 新型示踪剂Cy754-Rit的制备及检测

采用直接偶联法制备Cy754-Rit。分别取7份体积为50  $\mu$ L的10 mg/mL Rit置于10 mL离心管中, 将离心管编号为1、2、3、4、5、6、7, 1~5号离心管分别按照Rit与Cy754物质的量比为1 : 10、1 : 20、1 : 40、1 : 80、1 : 160的比例加入Cy754, 加入2.5 mg/mL Cy754的体积分别为

10、20、40、80和160  $\mu\text{L}$ ，在6和7号离心管中分别按照Rit与ICG物质的量比为1 : 50和1 : 100的比例加入ICG，加入Rit中的2.5 mg/mL ICG的体积分别为50、100  $\mu\text{L}$ ，通过补加无菌注射用水将所

有离心管定容至相同体积，从而保证荧光示踪剂的浓度梯度。将已配制的溶液静置观察10 min，轻微振荡明确是否有沉淀产生。透析纯化，收集Cy754-Rit的偶联物。

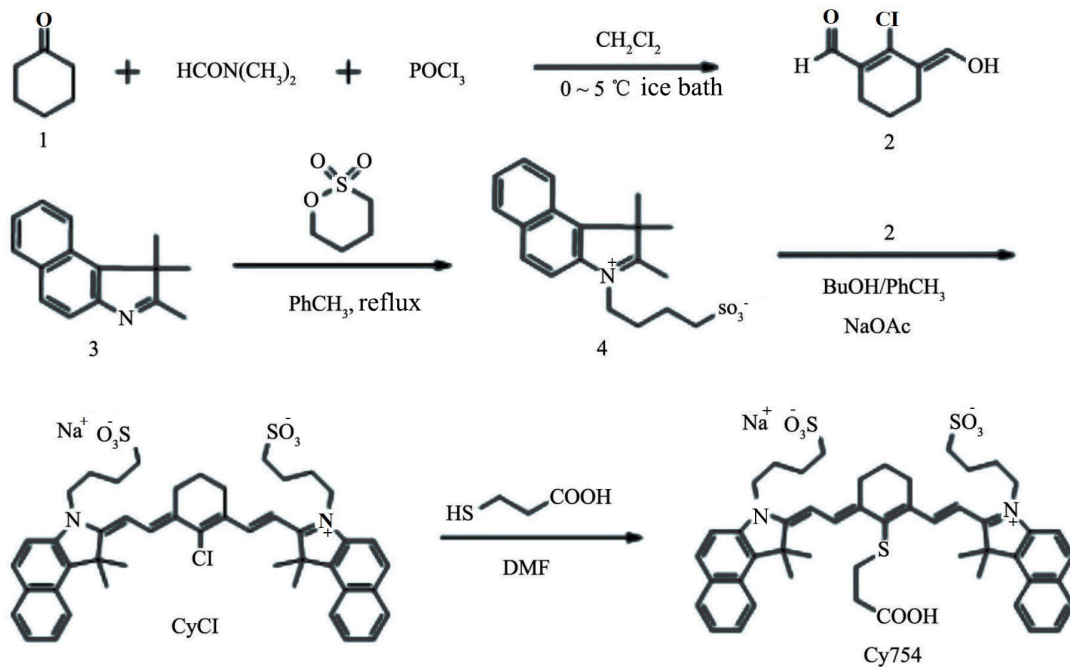


图1 新型聚甲川菁染料Cy754的化学合成路线

Fig. 1 The chemical synthesis route of a new polymethylene cyanine dye Cy754

1: Cyclohexanone; 2: 2-chloro-1,3-dimethylacetyl ring ethylene; 3: 2,3,3-trimethyl-3H-indole; 4: 2,3,3-trimethyl-1-(4-sulfonyl butyl)-4,5-indole ammonium salt

### 1.3.1 测定Cy754-Rit的标记率

采用双层析快速薄层层析-硅胶层析纸法测定标记率。体系1为V(吡啶) : V(乙醇) : V(水) = 5 : 2 : 1，体系2为丙酮。用体系1时，Cy754在起点，Cy754-Rit在前沿；用体系2时，Rit和Cy754-Rit在起点，Cy754在前沿。

### 1.3.2 分子完整性测定

采用8%非还原型十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳法检测Cy754-Rit中单抗分子的完整性，以Rit为阳性对照，确定Rit分子的完整性。

