

文章编号: 0253-2239(2004)10-1437-4

在体监测吲哚氰绿在肿瘤中引起的 X 射线衰减*

叶 昶 骆清铭** 梁文锡 陆锦玲

(华中科技大学生物医学光子学教育部重点实验室, 武汉 430074)

摘要: 介绍了在体观测肿瘤内注射吲哚氰绿(ICG),一种激光吸收染料前后 X 射线衰减的实验结果。实验采用已种植两周的骨髓瘤细胞(SP2/0),质量为 15~20 g 的 BALB/c 小鼠作为动物模型,采用数字 X 射线成像系统作为监测药物在肿瘤内扩散的机制。系统工作在 33 kVp,0.3 mA 下,曝光时间 4 s,采用 1.5×放大倍率。实验研究的是通过灰度值反应出不同区域的 X 射线衰减,和周围正常组织和图像中没有物体的背景区域相比较,注射 ICG 前后肿瘤内的灰度值发生了明显的变化。实验证明,使用数字 X 射线成像系统能够动态、有效、非侵入地监测 ICG 在肿瘤组织内的扩散,从而达到优化治疗结果的作用。

关键词: X 射线光学; 在体监测; X 射线衰减; 数字 X 射线成像; 吲哚氰绿

中图分类号: Q81; R8 文献标识码: A

In Vivo Observing X-Ray Attenuation of Intratumor Injection of Indocyanine Green

Ye Chang Luo Qingming Liang Wenxi Lu Jinling

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

(Received 14 July 2003; revised 26 March 2004)

Abstract: Some experimental results of in vivo observing X-ray attenuation of intra-tumor injection of indocyanine green (ICG) are reported. An eight-to nine-week-old male BALB/c mouse with mass between 15 g and 20 g is used in the experiments. The mouse is implanted with myeloma cell line (SP2/0) two week before. A system used to monitor the intratumor diffusion of ICG is a digital X-ray imaging system. It works at 33 kVp, 0.3 mA with exposures duration of 4 seconds and magnification of 1.5. The objective of this research is to study the X-ray attenuation at different area, which represented by gray-scale value. Compare to the ROI in the tissue without ICG and ROI of black background in the image, there is an obvious change in the tumor, which is the area ICG can diffuse to. It shows the feasibility of using digital X-ray imaging system dynamically, effectively and noninterventionally to monitor the diffusion of the ICG.

Key words: X-ray optics; in vivo observing; X-ray attenuation; digital X-ray imaging; indocyanine green

1 引 言

选择性的激光-组织相互作用是深层肿瘤非侵

害治疗的一种很有前途的方法。使用一种近红外区域波长的激光束结合肿瘤内注射激光吸收染料的方法,激光的能量能够有目标地破坏肿瘤细胞而不会破坏周围组织的正常细胞。在激光免疫治疗中,吲哚氰绿(ICG),一种激光吸收染料,常常和近红外激光配合被用来实现对深度肿瘤选择性光热作用,从而达到杀死癌细胞的目的。激光释放出的具有低组织吸收系数的近红外光,ICG 的吸收峰值对应于激

* 国家自然科学基金(60178028)、国家杰出青年科学基金(60025514)、教育部科学技术研究重大项目(重大 10420)和 211 工程资助课题。

** 通信联系人。E-mail: qluo@mail.hust.edu.cn

收稿日期:2003-07-14;收到修改稿日期:2004-03-26

光的波长,从而获取选择性的激光-肿瘤相互作用。在治疗过程中,ICG 被直接注射到癌变组织,然后通过吲哚氰绿对穿过组织的光子吸收,实现杀死癌细胞的目的^[1]。

由于 ICG 是通过直接给药的方式注射到癌变组织中去的,肿瘤内注射的精确定位,染剂在肿瘤内的分布和其在周围正常组织中的扩散,以及激光照射的时间都是决定治疗结果的重要因素。

