

肿瘤血管的高分辨光声定量成像

陈宁波^{1,2}, 周慧超^{2,3}, 赵煌旋², 王柏权^{1,2}, 宋亮², 刘成波^{2**}, 张建辉^{1*}

¹广州大学机械与电气工程学院, 广东 广州 510006;

²中国科学院深圳先进技术研究院生物医学光学与分子影像研究室, 广东 深圳 518055;

³中山大学附属第三医院超声科, 广东 广州 510630

摘要 利用微米级分辨率的高分辨光声显微成像系统, 对小鼠耳部肿瘤早期血管的生长以及肿瘤对抗血管治疗药物的响应过程进行连续无标记的成像监测; 提出将基于三维 Hessian 矩阵的血管提取算法应用于肿瘤血管的光声定量成像, 以提高肿瘤血管的提取精度, 并定量分析肿瘤血管的直径、密度、弯曲度等形态学信息变化。结果表明, 高分辨光声定量成像在肿瘤及其他以血管变化为病理特征的疾病机制研究方面具有巨大的应用潜力。

关键词 医用光学; 光声成像; 定量分析; 血管提取; 血管生成; 生物医学

中图分类号 Q631

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201946.0907001

High-Resolution Photoacoustic Quantitative Imaging of Tumor Vessels

Chen Ningbo^{1,2}, Zhou Huichao^{2,3}, Zhao Huangxuan², Wang Boquan^{1,2}, Song Liang²,
Liu Chengbo^{2**}, Zhang Jianhui^{1*}

¹School of Mechanical and Electrical Engineering, Guangzhou University, Guangzhou, Guangdong 510006, China;

²Research Lab for Biomedical Optics and Molecular Imaging, Shenzhen Institutes of Advanced Technology,
Chinese Academy of Sciences, Shenzhen, Guangdong 518055, China;

³Department of Ultrasound, the Third Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University,
Guangzhou, Guangdong 510630, China

Abstract We use a high-resolution (micrometer scale) photoacoustic microscopic imaging system to continuously monitor early-stage tumor angiogenesis in the ear of mice and its response to anti-angiogenesis therapy. Further, a three-dimensional Hessian-matrix-based vascular extraction algorithm is proposed for the quantitative photoacoustic imaging of tumor vessels to improve the tumor vessel extraction accuracy. Subsequently, the morphological changes in various parameters, such as the diameter, density, and tortuosity, of the tumor vessels are quantitatively analyzed. Furthermore, the potential of high-resolution photoacoustic quantitative imaging to study the pathological mechanisms of tumors and other diseases characterized by vascular changes is demonstrated in this study.

Key words medical optics; photoacoustic imaging; quantitative analysis; vascular extraction; angiogenesis; biomedicine

OCIS codes 170.5120; 170.3880; 110.5120

1 引言

实体肿瘤的生长伴随着血管新生的过程, 肿瘤中的血管网络不仅为肿瘤细胞生长提供所需的营养物质和氧气, 还能影响肿瘤对治疗的响应^[1]。传统的化疗药物缺乏特异性, 会同时损伤肿瘤细胞和正

常细胞, 产生严重的副作用, 肿瘤细胞耐药性的增强也会造成疾病复发的风险。在 20 世纪 70 年代初, 美国哈佛大学医学院的 Folkman^[2] 提出了抗血管生成疗法的设想, 即通过抑制肿瘤血管生长因子来阻止肿瘤血管的生成, 从而切断肿瘤细胞的养分供应通道, 达到治疗肿瘤疾病的目的。

收稿日期: 2019-03-20; 修回日期: 2019-05-10; 录用日期: 2019-05-17

基金项目: 国家自然科学基金(91739117)、深圳市科技计划(JCYJ20160608214524052)、广州大学科研能力提升计划(2018A001)

* E-mail: zhangjh@nuaa.edu.cn; ** E-mail: cb.liu@siat.ac.cn

在临床研究和临床前研究中,虽然多种无创的医学影像技术,如磁共振成像(MRI)^[3]、正电子发射断层扫描成像(PET)^[4]、X射线计算机断层成像(X-CT)^[5]和超声成像(USI)^[6]等均有应用于肿瘤血管评估的先例,但是,这些成像方式通常需要依靠外源性造影剂,且部分成像方式成本高昂,有的还有电离辐射危害等弊端。更重要的是,以上这些成像方式的分辨率都无法满足微循环毛细血管的显微成像,难以在肿瘤早期进行新生血管的活体成像,使得其在肿瘤早期诊断和抗血管治疗效果的监测方面存在巨大挑战。

光声成像(PAI)技术依靠组织中的血红蛋白等吸光物质来吸收特定波长的脉冲激光,吸收的部分光能转化成热能,引起组织周期性的热膨胀,从而产生机械振动,进而发射超声波。结合外部宽带的超声换能器对超声波进行探测,就可以无损地重建组织的三维(3D)结构信息^[7]。光声成像技术独特的优势在于结合了物质特异性的光学吸收和超声的深度分辨能力,可以实现不同物质的成分区分和多尺度成像。光声显微成像(PAM)作为光声成像的一个分支,可以实现微米级甚至亚微米级的高分辨率无标记显微成像,对于与肿瘤微细血管生成相关的应用研究至关重要^[8-10]。近年来,已有许多研究人员采用光声成像技术对新生血管(或毛细血管)进行了肿瘤诊断和监测^[11-20];Zhang等^[18]早在2006年就利用光声显微成像技术实现了黑色素瘤及其周围血管的检测,为理解肿瘤与其微环境之间的相互作用,以及黑色素瘤非侵入性检测和分期提供了可能;Lin等^[19]采用新型小鼠背部无创固定夹具,基于光声显微成像系统实现了小鼠背部乳腺癌肿瘤血管生成的连续监测,并对血管直径和血供变化进行了定量分析,为揭示肿瘤血管的生成机制提供了参考;Bi等^[20]针对小鼠脑胶质瘤,利用光声显微成像技术监测了抗肿瘤药物CA4P作用下肿瘤血管关闭和恢复的过程,展示了光声显微成像在肿瘤治疗效果监测方面的潜力。众多应用研究的开展使得光声显微成像技术成为肿瘤诊断和治疗评估的一种有效手段。