### 1.3.3 免疫活性检测

双抗体夹心间接ELISA法检测Cy754-Rit中单抗分子的免疫活性，兔抗鼠IgG-Fab抗体为包被抗体，质量分数为1%的牛血清白蛋白封闭1 h，加入Cy754-Rit，在室温条件下避光反应2 h，加入辣根过氧化物酶标记的羊抗人IgG-Fc段抗体，在室温条件下避光反应1 h，盐酸邻苯二胺显色，

酶标仪测定412 nm处的吸光度 ( $D_{412 \text{ nm}}$ ) 值。

### 1.3.4 细菌检测

将Cy754-Rit样品接种到已经过高压蒸气灭菌器灭菌的中性培养基中，在无菌实验室28 °C的条件下，连续培养并观察7 d，明确是否有细菌菌落生长。

### 1.3.5 热原检测

以大肠杆菌内毒素 (1 U/mL) 为阳性对照，无菌无热原注射用水为阴性对照，应用鲎试剂检测Cy754-Rit是否存在热原。1 mL注射用水溶解鲎试剂，将Cy754-Rit待测样品加入到已溶解的鲎试剂中，37 °C下温育1 h。试剂若呈胶冻状为有热原；若为澄清液体，则视作无热原。

### 1.3.6 急性毒性实验

取无菌级SD大鼠20只，15只称重染色编号，并随机将其分为高剂量、中剂量和低剂量3个实验组，每个实验组各5只大鼠，麻醉后，

按照Cy754剂量计算高剂量25 mg/kg、中剂量2.5 mg/kg和低剂量0.5 mg/kg于大鼠后肢足垫皮下注射相应剂量的Cy754-Rit, 连续7 d观察实验大鼠的生存状况, 确认实验大鼠是否存在死亡的情况。

#### 1.4 发射荧光强度对比

将1~5号Cy754-Rit样品, 以及6和7号ICG-Rit样品, 分别放置于多模式成像系统中, 设置相同激发光强度, 对比两者最佳荧光显像处的发射光辐射效率, 比较Cy754-Rit和ICG-Rit最佳荧光显像位置的发射光辐射效率。

另外, 将1~7号样品置于荧光脉管成像仪下, 将成像仪探头固定在10 cm高度, 并固定探头激发光强度, 比较临床实际操作过程中Cy754-Rit和ICG-Rit的发射荧光强度。

#### 1.5 发射荧光组织穿透力对比

通过组织剪将腋窝游离皮下组织拉伸平展后裁剪成2 mm薄层, 将薄层脂肪组织拉伸平展后放置于1~5号Cy754-Rit样品, 以及6和7号ICG-Rit样品上, 通过临床实用的荧光脉管系统成像仪进行荧光显像, 将成像仪探头固定在10 cm高度, 并固定探头激发光强度, 观察所检测样品的荧光显像情况, 如果检测样品所激发出的荧光能够穿透覆盖的薄层脂肪组织, 那么就继续逐层覆盖拉伸平展的薄层脂肪组织并进行荧光显像观察, 直至所观察的发射荧光难以穿透所覆盖的薄层脂肪组织, 详细记录各检测样品所激发出荧光穿透薄层脂肪组织的最大厚度。

#### 1.6 检测Cy754-Rit的前哨淋巴结定位性能

在大鼠后肢SLN动物模型上, 比较Cy754-Rit组、Cy754组、ICG-Rit组、核素组的SLN定位情况, 每组10只, 注射示踪剂5 min后, 在麻醉状态下将大鼠后肢及腹部进行解剖, 暴露后肢淋巴引流系统, 荧光示踪剂组通过荧光脉管成像仪进行连续显像观察, 核素组通过 $\gamma$ 探测器连续检测, 分别探测后肢腋窝淋巴结(SLN)、髂总淋巴结和肾旁淋巴结的显像和放射性浓集情况, 比较显像SLN的发射荧光组织穿透力, 将SLN精细解剖, 测量SLN上所覆盖皮下组织的厚度。

### 1.7 统计学处理

应用SPSS 17.0软件进行统计分析。两组独立样本间的比较采用 $t$ 检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 新型聚甲川菁染料Cy754的理化性质

