

面向吲哚菁绿药代动力学成像的动态实验系统

张雁琦¹, 王欣¹, 尹国艳¹, 李娇^{1,2}, 马文娟³, 周仲兴^{1,2}, 赵会娟^{1,2},
高峰^{1,2}, 张丽敏^{1,2*}

¹天津大学精密仪器与光电子工程学院, 天津 300072;

²天津市生物医学检测技术与仪器重点实验室, 天津 300072;

³天津医科大学附属肿瘤医院, 天津 300060

摘要 为实现小动物吲哚菁绿(ICG)药代动力学成像,设计了一套高灵敏度扩散荧光层析成像系统。该系统采用了基于离散光纤耦合光子计数采集的仿计算机断层成像扫描方式,在保障高灵敏度和大动态范围测量的前提下,可有效提高系统的空间采样分辨率;同时采用了基于光开关切换四通道串-并混和的测量模式,兼顾了测量时间分辨率和系统性价比之间的平衡。为验证实验系统的有效性,设计了可模拟小动物体内 ICG 代谢规律的动态仿体,并结合实验室开发的荧光剂药代动力学直接重建算法,实现了 ICG 代谢速率的重建。实验结果表明,该系统具有较高的空间分辨率、灵敏度和量化性。

关键词 医用光学; 扩散荧光层析成像; 药代动力学; 吲哚菁绿; 光子计数; 动态测量; 动态仿体

中图分类号 Q63

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201744.0107001

Dynamic Experimental System for Indocyanine Green Pharmacokinetic Imaging

Zhang Yanqi¹, Wang Xin¹, Yin Guoyan¹, Li Jiao^{1,2}, Ma Wenjuan³,
Zhou Zhongxing^{1,2}, Zhao Huijuan^{1,2}, Gao Feng^{1,2}, Zhang Limin^{1,2}

¹School of Precision Instrument and Opto-Electronics Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

²Tianjin Key Laboratory of Biomedical Detecting Techniques and Instruments, Tianjin 300072, China;

³Cancer Institute and Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China

Abstract A highly-sensitive pharmacokinetic diffuse fluorescence tomographic system is proposed to achieve the indocyanine green (ICG) pharmacokinetic imaging of small animals. The system employs a photon-counting technique based on discrete optical fiber measurement of computed tomography scanning mode in the computer tomography, which effectively improves spatial sampling resolution of the system on the premise of high sensitivity and wide dynamic measurement range. Meanwhile, it adopts serial-parallel mixed measurement mode through switching four photomultiplier tube photon-counting channels by optical switch to obtain a balance between time resolution of measurement and cost-effectiveness of the system. We investigate the principle validity of the system by designing a dynamic phantom that can simulate ICG metabolism in living tissue. In addition, combined with the algorithm of fluorescent agent pharmacokinetic imaging developed by our laboratory, the reconstruction of ICG metabolic velocity is realized. Experimental results show that the proposed system has high sensitivity, spatial resolution and quantitiveness.

Key words medical optics; diffuse fluorescence tomography; pharmacokinetics; indocyanine green; photon-

收稿日期: 2016-09-23; 收到修改稿日期: 2016-10-08

基金项目: 国家自然科学基金(81371602,61475115,61475116,81401453,61575140,81571723,81671728)、天津市应用基础及前沿技术研究计划重点项目(15JCZDJC31800,16JCZDJC31200)、天津市自然科学基金(14JCQNJC14400,15JCQNJC14500)