在过去的几十年里,使用 X 射线成像技术探测癌症有了很大的发展。数字 X 射线成像技术通过减少衬比度降级和增加成像动态范围,更增强了系统的成像能力。与传统的用于临床的数字图像增强器相比较,基于光纤耦合电荷耦合器件(CCD)的数字 X 射线成像系统能够提供较高的衬比度灵敏度和信噪比^[2]。有一些数字 X 射线系统的衬比度灵敏度和分辨率级别甚至能够达到或超越荧屏-胶片系统的“金标准”^[3]。因此,这种新的成像技术不仅能够提高肿瘤的探测过程,而且能够辅助低物体衬比度特征下空间高分辨率要求的诊断过程。

数字 X 射线成像系统能够通过提供图像数据来优化治疗过程的各个参量,从而在深层肿瘤治疗中增强选择性激光-组织相互作用。Xu Fang 等^[4]通过实验测量了 ICG 水溶液的 X 射线衰减系数。从所测量的水和 ICG 溶液的 X 射线衰减系数的差别表明,使用数字 X 射线成像技术是用来监控 ICG 溶液的给药的一种新型机制^[5]。

在本文的研究中,一个基于光纤耦合 CCD 探测器的数字 X 射线成像系统被用来监控肿瘤内注射染剂溶液的扩散,动物模型为耳后种植骨髓瘤细胞的小鼠。在注射激光吸收染剂前后获取传输的 X 射线信号,其信号通过该区域上的灰度值表示。注射后进行的是动态观测,提供肿瘤内染剂的分布信息。这项研究进一步探讨了使用数字 X 射线成像技术对光热疗法治疗癌症给药和药物扩散进行在体监测的新的方法的可行性。

2 材料与方 法

2.1 肿瘤模型

SP2/0 细胞株是 BALB/c 小鼠的骨髓瘤细胞,由华中科技大学同济医学院免疫教研室沈关心教授惠赠。DMEM 培养基为 GIBCO 公司产品,小牛血清购自郑州伯安生物工程有限公司,其他试剂均为国产分析纯。

SP2/0 细胞以含 100 u/ml 青霉素,100 μ g/ml 链霉素,质量比 10% 小牛血清的 DMEM 为培养基,在 37 $^{\circ}$ C,体积比 5% CO₂ 的培养箱中培养。

实验动物为 6~7 周龄的同系 BALB/c 雄性小鼠,体重在 15~20 g 之间。收集对数生长期 SP2/0 细胞,用 PBS 洗涤细胞两次除去血清,并调节浓度制备成细胞悬液。肌肉注射 2% 乌拉坦及 1% 巴比妥钠[(0.8~0.9 ml)/100 g]麻醉小鼠后,用配备 4 号针头的 1 ml 注射器将细胞悬液注射到小鼠耳部皮下,接种 10⁵~10⁶ 个细胞。两周后进行实验。

2.2 数字 X 射线成像系统

实验中使用的系统为数字 X 射线光纤耦合的 CCD 成像系统(Faxitron X-ray Corp., Wheeling, Illinois),如图 1 所示。其中探测器部分包括一个闪烁屏(CsI),通过光纤耦合到两个 1024 \times 1024 的 CCD 阵列上。其中闪烁屏提供了 10.16 cm \times 5.08 cm 的成像范围。而两个 CCD 阵列的尺寸分别为 2.5 cm \times 2.5 cm。闪烁屏与 CCD 的尺寸比例约为 2:1。CCD 图像阵列具有 24 μ m 像素空间距离,也就是说探测器的有效像素尺寸为 48 μ m。