化学合成的Cy754样品为蓝黑色粉末, 溶液颜色为靛蓝色, 其最大紫外吸收波长为754 nm, 最大荧光发射波长为795 nm。

### 2.2 新型示踪剂Cy754-Rit的基本性能

双层析快速薄层层析-硅胶层析纸法检测发现, 当溶剂体系为1时, 基线处未发现荧光显像物质, 而位于前沿位置, 说明Cy754-Rit中不存在游离的Cy754; 当溶剂体系为2时, 前沿位置未发现荧光显像物质和蛋白质, 在基线处确定存在荧光显像物质和蛋白质, 再次说明Cy754-Rit中不存在游离的Cy754。因此, Rit上Cy754的标记率达99%以上。

非还原型十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳法检测发现, 与Rit蛋白质阳性对照相比, 1~4号Cy754-Rit样品均未出现蛋白质的降解条带, 说明Rit与Cy754发生偶联反应后仍保持了单抗蛋白分子的完整性。

经ELISA法检测发现, 小鼠IgG抗体阴性对照组的显色反应均呈阴性, Rit阳性对照组的显色反应均呈阳性, 说明ELISA检测方法是准确的, 经观察确定各物质的量比的Cy754-Rit显色反应均呈阳性,  $D_{412\text{ nm}}$ 值并没有差别, 可见Rit与Cy754进行偶联反应之后并未改变其免疫活性。ELISA法检测Cy754-Rit免疫活性的结果见表1。

经过连续7 d的观察, 各样品培养基均未发现颜色变化, 也未发现细菌菌落生长。

经过灵敏度为0.5 EU/mL的鲎试剂检测后发现, 所有浓度的Cy754-Rit样品溶液结果均为阴性, 符合中国药典2015年版的细菌内毒素检测要求, 说明Cy754-Rit样品中无细菌内毒素。凝胶半定量实验检测Cy754-Rit样品中是否含有细菌内毒素的结果见表2。

表 1 Cy754-Rit免疫活性的显色反应结果

**Tab. 1 The color reaction results of Cy754-Rit molecular immune activity**

Item	IgG		Rit		1		2		3		4	
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cy754-Rit	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

表 2 凝胶半定量实验检测Cy754-Rit中细菌内毒素的结果

**Tab. 2 The results of gel semi-quantitative experiment to test bacterial endotoxin in Cy754-Rit**

Endotoxin concentration	Added solution	Diluting liquid	Dilution multiples	Actual concentration	Result
No	Cy754-Rit	Reagent water	1	No	-
			2	No	-
			4	No	-
			8	No	-
2 <sup>λ</sup>	Cy754-Rit	No	1	2 <sup>λ</sup>	+
2 <sup>λ</sup>			Reagent water	Reagent water	1
	2	1 <sup>λ</sup>			+
	4	0.5 <sup>λ</sup>			+
	8	0.25 <sup>λ</sup>			+
No	Reagent water	No	No	No	-

λ: The sensibility of Limulus tests (EU/mL)

经过连续7 d观察未发现实验大鼠死亡，高剂量、中剂量和低剂量3组实验大鼠均未发现Cy754-Rit注射局部出现异常反应。经静脉采血检测实验大鼠的肝功能均未见异常，肾功能也均未见异常。经高效液相色谱法（high performance liquid chromatography, HPLC）检测各脏器（心脏、肝脏、肾脏和肺脏）均未发现Cy754-Rit残留，表明Cy754-Rit对实验大鼠来说是无急性毒性、无肝肾毒性且代谢后无脏器残留的化合物。

### 2.3 发射荧光强度的对比结果

当激发波长为745 nm、发射波长为840 nm时，1~5号Cy754样品最佳荧光显像位置的发射光辐射效率分别为 $1.16 \times 10^8$ 、 $1.44 \times 10^8$ 、 $1.42 \times 10^8$ 、 $1.36 \times 10^8$ 和 $1.12 \times 10^8$ ，6和7号ICG最佳荧光显像位置的发射光辐射效率分别为 $0.28 \times 10^8$ 和 $0.24 \times 10^8$ （图2A）。当激发波长为745 nm、发射波长为840 nm时，1~5号Cy754-Rit样品最佳荧光显像位置的发射光辐射效率分别为 $1.82 \times 10^{10}$ 、 $2.67 \times 10^{10}$ 、 $2.86 \times 10^{10}$ 、 $3.08 \times 10^{10}$ 和 $3.74 \times 10^{10}$ ，6和7号ICG-Rit最佳荧光显像位置的发射光辐射效率分别为 $6.56 \times 10^8$ 和 $4.63 \times 10^8$ （图2B）。Cy754-Rit的5号样品在制备静置过程中出现沉淀，虽然其发射光辐射效率最高但不可将其用于新型荧光靶向示踪剂的体内研究，因此，确定4号为最佳荧光显像Cy754-Rit，最佳物质的量比为1 : 80，并