作者简介: 张雁琦(1991—),女,博士研究生,主要从事荧光剂药代动力学方面的研究。E-mail: yanqizhang@tju.edu.cn

导师简介: 高峰(1963—),男,博士,教授,博士生导师,主要从事组织光学成像方面的研究。

E-mail: gaofeng@tju.edu.cn

* 通信联系人。E-mail: zhanglm@tju.edu.cn

counting; dynamic measurement; dynamic phantom

OCIS codes 170.0110; 170.3880; 170.6920

1 引 言

基于扩散荧光层析成像(DFT)技术的叫噪菁绿(ICG)药代动力学成像是目前新兴的一种小动物荧光剂药代动力学成像方法^[1]。与传统的 DFT 技术相比,该方法在获取荧光剂浓度的基础上可进一步得到组织体的生理和病理定量信息,从而在早期肿瘤检测、肿瘤分期、药效评价、动态生物学和病理信息监测等领域具有重要的应用前景^[2-3]。在荧光剂药代动力学成像研究中,ICG 是一种常用荧光染料,且是美国食品药品监督管理局(FDA)批准的唯一一种体内应用染料,ICG 注射进入体内后,会被肝细胞选择性摄入,经肝细胞分泌进入胆汁,最终由胆道快速排出^[4]。ICG 药代动力学成像在 DFT 技术基础上通过动态测量荧光强度变化,并结合药代动力学原理和数学模型,实现 ICG 在活体生物组织内吸收、分布、代谢等参数的成像,可有效克服静态 DFT 成像中存在的最佳测量时间段难以判断的问题,从而获得组织体的动态生理和病理信息^[5-7]。由于 ICG 在组织体中的代谢时间较短^[1],因此设计能够实现快速测量的高分辨率、高灵敏度的动态测量系统是实现该技术的重要基础。

在 DFT 技术的实验系统发展方面,根据光源激励方式的不同,分为稳态、频域和时域三种测量模式。其中,稳态测量模式获取数据速度快,在体测量时可以实现实时、动态测量,尤其对于药代动力学和快变化生理信息的获取等研究具有重要的实用意义。出射光的探测主要包含两种方式:1)采用 CCD 相机扫描,该方式具有高密度空间采样能力,但需要较长的积分时间才可以获得较好的信噪比;2)采用光纤耦合技术的离散测量方式,通过光纤与微弱光检测技术(光电倍增管等)相结合,可实现高灵敏度、短时间测量,但空间采样密度低^[8-9]。

本文搭建了一套面向 ICG 药代动力学成像的动态实验系统。该系统将离散光纤分布耦合光子计数采集方式与仿计算机断层成像(CT)扫描方式相结合,前者可对系统实现高灵敏度和大动态范围测量,后者则有效提高了系统的空间采样分辨率。在此基础上,自行设计了基于 FPGA 的 64 位四通道门宽可变光子计数器型稳态测量模式,该光子计数技术可以应用于低浓度 ICG 的成像(探测浓度可以达到 nmol 量级),且能同时探测较强的激发光信号和微弱的荧光信号,从而实现光信号的宽测量范围。此外,该系统还采用了基于光开关切换四通道串-并混和的测量模式,即 1~8 探测位置通过光开关切换一次,可实现 1~4 和 5~8 探测位置的切换测量,该设计在满足了测量时间分辨需求的基础上降低了系统探测成本。为验证该实验系统对 ICG 药代动力学成像的有效性,设计了动态仿体实验以模拟小动物体内的 ICG 代谢规律,通过对 ICG 不同代谢率的模拟和动态测量,并结合课题组自主开发的成像算法^[10],验证了实验系统在蠕动泵的不同流速下(即不同的 ICG 代谢率)具有较高的分辨率、灵敏度和定量性。

2 面向 ICG 药代动力学成像的实验系统

2.1 动态测量实验装置

面向 ICG 药代动力学成像的实验系统如图 1 所示,主要由光源系统、准直器、成像腔、实验仿体、蠕动泵、电动旋转台、电动升降台、源光纤与探测光纤、光开关、滤光轮、光电倍增管(PMT)、光子计数模块和计算机组成。其中,光源系统中的脉冲调制激光控制器(MDL300,PicoQuant,德国)控制近红外光激光头(LDH-M-C-780,PicoQuant,德国),提供稳定、强度精细可调、780 nm 波长的连续波光源。系统的具体工作过程如下:光源耦合进入光源光纤(芯径为 300 μm ,数值孔径为 0.22)中,经固定于光纤支架上的准直器(FC230SMA-B,Thorlabs,美国)准直后入射到动态仿体表面;动态仿体与光纤架为同心圆设计,垂直并固定放入成像腔中,动态仿体的背景和目标体内部均放置由蠕动泵(BT100-02,中国保定)控制的进出液硅胶管,其内部的 ICG 溶液浓度随硅胶管进出液的输入和输出变化;位于光源同一水平面且均匀分布于 101.25°~258.75°之间的 8 路探测光纤(芯径为 500 μm ,数值孔径为 0.37)分别收集相应探测位置的透射光,并经由 16×4 光开关(FSW4-1×4-MM-C,中国电子科技集团公司第三十四研究所)切换后,分别导入载有滤光片(FF01-832/37-25,Semrock,美国)的 4 个马达驱动滤光轮(FW102C,Thorlabs,美国)中;光电倍增管