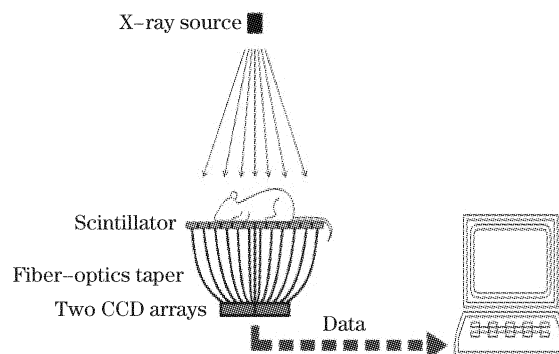


Fig. 1 Digital X-ray imaging system

数字 X 射线成像系统的工作电压为 10~35 kVp,固定工作电流为 0.3 mA,曝光时间为 0.1~999 s,X 射线管的焦点尺寸为 20 μ m,使用的是一个带铍窗的钨材料为射线管阳极材料的 X 射线源,铍窗厚度为 0.25 mm,X 射线发散角度为 40 $^{\circ}$ 。整个系统被设计成 X 射线源和探测器之间的距离固定可调在 57.2 cm,38.1 cm,28.6 cm,19.1 cm,14.3 cm 以及 11.4 cm。相应地,可以提供六种级别的放大率,分别为 1 \times 、1.5 \times 、2 \times 、3 \times 、4 \times 和 5 \times 。

本文中所选择的系统运行参量如下:工作电流为固定的 0.3 mA,工作电压为 33 kVp,曝光时间 4 s。成像范围 6.71 cm \times 3.38 cm。在 1.5 倍的放大倍率下,其空间分辨力达到 15.6 lp/mm^[6]。

2.3 监测 X 射线衰减技术

基于 CCD 的数字 X 射线成像系统在 X 射线探测过程中需要经过两个步骤。当 X 射线撞击闪烁屏, 闪烁屏捕获 X 射线能量并将其转化为可见光, 与入射 X 射线能量相应的可见光被释放出来。除了部分被丢失和散射的可见光, 其余的可见光被 CCD 探测到, 并将其转化为电信号读出, 最终以数字图像形式显示在屏幕上^[7]。而 X 射线通过物体时的衰减又符合 Beer 定理

$$I = I_0 \exp[-(\mu_1 x_1 + \mu_2 x_2 + \dots + \mu_n x_n)], \quad (1)$$

其中 I_0 为入射 X 射线强度, I 为经过物体衰减后的 X 射线强度, $\mu_1, \mu_2, \dots, \mu_n$ 分别为 X 射线束透射路径上各物质的衰减系数, x_1, x_2, \dots, x_n 分别为 X 射线束透射路径上各物质的厚度。也就是说, 屏幕显示的图像的灰度级对应着物体相应位置对 X 射线的衰减。在整个成像系统中, 考虑到 X 射线并非理想的单色 X 射线束^[8], X 射线源在相同曝光条件下出射的 X 射线在整个成像范围内存在一定的分布^[9], CCD 本身存在暗电流噪声等因素造成的图像误差^[10], 以下进行的监测将采用感兴趣区域 (ROI) 取均值的方法实现, 公式如下:

$$G = \frac{1}{m \times n} \sum_{y=1}^n \sum_{x=1}^m F_{\text{image}}(x, y), \quad (2)$$

其中 $F_{\text{image}}(x, y)$ 代表感兴趣区域的图像, m 和 n 分别为图像中行方向和列方向上的像素数目, G 代表感兴趣区域内的平均灰度值。

2.4 实验过程

采用接种骨髓瘤 2 周后的小鼠, 将 $100 \mu\text{l}$ ICG (SIGMA-ALDRICH Co., St. Louis, MO, USA, 分子量为 775) 水溶液 (0.3 mg/ml) 直接注射到肿瘤中进行 X 射线成像。通过观察感兴趣区域灰度的变化, 监测一定时间内 ICG 水溶液被注射到肿瘤组织后对 X 射线衰减造成的影响。从而证明数字 X 射线技术是一项用于激光免疫治疗肿瘤过程中对 ICG 溶液分布与扩散有效的监测技术。

首先, 拍摄一幅未注射 ICG 水溶液的肿瘤图像一张; 然后, 每间隔 15 s 拍摄注射了 ICG 水溶液的肿瘤图像, 共 7 幅。在图像处理过程中, 首先选取这 7 幅图像非肿瘤区域相同位置和相同大小的感兴趣区域, 通过这 7 个感兴趣区域求出该数字 X 射线成像系统在相同曝光条件下 X 射线在相同区域分布的波动范围; 然后, 选取所有图像 (包括未注射 ICG 水溶液图像) 肿瘤区域相同位置和相同大小的感兴趣区域, 将以上波动范围考虑在内, 比较注射 ICG

