

光声分子影像

李长辉¹ 叶硕奇^{1,2} 任秋实¹

(¹ 北京大学工学院生物医学工程系, 北京 100871; ² 上海交通大学生物医学工程系, 上海 200240)

摘要 光声分子影像是近期发展起来的新型无创在体影像技术。该技术结合了光声层析成像和分子影像, 具有成像深度深、分辨率高和特异性强的优点。光声分子影像已经被广泛用于活体动物实验中, 在对一些恶性肿瘤和炎症的检测中获得了令人振奋的结果。重点介绍了光声分子影像的机制和研究现状, 并对其应用前景进行展望。

关键词 生物医学成像; 分子影像; 光学成像; 光声层析成像; 无创成像

中图分类号 R318 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/LOP48.051701

Photoacoustic Molecular Imaging

Li Changhui¹ Ye Shuoqi^{1,2} Ren Qiushi¹

(¹ Department of Biomedical Engineering, Peking University, Beijing 100871, China
² Department of Biomedical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract Photoacoustic molecular imaging, by combining the photoacoustic tomography and molecular imaging, is a novel biomedical imaging modality that can image tissue non-invasively and in vivo. This modality has high imaging depth, resolution, and specificity. Photoacoustic molecular imaging has been widely used in animal experiments, achieving many promising results. We describe the fundamental mechanism of this modality, review its current research activities, and discuss its prospects.

Key words biomedical imaging; molecular imaging; optical imaging; photoacoustic tomography; non invasive imaging

OCIS codes 170.7170; 170.3880; 170.5120

1 引言

分子影像结合了生物分子技术和现代影像手段, 能对生理病理过程进行分子和细胞层次上的影像研究。和其他现代影像手段相比, 分子影像有着高度的灵敏性和特异性, 对多种重大疾病(例如癌症)的早期诊断有着重要的意义。随着生物技术、影像技术、化学、工程等技术的发展, 分子影像开始被广泛地应用于生命过程的研究和疾病的临床诊断。目前主要手段包括核磁分子影像(MRI)、正电子发射层析成像(PET)、单光子发射层析成像(SPET)、光学分子影像等。

与 MRI、PET 和 SPET 等技术相比, 基于光学的分子影像具有灵敏度高、特异性强、费用低、无辐射危害等优点。纯光学的分子影像技术主要依赖于可以激发荧光或者拉曼光的分子探针, 通过探测激发出的荧光或拉曼光来研究生物化学反应过程。由于人体组织通常对光有强烈的散射, 这使得基于纯光学分子影像技术绝大时候只能在组织表面浅层(约 1 mm)内获得较高的分辨率。最近十几年发展起来的光声层析成像(PAT)为突破高分辨纯光学成像在深度上的壁垒提供了强有力的工具, 而结合 PAT 和分子影像的光声分子影像也在过去几年的研究中获得了巨大的成功。本文对光声分子影像的成像机制和特色做了阐述, 介绍了现有的研究进展和面临的挑战, 并进行总结和讨论。

收稿日期: 2010-07-22; **收到修改稿日期**: 2010-12-09

基金项目: Wallace H. Coulter GT/Emory-RKU BME Collaborative Research Seed Grant Program

作者简介: 李长辉(1974—), 男, 研究员, 博士生导师, 主要从事生物医学光学成像方面的研究。

E-mail: changhui.li@pku.edu.cn

本文电子版彩色效果请详见中国光学期刊网(<http://www.opticsjournal.net>)

2 光声层析成像机制

1880年A. G. Bell发现的光声效应^[1]描述的是某些对光吸收的物质在受到非稳恒电磁波照射时会产生声波的现象。尽管光声效应一百多年前就被发现,但直到20世纪60~70年代,随着激光技术的出现才开始广泛地应用于物理、化学和生物医学领域^[2~4]。由于存在血液、黑色素等光吸收物质,组织吸收了非稳恒的电磁辐射能量后产生非稳恒的热膨胀,从而在周围介质中产生向外传播的机械压力波^[5~7]。基于这种机制,从20世纪90年代开始,多位研究人员开展了一系列的利用光声效应来对生物组织成像的前期研究,为光声层析成像奠定了理论和实验基础^[8~11]。在实际应用中,PAT一般采用短脉冲的激光或微波为照射源。当生物体中具有电磁波吸收的组织(如血红蛋白)吸收照射能量之后,会引起局部瞬间升温 and 热膨胀,从而产生向外发射的超声波。PAT通过在体外多点探测产生的超声波可以重建吸收体的位置和形态。由于每个电磁脉冲的时间非常短,照射期间的热扩散效应可以忽略不计。在这种近似条件下,光声效应在声学性质均匀的介质内产生和传播超声波的过程可以用波动方程来描述^[12,13]