(H8259-02e, Hamamatsu, 日本)将滤光处理后的光信号转化为电信号,电信号由自行设计的基于现场可编程逻辑门阵列(FPGA)的64位四通道门宽可变光子计数器(Cyclone III FPGA Starter Board, Altera, 美国)快速接收。之后系统利用旋转台来旋转仿体,可实现同一平面(xy 平面)在 360° 范围内的间隔扫描,从而采集不同光源入射角下的光子数信息。另外,系统中的电动升降台可使仿体沿 z 轴方向移动,通过控制旋转台的旋转角度与升降台的步进距离,系统可实现三维扫描。实验前,对成像系统的8个探测通道进行评估和校正,使其性能一致,以消除探测通道的差异性对实验结果的影响。测量过程中,整个系统放置于暗箱内以去除杂散光的影响,并通过计算机中基于LabVIEW语言编写的程序控制实现自动测量。

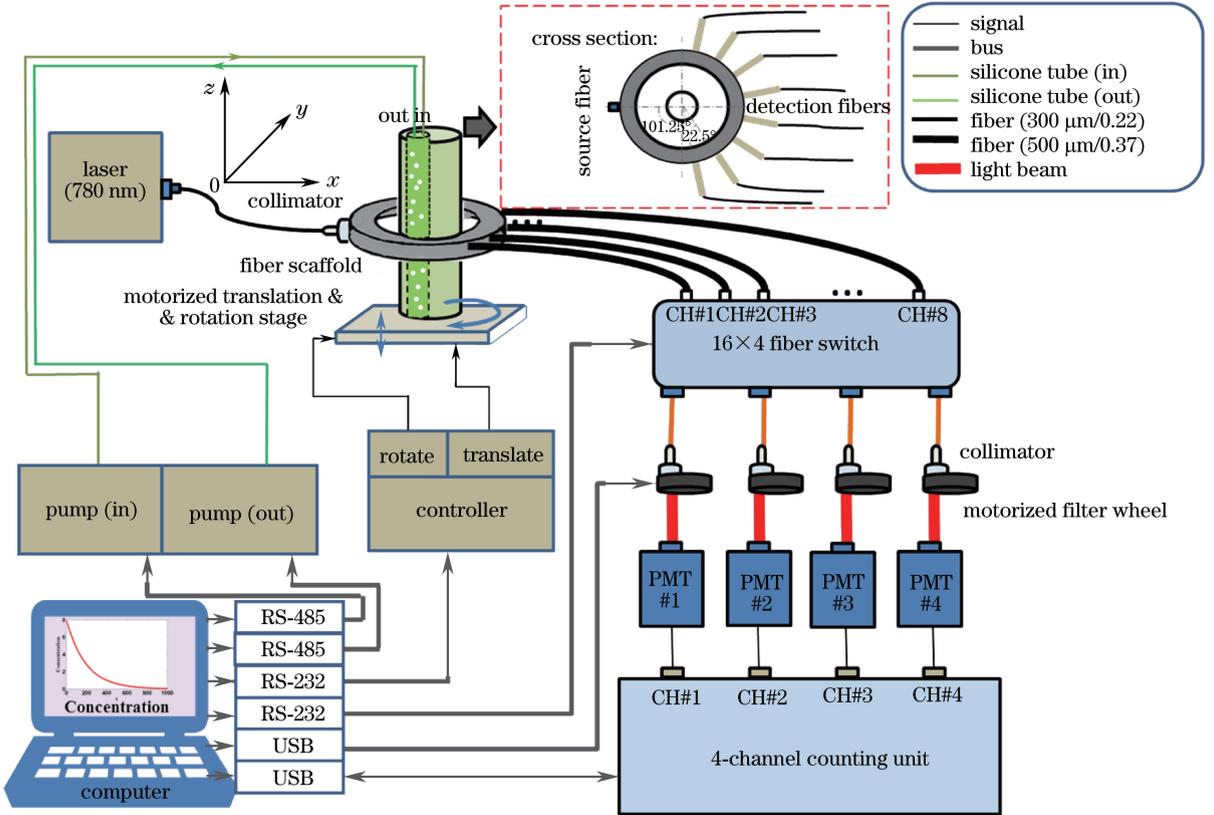


图 1 面向 ICG 药代动力学成像的动态实验系统

Fig. 1 Dynamic experimental system for ICG pharmacokinetic imaging

采用的 ICG 荧光染料的峰值激发波长约为 780 nm,峰值荧光发射波长约为 830 nm。实验中需要分别测量激发光信号与荧光信号,其中荧光信号较为微弱。当探测荧光信号时,马达驱动滤光轮中需放置一个干涉型带通滤光片(FF01-832/37-25, Semrock, 美国)用以滤除激发光信号。另外,滤光轮前的准直器使探测光准直入射到滤光片,以达到更好的滤光效果。当测量激发光信号时,由于微弱的荧光信号对激发光的影响可忽略,因而滤光轮中无需放置滤光片,可直接探测。

系统中光子计数模块是实现系统高灵敏性的关键部分,包括 PMT 与基于 FPGA 的 64 位四通道门宽可变光子计数器。其中,四通道可调门宽光子计数部分主要由总控制模块、分频模块、光开关切换时钟、计数门控信号、计数模块和 FT245RL 通信板组成。其中,开发板上晶振为 50 MHz,分频参数设置为 64 位数据,光子计数模块的计数门宽程控可调($20 \text{ ns} \sim 10^{10} \text{ s}$),可以根据实际测量信号的强度选择合适的门宽,使得系统具有良好的动态特性以及对低浓度 ICG 的较高探测灵敏度。由于该系统具有较宽的光信号测量范围,计数部分可以使用同一计数门宽测量较强的激发光信号和微弱的荧光信号,且不会达到计数饱和或溢出。该系统完成一次完整二维扫描的时间 T_{tot} (单位为 s) 的计算公式为

$$T_{\text{tot}} = (T_c \times 2 + T_{\text{opt}} + T_r) \times 360 / \theta, \quad (1)$$

