

文章编号: 0258-7025(2005)06-0869-04

利用激光散斑成像监测光动力治疗的血管损伤效应

刘 谦, 周斯博, 张智红, 骆清铭*

(华中科技大学生物医学光子学教育部重点实验室, 湖北 武汉 430074)

摘要 激光散斑衬比成像(LSCI)技术作为一种高时空分辨的血流流速分布监测技术,无需扫描即可实时地全场记录微循环血流的时空变化特性。鸡胚尿囊膜(CAM)是用于在体研究光动力治疗(PDT)血管损伤效应的理想动物模型。以发育 10 天鸡胚尿囊膜为模型,使用光敏剂——焦脱镁叶绿酸(pyropheophorbide acid, pyro-acid),激光照射波长为 656.5 nm,光照射功率为 40 mW/cm²,研究了肿瘤周围血管在激光照射下的血管管径变化和血流速度分布变化。研究表明,通过对血管管径和血流速度的监测,激光散斑衬比成像技术可以用于评估光动力治疗过程中的肿瘤周围血管损伤效应。

关键词 医用光学与生物技术;光动力治疗;激光散斑衬比成像;血管损伤

中图分类号 R318.51 **文献标识码** A

Application of Laser Speckle Imaging: Monitoring Changes of Vessels in Photodynamic Therapy

LIU Qian, ZHOU Si-bo, ZHANG Zhi-hong, LUO Qing-ming

(Key Laboratory of Biomedical Photonics of Ministry of Education, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430074, China)

Abstract Laser speckle contrast imaging (LSCI) technique is a new modality to monitoring blood flow dynamics with high spatio-temporal resolution. It records the full-field spatio-temporal characteristics of microcirculation without the need of scanning in real time. In this study, an in vivo model of chick chorioallantoic membrane (CAM) at embryo age (EA) of 10 days, was observed following photodynamic therapy (PDT) irradiated by semiconductor laser ($\lambda = 656.5 \text{ nm}$) whose light intensity incident on the treatment site was maintained 40 mW/cm² using the photosensitizer of pyropheophorbide acid (Pyro-acid). The changes of vessel structure and blood flow velocity were recorded respectively. This study shows that LSCI can assess the efficacy of peripheral vessel damage of tumor in PDT by monitoring changes of vessels structure and blood flow velocity.

Key words medical optics and biotechnology; photodynamic therapy; laser speckle contrast imaging; vascular damage

1 引 言

光动力治疗(PDT)是损伤最小的早期恶性肿瘤治疗方法,也是晚期恶性肿瘤的一种姑息治疗方法。光动力治疗能够选择性地消灭局部浅表肿瘤而不危及正常组织,并可以与化疗和放疗协同进行。目前,光动力治疗消灭肿瘤有三种机制^[1]:直接消灭肿瘤细胞;破坏肿瘤细胞周围的血管;治疗后激活免疫反应阻止肿瘤细胞生长。肿瘤细胞的生存和生长主要依靠肿瘤周围血管提供丰富的营养成分。在过去的 15 年里,研究光动力治疗如何破坏肿瘤周围血管和抑制

新生血管的机制一直受到关注,但是并没有完全被人们掌握^[2]。目前对血管损伤的评估只将血管的管径和损伤程度关联起来^[3],没有考虑血液流速或灌注率的影响。利用激光成像技术可以研究血液的流速分布^[4]、灌注率^[5]等血液动力学^[6]变化,这将为理解光动力治疗与血管的作用机制提供新的研究方法。使用激光散斑衬比成像(LSCI)技术,对鸡胚尿囊膜(CAM)上血管管径和血流速度进行实时监测,并以此评估光动力治疗过程中的肿瘤周围血管损伤效果。

利用激光技术监测生物体微循环主要有两种方

收稿日期: 2004-07-21; 收到修改稿日期: 2004-10-21

基金项目: 教育部科学技术研究重大项目(重大 10420)和国家自然科学基金(20105004)资助项目。

作者简介: 刘 谦(1976—),男,华中科技大学生物医学光子学教育部重点实验室讲师,博士,主要从事生物医学光子学方面的研究。E-mail: qianliu@mail.hust.edu.cn