$$\nabla^2 p(\mathbf{r}, t) - \frac{1}{v_s^2} \frac{\partial^2 p(\mathbf{r}, t)}{\partial t^2} = -\frac{\beta}{C_p} \frac{\partial H(\mathbf{r}, t)}{\partial t}, \quad (1)$$

式中 p 为超声波压强, β 为等体积膨胀系数, v_s 为声速, C_p 是生物组织的等压比热容, $H(\mathbf{r}, t)$ 是指在位置 \mathbf{r} 处、时刻 t 的局部加热函数。电磁波对组织的加热取决于照射强度、组织对电磁波的吸收系数、电导系数等因素,具体表达参考文献[6和14]。(1)式的解给出在位置 \mathbf{r} 、时刻 t 产生的超声波压强为

$$p(\mathbf{r}, t) = \frac{\beta}{4\pi C_p} \frac{\partial}{\partial t} \int d\mathbf{r}' \frac{1}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} H\left(\mathbf{r}', t - \frac{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|}{v_s}\right). \quad (2)$$

当前光声分子影像中用到的照射源主要是激光,除非特别指出,本文中提到的电磁波都默认为光波(波长范围从可见光到近红外)。激光技术和超声探测技术的发展使得PAT中的光照强度可以控制在安全的范围以内,从而实现无创无损成像。

如前所述,由于组织对光的强散射,纯光学成像方法的分辨率随着成像深度的增加而迅速降低。一般基于探测红外或者更短波长光的光学成像只能对大约人体皮下1 mm以内的组织进行高分辨率成像。另一方面,人体软组织(如皮肤、肌肉和脂肪)对超声的散射比对光的小大约2个数量级,因而超声能对深达内脏器官的组织进行高分辨成像。PAT探测脉冲光激发的超声波,利用了超声探测的优点,从而能对更深组织高分辨率成像。PAT基于组织或对比剂对光波的吸收发热效应。生物体内的光吸收体包括组织内的血液、黑色素和水,也包括由外界引入的纳米粒子和染料剂等。由于光吸收特性与物质分子结构和形态紧密相关(例如人的氧合血红蛋白和脱氧血红蛋白有着截然不同的光学吸收特性),PAT不仅能对组织结构成像,也可用于功能成像。

PAT结合了光学吸收衬度和超声探测,形成一种独特的成像手段。经过十多年的研究,PAT已经发展出了多种成像方式。基于对超声信号的探测方式和对重建算法的依赖不同,PAT可以被分成光声计算层析成像(PACT)、光声显微成像(PAM)以及基于超声透镜的光声层析成像^[6,7]。各种PAT技术有自己的特点与使用环境。PAT已成为目前国际上生物医学成像领域发展最快的成像机制之一。在我国,华南师范大学、华中科技大学和北京大学等研究机构也相继开展了对PAT的实验研究^[15~21],技术细节可以参考文献[6,7,22,23]。

3 基于光声效应的分子影像

光声分子影像把分子影像和PAT结合起来,从影像学上通过对带有分子探针的光声对比剂成像,研究分子和细胞层次上的生理病理过程。由于目前采用的分子探针本身通常并不是好的光学吸收体,光声分子影像主要利用生物化学的方法把分子探针(例如抗体蛋白)和光学吸收体结合起来(例如染料分子或者纳米粒子)[图1(a)]。基于配体-受体机制,合成的光声分子影像对比剂注入生物体内后,通过分子探针和靶分子的结合使得光学吸收体聚集在靶向分子所在的位置。在随后的光声层析成像中,通过获取绑定的光学吸收体分布,就可以获得靶向分子的在体分布,实现分子影像的目的。图1(a)表示光声分子影像对比剂的合成;图1(b)表示注入带有分子探针的对比剂后,由于分子探针和靶向分子的结合,导致对比剂聚集在肿瘤细胞或其他带有靶向分子的组织内。PAT对光吸收对比剂分布的成像也就反映了靶向分子的在体分布。

