

光学成像技术在体研究肿瘤的光动力效应*

周斯博¹⁾ 张智红^{1,2)} 刘 谦^{1,2)} 曾绍群^{1,2)} 骆清铭^{1,2)**}

¹⁾华中科技大学生物医学光子学教育部重点实验室, 武汉 430074;

²⁾湖北省生物信息与分子成像重点实验室, 武汉 430074)

摘要 光动力疗法 (PDT) 已发展成为一种较成熟的肿瘤治疗方法, PDT 诱导的血管损伤是杀死肿瘤的重要机制之一. 为了在活体肿瘤模型上实时监测 PDT 导致的血管损伤效应, 使用稳定高表达绿色荧光蛋白 (GFP) 的人涎腺腺样囊性癌细胞株 (ACC-M-GFP), 建立了基于鸡胚尿囊膜 (CAM) 的肿瘤模型. 应用荧光成像技术对肿瘤的生长位置、大小, 以及治疗区域进行方便精确的定位; 利用激光散斑成像技术, 实时监测 CAM 上肿瘤周围血管的血液动力学参数. 发现不同光动力剂量所导致的血管损伤有显著不同. 结果表明, 荧光标记的鸡胚尿囊膜肿瘤模型为研究 PDT 导致的血管损伤效应提供了良好的实验模型, 激光散斑成像技术适用于实时监测 PDT 过程中血管结构、血流速度的变化, 由此得出血液灌注率可用于评估 PDT 对肿瘤周围血管的损伤效应.

关键词 光动力疗法, 荧光成像, 激光散斑衬比成像, 鸡胚尿囊膜, 血管损伤

学科分类号 R332

光动力疗法 (photodynamic therapy, PDT) 就是利用光动力反应来进行疾病诊断和治疗^[1,2], 目前主要用于实体恶性肿瘤的治疗. 由于肿瘤细胞的生存和生长主要依靠肿瘤周围血管提供营养成分, 而血管损伤效应是 PDT 治疗肿瘤的重要机制之一, PDT 破坏肿瘤周围血管和抑制新生血管的机制一直受到关注, 但是并没有被完全研究清楚^[3], 这在某种程度上受限于动物模型以及成像方式的选取.

鸡胚尿囊膜 (chorioallantoic membrane, CAM) 模型关注的对象是鸡胚的尿囊膜, 它是胚胎外的一层薄膜, 胚胎通过其表面大量的血管网进行气体交换及营养摄取, 其透明的特性, 使得无损伤地观察个别血管以及测量在接受各种不同的治疗以后血管结构的变化成为可能. 因此 CAM 是一种理想的研究 PDT 诱导血管损伤、肿瘤生长以及新生血管生成的活体动物模型^[4,5], 所以选用该模型进行活体水平实验. 同时利用稳定高表达绿色荧光蛋白 (green fluorescence protein, GFP) 的肿瘤细胞, 采用荧光成像方法就可以对肿瘤组织进行精确定位并观察其生长.

PDT 实验需要持续使用激光照射, 导致以往研究主要关注 PDT 治疗前后血管管径的变化, 仅对血管进行明场成像, 忽略了 PDT 过程中血液流速以及灌流量等细节问题. 本实验应用激光散斑成像技术实时监测血管的变化, 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, 使用

衬比成像技术^[6,7], 无需扫描装置即可对感兴趣区域内的血流实时高分辨率成像. 使用高数值孔径物镜和快速的电子耦合器件 (CCD), 激光散斑衬比成像就可以高时空分辨地监测血液的流速分布^[8]、灌注率^[9]等血液动力学变化, 故非常适用于研究 PDT 对血管的破坏作用.

1 材料和方法

1.1 光敏剂

Pyro-acid 来源于天然的二氢卟吩, 由宾夕法尼亚大学放射医学系 Zheng 实验室提供, 相对分子质量: 631.7, 化学分子式: $C_{37}H_{37}N_3O_5$. Pyro-acid 有多个吸收峰, 其中以 405 nm 和 665 nm 为主要的吸收峰. 在进行 PDT 治疗时, 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.