对其进行SLN定位的相关研究（图2C）。

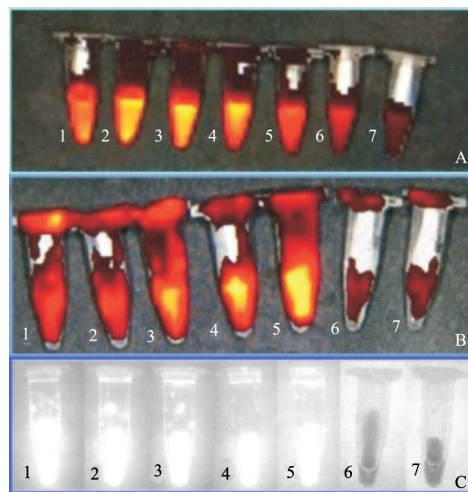


图 2 荧光显像系统检测激发荧光强度的对比结果

Fig. 2 The fluorescence intensity was tested in different samples by the fluorescence detector

A: The detection results of Cy754 and ICG before coupling reaction; B: The detection results of Cy754-Rit and ICG-Rit after coupling reaction; C: The detection results by clinical fluorescence imaging system

### 2.4 发射荧光组织穿透力对比

荧光脉管系统成像仪检测发现1~5号Cy754-Rit样品的发射荧光组织穿透力相似，Cy754-Rit所激发出荧光穿透薄层脂肪组织的最大厚度为22 mm；6和7号ICG-Rit样品的发射荧光组织穿透力较差，所激发出荧光穿透薄层脂肪组织的最大厚度为10 mm。

## 2.5 Cy754-Rit的前哨淋巴结定位性能

在Cy754-Rit组中, 9只大鼠经皮探测到SLN显像, 剥离皮肤之后, 10只大鼠均能探测到SLN显像, 并成功检出显像SLN, 荧光显像SLN的组织深度平均为14.3 mm, 无次级淋巴结显像; 在ICG-Rit组中, 4只大鼠经皮探测到SLN显像, 剥离皮肤之后, 6只大鼠均能探测到SLN显像, 并

成功检出显像SLN, 荧光显像SLN的组织深度平均为13.2 mm, 无次级淋巴结显像; 而在Cy754组中, 10只大鼠仅探测到引流淋巴管显像, 并未发现SLN及其他淋巴结荧光显像; 在核素组中, 19只大鼠均能经皮探测到SLN, 放射性浓集的SLN深度平均为16.5 mm。4组不同示踪剂定位SLN的对比结果见表3。

表3 四组不同示踪剂定位SLN的对比结果

Tab. 3 The results of SLN identification from four groups with different tracers

Group	Lymphatic imaging	Percutaneous SLN imaging	Strip skin SLN imaging	SLN permeability depth D/mm
Cy754-Rit	10	9	10	14.3 (12-16)
ICG-Rit	10	4	6	13.2 (12-15)
Radiotracer	-	10	10	16.5 (14-18)
Cy754	10	0	0	-

## 3 讨 论

菁染料是有机近红外荧光示踪剂的代表之一, 菁染料荧光显像具有可视化、高分辨率、经济和安全的优点, 因此, 已广泛应用于恶性肿瘤诊断、示踪显像和生物分子检测等医学领域<sup>[9-11]</sup>, 其中最具代表性的是ICG荧光示踪剂在SLNB中的应用, 临床研究结果显示, 荧光示踪剂引导SLNB具有检出率高、SLN检出个数多和实时显像的优势<sup>[12-15]</sup>。更值得注意的是, 菁染料在激发波长、光稳定性和荧光效率等方面可以进行相应的改进, 医学分子材料科学的发展有助于进一步改进菁染料的分子结构, 从而获得荧光量子效率高、光稳定性好且无毒安全的新型菁染料荧光示踪剂<sup>[16-17]</sup>。