尽管光声显微成像在肿瘤监测和早期诊断方面的研究开展得如火如荼^[21],但是对于肿瘤血管结构形态量化分析的光声显微成像研究仍然十分有限。在肿瘤血管疾病的研究中,结合血管形态量化算法高精度地提取肿瘤血管的直径、密度、弯曲度等多参量形态信息,可以为肿瘤的诊断和监测提供有效的量化指标。2014年,Yang等^[22]基于二维(2D)

Hessian矩阵开发出了适用于光声显微成像的多参量血管提取算法,并采用该算法对小鼠耳部微血管进行了分割和量化。此后,一些课题组相继开展了血管量化的光声成像研究。Meiburger等^[23]提出了基于血管滤波和中轴线提取的骨架化算法,并在大鼠背部烧伤模型上进行了血管形态的量化光声监测。Li等^[24]提出一种光声显微成像的血管树提取算法,并采用该算法对猫的大脑初级视觉皮层小动脉树进行了完整的提取。血管提取和量化算法的相关研究拓展了光声显微成像的应用范围,但是,目前适用于肿瘤这类特殊形态血管的量化提取算法的研究仍然比较少,其中,基于2D Hessian矩阵等血管提取算法对体数据进行逐层提取的方式更适用于正常小鼠耳部或其他平坦表面血管的提取,而3D数据中纵向分布的血管在单层截面上投影为不连续的点,容易被误认为是噪声信号而被过滤掉;且对于眼睛虹膜、肿瘤等表面弧形凸起的样本血管提取存在局限。鉴于此,本文提出了基于3D Hessian矩阵的血管提取算法,并验证了该算法在纵向分布血管提取方面的优势^[25]。本文通过搭建的高分辨光声显微成像系统对小鼠耳部前列腺癌移植瘤血管的生成进行监测,并结合抗血管药物对肿瘤进行治疗,监测抗血管药物的治疗效果。将基于3D Hessian矩阵的血管提取算法应用于肿瘤微血管形态的定量分析,实验结果表明,高分辨肿瘤血管光声定量成像在临床和临床前研究中具有潜在的应用价值。

2 方法与实验

2.1 高分辨光声显微成像系统设计

图1所示为高分辨光声显微成像系统原理示意图。采用重复频率为2 kHz、波长为532 nm的GKNQL-532型纳秒脉冲激光器作为光声信号激发光源,激光器出射的光束经光阑过滤杂散光、透镜组准直、针孔滤波等整形优化后,经由F-91-C型光纤耦合器耦合进入纤芯直径为3.2 μm的P1-460B-FC-1型单模光纤中,光纤出射的光束在成像探头处由数值孔径(NA)为0.1的PLN4X型物镜组准直,最终透过光声棱镜后聚焦在成像样本区域。定制的光声棱镜由直角棱镜与菱形棱镜黏结而成,在二者黏合面处形成一个“U”形的薄层空隙,在该空隙中填充硅酮油,以达到透光反声的目的。定制的菱形棱镜底面加工有球面凹槽,用以超声聚焦,其数值孔径为0.55,声学焦点与光学焦点共轴、共焦配置。整个探头部分集成于由步进电机驱动的VT-80型高

精密 3D 线性位移平台上,通过 LabVIEW 语言编写的上位机程序控制平台的运动,带动探头进行逐点扫描。样本激发的超声信号被中心频率为 50 MHz 的 V214-BC-RM 型单阵元超声换能器接收后,声信

号转化为电信号,并由 ZFL-500LN-BNC 型低噪声放大器进行放大,最后被 CS1422 型双通道数据采集卡以 200 MSa/s 的采样率进行采集并存储到计算机中。

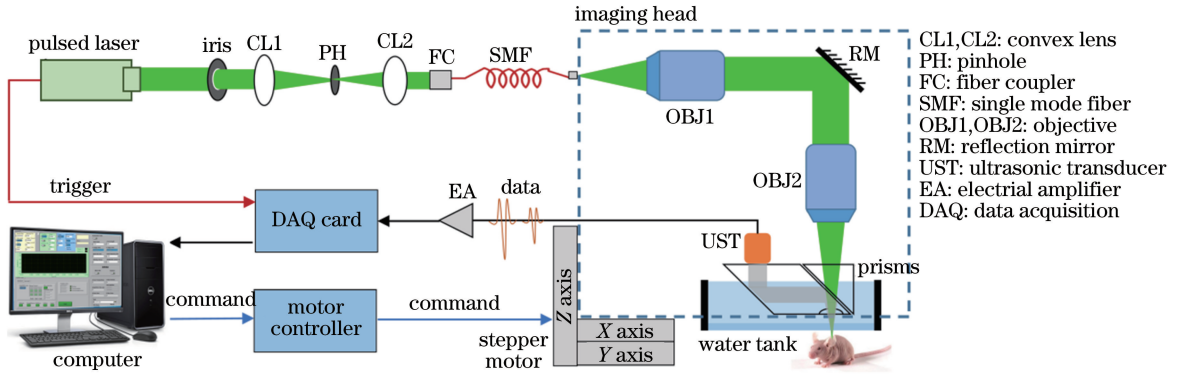


图 1 高分辨光声显微成像系统原理示意图

Fig. 1 Schematic of high-resolution photoacoustic microscopy imaging system

为了验证高分辨光声显微成像系统的性能,首先利用锋利的刀刃和直径为 $6 \mu\text{m}$ 的碳纤维丝分别测试系统的横向、纵向分辨率。横向分辨率取决于聚焦激光光斑的大小,与聚焦物镜的数值孔径相关,图 2(a)~(b)所示为垂直于刀刃边缘以步长 $1 \mu\text{m}$ 进行扫描测得的光声信号拟合曲线以及刀刃边缘光声最大幅值的投影(MAP)图。通过拟合虚线处测得的光声数据(EXP)可以得到边缘扩散函数(ESF),对 ESF 求导可得到线扩散函数(LSF)。其

