文章编号:1000-5404(2013)10-0969-04

论著

5-氨基乙酰丙酸介导继发性甲状旁腺功能亢进症大鼠甲状旁腺荧光特性的研究

杨 阳,练 渝,姜友昭,陈 兵 (400038 重庆,第三军医大学西南医院内分泌科)

[摘要] **目的** 研究5-氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid,5-ALA)定位继发性甲状旁腺功能亢进症(secondary hyperparathyroidism,SHPT)大鼠甲状旁腺组织方法的可行性,并观察其代谢产物原卟啉Ⅸ(protoporphyrinⅨ,PpⅨ)在甲状旁腺组织积聚的动态变化。**方法** 16只6~8周龄健康雌性SD大鼠,体质量180~200 g,分为手术组(5/6肾切除+高磷饲养,$n=12$)和假手术组(正常磷饲养,$n=4$),28 d后,2组大鼠腹腔注射500 mg/kg 5-ALA,405 nm蓝光探测2组大鼠颈部甲状腺区域,应用微型光纤光谱仪检测甲状腺、甲状旁腺组织内PpⅨ在不同时间的荧光强度、波长,并取其行组织学检查。**结果** 在注射5-ALA后,2组大鼠甲状旁腺组织均可用肉眼观察,大部分位于甲状腺外侧。手术组在0.5~4 h均可见甲状旁腺组织显红色荧光,假手术组在1~3 h均可见红色荧光,其中2组荧光强度在2 h达到高峰,手术组峰值显著高于假手术组($P<0.05$)。在注入5-ALA后2 h,手术组和假手术组内甲状旁腺组织荧光强度均高于甲状腺组织10倍。组织学检查确认红色荧光组织均为增生的甲状旁腺细胞。**结论** 5-ALA介导SHPT甲状旁腺组织的高荧光强度的特点为术中辨别增生与正常的甲状旁腺组织提供了重要的依据。

[关键词] 5-氨基乙酰丙酸;甲状旁腺;荧光;继发性甲状旁腺功能亢进症
[中图法分类号] R457;R581.1;R653 [文献标志码] A

Fluorescence characteristics in parathyroid glands by 5-aminolevulinic acid in secondary hyperparathyroidism rats

Yang Yang, Lian Yu, Jiang Youzhao, Chen Bing (Department of Endocrinology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the feasibility of the application of 5-aminolevulinic acid (5-ALA)-induced fluorescence for the detection of parathyroid glands in secondary hyperparathyroidism rats and to observe the dynamic changes of the accumulation of endogenous synthesized protoporphyrin Ⅸ (PpⅨ) after administration of 5-ALA. **Methods** Twelve female Sprague-Dawley rats, weighing 180 – 200 g, were divided into 2 groups: an operation group (5/6 nephrectomy plus high phosphorus food) and a sham operation group (normal phosphorus food). After 28 d, the two groups of rats were photosensitized by intraperitoneal injection of ALA solution. After surgical exposure of thyroid gland and parathyroid gland, the operative sites were observed under blue light (405nm) using a miniature fiber optic spectrometer to assess the fluorescence intensity of thyroid and parathyroid tissues. Histological examination of the fluorescent tissues was performed. **Results** After intraperitoneal injection of 5-ALA, parathyroid gland fluorescence was observed in two groups of rats. The red fluorescence of parathyroid glands was located on the posterolateral thyroid glands and could be seen by naked eyes. The red fluorescence of the parathyroid glands could be seen from 0.5 h to 4 h in the operation group and from 1 h to 3 h in the sham operation group. The peak intensity at 2 h in the operation group was significantly higher than that in the sham operation group ($P<0.05$), and the fluorescence intensity was 10 times higher in the parathyroid glands than in the thyroid gland in both of the two groups. The histology of the fluorescent tissues confirmed the tissue with red fluorescence was the proliferated parathyroid gland under a light microscope. **Conclusion** 5-ALA-induced high intensity fluorescence suggests an important support to identify the hyperplastic parathyroid glands rather than normal glands and improve the success of parathyroidectomy. It has potential clinical value in treatment of parathyroid diseases.