1.2 细胞培养

稳定高表达 GFP 的人涎腺腺样囊性癌细胞株 (ACC-M-GFP) 由本实验室熊涛提供. 用含 10% 小牛血清、青霉素 100 g/L 和链霉素 100 g/L 的 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO 公

*教育部科学技术研究重大项目 (重大 10420), 国家自然科学基金资助项目 (60278017, 60440420131), 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (2005BA711A04).

** 通讯联系人.

Tel: 027-87792033, E-mail: qluo@mail.hust.edu.cn

收稿日期: 2005-05-10, 接受日期: 2005-06-28

司产品) 培养基作为 ACC-M-GFP 细胞培养液, 置于 5% CO₂、饱和湿度、37℃ 细胞培养箱内常规培养。

1.3 鸡胚尿囊膜肿瘤模型的制备

将种蛋(购于湖北武汉四新农场)用 0.01% 的新洁尔灭水溶液清洗, 水温 35℃ 左右。晾干后将鸡蛋气室向上, 长轴与蛋托成 45° 放入 37.8℃ 恒温培养箱。培养箱中放入一只装有 1L 蒸馏水的烧杯以保持湿度(湿度 50%~60%), 每隔 12 h 翻蛋 1 次。孵育 72 h 后, 取出种蛋, 用 75% 乙醇擦拭蛋壳。用直接敲壳法将鸡胚移入自制的孵育容器内^[9]进行鸡胚无壳培养。在第 9~11 天将 50 μ l 含 $4.0 \times 10^6 \sim 7.0 \times 10^6$ 个 ACC-M-GFP 细胞的悬液接种至鸡胚 CAM 上, 24 h 后在荧光体式显微镜下选出汞灯照明下可见绿色荧光的鸡胚, 用 CCD 对其成像。隔 24 h 后再次观察该肿瘤, 并与第一次的图像进行对比, 如发现绿色荧光部分增大, 表明该鸡胚上有实体瘤生长。将已有实体瘤生长的鸡胚分为实验组和对照组进行实验。

1.4 活体水平的 PDT 实验

实验组: 在鸡胚尿囊膜上的肿瘤处放置一直径为 1 cm 的塑料圆环, 圆环内包含部分 ACC-M-GFP 肿瘤及周围血管, 并在圆环内加入不同浓度的光敏剂 Pyro-acid 溶液(终浓度分别为 20 μ mol/L, 30 μ mol/L, 40 μ mol/L) 100 μ l。将实验组鸡胚置于恒温培养箱内孵育 0.5 h 后, 用无菌 PBS 液冲洗 2 次, 拿掉塑料环, 使用温控半导体光纤耦合激光器 ($\lambda = (656.2 \pm 1.4)$ nm, $Max_{output} = 300$ mW) 对原圆环区域内的 CAM 进行照射, 激光输出功率分别为 20 mW/cm²、40 mW/cm², 照射时间分别为 15 min 和 30 min, 则总输出功率分别为 18 J/cm²、36 J/cm²、72 J/cm²。照射过程中利用激光散斑成像技术, 实时监测鸡胚尿囊膜 (CAM) 上给药区域血管变化, 并每隔 5 min 对尿囊膜上的照射区域进行明场成像。照射后继续培养 24 h, 再次对相同区域血管进行激光散斑成像。

对照组: 对照组分为光照对照组和光敏剂对照组。光照对照组不需加任何光敏剂, 直接使用与实验组中参数相同的激光照射 CAM 上的肿瘤及其周围血管区域; 光敏剂对照组则使用与实验组中浓度相同的光敏剂 Pyro-acid 溶液处理 CAM 的肿瘤区域, 但不使用激光照射。