中,LSF 的半峰全宽(FWHM)为测得的横向分辨率,为 $3.8 \mu\text{m}$,比理论计算值 $2.7 \mu\text{m}$ 稍小一些,这可能是由光声棱镜界面和底部凹槽引起的像差导致的。纵向分辨率取决于声速和超声换能器的带宽,实验所用换能器的标称 -6 dB 带宽为 70% ,图 2(c)所示为图 2(d)中白色箭头标识的碳纤维丝单点信号的高斯拟合曲线,其 FWHM 即为系统的纵向分辨率,测得的结果为 $27.2 \mu\text{m}$,与理论纵向分辨率 $26 \mu\text{m}$ 基本吻合。然后,利用琼脂粉、脂肪乳

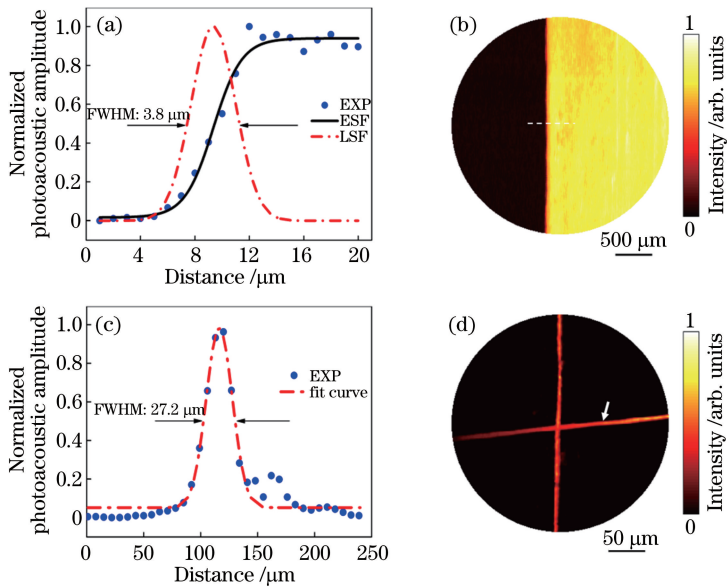


图 2 系统空间分辨率的测试结果。(a)刀刃边缘横向轮廓的拟合曲线;(b)刀刃边缘光声 MAP 图;
(c)碳纤维丝纵向轮廓的高斯拟合曲线;(d)碳纤维丝光声 MAP 图

Fig. 2 Spatial resolution test results of imaging system. (a) Fitted lateral profiles of blade edge; (b) photoacoustic MAP image of blade edge; (c) Gaussian-fitted axial profile of single carbon fiber; (d) MAP image of carbon fibers

溶液和去离子水,配制含 1%(质量分数)琼脂粉和 1%(体积分数)脂肪乳的混合溶液,制作凝胶仿体模仿生物组织中的散射介质,以测试成像深度。进行测试时,将一根细金属针斜插入仿体中,形成深度变化,另一根金属针平放于仿体样本表面作为深度参照。图 3(a)所示为仿体实物图,对图 3(a)中的方框区域进行深度成像测试,光声成像结

果如图 3(b)所示。计算得出成像深度约为 1.4 mm,但是,随着成像深度增加,信噪比有所降低。另外,光声图像的采集时间取决于扫描范围、扫描步长以及电机的扫描速率。例如,对于大小为 3 mm×3 mm 的成像区域,当相邻 B-scan 的步长间隔设置为 5 μm,电机驱动的位移速度设置为 5 mm/s 时,成像耗时约为 10 min。

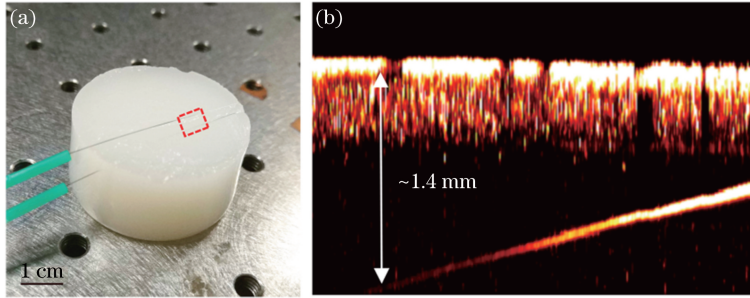


图 3 系统成像深度的测试结果。(a)仿体实物图;(b)光声成像结果

Fig. 3 Imaging depth test results of system. (a) Photo of phantom; (b) photoacoustic imaging result

为了进一步验证高分辨光声显微成像系统对活体微血管的成像性能,选取健康小鼠的耳部血管进行成像实验,结果如图 4 所示。图 4(a)所示为实验小鼠实物图。对成像结果进行深度编码后,得到小鼠耳部血管的光声深度编码图,如图 4(b)所示,其中色度条从下到上表示血管由浅表到深层的分布,血管的有效深度可达 0.46 mm。图 4

(c)所示为图 4(b)中圆框区域的放大图,取白色箭头所指处单根微血管沿虚线方向的光声信号的强度进行高斯拟合,计算得到拟合曲线的 FWHM 为 6.5 μm,如图 4(d)所示,该活体成像的分辨率足够区分单根肿瘤新生血管,使活体小鼠肿瘤血管生成及抗血管治疗效果的连续无标记监测成为可能。

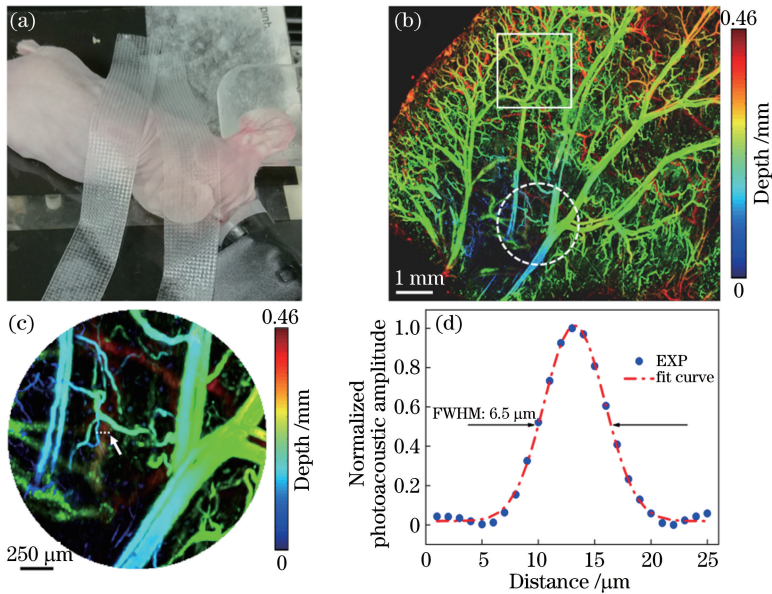


图 4 健康小鼠耳部微血管的高分辨光声显微成像结果。(a)小鼠实物图;(b)小鼠耳部血管深度编码图;(c)图 4(b)中圆框区域的放大图;(d)沿虚线处血管光声信号强度的高斯拟合曲线