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81270870)
[通信作者] 陈 兵,E-mail:chenbing3@medmail.com.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130321.1105.025.html(2013-03-21)

[**Key words**] 5-aminolevulinic acid; parathyroid glands; fluorescence; secondary hyperparathyroidism

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81270870). Corresponding author: Chen Bing, E-mail: chenbing3@medmail.com.cn

继发性甲状旁腺功能亢进症(secondary hyperparathyroidism,SHPT)是慢性肾功能不全的常见并发症,表现为甲状旁腺激素(parathyroid hormone,PTH)分泌增多、钙磷代谢紊乱,1,25(OH)$_2$D$_3$ 缺乏,由于部分患者治疗不规范、持续的高磷血症等因素进展为难治性SHPT,引起骨折、骨痛、血管钙化等症状,严重影响患者的生存质量,此时需要进行甲状旁腺切除术治疗。故正确定性和准确定位甲状旁腺(parathyroid gland,PTG)是提高手术成功率的必要前提。PTG体积微小、数量和解剖位置时常变异,与周围组织[甲状腺(thyroid gland,TG)、脂肪组织、淋巴结]颜色形态相似,肉眼难以辨别,时常影响手术进程[1]。5-氨基乙酰丙酸(5-aminolevulinic acid,5-ALA)是体内合成血红素的前体物质,本身并非光敏剂,其中间代谢产物原卟啉Ⅸ(protoporphyrinⅨ,PpⅨ)具有强光敏作用,当大量外源性ALA注入体内时,造成PpⅨ在特定组织内的大量积聚,通过特定波长(380~440 nm)激发光下发射出红色荧光[2]。本研究利用此原理建立5-ALA荧光定位SHPT大鼠PTG的技术,并观察其代谢产物PpⅨ在PTG积聚的动态变化,以期为术中定位增生和正常PTG提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

选取16只6~8周龄雌性SD大鼠,体质量在180~200 g(由第三军医大学第三附属医院实验动物中心提供);5-ALA(购于上海阿拉丁试剂有限公司);大鼠全段甲状旁腺素激素(intact PTH, iPTH) ELISA试剂盒(购于上海沪尚生物科技有限公司)。高磷饲料配制:大鼠饲料(大坪动物研究所饲料配置中心提供)中磷、钙含量比例参照美国营养学会1993年AIN-93G标准[3]及2003年国内王小兵等[4]研究结果制备大鼠高磷饲料(含磷1.2%,含钙1.6%)。

1.2 方法

1.2.1 SHPT大鼠模型的建立 取大鼠16只,手术组(n=12)采用5/6肾切除术+高磷饲养,肾脏切除分2次进行:0.7 mL/100 g 5%水合氯醛腹腔注射麻醉,局部剪毛,常规皮肤消毒,从背左侧肋脊角1.5 cm处切口,充分暴露左侧肾脏,剥离肾包膜,在无菌条件下手术切除左肾皮质2/3,术后1周行右肾切除,2次手术总计切除5/6肾脏,缝合前均予以腹腔注射青霉素40×10^4 U/kg。第2次手术完成后,予以高磷饲养;假手术组(n=4)游离两侧肾脏的包膜而不结扎双侧血管,正常饲料饲养。

1.2.2 标本的收集及血清生化指标检测 28 d后,取2组大鼠颈静脉血,分别用AU5400系列全自动生化分析仪检测大鼠血清中肌酐(Cr)、总钙(Ca)、无机磷(P),免疫酶联法检测大鼠iPTH。