式中 T_c 、 T_{opt} 、 T_r 分别表示计数门宽、光开关延时和旋转台旋转时间,单位均为 s; θ 表示每次旋转间隔,单位为 $^\circ$; 常数 2 为每个光源入射点对应的 1~4 和 5~8 探测位置的测量次数。若以计数门宽 1 s、光开关延时

0.01 s、旋转台旋转时间 0.5 s 以及每次旋转间隔 22.5°(即光源入射点数为 16)为例,该系统完成一次完整二维扫描的时间为 40.16 s。在测量过程中,每个光源入射点对应的 1~4 和 5~8 探测位置需分为两个时间节点测量。如对第 1 个光源入射点对应的 1~4 探测位置进行测量时计为第 1 个测量时间节点,之后通过光开关切换,探测器对第 1 个光源入射点对应的 5~8 探测位置进行测量,此时计为第 2 个时间节点测量;接着旋转台旋转 22.5°,对第 2 个光源入射点对应的 1~4 探测位置进行测量,即第 3 个时间节点测量。以此类推,即在一次完整二维扫描时间内完成了 32 个时间节点的信息测量,因此系统能够在 ICG 代谢时间内获得足够的光子测量信息,从而实现动态测量。

2.2 动态仿体设计

为验证上述动态测量装置在面向 ICG 药代动力学成像实验中的有效性,设计了动态仿体实验。仿体的初始光学参数模拟由固态仿体(由聚甲醛制成)与液态仿体(由一定量的 ICG 混合体积分数为 1% Intralipid 制成)相结合实现。之后,通过计算机控制与液态仿体相连的进出液蠕动泵实现 ICG 浓度的改变,以模拟小动物组织体中的 ICG 药代动力学过程。动态仿体分为背景和目標体两部分,可分别用于模拟正常组织和病变组织的 ICG 代谢过程,其模型示意图和实物图分别如图 2(a)和 2(b)所示。其中,由聚甲醛制成直径为 30 mm、高为 60 mm、壁厚为 0.1 mm 的圆柱空腔仿体作为仿体背景,在距离背景中心 8 mm 处内置仿体目标体,目标体同样是由聚甲醛制成的直径为 12 mm、高为 75 mm、壁厚为 0.1 mm 的圆柱形空腔。在波长为 780 nm 的 ICG 激发光下,采用时间分辨光谱法测得所用固态仿体的光学参数为:折射率 $n_1=1.5$ 、吸收系数 $\mu_{a1}=0.0038 \text{ mm}^{-1}$ 、约化散射系数 $\mu'_{s1}=0.978 \text{ mm}^{-1}$;液态仿体的光学参数为:折射率 $n_2=1.5$ 、吸收系数 $\mu_{a2}=0.0017 \text{ mm}^{-1}$ 、约化散射系数 $\mu'_{s2}=0.87 \text{ mm}^{-1}$ 。仿体的背景荧光产率根据经验值设定为 10^{-5} mm^{-1} 。另外,由于激发光波长和荧光波长相差较小,因此可假定仿体在两种波长下的光学参数相等^[11]。