3.1 光声分子影像对比剂

到目前为止,已经有多种光学吸收体,包括金属纳米颗粒、碳纳米材料和染料等,被成功地用于合成光声分子影像对比剂,研究包括肿瘤和炎症等生理病理过程^[24~30]。下面介绍主要的几种成像对比剂。

1) 金属纳米粒子

金属纳米粒子由于表面等离子体效应,对特定的光波有着强吸收效应。通过改变纳米粒子的大小和形状,吸收峰的波长在可见光到红外光范围内可调。在所有金属纳米粒子中,金纳米粒子除了强光吸收特性外,还具有优越的生物相容性和表面修饰性,便于实现和分子探针相结合,从而是制备多种光声分子影像剂的重要材料。金纳米粒子主要采用聚乙二醇(PEG)修饰纳米颗粒表面,达到延长循环和生物降解过程、便于绑定分子探针的目的。目前在光声分子影像中可以用到的已经绑定分子探针的金纳米粒子包括:金纳米笼(GNC),金纳米棒,金纳米壳等。例如,边长大约是 36 nm 的 GNC 的吸收峰可以调到 800 nm,通过 PEG 修饰后,它已经成功地绑定了针对乳腺癌 HER2 受体的抗体蛋白 anti-HER2^[31]。

2) 碳纳米粒子

除了金属纳米粒子外,碳纳米粒子也展现出光吸收的优越性质。目前,已经有几种单壁碳纳米管(SWNT)被用于 PAT 成像。例如图 2(从 Macmillan 出版社获得版权^[25])所示, A. De La Zerda 等^[25]把 Arg-Gly-Asp (RGD)和直径为 1~2 nm、长度是 50~300 nm 的单壁碳纳米管结合成光声分子影像对比剂,用于探测活体小鼠体内 U87MG 肿瘤。肿瘤部位会分泌过量的 $\alpha_v\beta_3$ 整联蛋白,SWNT 绑定了(精-甘-天冬氨酸)基序环肽(RGD 肽)用于整联蛋白的配体。浓度是 1.2 $\mu\text{mol/L}$ 的对比剂通过尾部静脉注射入小鼠体内。在 2 只小鼠上分别注射了不加分子探针的碳纳米管(Plain SWNT)和加了分子探针的靶向碳纳米管(SWNT-RGD),通过实验比较光声层析成像结果的差别。结果表明,分子探针使得作为光吸收体的碳纳米管显著地聚集在肿瘤发生部位。图 2 表示用单壁碳纳米管靶向活体老鼠中的肿瘤用超声(灰度)和光声(绿色)两种模式对肿瘤的 1 个纵切面成像(标注为白点处)。超声图像给出了皮肤和肿瘤边界。最后 2 张是用注射对比剂 4 h 后的图像减去注射之前的图像相减的结果。在注射未结合探针的碳纳米管小鼠模型中有 1 个强光声信号源(白色箭头指示的位置),但它没有在相减图像的结果中显示,这表明这个信号源很可能是一个大血管,光声信号来源于血液而不是 CNTs。

3) 天然或人工的染料分子

除了纳米粒子,一些天然或人工合成的染料分子作为光吸收体也被用于光声分子影像中。例如 M. L. Li 等^[29]绑定染料 ICG 的水溶性衍生物 IRDye 800-NHS 和针对 $\alpha_v\beta_3$ 整联蛋白的分子探针 cyclic peptide cyclo (Lys-Arg-Gly-Asp-Phe),合成出 IRDye800-c(KRGDf) 光声分子影像对比剂。由于 IRDye800 在 800 nm 有个光吸收峰,这种对比剂已经被成功地用于研究小鼠恶性肿瘤诱发的血管增生现象。另一方面,ICG 同时有荧光效应,IRDye800-c(KRGDf) 也可以用于荧光分子影像,是多模态分子影像的共同造影剂。