1.2.3 5-ALA荧光探测大鼠甲状旁腺 将2组大鼠模型腹腔注射500 mg/kg 5-ALA溶液(将5-ALA粉末溶于0.9%氯化钠溶液中配置成浓度为3%的5-ALA缓冲液,为保证药物活性,溶液在每次实验前现配)后,予0.7 mL/100 g 5%水合氯醛腹腔麻醉,颈部手术区域脱毛,分离大鼠颈部肌肉,暴露气管、甲状腺。使用405 nm蓝光LED灯照射两侧甲状腺区域,通过红色滤光片(深圳市激埃特光电有限公司)观察并记录(相机型号Sony NEX-5N)发光组织的解剖位置和显色情况;应用微型光纤光谱仪(Ocean Optics USB2000+)在0、0.5、1、2、3、4 h等6个时间点检测甲状腺、甲状旁腺组织内代谢产物PpⅨ的荧光强度及波长,并通过光谱分析软件(ocean optics spectra suite)处理分析200~800 nm的光谱。

1.2.4 组织学观察 将切除的荧光组织用4%多聚甲醛固定,常规脱水,透明,石蜡浸蜡,包埋,切片,HE染色,光学显微镜观察。

1.3 统计学分析

计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件,2组间差异显著性检验采用两独立样本t检验。

2 结果

2.1 SHPT大鼠模型建立情况

手术组8只大鼠存活,术后无出血和感染,1只大鼠于第1次术后第1天死亡,尸体解剖发现左侧残余肾脏与周围脂肪形成血肿,考虑术后出血致死;1只大鼠于第2次术中死亡,考虑麻药剂量过大致死;2只大鼠分别于第2次术后2、10 d死亡,考虑肾功能衰竭死亡。假手术组大鼠未见死亡。

2.2 生化指标检测结果

手术组大鼠血清iPTH水平均高于假手术组($P<0.05$);手术组血清P水平高于假手术组($P<0.05$);手术组大鼠血清Cr水平均高于假手术组($P<0.05$);手术组大鼠血清Ca水平与假手术组差异无显著性($P>0.05$),见表1。

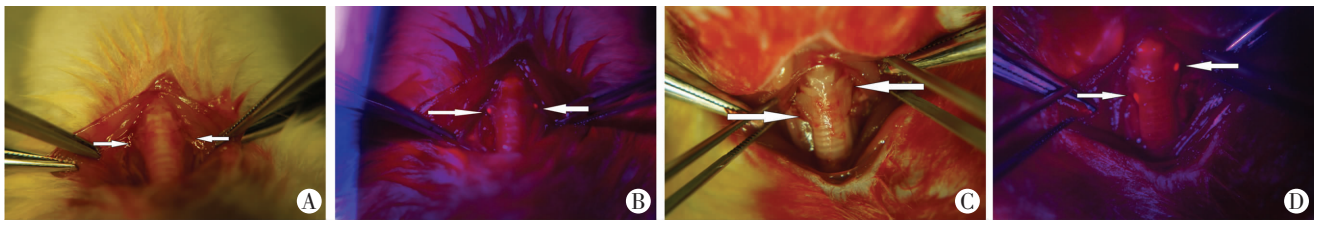
表1 2组大鼠术后高磷饲养第28天血清生化指标($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Cr (μmol/L)	Ca (mmol/L)	P (mmol/L)	iPTH (ng/L)
手术组	8	86.38±12.22[a]	2.50±0.13	3.63±0.24[a]	105.27±10.41[a]
假手术组	4	27.75±2.50	2.54±0.07	2.36±0.18	24.75±3.74

a:$P<0.05$,与假手术组比较

2.3 荧光手术情况

在日光灯照射下,暴露大鼠颈部,观察两侧的甲状旁腺,手术组体积较假手术组稍大,颜色与周围组织相似,肉眼识别困难。注射500 mg/kg 5-ALA溶液2 h后,在405 nm蓝光照射下,通过红色滤光片,2组均能用肉眼发现双侧甲状腺外侧各有