为了实现 ICG 浓度的动态改变,仿体背景与目标体中均插入两个与蠕动泵相连的直径为 4 mm 的硅胶管,分别作为进、出液管,通过控制硅胶管流速可实现仿体背景和目標体不同 ICG 代谢率的模拟。实验中进出液硅胶管的流速需设置相同,以达到不改变液态仿体总体积的目的。参照蠕动泵使用说明可知,硅胶管内进液或出液流速 v_{tube} (单位为 mL/s)的计算公式为

$$v_{\text{tube}} = \alpha \times r_{\text{pump}}, \tag{2}$$

式中 r_{pump} 为蠕动泵的泵速,取值 0~100 r/min, α 为常数。不同型号的硅胶管具有不同的 α 值,以实验所用的 13 号硅胶管为例, α 取值为 1.05×10^{-3} 。由上述信息可知 ICG 代谢率与硅胶管流速存在线性关系,若能得到硅胶管流速的重建值,并计算重建值与参考值之间的误差,不仅可以验证面向 ICG 药代动力学成像动

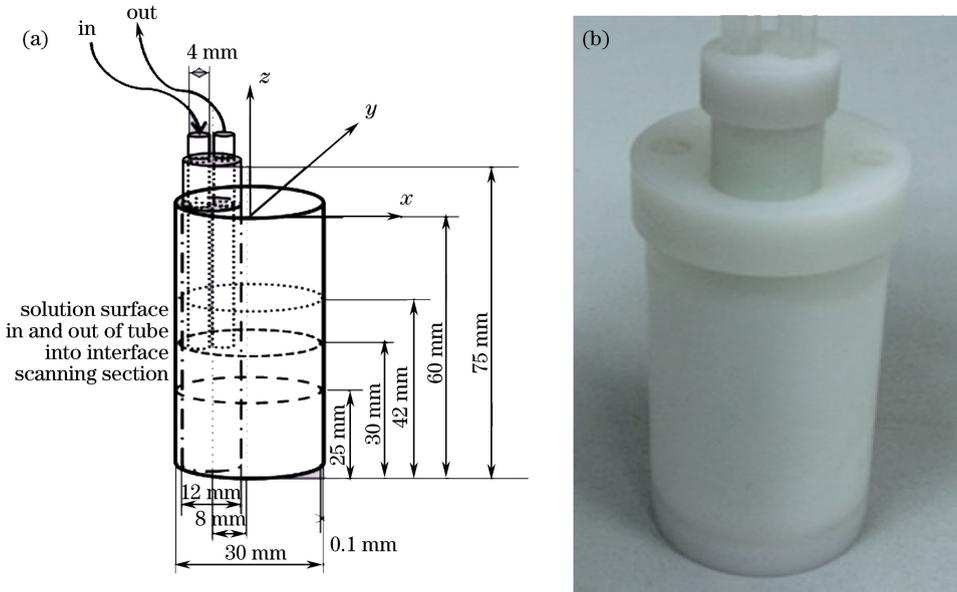


图 2 动态仿体的 (a)模型示意图与 (b)实物图

Fig. 2 (a) Schematic and (b) picture of dynamic phantom

态实验系统的有效性,而且可以反映该系统的性能。

3 图像重建方法

基于动态系统的测量数据,结合实验室开发的基于自适应扩展卡尔曼滤波的荧光剂药代动力学直接重建方法,对动态仿体的 ICG 浓度曲线进行重建。扩展卡尔曼滤波是一种高效率的递归滤波器(自回归滤波器),能够从一系列包含噪声的测量值中估计动态系统的状态,且适用于非线性系统。实验室开发的自适应扩展卡尔曼滤波方法通过在参数重建过程中加入自适应因子,及时修正测量偏差,有效提高了参数重建准确度,具体方法可参考文献[10]。