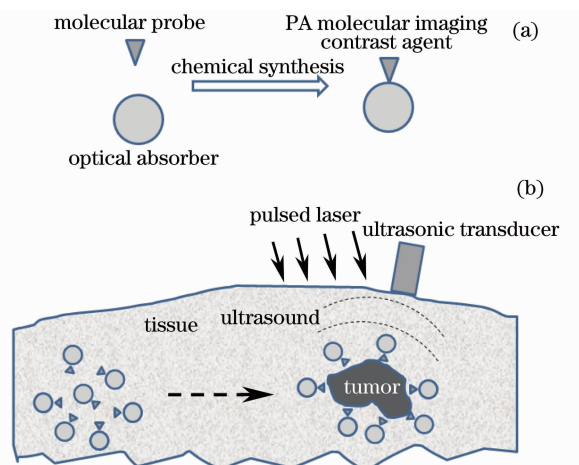


图 1 光声分子影像机制

Fig. 1 Mechanism of photoacoustic molecular imaging

图 2 单壁碳纳米管靶向肿瘤的纵切面成像图

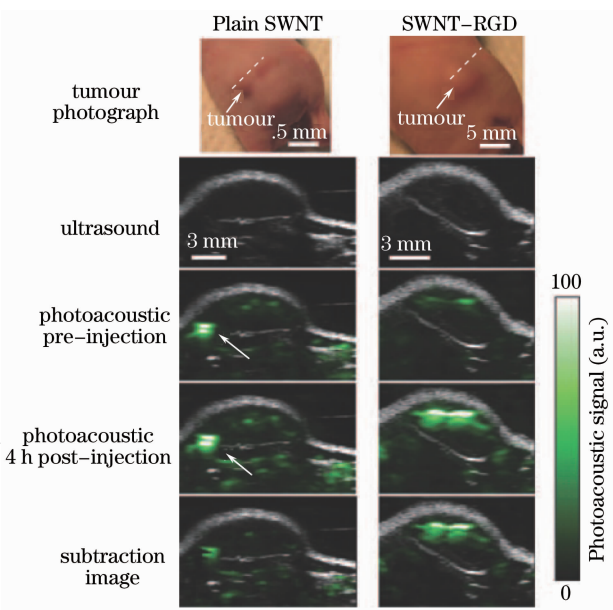


图 2 单壁碳纳米管靶向肿瘤的纵切面成像图

Fig. 2 Single-walled carbon nanotube targets tumor images of one vertical slice

除了前面介绍的3种通过绑定分子探针和光学吸收体的方法外,还有一种通过利用化学反应改变对比剂光吸收特性的方式实现光声分子影像。这种方法的主要原理是针对特定的生物化学反应过程,结果是把原本光吸收比较弱的对比剂转化成强吸收物,从而可以被PAT成像。例如,Dr. Li等^[32]在研究LacZ基因表达中,采用5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-gal)试剂作对比剂。在LacZ基因表达前,X-gal是无色透明的试剂。然而X-gal和LacZ基因表达产生的 β -半乳糖苷酶产物会发生化学反应,转化为对红光强吸收的深蓝色物质。实验中采用650 nm的激光作光源,PAT图像显示只有在肿瘤区域,X-gal才转换为红光吸收体,这与随后的解剖结果相一致。

光声分子影像由于结合了光学和超声的特点,在成像深度上相对其他光学方法有显著的优越性。近些年,光声分子影像获得了巨大的发展,成为国际上重要的前沿研究课题。我国也开始这方面的研究,其中南师范大学的L. Z. Xiang等^[26]通过绑定抗体和单壁碳纳米管制作对比剂,用于研究活体小鼠中的U87肿瘤。

3.2 光声分子影像的特点与面临的挑战

前面介绍了光声分子影像的成像机制和研究动态。和其他基于纯光学的分子影像技术相比,光声分子影像继承了光学衬度和超声探测的特点,主要有

1)光声分子影像反映了组织或对比剂在光学吸收上的差异。

2)它能对深层的组织进行三维成像。光声分子影像探测的是超声波,而超声波在软组织中的散射远小于光。

3)它可以避开光致漂白的问题。光声分子影像基于对比剂对光的吸收后的热效应,不依赖于荧光效应。

4)和超声成像一样,光声分子影像不能对组织空腔或者骨骼后面的区域成像。

尽管光声分子影像能够突破现有的高分辨率光学分子影像的深度壁垒,但它在临床应用上也面临很大的挑战,主要集中在以下3个方面

1)成像灵敏度。由于组织本身有内在的光吸收体(例如血液),光声分子影像中往往要求对比剂产生的光声信号大于内在组织的光声信号。基于目前用到的光吸收体,光声分子影像的对比剂注入剂量通常比荧光分子影像需要的大1个数量级以上。而高浓度的对比剂有可能影响生物组织的生理病理过程。因而,研发有更高光吸收能力的对比剂对光声分子影像非常重要。