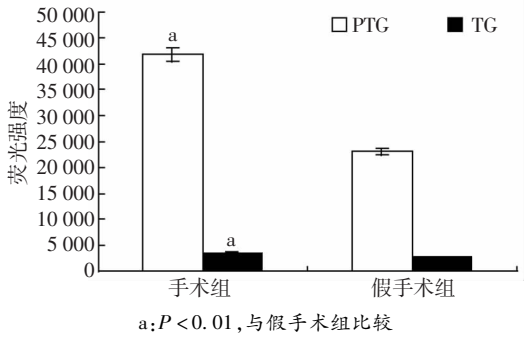
A:假手术组日光灯照射;B:假手术组蓝光照射;C:手术组日光灯照射;D:手术组蓝光照射 ↑:示甲状旁腺组织

图 1 注射 5-ALA 2 h 后荧光探测 2 组甲状旁腺组织

1 个卵圆形红色荧光组织,且手术组较假手术组荧光亮度更强,手术组直径为 3 ~4 mm,假手术组直径为 1 ~2 mm,而周围组织(如甲状腺、气管)则无明显荧光(图 1)。

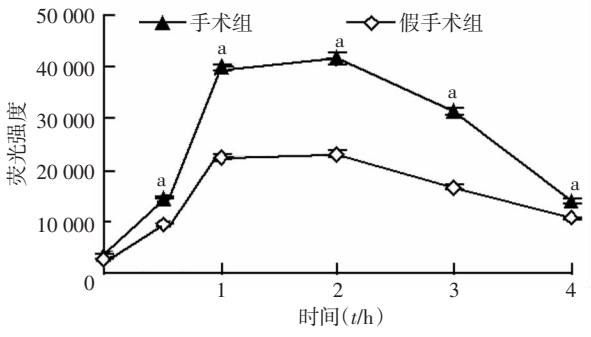
2.4 甲状腺、甲状旁腺组织内 PpⅨ积聚的动态变化

注射 5-ALA 溶液 2 h 后,通过微型光纤光谱仪检测 2 组大鼠甲状旁腺组织的荧光光谱,波长 405 nm 为激发光,波长635 nm 为 PpⅨ的吸收峰,其峰值高低反映了荧光强度即 PpⅨ的聚集程度。可以看到手术组和假手术组内甲状旁腺组织荧光强度约为甲状腺组织 10 倍;而手术组的甲状旁腺组织荧光强度约为假手术组的甲状旁腺组织 2 倍(图 2)。观察 PpⅨ的聚集情况,其荧光表现为一个动态过程,具有明显的时间依赖性:手术组在 0.5 ~4 h 均可见甲状旁腺组织显红色荧光,假手术组在 1 ~3 h 均可见红色荧光,其中 2 组荧光强度在 2 h 达到高峰,PpⅨ的显著聚集,随后逐渐降低,但手术组峰值均显著高于假手术组($P<0.01$,图 3)。



a:$P<0.01$,与假手术组比较

图 2 注射 5-ALA 2 h 后 2 组大鼠甲状旁腺组织荧光强度

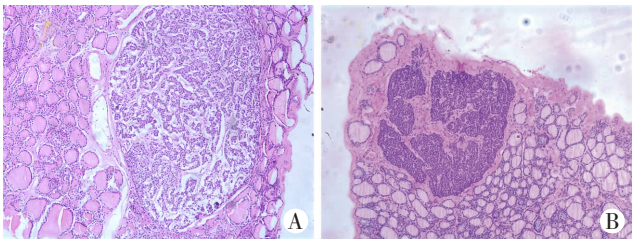


a:$P<0.01$,与假手术组比较

图 3 2 组大鼠甲状旁腺组织内 PpⅨ积聚的动态变化

2.5 组织学检查结果

将 2 组大鼠的红色荧光组织行组织切片,HE 染色显示为甲状旁腺细胞。手术组:甲状旁腺腺体增大,在低倍光学显微镜下:甲状旁腺呈卵圆形,位于甲状腺外侧,由结缔组织包围;在高倍光学显微镜下:主要为主细胞,可见少量嗜酸性细胞,无脂肪细胞(图 4A)。假手术组:甲状旁腺腺体正常,在低倍光学显微镜下:甲状旁腺呈卵圆形,位于甲状腺外侧,由结缔组织包围;在高倍光学显微镜下:主要为主细胞,可见少量嗜酸性细胞以及数个脂肪细胞(图 4B)。