1.5 光学成像系统

光学成像系统如图 1 所示, 将荧光成像系统与

激光散斑成像系统整合成为一套光学成像系统。

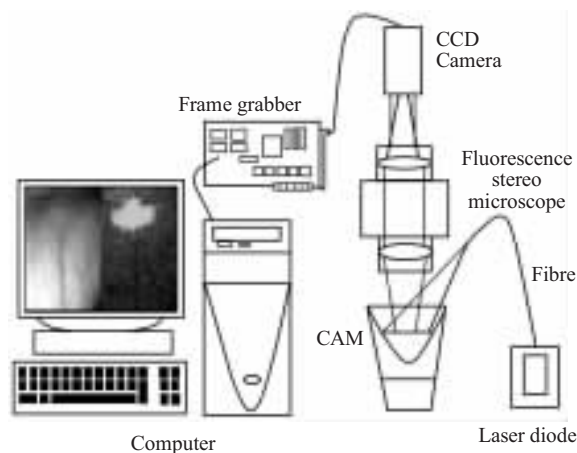


Fig.1 Schematic diagram of system

荧光成像时, 由荧光变焦体式显微镜(Leica MZ FL III)所带的 CCD(分辨率为 6.45 μ m/pixel) 采集鸡胚上的肿瘤以及光敏剂浸润区域由汞灯激发出来的荧光信号, 用以定位肿瘤以及确定激光照射区域。所用滤光片分别为 GFP 专用滤光片组($E_x = 470/40$ nm, $E_m = 525/50$ nm)和 Pyro-acid 专用滤光片组($E_x = 425/60$ nm, $E_m = 590$ nm LP)。

激光散斑成像时, 基于激光散斑成像原理^[10], 系统包括光路和成像系统。散斑的形成需要高相干性的光源, 因此光路采用实验中用于 PDT 激光照射的温控半导体光纤耦合激光器, 避免了 PDT 激光照射和散斑成像光源的切换和互相干扰, 也减少了系统开销。激光器发出的光束耦合到光纤(直径为 0.2 mm), 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。成像系统部分利用上文提到的荧光成像部分, 样品中的后向散射光信号被带有 CCD 的荧光变焦体式显微镜收集, 通过图像采集卡与计算机相连接, 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数。增加辅助物镜和使用高倍物镜即可进行高空间分辨成像, CCD 最快成像速度为 80 帧每秒, 可观察快信号的变化。

1.6 实验数据分析

由 CCD 得到血流分布的原始散斑图像, 计算散斑图像的衬比 $K = \sigma_s / \langle I \rangle$, 其中 σ_s 为散斑光强的标准方差, $\langle I \rangle$ 为散斑光强的平均值。根据散斑衬比与组织中的散射物质运动速度的反比例关系^[6,7,10], 计算出血流速度分布和血管灌注率。血管

管径变化可根据血流速度分布图像中血管与背景的强烈对比关系测量得到.

2 结果与讨论

2.1 CAM 肿瘤模型的荧光成像

将经过荧光基因转染的肿瘤细胞接种于 CAM 上, 肿瘤实体经一定波长的光照射以后发出荧光, 本文的肿瘤制备方法是在鸡胚尿囊膜上滴加细胞悬液, 由于鸡胚自身的翻动, 使肿瘤在整个鸡胚尿囊

膜上散在分布生长, 肉眼可见一些白色散在的小点样团块. 为了准确地确定肿瘤的位置, 我们应用荧光成像技术确定肿瘤的生长区域, 定位 PDT 实验中的肿瘤周围血管. 实验中发现肿瘤生长范围(图 2 中白色区域) 清晰可见. 较好地解决了以往的鸡胚肿瘤模型无法对肿瘤精确定位的问题, 为有效地监测肿瘤及其周围新生血管的生长提供了一个极好的途径.

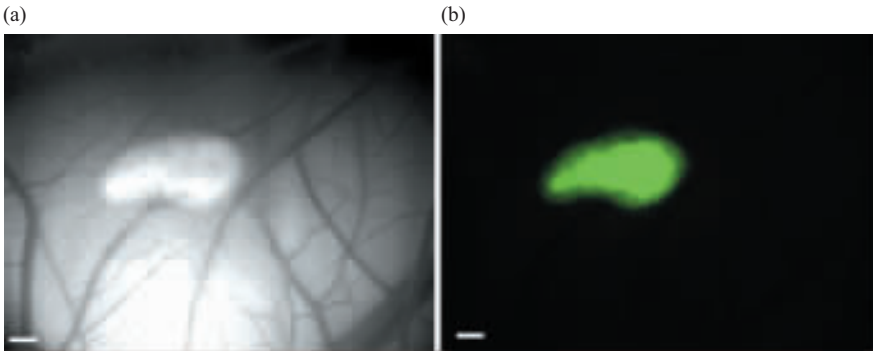


Fig.2 The images of ACC-M-GFP tumor on the CAM
The tumor illustrated by white light image (a) and fluorescence image (b). The filter cube is 470/40 nm excitation and 525/50 nm emission. The bar represents 500 μm .