4 动态仿体实验结果及讨论

为验证动态系统的性能,采用图 2 中的动态仿体,设计了通过改变蠕动泵的泵速来改变目标体内 ICG 浓度的动态仿体实验。实验使用的硅胶管型号为 13 号,设置的可变光子计数器计数门宽为 1 s,旋转台旋转间隔为 22.5° ,二维扫描旋转圈为 4 圈(即测量时间节点数为 128 个),蠕动泵泵速分别设置为 90,70,50,30,10,5 r/min。背景空腔内注入 30 mL 1% Intralipid 溶液,目标体空腔内注入 5 mL ICG 溶液,其初始浓度为 $1 \mu\text{mol/L}$ (小动物 ICG 药代动力学实验常用的初始浓度值)^[12]。采用荧光剂药代动力学成像重建算法得到不同蠕动泵泵速对应的目标体 ICG 溶度变化曲线,如图 3 所示。图中横坐标表示时间节点 k ,纵坐标表示目标体的 ICG 浓度值,实线和虚线分别表示不同泵速下 ICG 理论和重建浓度的变化曲线。由图 3 可知,基于设计的测量系统及提出的重建方法可以获得不同蠕动泵泵速下的 ICG 浓度曲线,并且测量的时间节点越多重建的 ICG 浓度越接近理论值。同时还可以看到,系统能有效区分不同泵速时对应目标体的 ICG 浓度曲线。

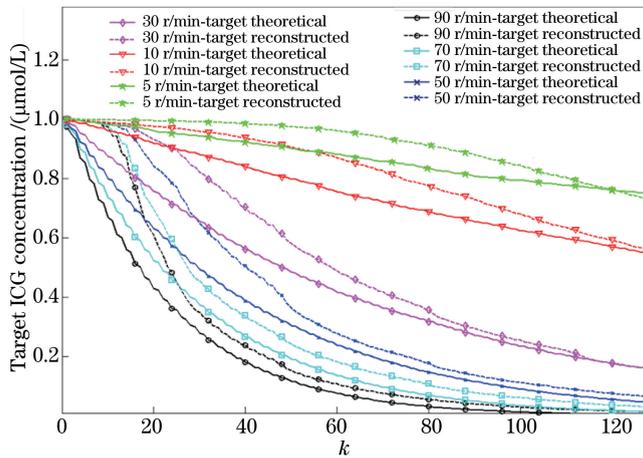


图 3 不同泵速下目标体 ICG 的理论和重建浓度随时间节点的变化

Fig. 3 Theoretical and reconstructed target ICG concentration versus time node at different pump speeds

图 4(a)为算法重建得到的不同蠕动泵泵速对应的二维流速图像,其中圆环代表目标体的实际位置和形状。图 4(b)为图 4(a)在 $y=0$ 时的 x 轴剖线图。从图 4(a)可以看出,重建目标体的位置和形状较为准确,但尺寸存在略微的膨胀,这是重建算法本身所固有的病态性造成的^[13]。图 4(b)中,在不同泵速下对应不同浓度的目标体,其流速的最大重建值分别为 0.1019,0.0809,0.0565,0.0367,0.0131,0.0064 mL/s,均略高于理论值(0.0945,0.0735,0.0525,0.0315,0.0105,0.0053 mL/s),但重建值之间的比值与理论值之间的比值接近,即 18:14:10:6:2:1。

为了进一步评估动态实验系统的有效性,计算了不同蠕动泵泵速时的硅胶管理论流速值、重建流速值以及重建流速值与理论值之间的相对误差,如表 1 所示。

如果流速的相对误差小于 30%,认为系统可以有效区分不同的流速。由表 1 可以看到,当泵速为 30 r/min 时,流速相对误差最大,为 26.3%,根据系统有效区分流速标准,说明该系统在不同的泵速时均具有