A:手术组;B:假手术组

图 4 2 组大鼠甲状旁腺组织学检查 (HE ×100)

3 讨论

在原发性和继发性甲旁亢疾病中,通过颈部探测,能够切除增生的甲状旁腺组织的成功率为 80% ~97%,但这是基于在熟悉甲状旁腺解剖学和胚胎发育学的先前提下,手术的失败往往是由于没有掌握甲状旁腺组织定位的能力[5]。传统的甲状旁腺切除术必须先进行颈部暴露,寻找到甲状旁腺,最后切除病理性增生的腺体。目前,术中甲状旁腺的定位技术包括超声波检查、核素^{99}mTc-MIBI、快速 PTH 检测[6-7],虽然定位甲状旁腺的成功率也较高,但超声检测对异位甲状旁腺的诊断却受到限制,放射性核素显像检查对人体也有一定的辐射影响,而利用 5-ALA 术中定位甲状旁腺,操作安全、简单,能够缩短颈部探测的时间,降低发病率、提高效率。

外源性 ALA 引起细胞内 PpⅨ聚集的原因与血红素代谢过程中细胞内的两种酶活性相关:一种是经过 6 步催化酶反应将 ALA 转变成 PpⅨ的一系列酶,另一种是催化 PpⅨ转变成血红素的酶(亚铁螯合酶)。当前者活性高、后者活性低时,则会造成细胞内 PpⅨ的短暂聚集,经特定波长激发,则会发射出 635 nm 相应强度的红色荧光。由于不同组织进行催化合成血红素的能力不同(与催化酶活性相关),组织聚集 PpⅨ的含

量不同,以至于组织荧光的强度不同[2],这可能是造成甲状旁腺与周围组织(气管、甲状腺、肌肉)荧光差异的原因。在肿瘤组织中,由于亚铁螯合酶活性相对正常组织为低,使细胞内 PpⅨ的浓度升高,此特点成为肿瘤分子荧光诊断的一个关键步骤,临床上不仅用于全身的皮肤癌、膀胱癌、恶性神经胶质瘤等的诊断,还可进行治疗[8-12]。

目前,仅2个国外研究组[13-15]报道5-ALA荧光定位正常大鼠甲状旁腺组织的文献。在本研究中,我们成功建立了5-ALA荧光探测增生的甲状旁腺组织的方法,根据实验结果,其最佳手术探查时间为5-ALA注射后1~2 h;将其与正常甲状旁腺组织进行荧光强度动态分析,均表现为具有时间依赖性的动态过程,而增生组织与正常组织间荧光对比最为显著的时间段为5-ALA注射后1~3 h,在此段时间内,利用高荧光强度的特点为甲状旁腺切除术中辨别增生或腺瘤与正常的甲状旁腺组织提供了重要的依据。同时,实验也证实了甲状腺组织的荧光强度显著低于甲状旁腺组织,而非无荧光。另外,我们将甲状腺体区域的红色荧光组织进行组织学检查,能更为准确的判断红色荧光组织是否为甲状旁腺组织。而本实验中使用的蓝色光源为能量密度小的激发光源为405 nm波长的LED灯,可尽量减少对组织的损伤,配予红色滤光片,使观察视野清晰、手术操作简便。

尽管已有5-ALA荧光定位甲状旁腺相关文献报道,但却很少用于临床,仅有少数的病例报道[16-17]。目前5-ALA在临床应用安全性、最佳口服剂量和药代动力学已被相关文献证实[10,18]。所以,利用5-ALA荧光探测技术快速识别增生或正常甲状旁腺组织,能提高甲状旁腺切除手术成功率,缩短手术时间,是我们寻求的理想术中定位方法。

5-ALA能介导增生和正常甲状旁腺组织原卟啉Ⅸ的积聚,其荧光表现为一个具有时间依赖性的动态过程;甲旁亢甲状旁腺组织的高荧光强度特点为辨别增生与正常的甲状旁腺组织提供了重要的依据,有助于提高甲状旁腺切除术的成功率,具有潜在的临床应用价值。

参考文献:

[1] Tominaga Y, Matsuoka S, Uno N. Surgical and medical treatment of secondary hyperparathyroidism in patients on continuous dialysis[J]. World J Surg, 2009, 33(11): 2335-2342.