2)安全性。目前在动物实验上较为成功的光声分子影像对比剂大多用到纳米粒子。不仅金属纳米粒子很多都存在重金属生物毒性,碳纳米管的生物毒性也在研究,而且天然或人工的染料也会带有毒性。另外,目前用到的纳米粒子体积比较大(尺寸一般都大于10 nm),这使得纳米粒子往往会在肝、脾等重要部位聚集不宜被生物体代谢排出。降低纳米粒子或染料的生物毒性,让对比剂最终能被动物分解为无害物质或排出体外,也是重要的研究课题。

3)纳米粒子的体积。除了直接的病变部位局域注射外,分子影像一般都是通过静脉注射或其他方法让对比剂通过循环系统到达病变部位。然而现有的用于光声分子影像的纳米粒子尺度使得其难以穿透正常循环系统的外壁,从而在没有破坏或改变循环系统结构的情况下,使得对比剂难以到达某些病变组织(例外,恶性肿瘤破坏了局域的循环系统结构,为纳米粒子的到达开了“窗口”)。制作更小体积,并同时能保留其对可见光到红外光有强吸收的纳米粒子是解决这个问题的有效手段。

4 结 论

介绍了近期发展起来的光声分子影像。由于采用了结合光学对比和超声探测的混合技术,光声分子影像可以在保持高空间分辨率的同时对更深的活体组织进行成像,这是相对于纯光学手段不可比拟的优势。尽管光声分子影像在活体动物上取得了成功,为了推动光声分子影像在临床上的应用,不仅需要开发更多更有效的对比剂,也需要研发更灵敏的宽带超声换能器阵列。此外,尽管现有的光声分子影像只用到激光,由于人体对微波的某些波段几乎透明或半透明,研发对这些波段的微波强吸收的分子影像对比剂,将极大地拓展光声分子影像的应用范围。相信光声分子影像将成为分子影像中的重要组成部分,其在某些重大疾病(例如乳腺癌、皮肤癌)上的早期诊断具有巨大的应用前景。