* 通信联系人。E-mail: qluo@mail.hust.edu.cn

法:激光多普勒法和激光散斑法。激光多普勒法通过多普勒频差信号获得血流速度,增加光束扫描装置可以对大区域面积成像^[4,7];激光散斑法通过对红细胞后向散射散斑的一阶和二阶统计分析获取血流信息^[8],使用衬比成像^[4,9],无需扫描装置可以对区域内血流进行高分辨率成像。使用高数值孔径物镜和快速的电子耦合器件(CCD),激光散斑衬比成像可以高时空分辨地监测不同类型和管径的微血管血流分布。

鸡胚尿囊膜是一种研究光动力治疗血管损伤和生长的理想的在体动物模型^[3,10]。鸡胚尿囊膜是具有丰富血管网络的胚胎外膜,胚胎通过它来进行气体交换。因为鸡胚尿囊膜是一层透明的膜,可以在光动力治疗过程中对血管网络和微血管结构变化进行无损伤的实时在体观察。鸡胚尿囊膜在鸡胚发育的4~5天(EA 4~5)形成,膜上的血管网络完全形成于EA9,鸡胚的免疫系统在EA17时形成,因此,EA 9~17是最好的实验观察时间。

2 材料和方法

2.1 激光散斑成像系统

激光散斑成像^[11]系统包括光路和成像系统两部分,如图1所示。因为散斑的形成需要高相干性的光源,因此光路采用温控半导体光纤耦合激光器($\lambda=656.2\pm 1.4$ nm, 300 mW)。激光器发出的光束耦合到光纤(直径为0.2 mm)中,光纤的一端耦合微透镜,光束直接照射在含有高散射物质的生物样品表面,光斑面积约为1 cm²;光动力治疗和激光散斑成像使用同一激光器,避免了光动力治疗激光照射和散斑成像光源的切换和互相干扰,简化了系统构造。在成像系统部分,从样品中后向散射出来的光信号被带有CCD(分辨率为6.45 $\mu\text{m}/\text{pixel}$)的变焦体式显微镜收集,通过图像采集卡与计算机相

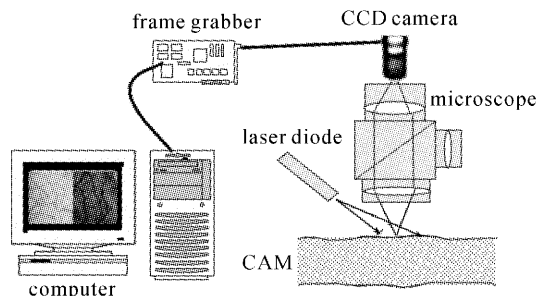


图1 激光散斑成像系统

Fig.1 Schematic diagram of laser speckle imaging system

连接,并由计算机处理图像信号。根据血管大小和流速来设定图像采集控制软件的图像像素大小、图像帧数和曝光时间等参量。增加辅助物镜和使用高倍物镜可以进行高空间分辨成像,CCD最快成像速度为每秒80帧,可以观察快信号的变化。

2.2 鸡胚尿囊膜模型

鸡胚尿囊膜模型的培养在参考文献^[3,10]中已有详细描述,我们参考其方法,做了部分改进。将种蛋用含0.01%的新洁尔灭水溶液(水温35℃)清洗,晾干后将种蛋气室向上,长轴与蛋托(冰箱自带)成45°放入温度为37.5℃,湿度为60%的恒温孵箱中。每天转蛋至少二次。孵育3天后,取出鸡蛋,用75%乙醇擦拭蛋壳,采用直接敲壳法移植鸡胚,将鸡胚移入孵育容器内。在EA 9~11之间将 4.0×10^7 mL⁻¹的涎腺癌细胞接种至鸡胚尿囊膜上血管丰富的区域。一至两天后选出有实体瘤生长的鸡胚尿囊膜备用。