[2] Kennedy, Pottier R H. Endogenous protoporphyrin Ⅸ, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy[J]. J Photochem Photobiol B, 1992, 14(4): 275-292.

[3] Reeves P G, Nielsen F H, Fahey G C Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet[J]. J Nutr, 1993, 123(11): 1939-1951.

[4] 王小兵, 王笑云, 周富华. 自制含不同磷、钙量的大鼠实验饲料的研究[J]. 中国血液净化, 2003, 2(8): 436-438.

[5] Phitayakorn R, McHenry C R. Incidence and location of ectopic abnormal parathyroid glands[J]. Am J Surg, 2006, 191(3): 418-423.

[6] Siperstein A, Berber E, Mackey R, *et al*. Prospective evaluation of sestamibi scan, ultrasonography, and rapid PTH to predict the success of limited exploration for sporadic primary hyperparathyroidism[J]. Surgery, 2004, 136(4): 872-880.

[7] Arici C, Cheah W K, Ituarte P H, *et al*. Can localization studies be used to direct focused parathyroid operations?[J]. Surgery, 2001, 129(6): 720-729.

[8] Piacquadio D J, Chen D M, Farber H F, *et al*. Photodynamic therapy with aminolevulinic acid topical solution and visible blue light in the treatment of multiple actinic keratoses of the face and scalp: investigator-blinded, phase 3, multicenter trials[J]. Arch Dermatol, 2004, 140(1): 41-46.

[9] Gold M H, Goldman M P. 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy: where we have been and where we are going[J]. Dermatol Surg, 2004, 30(8): 1077-1084.

[10] Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, *et al*. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial[J]. Lancet Oncol, 2006, 7(5): 392-401.

[11] Pech O, Gossner L, May A, *et al*. Long-term results of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid for superficial Barrett's cancer and high-grade intraepithelial neoplasia[J]. Gastrointest Endosc, 2005, 62(1): 24-30.

[12] Riedl C R, Daniltchenko D, Koenig F, *et al*. Fluorescence endoscopy with 5-aminolevulinic acid reduces early recurrence rate in superficial bladder cancer[J]. J Urol, 2001, 165(4): 1121-1123.

[13] Asher S A, Peters G E, Pehler S F, *et al*. Fluorescent detection of rat parathyroid glands via 5-aminolevulinic acid[J]. Laryngoscope, 2008, 118(6): 1014-1018.

[14] Gahlen J, Winkler S, Flechtenmacher C, *et al*. Intraoperative fluorescence visualization of the parathyroid gland in rats[J]. Endocrinology, 2001, 142(11): 5031-5034.

[15] Prosst R L, Schroeter L, Gahlen J. Kinetics of intraoperative fluorescence diagnosis of parathyroid glands[J]. Eur J Endocrinol, 2004, 150(5): 743-747.

[16] Akasu H, Igarashi T, Tanaka K, *et al*. Photodynamic identification of human parathyroid glands with 5-aminolevulinic acid[J]. J Nippon Med Sch, 2006, 73(5): 246-247.

[17] Prosst R L, Gahlen J, Schnuelle P, *et al*. Fluorescence-guided minimally invasive parathyroidectomy: a novel surgical therapy for secondary hyperparathyroidism[J]. Am J Kidney Dis, 2006, 48(2): 327-331.

[18] Dalton J T, Yates C R, Yin D, *et al*. Clinical pharmacokinetics of 5-aminolevulinic acid in healthy volunteers and patients at high risk for recurrent bladder cancer[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2002, 301(2): 507-512.

(**收稿**:2012-12-21;**修回**:2013-03-12)

(编辑 栾 嘉)