Fig. 4 High-resolution photoacoustic microscopic imaging results of micro-vessels in ear of healthy mouse. (a) Photo of mouse; (b) depth-encoded photoacoustic imaging result of ear vessels; (c) enlarged circle area in Fig. 4(b); (d) Gaussian-fitted profile of photoacoustic signal intensity along white line in enlarged area

2.2 基于 3D Hessian 矩阵的血管提取算法

在采集到的光声 3D 体数据中,每一点处的 3D Hessian 矩阵是由 $I(x, y, z, s)$ 的二阶偏导数组成的 3×3 型实对称矩阵,即

$$\nabla^2 I = \begin{bmatrix} \frac{\partial^2 I(x, y, z, s)}{\partial x^2} & \frac{\partial^2 I(x, y, z, s)}{\partial x \partial y} & \frac{\partial^2 I(x, y, z, s)}{\partial x \partial z} \\ \frac{\partial^2 I(x, y, z, s)}{\partial y \partial x} & \frac{\partial^2 I(x, y, z, s)}{\partial y^2} & \frac{\partial^2 I(x, y, z, s)}{\partial y \partial z} \\ \frac{\partial^2 I(x, y, z, s)}{\partial z \partial x} & \frac{\partial^2 I(x, y, z, s)}{\partial z \partial y} & \frac{\partial^2 I(x, y, z, s)}{\partial z^2} \end{bmatrix}, \quad (1)$$

式中: ∇^2 为拉普拉斯算子; $I(x, y, z, s)$ 为 (x, y, z) 处的输入体数据经高斯核函数 $G(x, y, z, s)$ 进行 3D 滤波后的强度值; $s(1 \leq s \leq 9)$ 为高斯核函数的尺度因子,用于消除图像中与噪声相关的高频信

号。Hessian 矩阵的特征值和特征向量可以用来表征数据中血管的强度及走向,计算血管的特征图像,算法的详细介绍可以参考文献[25]。图 5 所示为基于 3D Hessian 矩阵提取血管信号的步骤及结果。图 5(a)所示为血管信号提取算法流程图,具体步骤如下:对原始图像进行去噪等预处理,以增强对血管的识别;然后基于 3D Hessian 矩阵计算得到血管的特征值图,对血管特征值图进行强度变换,使信号较弱的血管强度进一步增强,得到增强的特征值图;最后选取增强特征图中强度值最高的像素点进行区域生长,得到最终的血管提取图。选取图 4(b)中方框内大小为 $400 \text{ pixel} \times 400 \text{ pixel} \times 60 \text{ pixel}$ 的 3D 体数据进行血管提取,与图 5(a)中各步骤相对应的结果如图 5(b)~(e)所示。

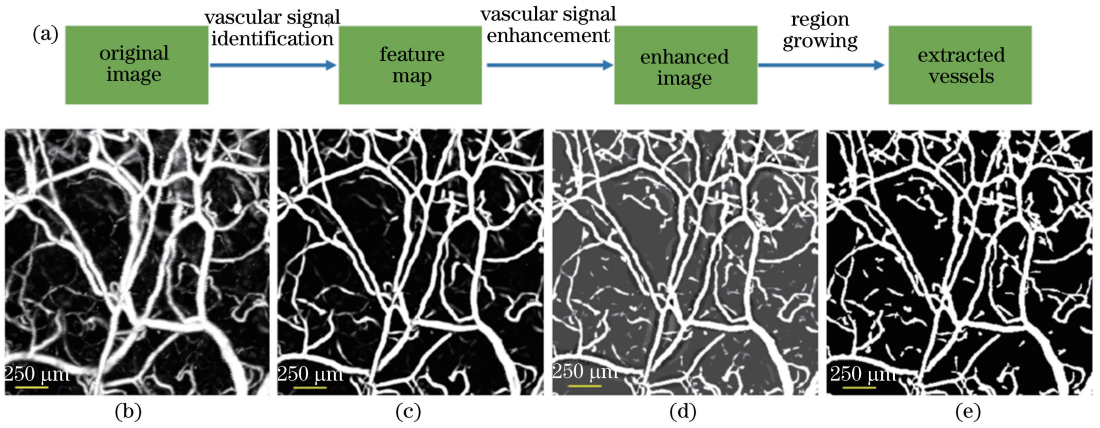


图 5 血管信号的提取步骤及结果。(a)血管信号提取算法流程图;(b)小鼠耳部血管原始图(图 4 方框区域);(c)小鼠耳部血管特征值图;(d)小鼠耳部血管增强图;(e)小鼠耳部血管提取图

Fig. 5 Steps and results of vascular signal extraction. (a) Flowchart of vascular signal extraction algorithm; (b) original image of mouse ear vessels (rectangle area in Fig. 4); (c) feature MAP of mouse ear vessels; (d) enhanced image of mouse ear vessels; (e) extracted vessels of mouse ear

为了阐明 3D Hessian 矩阵血管提取算法较 2D Hessian 矩阵血管提取算法在肿瘤血管提取中的优势,本文选取大小为 $150 \text{ pixel} \times 150 \text{ pixel} \times 80 \text{ pixel}$ 的肿瘤血管区域 3D 数据进行提取对比。图 6(a)所示为小鼠耳部肿瘤血管的光声图,选取的肿瘤血管区域如图 6(a)中的虚线框所示。图 6(b)~(d)分别为选取肿瘤血管区域的放大图、2D Hessian 矩阵血管提取算法的处理结果和 3D Hessian 矩阵血管提取算法的处理结果。如图 6(b)~(d)中箭头所标识的血管所示,3D Hessian 矩阵血管提取算法可以完成精确识别,而 2D Hessian 矩阵算法显然识别不足,由此可以说明 3D Hessian 矩阵血管提取算法在肿瘤血管提取方面的优势。