参 考 文 献

- 1 A. G. Bell. On the production of sound by light[J]. *American J. Science*, 1880, **20**: 305~324
- 2 L. B. Kreuzer. Ultralow gas concentration infrared absorption spectroscopy [J]. *J. Appl. Phys.*, 1971, **42**(7): 2934~2943
- 3 A. Rosencwaig. Photoacoustics and Photoacoustic Spectroscopy[M]. Chemical Analysis New York: Wiley, 1980
- 4 V. E. Gusev, A. A. Karabutov, K. Hendzel. Laser Optoacoustics[M]. AIP Press, 1993
- 5 L. V. Wang, H. I. Wu. Biomedical Optics: Principles and Imaging[M]. Hoboken, N. J. : Wiley, 2007
- 6 C. Li, L. V. Wang. Photoacoustic tomography and sensing in biomedicine[J]. *Physics in Medicine and Biology*, 2009, **54**(19): R59~R97
- 7 M. Xu, L. V. Wang. Photoacoustic imaging in biomedicine [J]. *Review of Scientific Instruments*, 2006, **77**(4): 41101~41122
- 8 R. A. Kruger. Photoacoustic ultrasound[J]. *Medical Physics*, 1994, **21**(1): 127~131
- 9 A. A. Karabutov, N. B. Podymova, V. S. Letokhov. Time-resolved laser optoacoustic tomography of inhomogeneous media[J]. *Appl. Phys. B-Lasers Opt.*, 1996, **63**(6): 545~563
- 10 A. A. Oraevsky, S. L. Jacques, R. O. Esenaliev. Optoacoustic imaging for medical diagnosis [P]. 1996, 5, 840, 023
- 11 L. H. V. Wang, X. M. Zhao, H. T. Sun *et al.*. Microwave-induced acoustic imaging of biological tissues[J]. *Review of Scientific Instruments*, 1999, **70**(9): 3744~3748
- 12 P. M. Morse, K. U. Ingard. Theoretical Acoustics[M]. Princeton, New Jersey: Princeton University Press, 1986, 927
- 13 G. J. Diebold, T. Sun, M. I. Khan. Photoacoustic monopole radiation in 1-dimension, 2-dimension, and 3-dimension[J]. *Physical Review Letters*, 1991, **67**(24): 3384~3387
- 14 C. H. Li, M. Pramanik, G. Ku *et al.*. Image distortion in thermoacoustic tomography caused by microwave diffraction[J]. *Physical Review E*, 2008, **77**(3): 031923
- 15 X. Yang, X. Cai, K. Maslov *et al.*. High-resolution photoacoustic microscope for rat brain imaging in vivo[J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2010, **8**(6): 609~611
- 16 Yuan Yi, Xiang Liangzhong. Progress on photoacoustic structural and functional Imaging[J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2009, **18**(2): 281~284
袁 毅, 向良忠. 光声结构与功能成像技术研究进展[J]. *激光生物学报*, 2009, **18**(2): 281~284
- 17 G. Z. Yin, D. Xing, S. H. Yang. Dynamic monitoring of blood oxygen saturation in vivo using double-ring photoacoustic sensor[J]. *J. Appl. Phys.*, 2009, **106**(1): 013109
- 18 C. Zhang, Y. Y. Wang. Deconvolution reconstruction of full-view and limited-view photoacoustic tomography: a simulation study[J]. *Journal of the Optical Society of America a-Optics Image Science and Vision*, 2008, **25**(10): 2436~2443
- 19 H. Wang, D. Xing, L. Z. Xiang. Photoacoustic imaging using an ultrasonic Fresnel zone plate transducer[J]. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 2008, **41**(9): 095111
- 20 D. W. Yang, D. Xing, H. M. Gu *et al.*. Fast multielement phase-controlled photoacoustic imaging based on limited-field-filtered back-projection algorithm[J]. *Appl. Phys. Lett.*, 2005, **87**(19): 194101
- 21 Xing Da, Xiang Liangzhong. Photoacoustic imaging technique of tissue and its applications in biomedicine[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2007, **44**(8): 26~33
邢 达, 向良忠. 生物组织的光声成像技术及其在生物医学中的应用[J]. *激光与光电子学进展*, 2007, **44**(8): 26~33
- 22 L. V. Wang. Multiscale photoacoustic microscopy and computed tomography[J]. *Nat. Photonics*, 2009, **3**(9): 503~509
- 23 S. K. Patch, O. Scherzer. Photo- and thermo-acoustic Imaging[J]. *Inverse Problems*, 2007, **23**(6): S1~S10
- 24 A. A. Oraevsky, S. A. Ermilov, M. A. Eghtedari *et al.*. Molecular imaging in the mouse model of breast cancer based on optical illumination and ultrasonic detection[J]. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2007, **106**: S77~S78
- 25 A. De La Zerda, C. Zavaleta, S. Keren *et al.*. Carbon nanotubes as photoacoustic molecular imaging agents in living mice [J]. *Nat. Nanotechnol.*, 2008, **3**(9): 557~562
- 26 L. Z. Xiang, Y. Yuan, D. Xing *et al.*. Photoacoustic molecular imaging with antibody-functionalized single-walled carbon nanotubes for early diagnosis of tumor[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2009, **14**(2): 021008
- 27 Q. Zhang, N. Iwakuma, P. Sharma *et al.*. Gold nanoparticles as a contrast agent for in vivo tumor imaging with photoacoustic tomography[J]. *Nanotechnology*, 2009, **20**(39): 8
- 28 J. W. Kim, E. I. Galanzha, E. V. Shashkov *et al.*. Golden carbon nanotubes as multimodal photoacoustic and photothermal high-contrast molecular agents[J]. *Nat. Nanotechnol.*, 2009, **4**(10): 688~694

- 29 M. L. Li, J. T. Oh, X. Y. Xie *et al.*. Simultaneous molecular and hypoxia imaging of brain tumors in vivo using spectroscopic photoacoustic tomography[C]. *Proceedings of the IEEE*, 2008. 481~489
- 30 D. L. Chamberland, A. Agarwal, N. Kotov *et al.*. Photoacoustic tomography of joints aided by an Etanercept-conjugated gold nanoparticle contrast agent anexvivo preliminary rat study[J]. *Nanotechnology*, 2008, **19**(9): 095101
- 31 J. Chen, F. Saeki, B. J. Wiley *et al.*. Gold nanocages; Bioconjugation and their potential use as optical imaging contrast agents[J]. *Nano Lett.*, 2005, **5**(3): 473~477
- 32 L. Li, R. J. Zemp, G. Lungu *et al.*. Photoacoustic imaging of lacZ gene expression in vivo[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2007, **12**(2): 020504