同时, 由于光敏剂本身既是诊断试剂又是治疗试剂, 所以也可以通过荧光成像的方法确定给药区域, 从而决定激光的照射区域, 图 3 中圆形荧光区域即为给药区域.

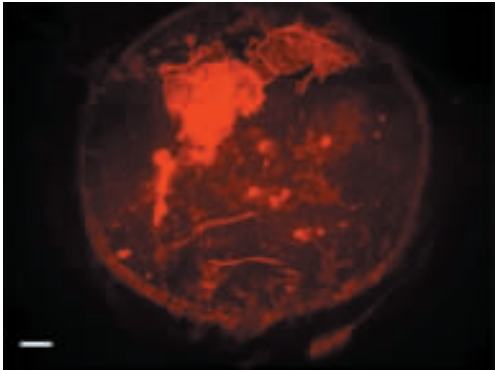


Fig.3 The Fluorescence image of Pyro-acid area
The filter cube is 425/60 nm excitation and 590 nmLP emission. The bar represents 500 μm .

鸡胚的免疫缺陷性使得在鸡胚上接种异体肿瘤成为可能. 传统实验多使用裸鼠等具有免疫缺陷的

动物进行异体肿瘤的种植. 无壳 CAM 肿瘤模型较裸鼠模型有以下优点: a. 实验周期短; b. 价格低廉; c. 接种简单, 条件要求低, 移植物植入位置可实现相对统一; d. 成瘤率高, 高达 90% 以上; e. 提供开阔的视野便于进行多种观察和操作.

无壳 CAM 肿瘤模型也存在一定的缺点: a. 存活率较低, 只有 70% 左右的鸡胚能够存活到 15 天以后; b. 可供观察时间较短, 无法进行长时程监测 PDT 的重复效果; c. 由于肿瘤在生长过程中也释放血管生长因子, 导致观测者难以区分造成血管密度改变的原因: 即有可能是由于肿瘤释放的血管生长因子造成血管密度的改变, 也有可能在于鸡胚尿囊膜本身血管的重排^[4].

2.2 PDT 的血管损伤效应

在实体瘤的治疗方法中, 有一种方法是将实体瘤周围血管破坏, 使其无法从周围血管得到养份的供给. 鸡胚尿囊膜上肿瘤周围的血管不同于尿囊膜上其他部位的血管, 这是因为这部分血管由于受到肿瘤所释放的血管生长因子的作用, 生长十分旺盛, 初期即可向肿瘤部位聚集, 后期还会诱导新生

血管长入肿瘤^[11,12], 给肿瘤提供养份. 但是由于鸡胚的免疫能力在 EA-17 时完善, 届时鸡胚会将肿瘤作为异种物质排出^[4], 所以鸡胚生长后期不适合 PDT 疗效的观察. 因此破坏肿瘤周围的血管, 就能够起到破坏肿瘤的作用. 由于以上原因, 本文只对肿瘤周围血管的破坏进行了观察.

为了确定光照剂量以及光敏剂本身对鸡胚尿囊膜肿瘤周围血管的影响, 实验先进行了光照对照组和光敏剂对照组的实验. 光照对照组实验中, 照射过程中以及 24 h 以后均未观察到血管损伤; 光敏剂对照组实验中, 利用其他波长的激光器对鸡胚进行散斑成像, 观察到: Pyro-acid 溶液浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 和 30 $\mu\text{mol/L}$ 的实验组, 给药前后血管的管径和流速无太大改变, 血管无损伤; 但是 40 $\mu\text{mol/L}$ 的 Pyro-acid 溶液则使血管出现轻微程度的损伤. 由此可见, 在光动力治疗中确定合适浓度的光敏剂, 对避免由于光敏剂本身所导致的正常组织或血管的非特异性损伤是十分必要的.

PDT 实验开始阶段血管均出现轻微扩张, 管径增粗、流速增大的现象, 在直径较小的血管上尤为明显. 这是由于光热效应引起的局部温度升高, 使得该局部的血管管径增加^[8]. 在光动力治疗起始阶段, 相对于光敏反应, 光热效应占主导地位, 使得血管管径增粗、流速增大. 光照对照组也有相同现象, 但是对光照对照组的鸡胚 24 h 后进行的观察证明, 这种血管扩张的现象不会对血管造成实质性损坏.