水溶液前后, 该区域中引起的 X 射线衰减的变化, 其数值通过感兴趣区域上的平均灰度值反应出来。

3 结 果

根据 Xu Fang 等^[4]测量 ICG 水溶液的 X 射线衰减系数的实验可知, CCD 探测器在一定 X 射线曝光条件下对 ICG 水溶液在射线衰减路径上厚度变化的响应为线性, 由此证明, 在肿瘤感兴趣区域获取的灰度级变化数值反映了注射 ICG 水溶液组织的吸收变化如图 3。

图 2 显示的是使用数字 X 射线成像系统对耳后种植肿瘤的小鼠成像。图中标记三个不同的感兴趣区域: 1 代表图像中没有物体的成像区域, 2 代表周围正常组织区域, 3 则代表肿瘤内注射 ICG 的区域。这三个感兴趣区域大小相同, 均为 30×30 个像素。感兴趣区域尺寸的选择一方面能够代表其相应位置的 X 射线信号值, 另一方面又尽量减小由于组织或肿瘤的厚度不均引起的误差。

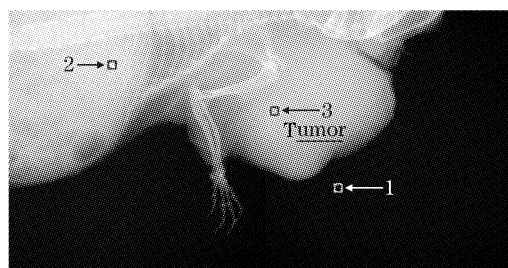


Fig. 2 A mouse with tumor back its ear is imaged by a digital X-ray imaging system. Positions of the three different ROI are marked. 1: ROI in black background, 2: ROI in tissue without ICG, 3: ROI in tumor

图 3(a)~图 3(c) 则分别为图 2 中所标记的不同感兴趣区域在注射 ICG 溶液前后不同的 X 射线衰减信号, 通过对应区域内平均灰度值表现。其中, 第一帧图像为注射溶液前拍摄, 其余 6 帧分别为注射 ICG 后, 每间隔 15 s 所拍摄。如图 3(a)~图 3(c) 所示, 与周围正常组织和图像中没有物体的背景区域相比较, 注射 ICG 前后肿瘤感兴趣区域内的灰度值发生了明显的变化。其中肿瘤感兴趣区域内的灰度值减小了约 150 个灰度级, 而周围正常组织感兴趣区域内的 X 射线信号减弱程度小于 20 个灰度级。在没有物体的背景区域甚至只有几个灰度级的变化范围。其中相对较大的正常组织内的 X 射线信号变化可能是由小鼠的呼吸和心跳引起。

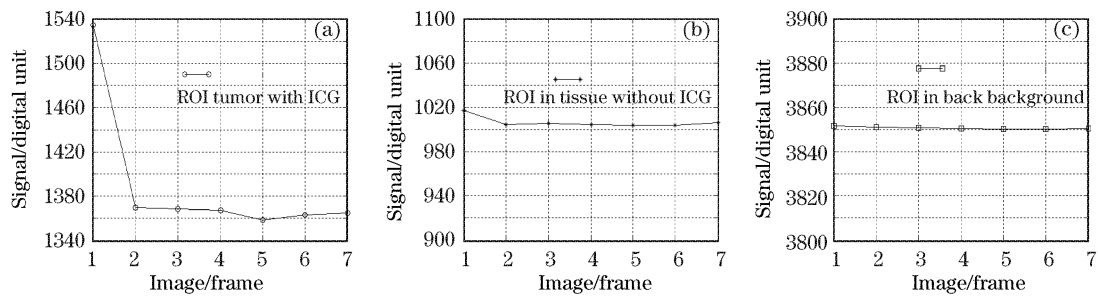


Fig. 3 (a)~(c) the change of the signal (represented by gray-scale value). There are three different ROIs