2.3 光敏剂

光动力治疗实验中使用的敏剂为焦脱镁叶绿酸(Pyro-acid)。其荧光分子焦脱镁叶绿酸- α (Pyropheophorbide- α)来源于天然的二氢卟吩(Chlorin)。美国宾夕法尼亚大学放射医学系G. Zheng^[12]实验室合成了焦脱镁叶绿酸- α 的两种衍生物Pyropheophorbide 2-deoxyglucose(焦脱镁叶绿酸标记的2位-脱氧葡萄糖)和焦脱镁叶绿酸,它们具有相同的吸收和发射光谱。焦脱镁叶绿酸的分子量为631.7,化学分子式为C₃₇H₃₇N₅O₅。焦脱镁叶绿酸有多个吸收峰,其中以405 nm和665 nm为主要的吸收峰。在光动力治疗处理时,一般选用670 nm作为照射波长,以增加光线在组织中的穿透能力。焦脱镁叶绿酸溶解于DMEM中,贮存液浓度为40 mmol/mL。

2.4 光动力治疗

在EA10时,将一塑料环(内径为10 mm)放置于肿瘤团块及其周围血管的上面,且确保底边与鸡胚尿囊膜充分吻合。向塑料环内加入100 μL 焦脱镁叶绿酸溶液,以浸润方式注入光敏剂。焦脱镁叶绿酸浸润2.5 h后,用磷酸盐缓冲液(PBS)溶液洗涤5次,以去除未浸润到肿瘤或血管内的焦脱镁叶绿酸。实验中鸡胚尿囊膜模型分成两组,一组按照上面方法制备,一组不加任何光敏剂,作为光照对照组。去除塑料环,使用波长为656 nm的连续激光分别对两组鸡胚尿囊膜进行照射,激光输出功率由光功率计测定,实验中使用的输出功率为40 mW/cm²。照射过程中,每分钟对照射区域血管

分别进行白光 CCD 成像和激光散斑成像。

2.5 数据分析方法

由 CCD 得到血流分布的原始散斑图像,计算散斑图像的衬比 $K = \sigma_s / \langle I \rangle$, σ_s 为散斑光强的标准方差, $\langle I \rangle$ 为散斑光强的平均值。因散斑衬比与组织中的散射物质运动速度成反比^[4,8,11],可计算出血流速度的分布和血管的灌注率。而血流速度分布图像中血管与背景有很强的对比,可以快速计算出血管管径的变化。

3 结果和讨论

光照对照组实验中,未加光敏剂的鸡胚尿囊膜血管在激光照射 20 min 后并没有引起血管的收缩扩张变形,血流速度因为光热效应略有增加。因此,激光照射本身对鸡胚尿囊膜模型中的血管无损伤效应。

3.1 光动力治疗对血流流速的影响

图 2 显示,激光散斑衬比成像技术可以用来观察区域内血流流速的分布。其中 a1, a2, a3, a4 和

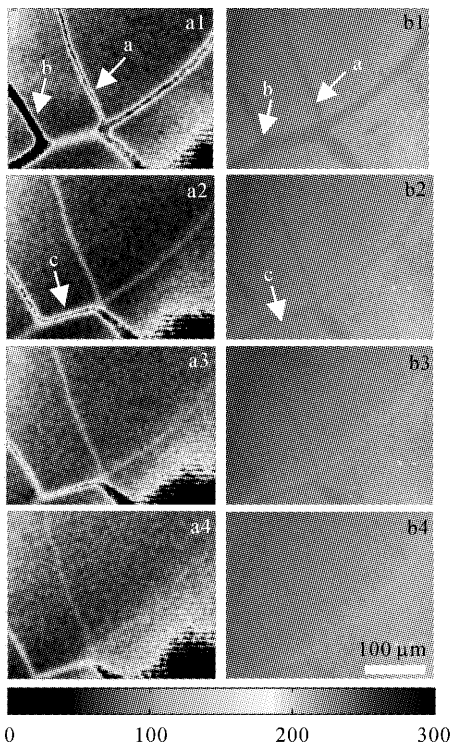


图 2 PDT 过程中不同时刻 CAM 血管变化的激光散斑图(a1, a2, a3, a4)和白光成像图(b1, b2, b3, b4)。a, b, c 分别标记不同的血管