在 PDT 过程中, 光动力作用使得血流速度在血管刚开始收缩时不会减慢, 相反, 因血管收缩, 血流速度会代偿性增加, 小剂量的光敏剂和光剂量配合作用时尤为明显(图 4, 图 5). 当 Pyro-acid 剂量为 20 $\mu\text{mol/L}$, 光照功率为 40 mW/cm^2 时, 6 min 时血液的灌流量升至初始值的 120% 以上, 6 min 后持续降低, 20 min 后, 部分较细的毛细血管出现断裂, 血流停滞, 而较粗的毛细血管(直径在 80 μm 左右)灌流量下降至 20% 左右, 30 min 后, 照射区域的毛细血管血流基本停滞. 这主要是因为血管的破坏激活了血小板及炎性细胞, 导致炎性因子释放, 血管收缩, 血细胞滞留凝集和血流停滞^[12].

现有研究表明, PDT 对血管的损伤效应主要与血管直径大小相关, 而与血管的类型(动脉或静脉)相关性较小^[13]. 这一结论在我们的实验中也得到证实, 分别对直径在 80 μm 左右和直径大于

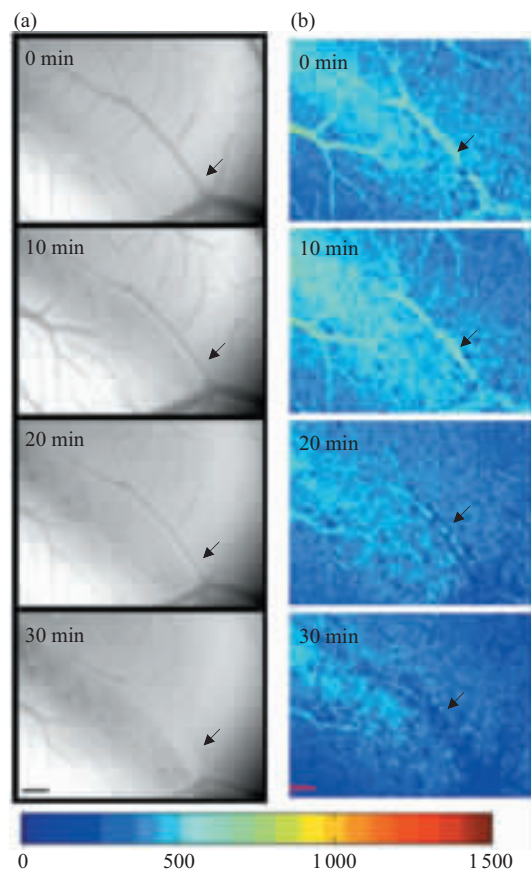


Fig.4 CAM vessel changes during PDT process

CAM vessel changes in PDT illustrated by white light images (a) and laser speckle images (b) at the time of 0 min, 10 min, 20 min and 30 min. The concentration of Pyro-acid is 20 $\mu\text{mol/L}$, and the light dose is 40 mW/cm^2 , 30 min. The vessel which the arrow denotes is our interested vessel. The bar represents 500 μm .

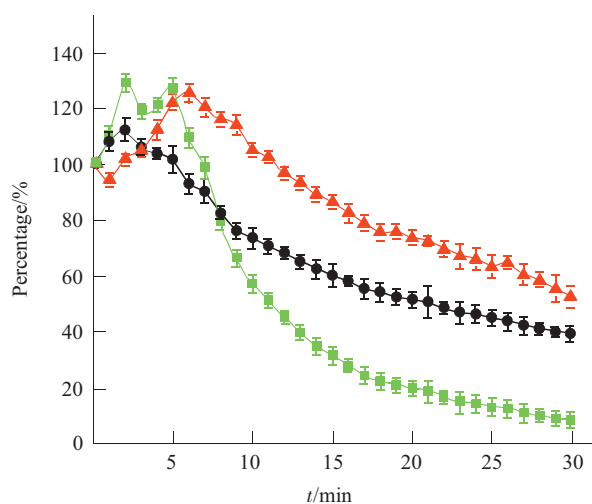


Fig.5 The changes of our interested vessel diameter, blood flow velocity and perfusion in PDT

●—●: Vessel width; ▲—▲: Blood flow velocity; ■—■: Perfusion.