4 讨 论

由于周围正常组织对激光具有非常强的吸收和/或散射作用^[11],通过激光对深层肿瘤进行非侵袭治疗是一个非常困难的任务。然而,具有近红外波长的激光在深层肿瘤治疗中显示了很大的潜力,其主要原因在于组织对于这个波长范围内的吸收率较低。当目标组织中激光吸收剂结合相应的吸收峰值近红外光能够被吸收,并且光热能量能够引起组织的高度选择性破坏。

如果将这样的治疗过程临床应用于深层肿瘤中,则需要一个可靠的探测和指导系统。数字 X 射线成像技术显示其能够提供乳腺肿瘤探测的清晰图像。一个光耦合 CCD 成像系统能够提供很高的图像分辨率,更重要的是,具有很大的动态范围。尽管使用激光治疗肿瘤能够通过组织学和其他方法实现,CCD 成像系统所提供的对激光-组织相互作用的直接的非侵入性的分析则是最有利的。获取的信息能够被用于优化治疗方式。通过一个快速的计算系统,能够得到实时的监测。目前的研究是为了确定这种技术能够被用于监测肿瘤内给药和激光-组织相互作用的可行性。

尽管图 2 只表现了肿瘤内外特殊的有限的区域,但其仍然如实描述了组织内药物扩散的动态过程。在肿瘤中的其他位置,染剂的扩散率可根据其距离注射点的远近而变化。由于肿瘤和其他组织结构的厚度并非均匀的,X 射线数字信号的数值在不同的位置可能不同。然而,ICG 在整个给定肿瘤中的空间和时间分布都能够通过分析注射后整个肿瘤 X 射线值图形确定。

致谢 感谢 Wei R. Chen 博士 (University of Central Oklahoma) 和 Hong Liu 教授 (University of Oklahoma) 对本研究的指点,并提供相关论文。

参 考 文 献

- 1 Chen W R, Singhal A K, Liu Hong *et al.*. Antitumor immunity induced by laser immunotherapy and its adoptive transfer. *J. Cancer Research*, 2001, **61**(2): 459~461
- 2 Maidment A D A, Yaffe M J. Analysis of the spatial-frequency-dependent DQE of optically coupled digital mammography detectors. *J. Med. Phys.*, 1994, **21**(6): 721~729
- 3 Karellas A, Harris L, Liu H *et al.*. Charge-coupled device detector: Performance considerations and potential for mammographic Imaging. *J. Med. Phys.*, 1992, **19**(4): 1015~1023
- 4 Xu Fang, Liu Hong, Wu Xizeng *et al.*. Measurement of X-ray attenuation coefficients of aqueous solutions of indocyanine green and glycosylated chitosan. *J. Med. Phys.*, 1999, **26**(7): 1371~1374
- 5 Chen W R, Liu Hong, Yue Wei *et al.*. Dynamically observing intratumor injection of laser-absorbing dye and immunoadjuvant using digital X-ray imaging technique. *J. Opt. Engng.*, 2000, **40**(7): 1249~1254
- 6 Fabrice Ouandji, Eric Potter, Chen W R *et al.*. Characterization of a CCD-based digital X-ray imaging system for small-animal studies: properties of spatial resolution. *J. App. Opt.*, 2002, **41**(13): 2420~2427
- 7 Muller S. Full-field digital mammography designed as a complete system. *J. Eur. J. Radiol.*, 1999, **31**(1): 25~34
- 8 Perry Sprawls, Jr. *Physical Principles of Medical Imaging* (医学成像的物理原理). Huang Zhizhuo transl. Beijing: High Education Press, 1993 (in Chinese)
- 9 Cunningham I A, Shaw R. Signal-to-noise optimization of medical imaging systems. *J. Opt. Soc. Am. (A)*, 1999, **16**(3): 621~632
- 10 Srinivasan Vedantham, Andrew Karellas, Sankararaman Suryanarayanan *et al.*. Full breast digital mammography with an amorphous silicon-based flat panel detector: Physical characteristics of a clinical prototype. *J. Med. Phys.*, 2000, **27**(3): 558~567
- 11 Choeng W F, Parhl S A, Welch A J. A review of the optical properties of Biological Tissue. *J. IEEE J. Quant. Electron.*, 1990, **26**(12): 2166~2185