利用 3D Hessian 矩阵血管提取算法对不同时间点的小鼠肿瘤血管进行提取,可以完成血管密度、弯曲度、直径分布的定量分析,比较各参数的变化。血管密度定义为血管总长度与 3D 数据总体积的比值;血管弯曲度由距离比(DM)、拐点数度量(ICM)、角度和度量(SOAM)3 个参数共同定义,其中 DM 为每条血管段的实际路径长度与血管两端之间的线性距离的比值,ICM 为距离比与每条血管曲线的拐点数的乘积,SOAM 为 3D 曲线所有点的曲率之和与曲线实际长度的比值。血管的直径分布通过提取的血管中心线计算中心线垂线与两侧血管壁边缘交点之间的距离获取。另外,为了评估 3D Hessian 矩阵血管提取算法的准确度,利用商业图像

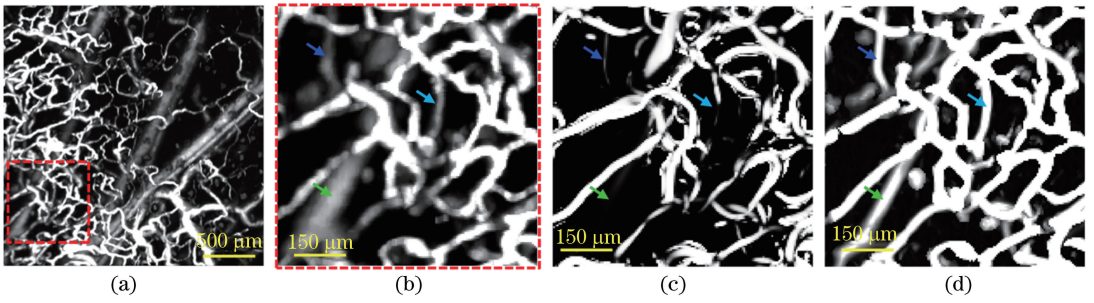


图6 肿瘤血管提取效果的对比。(a)肿瘤血管的光声图;(b)选取肿瘤血管区域的放大图;
(c) 2D Hessian 矩阵算法的处理结果;(d) 3D Hessian 矩阵血管提取算法的处理结果

Fig. 6 Effect comparison of tumor vessel extraction. (a) Photoacoustic image of tumor vessels; (b) enlarged image of red dashed rectangle area in Fig. 6(a); (c) processing result of 2D Hessian matrix algorithm; (d) processing result of 3D Hessian matrix algorithm

处理软件 ImageJ(1.15k 版)在同一图像上对该血管提取算法进行了校准,二者定量结果的相关度较高。算法的所有处理过程均通过 MATLAB 软件(2014a 版)实现。

2.3 小鼠活体实验设计

使用 4~6 周龄、体重为 18~20 g、品系为 Balb/c 的雄性裸鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司)建立小鼠肿瘤模型并进行活体光声成像。使用人源前列腺癌细胞系 C4-2 建立小鼠耳部移植瘤模型,将 C4-2 细胞放入到添加 10%(体积分数)胎牛血清、1%(体积分数)青霉素的 DMEM (Dulbecco's modified eagle medium)培养基中,并置于 37 °C、5%(体积分数)CO₂的环境下培养孵育,在第 0 天完成小鼠耳部正常血管的成像后,将 C4-2 细胞(10⁶个)经由皮下注射至小鼠耳部建模。将荷瘤小鼠随机分为治疗组和正常组,其中:正常组小鼠不进行治疗处理,每 2 天对肿瘤区域进行一次光声显微成像,对肿瘤血管的生成进行连续无标记监测;在第 4 天肿瘤形成后对治疗组小鼠进行成像,随即通过腹腔注射 DC101 药物进行治疗,次日成像,以监测治疗后血管的变化,随后进行治疗,以此类推,连续 3 d 进行成像和治疗。通过血管定量算法对所有采集的数据完成形态学分析,统计血管密度、直径分布和血管弯曲度信息。在光声成像过程中,通过 Matrix VMR 型小动物麻醉机将一定体积分数的异氟烷(3%,用于诱导;1%~2%用于维持)混入氧气(1 L/min)中对实验小鼠实施麻醉,并采用 69002 型体温控制器使小鼠的体温维持在 37 °C。活体成像时,照射在小鼠样本上的单脉冲激光能量约为 200 nJ,计算得到小鼠耳部表皮处相应的光能量密度约为 16 mJ/cm²,符合美国国家标准协会(ANSI)

安全阈值 20 mJ/cm²的要求。实验过程中的所有操作均按照中国科学院深圳先进技术研究院动物研究委员会批准的方案进行。

3 结果与分析

3.1 小鼠肿瘤血管生成的连续无标记监测

利用搭建的高分辨光声显微成像系统,在不依靠外源性造影剂的情况下,每 2 天对小鼠耳部前列腺肿瘤血管早期的生长过程进行监测及定量分析。图 7(a)~(c)所示分别为第 0 天、第 2 天、第 4 天小鼠耳部肿瘤血管的深度编码图,其中肿瘤区域位于图像中间。为了更直观地显示肿瘤血管的浸润深度,利用不同的颜色对不同深度的血管进行编码处理,血管的有效成像深度为 0.62 mm。从图 7(a)~(c)可以清晰地看出,随着肿瘤的产生和发展,第 2 天、第 4 天用蓝色编码的表层肿瘤血管的形态、浸润深度与第 0 天的正常血管区别明显。图 7(d)~(f)所示分别为对应图 7(a)~(c)的基于 3D Hessian 矩阵血管提取算法提取的血管二值图像和血管中心线(蓝色细线)的融合图(详见电子版)。从图 7(d)~(f)可以看出,采用 3D Hessian 矩阵血管提取算法较完整地提取出了肿瘤区域和正常区域的血管脉络,为血管形态学定量分析提供了可靠的依据。图 7(g)~(i)所示分别为第 0 天、第 2 天、第 4 天同一肿瘤区域血管的密度、弯曲度和直径分布的定量分析结果。由图 7(g)可知,血管密度逐渐增加,第 4 天的血管密度为 0.22463,较第 0 天的血管密度 0.16718 约增加了 34.36%。由图 7(h)可知,血管弯曲度参数 DM、ICM 和 SOAM 在肿瘤生长的第 2 天、第 4 天均高于第 0 天。由图 7(i)可知,随着肿瘤的发展,微血管的直径 D_v 逐渐增大, $15 \mu\text{m} < D_v \leq$