Fig.2 CAM vessel changes in PDT illustrated by laser speckle images (a1, a2, a3, a4) and white light images (b1, b2, b3, b4) at the time of 0, 5, 10, 15 min. a, b, c label different vessels

b1, b2, b3, b4 分别为激光照射时间为 0, 5, 10, 15 min 时的激光散斑衬比图像和白光 CCD 图像。图 2(a)中血管的颜色越深表示血液相对流速越快。光动力治疗过程中,随着光动力剂量的增加(0~36 J/cm²),鸡胚尿囊膜的血流流速逐渐降低,结果与光动力治疗的激光多普勒流速测量^[6]一致。设光动力治疗之前的血流速度为 100%, 15 min 后,血流速度降低到低于 30%,如图 3 所示。血管 a(直径为 20 μm)和血管 b(直径为 30 μm)的流速变化具有相近的下降趋势。结合图 2 和图 3,在长时间的激光照射后,由于光动力治疗的光敏化反应,血流速度逐渐降低,最后停滞。并且在激光散斑图中可以清楚地观察到血管 b 的血液滞留随着血管 a 功能的丧失而成为连接血管 b 的通道,而图 2(b)的白光 CCD 图只能观察到血管外径的变化。在血管网络中,不同部位的光敏剂浓度不同。光敏化反应速度也不同,激光散斑的血流速度分布成像可以观察血管网络在不同药物浓度情况下的血流速度变化,比研究单根血管的变化更具有代表性,对光动力治疗血管损伤的评估更为准确。

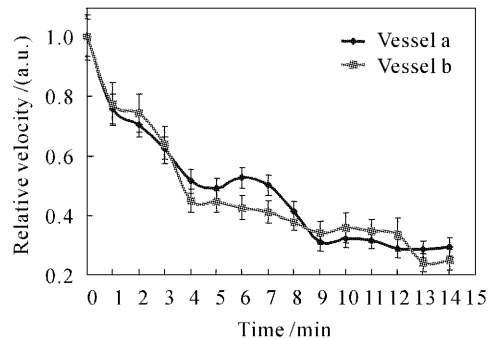


图 3 CAM 血流速度变化。Vessel a 和 Vessel b 分别为图 2 中的血管 a 和血管 b

Fig.3 Changes of blood flow velocity. Curves of Vessel a, b represent the Vessel a, b in Fig. 2

3.2 血管管径的变化

图 4 说明了血管的平均管径在激光照射过程中的变化。在激光照射的前 2 min,血管先扩张,管径增大,然后血管逐渐收缩,管径变小。收缩的同时,血流速度降低。在 10 min 后,毛细血管先断裂,血流停滞。15 min 后,照射区域血流基本停滞。其原因主要为血管的破坏激活血小板及炎性细胞导致炎性因子释放,引起血管收缩、血细胞滞留凝集和血流停滞^[13]。前 2min 的血管扩张是因为相比光敏反应,光热效应占主导地位,引起局部温度升高,而血

管的直径随温度的升高而逐渐增加^[6],导致了血管的暂时扩张。

3.3 血管损伤评估

血液灌注量的变化为流速与管径平方的乘积。36 J/cm² 的激光照射后,平均血液灌注量只有照射前的 2%,如图 4 所示。M. J. Hammer-Wilson 等^[3]以血管管径大小为加权值来评估血管损伤程度:将不同的损伤状态定义为不同的等级(0~3 级),把管径大小分别定义为 4 个权值(0~3),并将等级与权值之积作为最后的损伤级别。引入血液灌注量代替血管管径作为加权值来评估损伤程度,不仅考虑了血管管径的变化(血管壁内皮细胞的失活),并将血液流速(红细胞凝集和血流停滞)作为参考。同样将不同的损伤状态定义为不同的等级,参照图 4 中的灌注率变化曲线,将血液灌注率百分比分为三个权值(1~3),分别对应灌注率百分比变化的 0%,0%~70%,70%~100%,而将等级与灌注率权值之积作为最终血管损伤等级。新的分级方法可以更加清楚地区分无损伤、血液凝结、血管收缩、血流停滞、血管扩张和出血等血管损伤状态,并作出光动力治疗的肿瘤周围血管损伤效应评估。