100 μm 的血管 PDT 后的数据进行分析, 血管受到的破坏分别见图 6a 和 b. 其中, 当 Pyro-acid 浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$, 光剂量为 36 J/cm^2 、72 J/cm^2 时直径在 80 μm 左右的血管被完全破坏, 灌流量降为 0. 直径大于 100 μm 的血管由于其管壁较厚, 受小剂量

(20 $\mu\text{mol/L}$) 的 Pyro-acid 影响不大, 均在初始值的 50% 以上, 并于 24 h 后较多恢复, 大剂量 (40 $\mu\text{mol/L}$) 的 Pyro-acid 对血管有损伤, 但是比直径较小的血管的损伤仍要小很多, 为初始值的 30%~50% 之间.

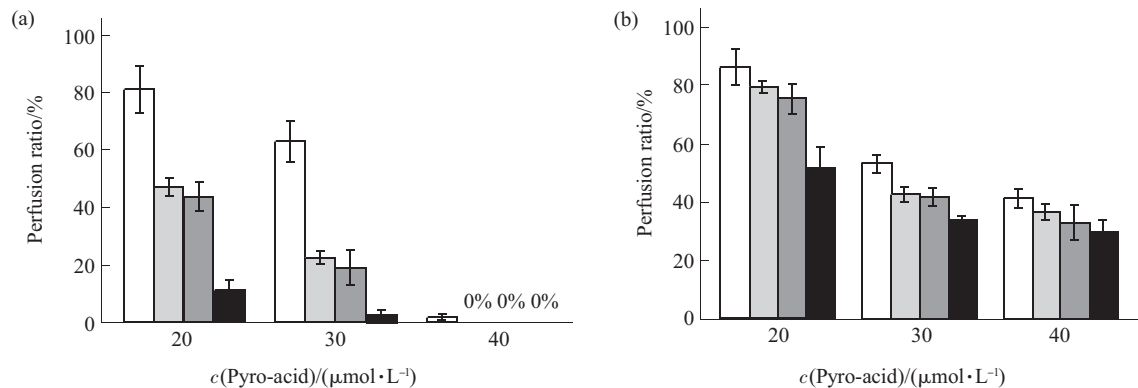


Fig.6 The PDT damage to the vessel around the tumor

(a) The vessels diameter is about 80 μm , when the concentration of Pyro-acid is 40 μmol , the light dose is 36 J/cm^2 , 72 J/cm^2 , the vessel perfusion became 0. (b) The vessels diameter is above 100 μm . The light dosage is indicated below histograms. $\square$: 20 mW/cm^2 , 15 min; $\square$: 20 mW/cm^2 , 30 min; $\blacksquare$: 40 mW/cm^2 , 15 min; $\blacksquare$: 40 mW/cm^2 , 30 min.

3 结 论

综上所述, CAM 肿瘤模型为研究 PDT 的血管损伤效应提供了良好的模型基础. 结合荧光成像技术, CAM 能够更精确地对肿瘤生长区域进行定位, 使得监测肿瘤生长成为可能, 由于光敏剂的特性, CAM 上的光照区域也可以被精确地确定. 应用激光散斑成像技术获得 PDT 光照射区域内的血液灌注量的变化信息, 对 PDT 引起的血管损伤效应进行了实时在体监测, 对于研究新型光敏剂、寻找肿瘤的最佳光动力剂量具有重要意义.

致谢 感谢宾夕法尼亚大学放射医学系 Zheng 实验室提供 Pyro-acid, 本实验室熊涛提供 ACC-M-GFP 细胞.