30 μm 的血管逐渐减少,30 $\mu\text{m} < D_v \leq 45 \mu\text{m}$ 的血管甚至 $D_v > 45 \mu\text{m}$ 的血管开始增多。该肿瘤血管连续监测的定量数据揭示了肿瘤血管生成过程中形

态的变化情况,各量化参数的变化趋势符合肿瘤血管发展的特点^[26],为后续监测肿瘤血管对抗血管治疗的响应奠定了坚实的基础。

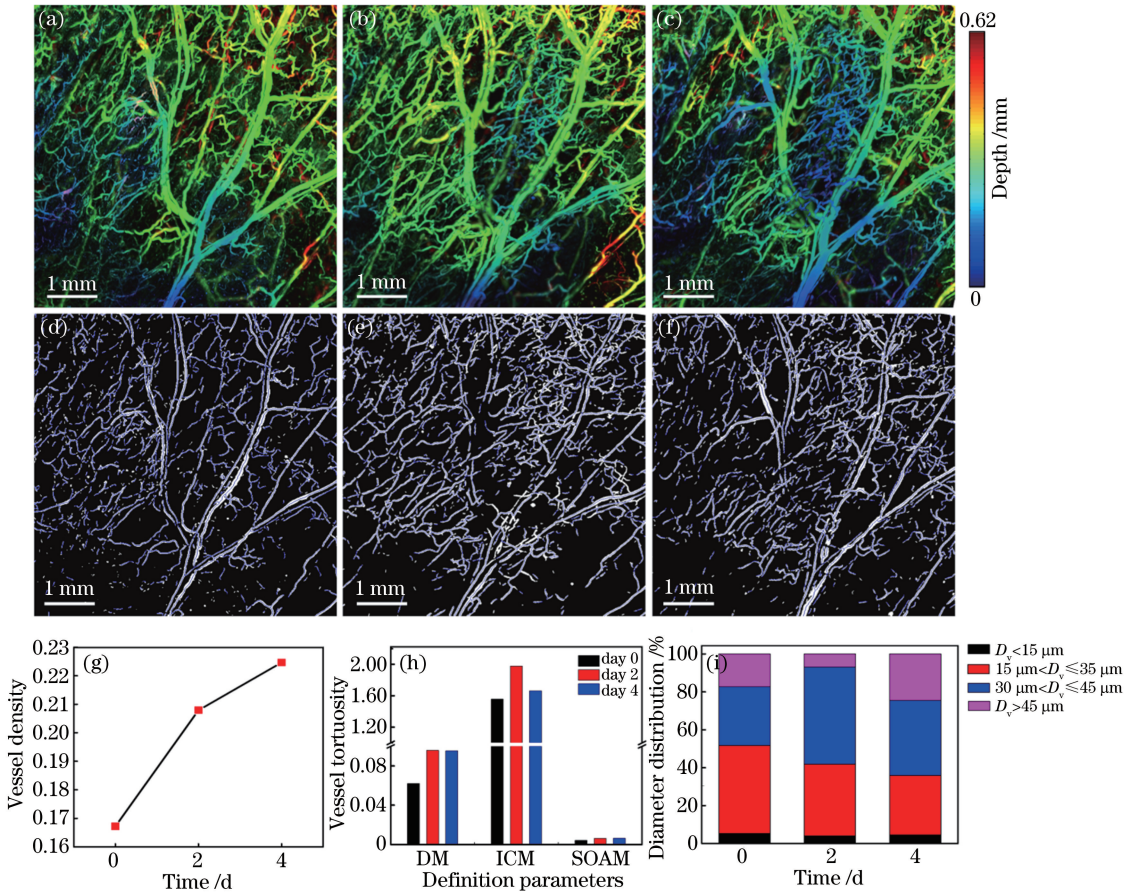


图 7 小鼠肿瘤血管生成的连续无标记监测结果。(a)~(c)第 0 天、第 2 天、第 4 天小鼠耳部肿瘤血管的深度编码图；(d)~(f)对应图 7(a)~(c)的血管提取图；(g)血管密度的定量结果；(h)血管弯曲度的定量结果；(i)血管直径 D_v 分布的定量结果
Fig. 7 Continuous unmarked monitoring results of tumor angiogenesis in ear of mouse. (a)-(c) Depth-encoded photoacoustic imaging results of tumor vessels on day 0, day 2, day 4; (d)-(f) MAPs of extracted vessels corresponding to Figs. 7(a)-(c); (g) quantitative results of vessel density on different days; (h) quantitative results of vessel tortuosity on different days; (i) quantitative results of vessel diameter D_v distribution on different days

3.2 小鼠肿瘤对抗血管治疗的响应监测

研究^[27]表明,与正常区域的血管相比,肿瘤血管结构紊乱无序、形态迂曲、渗透性高,这些特征在阻碍血液和氧供应的同时会影响治疗药物输送到肿瘤细胞。合理使用抗血管生成药物可以在肿瘤消退前促进肿瘤血管趋向正常化,利于药物输送到肿瘤细胞,提高治疗效果^[28]。

为了进一步阐明高分辨光声定量成像在肿瘤抗血管生成治疗监测中的研究意义,在小鼠耳部前列腺肿瘤形成后的第 4 天,采用腹腔注射 DC101 对荷瘤小鼠进行连续 3 d 的药物治理,每天均对肿瘤血管的生长情况进行高分辨光声监测。图 8(a)~(d)所示分别为第 0 天正常耳部血管和该区域第 4 天、

第 5 天、第 6 天肿瘤血管的深度编码图,直观地反映了肿瘤的生长情况,肿瘤内血管的形态随着治疗的进行而逐渐改变直至消退。图 8(e)~(h)所示为对应图 8(a)~(d)的肿瘤血管提取图。根据血管提取图对成像区域的血管进行定量分析可知,第 5 天,即治疗后的第 2 天,肿瘤的整体密度仍然在增大,如图 8(i)所示。但是肿瘤内部正常化的血管开始增多,如图 8(c)所示。该时间窗口利于药物输送到肿瘤内部增强治疗效果,继续进行抗血管治疗后,肿瘤血管密度在第 6 天较治疗开始(第 4 天)时降低了 21.91%,如图 8(i)所示。血管弯曲度的各项指标(DM、ICM、SOAM)随着治疗的进行均呈下降的趋势,如图 8(j)所示。图 8(k)所示为血管直径分布的