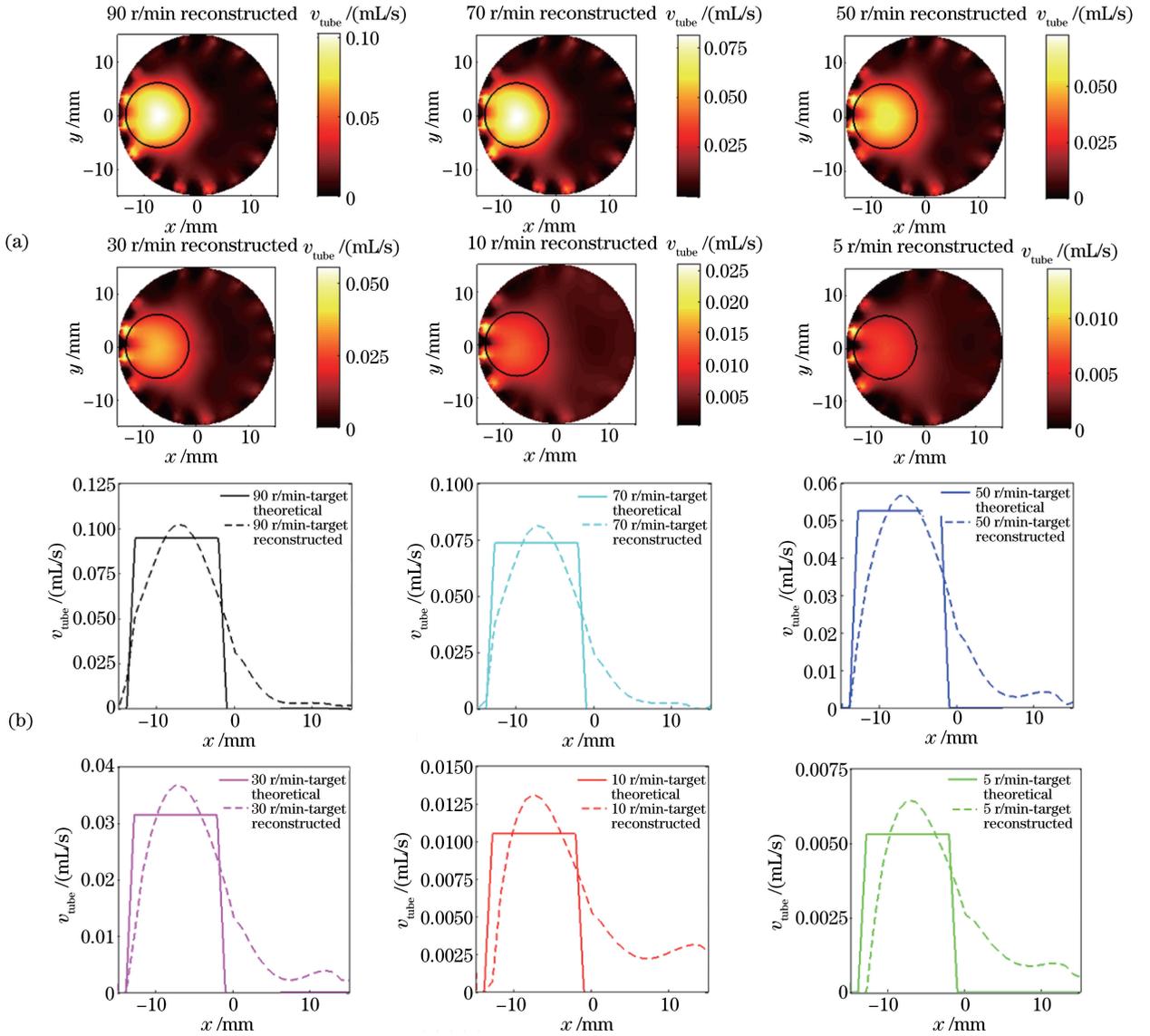


图 4 (a)不同泵速下的重建流速图像;(b)与图 4(a)对应的 x 轴剖线图

Fig. 4 (a) Images of reconstructed flow rate at different pump speeds; (b) x -profiles corresponding to Fig. 4(a)

好的分辨率。另外,除泵速为 30 r/min 以外,随着泵速的增大,流速的相对误差逐渐增大,原因可能为当硅胶管流速较高时,在有限采样间隔内硅胶管注入的 Intralipid 不易与目标体内的溶液均匀混合。此外,泵速为 30 r/min 时相对误差最大,其主要原因是实验时与蠕动泵连接的进出液硅胶管流速不完全相等,改变了目标体溶液的总容积。当泵速为 5 r/min 时,流速的相对误差仅为 1.9%。由此可知,系统的灵敏度可以达到 5 r/min,最高量化度可达 98.08%。

表 1 不同泵速下目标体流速理论值、重建值以及重建值与理论值之间的相对误差

Table 1 Theoretical and reconstructed flow rates at different pump speeds and relative errors between them