本研究通过延长共轭聚甲川链红移了聚甲川菁染料的最大吸收光波长和激发荧光的最大发射光波长, 增加聚甲川链上阴离子的种类提高了近红外聚甲川菁染料的光稳定性和水溶液量子产率, 在聚甲川链中心环己烯上增加活性羧基基团提高了含氮杂环氮原子上的电子云密度使斯托克斯位移增大从而改善了聚甲川菁染料荧光信号的精准度, 加入强亲水的羧基基团提高了聚甲川菁染料的水溶性, 最终获得新型聚甲川菁染料Cy754。通过将化学合成的新型聚甲川菁染料Cy754与利妥昔单抗克隆抗体生物蛋白结合,

形成了具有靶向SLN作用的新型荧光靶向示踪剂Cy754-Rit。

本研究结果显示, 在相同能量的激发光源下, Cy754-Rit的发射荧光组织穿透力明显优于ICG-Rit的发射荧光组织穿透力, 并且与偶联反应前新型聚甲川菁染料Cy754的发射荧光组织穿透力相比, Rit偶联反应之后的Cy754-Rit荧光组织穿透力有所改善, 说明与大分子蛋白结合后聚甲川菁染料Cy754分子的斯托克斯位移发生了变化, 更有利于新型荧光靶向示踪剂Cy754-Rit规避周围组织的自发荧光。

近红外荧光具有高灵敏度、高特异度、无放射性和实时显像等优点<sup>[18-20]</sup>, Cy754-Rit则同时具备近红外荧光示踪剂和单克隆抗体的双重特点。在SLN动物模型验证研究中, 新型聚甲川菁染料Cy754只能使引流淋巴管染色、显像, 而不能使引流淋巴结染色、显像, 无法定位SLN的位置, 这可能是由于新型聚甲川菁染料Cy754颗粒较小且极易溶于水难以在淋巴结内短暂停留所导致的; 与Cy754相比, Cy754-Rit能够与SLN靶向结合并在此停留, 使SLN能够均匀着色, 同时能够使该淋巴结荧光显像阳性, 经连续观察并未发现次级淋巴结荧光显像。

光学显像的最大缺点是组织穿透力差, 这也是该领域所研究的焦点之一。目前, 光声显像技术的组织检测深度可达数厘米, 具有光学显像的高对比度和超声显像的大深度、高分辨等特点, 将

有望突破光学显像组织穿透力差的瓶颈<sup>[21-24]</sup>。本课题组将进一步开展新型荧光靶向SLN示踪剂与光声显像技术联合定位SLN的相关研究,以期打破荧光示踪剂定位SLN深度较浅的瓶颈,为该方法的临床应用推广提供有力的技术支持。在临床研究方面,本课题组会将新型增强荧光靶向示踪剂Cy754-Rit与联合法(蓝染+核素)进行对比,比较二者在SLN定位方面的差异,从而明确该新型示踪剂的临床应用价值。

总之,新型增强荧光靶向示踪剂Cy754-Rit的制备工艺简便、高效、无放射性,其荧光强度较传统荧光靶向示踪剂明显增强。经SLN动物模型验证,局部注射Cy754-Rit能够准确定位到SLN,SLN显像清晰稳定,穿透力好,但仍需临床试验进行相关验证。