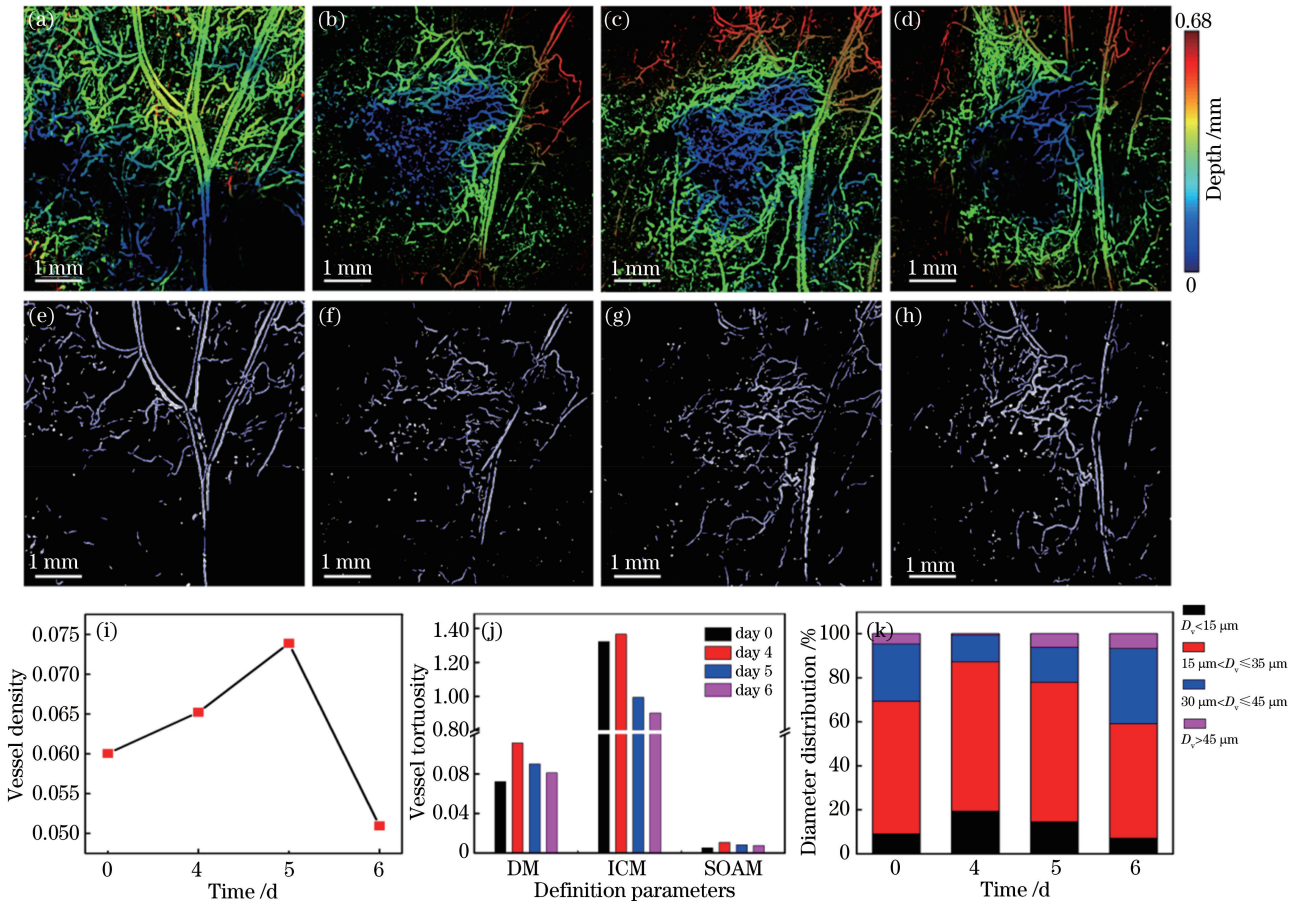


图 8 小鼠肿瘤血管对抗血管治疗响应的连续无标记监测结果。(a)~(d)第 0 天、第 4 天、第 5 天、第 6 天小鼠耳部肿瘤血管的深度编码图;(e)~(h)对应图 8(a)~(d)的血管提取图;(i)血管密度的定量结果;(j)血管弯曲度的定量结果;(k)血管直径 D_v 分布的定量结果

Fig. 8 Continuous unmarked monitoring changes of mouse tumor vessels response to anti-angiogenic therapy. (a)-(d) Depth encoded photoacoustic imaging results of tumor vessels on day 0, day 4, day 5, day 6; (e)-(h) MAPs of extracted vessels corresponding to Figs. 8(a)-(d); (i) quantitative results of vessel density on different days; (j) quantitative results of vessel tortuosity on different days; (k) quantitative results of vessel diameter D_v distribution on different days

定量结果,可以看出,抗血管治疗对肿瘤微细血管(直径 $D_v \leq 15 \mu\text{m}$)的阻断效果显著, $30 \mu\text{m} < D_v \leq 45 \mu\text{m}$ 和 $D_v > 45 \mu\text{m}$ 的血管在治疗过程中呈逐渐增多的趋势,在一定程度上说明肿瘤血管在逐渐向正常化方向发展。

4 结 论

本文提出了一种适用于肿瘤血管无标记监测的高分辨率声定量成像方法,利用波长为 532 nm 的激光作为激发光源,实现了仿体和活体小鼠单根血管的高分辨光声显微成像,横向分辨率分别达到 $3.8 \mu\text{m}$ 和 $6.5 \mu\text{m}$,并且完成了小鼠耳部前列腺移植瘤血管生成以及肿瘤对抗血管治疗响应的连续无标记监测。将基于 3D Hessian 矩阵的血管提取算法

首次应用于肿瘤血管的提取,定量分析了肿瘤血管形态的变化过程。结果表明,肿瘤血管的生成伴随着血管密度、弯曲度、直径的显著增加,采用抗血管药物治疗肿瘤时,血管形态参数趋向于正常化,该研究为肿瘤抗血管生成治疗及其他以血管变化为病理特征的应用研究提供了一种新途径。