Pump speed / (r/min)	Theoretical flow	Reconstructed flow	Relative error / %
	rate of tube / (mL/s)	rate of tube / (mL/s)	
90	0.0945	0.0755	20.1
70	0.0735	0.0595	19.0
50	0.0525	0.0438	16.6
30	0.0315	0.0232	26.3
10	0.0105	0.0108	2.9
5	0.0053	0.0052	1.9

5 结 论

面向 ICG 药代动力学成像的实际应用,搭建了一套基于仿 CT 扫描方式的动态实验系统,设计了可有效模拟活体生物组织内 ICG 代谢规律的动态仿体,并结合实验室发展的药代动力学重建方法对实验系统的有效性进行了验证。对不同蠕动泵泵速下的 ICG 浓度曲线进行重建,实验结果验证了系统在探测 ICG 代谢变化方面具有较高的分辨率、灵敏度和量化性,其中系统最高分辨率和灵敏度可达 5 r/min,最高量化度可达 98.08%。该工作将对下一步的活体小鼠 ICG 药代动力学成像研究具有重要的指导意义。

参 考 文 献

- [1] Zhang G L, Liu F, Zhang B, *et al.* Imaging of pharmacokinetic rates of indocyanine green in mouse liver with a hybrid fluorescence molecular tomography/X-ray computed tomography system[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2013, 18(4): 040505.
- [2] Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?[J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 1990, 82(1): 4-6.
- [3] Jain R K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy[J]. *Science*, 2005, 307(5706): 58-62.
- [4] Yu Qian, Guo Yiming, Cui Haizhen, *et al.* The relevance evaluation of indocyanine green excretion test in the hepatic functional reserve[J]. *China Journal of Laboratory Diagnosis*, 2014, 18(11): 1776-1778.
于 倩, 郭义明, 崔海珍, 等. 吲哚菁绿排泄试验与肝脏储备功能的相关性评价[J]. *中国实验诊断学*, 2014, 18(11): 1776-1778.
- [5] Cuccia D J, Bevilacqua F, Durkin A J, *et al.* *In vivo* quantification of optical contrast agent dynamics in rat tumors by use of diffuse optical spectroscopy with magnetic resonance imaging coregistration[J]. *Applied Optics*, 2003, 42(16): 2940-2950.
- [6] Intes X, Ripoll J, Chen Y, *et al.* *In vivo* continuous-wave optical breast imaging enhanced with indocyanine green[J]. *Medical Physics*, 2003, 30(6): 1039-1047.
- [7] Alacam B, Yazici B. Direct reconstruction of pharmacokinetic-rate images of optical fluorophores from NIR measurements[J]. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 2009, 28(9): 1337-1353.
- [8] Wang X, Wu L H, Yi X, *et al.* Performance enhancement of pharmacokinetic diffuse fluorescence tomography by use of adaptive extended Kalman filtering[J]. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2015, 2015: 739459.
- [9] Saxena V, Sadoqi M, Shao J. Polymeric nanoparticulate delivery system for indocyanine green: biodistribution in healthy mice[J]. *International Journal of Pharmaceutics*, 2006, 308(1): 200-204.
- [10] Wang X, Zhang Y Q, Zhang L M, *et al.* Direct reconstruction in CT-analogous pharmacokinetic diffuse fluorescence tomography: two-dimensional simulative and experimental validations[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2016, 21(4): 046007.
- [11] Li Jiao, Gao Feng, Yi Xi, *et al.* A methodological and experimental investigation on time-domain diffuse fluorescence tomography of analytic based on two-dimensional circular scheme[J]. *Chinese J Lasers*, 2010, 37(11): 2743-2748.
李 娇, 高 峰, 易 茜, 等. 基于二维圆域解析模型的时域扩散荧光层析原理与实验研究[J]. *中国激光*, 2010, 37(11): 2743-2748.
- [12] Liu X, Guo X L, Liu F, *et al.* Imaging of indocyanine green perfusion in mouse liver with fluorescence diffuse optical tomography[J]. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 2011, 58(8): 2139-2143.
- [13] Zhang Limin, Gao Feng, Li Jiao, *et al.* Reconstructing three-dimensional fluorescent parameters using time-resolved data based on transmittance and reflection measurements[J]. *Chinese J Lasers*, 2009, 36(10): 2552-2556.
张丽敏, 高 峰, 李 娇, 等. 基于透射和反射时间分辨测量数据的荧光参数三维重建[J]. *中国激光*, 2009, 36(10): 2552-2556.