参 考 文 献

- Macdonald I J, Dougherty T J. Basic principles of photodynamic therapy. *J Porphyrins Phthalocyanines*, 2001, **5** (2): 105~129
- Dolmans D E J G J, Fukumura D, Jain R K. Photodynamic therapy for cancer. *Nature*, 2003, **3** (5): 380~387
- Dolmans D E J G J, Kadambi A, Hill J S, *et al.* Vascular accumulation of a novel photosensitizer, MV6401, causes selective thrombosis in tumor vessels after photodynamic therapy. *Cancer Research*, 2002, **62** (7): 2151~2156
- Madsen Steen J, Sun Chung-Ho, Tromberg B J, *et al.* Development of an *in vivo* model for the study of photodynamic therapy and anti-angiogenic treatments. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng*, 2003, **4952**: 17~22
- Dugan J D, Lawton M T, Glaser B, *et al.* A new technique for explantation and *in vitro* cultivation of chicken embryos. *The Anatomical Record*, 1991, **229** (1): 125~128
- Briers J D. Laser Doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging. *Physiol Meas*, 2001, **22** (4): 35~66
- Briers J D, Webster S. Laser speckle contrast analysis (LASCA): a non-scanning, full-field technique for monitoring capillary blood flow. *Journal of Biomedical Optics*, 1996, **1**: 174~179
- 程海英, 朱 丹, 骆清铭, 等. 血液灌注率动态变化的光学监测. *中国激光*, 2003, **30** (7): 668~672
Cheng H Y, Zhu D, Luo Q M, *et al.* *Chin J Lasers*, 2003, **30** (7): 668~672
- 王国庆, 易 成, 周宏远. 一种可用于肿瘤微循环研究的鸡胚无壳培养技术. *微循环学杂志*, 2002, **12** (3): 32~34
Wang G Q, Yi C, Zhou H Y. *Chin J Microcirculation*, 2002, **12** (3): 32~34
- Chen H Y, Luo Q M, Liu Q. Laser speckle imaging of blood flow in microcirculation. *Physics in Medicine and Biology*, 2004, **49** (7): 1347~1357
- Jacques W M M, Carlos C J, Gerbenter R, *et al.* Tumor necrosis factor- α but not interleukin-1 β or interleukin-8 concentrations correlate with angiogenic activity of peritoneal fluid from patients with minimal to mild endometriosis. *Fertility and Sterility*, 2001, **75** (1): 181~185

- 12 朱世能主编. 肿瘤基础理论. 上海: 上海科学技术出版社. 1986. 159~167
Zhu S N. The Basic Principle of Tumor. Shanghai: Shanghai publishing company of science and technology. 1986. 159~167
- 13 Hammer-Wilson M J, Akian L, Espinoza J, *et al.* Photodynamic parameters in the chick chorioallantoic membrane (CAM) bioassay for topically applied photosensitizers. Photochemical and Photobiological Sciences, 1999, **53** (1~3): 44~52

The Application of Optical Imaging: Studying the Photodynamic Effect of Tumor *In vivo**

ZHOU Si-Bo¹⁾, ZHANG Zhi-Hong^{1,2)}, LIU Qian^{1,2)}, ZENG Shao-Qun^{1,2)}, LUO Qing-Ming^{1,2)**}

¹⁾Key Laboratory of Biomedical Photonics of Ministry of Education, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China;

²⁾Hubei Bioinformatics and Molecular Imaging Key Laboratory, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract Photodynamic therapy (PDT) has been widely used as an anticancer treatment in the clinic. However, the damage to the vessel induced by PDT, one of the most important aspects to tumour therapy, is not clearly understood. In order to study the effect of vascular damage *in vivo* during PDT, the chicken chorioallantoic membrane (CAM) tumor model by using stable high GFP-expressing human adenoid cystic carcinoma cell strain (ACC-M-GFP) is built for the experiment. The fluorescence imaging was used to show the location and the size of the tumor and treatment region. The dynamic parameter change of blood with different photodynamic doses in PDT was monitored in real time by laser speckle contrast imaging (LSCI) technique. The experimental results show that: the photodynamic effects are observably different at different photodynamic doses. It proved that: firstly the GFP-expressing tumor CAM model is extremely suitable for studying the photodynamic effect on the vessels, because of its convenience to locate the tumor and treatment region on the CAM. Secondly, with the aid of the LSCI technique, it is able to perform real-time monitoring of vessel structure and flow velocity change to identify the perfusion variation in PDT and to additionally investigate the damage to the vessels around the tumor induced by PDT.

Key words photodynamic therapy, fluorescence imaging, laser speckle contrast imaging, chorioallantoic membrane, vascular damage

*This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (60278017, 60440420131), The Important Project of Ministry of Education (10420) and National Basic Research Program of China (2005BA711A04).

**Corresponding author . Tel: 86-27-87792033, E-mail: qluo@mail.hust.edu.cn

Received: May 10, 2005 Accepted: June 28, 2005