#### [参 考 文 献]

- [1] VERONESI U, PAGANELLI G, GALIMBERTI V, et al. Sentinel-node biopsy to avoid axillary dissection in breast cancer with clinically negative lymph-nodes [J]. *Lancet*, 1997, 349(9069): 1864-1867.
- [2] MANSEL R E, FALLOWFIELD L, KISSIN M, et al. Randomized multicenter trial of sentinel node biopsy versus standard axillary treatment in operable breast cancer: the ALMANAC trial [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2006, 98(9): 599-609.
- [3] KRAG D N, ANDERSON S J, JULIAN T B, et al. Technical outcomes of sentinel-lymph-node resection and conventional axillary-lymph-node dissection in patients with clinically node-negative breast cancer: results from the NSABP B-32 randomised phase III trial [J]. *Lancet Oncol*, 2007, 8(10): 881-888.
- [4] 王永胜, 欧阳涛, 王启堂, 等. 中国前哨淋巴结活检多中心协作研究CBCSG-001最新资料报告 [J]. *中华乳腺病杂志(电子版)*, 2009, 3(3): 265-272.
- [5] 丛斌斌, 孙 晓, 宋现让, 等. 新型前哨淋巴结示踪剂的制备及动物实验研究 [J]. *中国癌症杂志*, 2016, 26(3): 245-250.
- [6] 李盼盼, 王永胜. 乳腺癌前哨淋巴结活检术新型示踪剂的研究进展 [J]. *中国癌症杂志*, 2016, 26(12): 1031-1036.
- [7] 吴 爽, 孙 晓, 丛斌斌, 等. 乳腺癌前哨淋巴结活检示踪剂研究进展 [J]. *中国癌症杂志*, 2019, 29(7): 540-544.
- [8] CONG B B, SUN X, SONG X R, et al. Preparation study of indocyanine green-rituximab: a new receptor-targeted tracer for sentinel lymph node in breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(30): 47526-47535.
- [9] 王晓驰, 常 刚, 曹瑞军, 等. 近红外荧光染料的结构、性质及生物荧光成像应用 [J]. *化学进展*, 2015, 27(7): 794-805.
- [10] ARJONA-ESTEBAN A, STOLTE M, WÜRTHNER F. Conformational switching of  $\pi$ -conjugated junctions from merocyanine to cyanine states by solvent polarity [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55(7): 2470-2473.
- [11] BUCKLE T, VAN WILLIGEN D M, SPA S J, et al. Tracers for fluorescence-guided surgery: how elongation of the polymethine chain in cyanine dyes alters the pharmacokinetics of a dual-modality c [RGDyK] tracer [J]. *J Nucl Med*, 2018, 59(6): 986-992.
- [12] 张贾震男, 欧江华, 张晨光, 等. 联合吲哚菁绿荧光法与蓝染法行乳腺癌前哨淋巴结活检的临床研究 [J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(5): 705-710.
- [13] ZHOU Y, LI Y, MAO F, et al. Preliminary study of contrast-enhanced ultrasound in combination with blue dye vs indocyanine green fluorescence, in combination with blue dye for sentinel lymph node biopsy in breast cancer [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 939.
- [14] TAKEMOTO N, KOYANAGI A, YASUDA M, et al. Comparison of the indocyanine green dye method versus the combined method of indigo carmine blue dye with indocyanine green fluorescence imaging for sentinel lymph node biopsy in breast conservative therapy for stage  $\leq$  II A breast cancer [J]. *BMC Womens Health*, 2018, 18(1): 151.
- [15] GUO J, YANG H, WANG S, et al. Comparison of sentinel lymph node biopsy guided by indocyanine green, blue dye, and their combination in breast cancer patients: a prospective cohort study [J]. *World J Surg Oncol*, 2017, 15(1): 196.
- [16] KOMLJENOVIC D, WIESSLER M, WALDECK W, et al. NIR-Cyanine dye linker: a promising candidate for isochronic fluorescence imaging in molecular cancer diagnostics and therapy monitoring [J]. *Theranostics*, 2016, 6(1): 131-141.
- [17] 张现峰, 芦静波, 王学梅. 温敏性碳量子点的快速制备、荧光性质及细胞成像应用 [J]. *分析测试学报*, 2018, 37(2): 198-203.
- [18] KOSAKA N, OGAWA M, CHOYKE P L, et al. Clinical implications of near-infrared fluorescence imaging in cancer [J]. *Future Oncol*, 2009, 5(9): 1501-1511.
- [19] HELLEBUST A, RICHARDS-KORTUM R. Advances in molecular imaging: targeted optical contrast agents for cancer diagnostics [J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2012, 7(3): 429-445.
- [20] LI N, ZHU H, LI Y, et al. Synthesis and evaluation of Cy5.5-Rit tracer for specific near-infrared fluorescence imaging of sentinel lymph node [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26(17): 4233-4236.
- [21] 林日强, 冷 吉, 陈敬钦, 等. 面向临床应用的光声成像技术 [J]. *中国医疗设备*, 2018, 33(1): 1-5, 15.
- [22] 张 君, 彭乔立, 张小明, 等. 肿瘤光声成像研究进展 [J]. *中华核医学与分子影像杂志*, 2017, 37(6): 361-365.
- [23] 曾礼漳, 杨思华, 邢 达. 光声成像技术及其医学应用进展 [J]. *华南师范大学学报(自然科学版)*, 2016, 48(1): 9-15.
- [24] YANG L, CHENG J, CHEN Y, et al. Phase-transition nanodroplets for real-time photoacoustic/ultrasound dual-modality imaging and photothermal therapy of sentinel lymph node in breast cancer [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 45213.

(收稿日期: 2019-09-30 修回日期: 2019-12-14)