参 考 文 献

- [1] Denekamp J. Inadequate vasculature in solid tumours: consequences for cancer research strategies [J]. *BJR Supplement*, 1992, 24: 111-117.
- [2] Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors [J]. *Annals of Surgery*, 1972, 175(3): 409-416.
- [3] O'Connor B, Jackson A, Parker M, *et al.* DCE-MRI

- biomarkers in the clinical evaluation of antiangiogenic and vascular disrupting agents[J]. *British Journal of Cancer*, 2007, 96(2): 189-195.
- [4] Haubner R, Beer A J, Wang H, *et al.* Positron emission tomography tracers for imaging angiogenesis [J]. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2010, 37(S1): 86-103.
- [5] Kiessling F, Greschus S, Lichy M P, *et al.* Volumetric computed tomography (VCT): a new technology for noninvasive, high-resolution monitoring of tumor angiogenesis [J]. *Nature Medicine*, 2004, 10(10): 1133-1138.
- [6] Ferrara K W, Merritt C R B, Burns P N, *et al.* Evaluation of tumor angiogenesis with US: imaging, Doppler, and contrast agents [J]. *Academic Radiology*, 2000, 7(10): 824-839.
- [7] Wang L V, Hu S. Photoacoustic tomography: *in vivo* imaging from organelles to organs[J]. *Science*, 2012, 335(6075): 1458-1462.
- [8] Maslov K, Zhang H F, Hu S, *et al.* Optical-resolution photoacoustic microscopy for *in vivo* imaging of single capillaries [J]. *Optics Letters*, 2008, 33(9): 929-931.
- [9] Chen Z J, Yang S H, Xing D. Progress and application of photoacoustic microscopy technique [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2018, 45(3): 0307008.
陈重江, 杨思华, 邢达. 光声显微成像技术研究进展及其应用[J]. *中国激光*, 2018, 45(3): 0307008.
- [10] Oladipupo S, Hu S, Kovalski J, *et al.* VEGF is essential for hypoxia-inducible factor-mediated neovascularization but dispensable for endothelial sprouting[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(32): 13264-13269.
- [11] Oladipupo S S, Hu S, Santeford A C, *et al.* Conditional HIF-1 induction produces multistage neovascularization with stage-specific sensitivity to VEGFR inhibitors and myeloid cell independence[J]. *Blood*, 2011, 117(15): 4142-4153.
- [12] Laufer J, Johnson P, Zhang E, *et al.* *In vivo* preclinical photoacoustic imaging of tumor vasculature development and therapy[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2012, 17(5): 056016.
- [13] Ruan Q, Xi L, Boye S L, *et al.* Development of an anti-angiogenic therapeutic model combining scAAV2-delivered siRNAs and noninvasive photoacoustic imaging of tumor vasculature development[J]. *Cancer Letters*, 2013, 332(1): 120-129.
- [14] Jathoul A P, Laufer J, Ogunlade O, *et al.* Deep *in vivo* photoacoustic imaging of mammalian tissues using a tyrosinase-based genetic reporter[J]. *Nature Photonics*, 2015, 9(4): 239-246.
- [15] Valluru K S, Willmann J K. Clinical photoacoustic imaging of cancer [J]. *Ultrasonography*, 2016, 35(4): 267-280.
- [16] Wang Y T, Xu D, Yang S H, *et al.* Toward *in vivo* biopsy of melanoma based on photoacoustic and ultrasound dual imaging with an integrated detector [J]. *Biomedical Optics Express*, 2016, 7(2): 279-286.
- [17] Yang J, Zhang G, Li Q Q, *et al.* Photoacoustic imaging for the evaluation of early tumor response to antivascular treatment [J]. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*, 2019, 9(2): 160-170.
- [18] Zhang H F, Maslov K, Stoica G, *et al.* Functional photoacoustic microscopy for high-resolution and noninvasive *in vivo* imaging [J]. *Nature Biotechnology*, 2006, 24(7): 848-851.
- [19] Lin R, Chen J, Wang H, *et al.* Longitudinal label-free optical-resolution photoacoustic microscopy of tumor angiogenesis *in vivo* [J]. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*, 2015, 5(1): 23-29.
- [20] Bi R Z, Balasundaram G, Jeon S, *et al.* Photoacoustic microscopy for evaluating combretastatin A4 phosphate induced vascular disruption in orthotopic glioma [J]. *Journal of Biophotonics*, 2018, 11(10): e201700327.
- [21] Wu H Q, Wang H Y, Xie W M, *et al.* Potential applications of photoacoustic imaging in early cancer diagnosis and treatment[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2019, 56(7): 070001.
吴华钦, 王昊宇, 谢文明, 等. 光声成像技术在早期癌症检测治疗中的潜在应用[J]. *激光与光电子学进展*, 2019, 56(7): 070001.
- [22] Yang Z Y, Chen J H, Yao J J, *et al.* Multi-parametric quantitative microvascular imaging with optical-resolution photoacoustic microscopy *in vivo* [J]. *Optics Express*, 2014, 22(2): 1500-1511.
- [23] Meiburger M, Nam Y, Chung E, *et al.* Skeletonization algorithm-based blood vessel quantification using *in vivo* 3D photoacoustic imaging [J]. *Physics in Medicine and Biology*, 2016, 61(22): 7994-8009.
- [24] Li Q, Li L, Yu T H, *et al.* Vascular tree extraction for photoacoustic microscopy and imaging of cat primary visual cortex [J]. *Journal of Biophotonics*, 2017, 10(6/7): 780-791.
- [25] Zhao H, Wang G, Lin R, *et al.* Three-dimensional Hessian matrix-based quantitative vascular imaging of rat iris with optical-resolution photoacoustic

- microscopy *in vivo* [J]. Journal of Biomedical Optics, 2018, 23(4): 046006.
- [26] Jain R K. Barriers to drug delivery in solid tumors [J]. Scientific American, 1994, 271(1): 58-65.
- [27] Baish J W, Jain R K. Fractals and cancer [J]. Cancer Research, 2000, 60(14): 3683-3688.
- [28] Jain R K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy [J]. Science, 2005, 307(5706): 58-62.