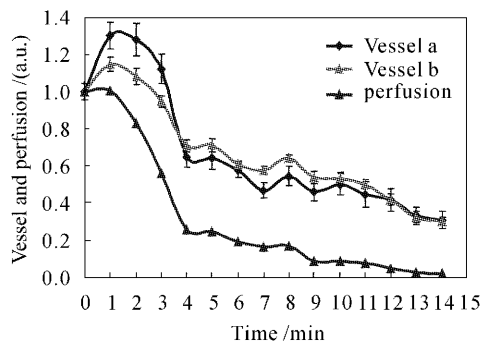


图 4 CAM 血管管径和灌注率的变化。Vessel a 和 Vessel b 分别为图 2 中的血管 a 和血管 b

Fig. 4 Changes of vessel structure and perfusion, curves of Vessel a, b represent the Vessel a, b in Fig. 2

4 结 论

在光动力治疗过程中,由于光敏化反应可造成微血管破坏,炎性因子的释放引起血管收缩、血细胞滞留凝集、血流停滞造成组织水肿、缺血、缺氧,从而

杀伤肿瘤。实验结果表明,激光散斑成像技术可以实时地监测光动力治疗过程中血管结构、血流流速和血液灌注量的变化,并以此来评估光动力治疗过程中的肿瘤周围血管损伤效应。

参 考 文 献

- 1 D. E. J. G. J. Dolmans, D. Fukumura, R. K. Jain. Photodynamic therapy for cancer [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2003, **3**(5): 380~387
- 2 D. E. J. G. J. Dolmans, A. Kadambi, J. S. Hill *et al.*. Vascular accumulation of a novel photosensitizer, MV6401, causes selective thrombosis in tumor vessels after photodynamic therapy [J]. *Cancer Research*, 2002, **62**(7): 2151~2156
- 3 M. J. Hammer-Wilson, L. Akian, J. Espinoza *et al.*. Photodynamic parameters in the chick chorioallantoic membrane (CAM) bioassay for topically applied photosensitizers [J]. *Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 1999, **53**(1~3): 44~52
- 4 J. D. Briers. Laser Doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging [J]. *Physiol. Meas.*, 2001, **22**(4): 35~66
- 5 Cheng Haiying, Zhu Dan, Luo Qingming *et al.*. Optical monitoring of the dynamic change of blood perfusion [J]. *Chinese J. Lasers*, 2003, **30**(7): 668~672
- 程海英,朱丹,骆清铭等. 血液灌注率动态变化的光学监测 [J]. *中国激光*, 2003, **30**(7): 668~672
- 6 B. Chen, B. W. Pogue, I. A. Goodwin *et al.*. Blood flow dynamics after photodynamic therapy with verteporfin in the RIF-1 tumor [J]. *Radiat Res.*, 2003, **160**(4): 452~459
- 7 F. Arnold, C. Y. J. He, G. W. Cherry. Perfusion imaging of skin island flap blood flow by a scanning laser Doppler technique [J]. *Brit. J. Plast. Surg.*, 1995, **48**(5): 280~287
- 8 Cheng Haiying, Luo Qingming, Wang Zheng *et al.*. Dynamic change of lymph flow monitored by laser speckle interference and spectroscopy methods [J]. *Chinese J. Lasers*, 2003, **30** (Suppl.): 221~223
- 程海英,骆清铭,王征等. 利用激光散斑干涉法与光谱技术实时监测淋巴流的动态特征 [J]. *中国激光*, 2003, **30**(增刊): 221~223
- 9 J. D. Briers, S. Webster. Laser speckle contrast analysis (LASCA): a non-scanning, full-field technique for monitoring capillary blood flow [J]. *J. Biomed. Opt.*, 1996, **1**(2): 174~179
- 10 V. Gottfried, E. S. Lindenbaum, S. Kimel. Vascular damage during PDT as monitored in the chick chorioallantoic membrane [J]. *Int. J. Radiat. Biol.*, 1991, **60**(1~2): 349~354
- 11 H. Y. Chen, Q. M. Luo, Q. Liu. Laser speckle imaging of blood flow in microcirculation [J]. *Phys. Med. Biol.*, 2004, **49**(7): 1347~1357
- 12 M. Zhang, Z. H. Zhang, D. Blessington *et al.*. Pyropheophorbide 2-deoxyglucosamide: a new photosensitizer targeting glucose transporters [J]. *Bioconjugate Chem.*, 2003, **14**(4): 709~714
- 13 I. J. Macdonald, T. J. Dougherty. Basic principles of photodynamic therapy [J]. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2001, **5**(2): 105~129