

利用近红外光激发的光声血管造影成像*

杨思华[†] 阴广志

(华南师范大学激光生命科学研究所暨激光生命科学教育部重点实验室, 广州 510631)

(2008 年 3 月 3 日收到, 2008 年 11 月 3 日收到修改稿)

利用近红外光结合对应波长的光吸收增强对照剂来实现在体小鼠脑皮层血管的光声成像. 近红外光在生物组织上有较深的穿透能力, 而作为光吸收增强剂的外源染料吲哚菁绿注射到血液系统后则增加了血管对光的选择性吸收, 从而增强了血管光声信号的强度. 实验在不破坏脑头皮和头盖骨的前提下, 通过静脉注射吲哚菁绿, 获得小鼠脑皮层血管的光声造影成像. 光声重建的血管网络与小鼠脑部解剖照片相当符合. 实验结果证明近红外光结合光吸收增强剂的光声血管造影技术对于开展光声脑功能成像, 光声分子成像提供了潜在的可行性.

关键词: 光声成像, 光吸收增强剂, 血管造影, 光声信号

PACC: 4337G, 8170

1. 引言

光声层析成像是近年来迅速发展起来的一种非电离化的新兴医学成像方法. 当用脉冲激光照射生物组织时, 组织中的吸收体吸收光能引起温升, 温升导致组织热膨胀而产生压力波(超声波), 这就是光声效应. 产生的光声波将穿过组织向外传播, 通过放置在吸收体周围的超声换能器探测各个方向的光声压, 并采用一定的反投影算法进行图像重建, 就可得到组织的光吸收分布图像, 它结合了纯光学成像的高对比度特性和纯超声成像的高穿透深度特性的优点^[1-4]. 光声成像技术探测的是被测点吸收激光后的光声信号, 它原理上避开了光散射的影响, 光声信号振幅取决于组织对激光能量的吸收程度, 由局部能流密度和作用目标的光吸收系数决定, 与光散射引起的光子传播路径无关, 因此, 其空间分辨率不受光散射的影响. 同时, 由于组织对超声的衰减和散射远小于对光的衰减和散射, 用超声探测器检测超声波代替光学成像中检测散射光子, 可显著提高成像深度和分辨率, 图像的对比度真实地反映生物组织内部的光吸收差异特性. 与传统的超声影像方法相比, 光声成像可以区分声学参数相同而光学参数不

同的待测样品, 提供高分辨率和高对比度的影像.

生物组织的光吸收特性与生物组织结构功能和病理特征紧密相关, 通过对这些光学参数的差异进行光声成像, 将在临床医学中有重要的应用价值. 在生物组织中对激光强吸收产生光声信号的常见光吸收体为血液中的血色素, 因此, 目前各地研究小组都致力于利用光声技术进行血液参数测量、肿瘤血管增生和病变的成像检测研究^[5,6]. 本小组的前期工作利用可见光波段进行激发, 对皮层血管, 病变血管实现清晰的光声成像^[7,8], 其系统分辨率达 $100\mu\text{m}$ 左右^[9]. 并利用光声技术作为评价手段, 对肿瘤光动力学治疗的治疗效果进行成像跟踪^[10]. 但由于可见光波段在组织中穿透能力有限, 目前血管检测大多局限于表皮或浅表血管. 要进一步对深层组织进行光声研究, 就必须解决激发光穿透能力的问题.

近红外光波段相对于可见光波段在生物组织中具有更深的组织穿透能力, 而近红外光成像技术结合相应的光吸收增强对照剂已经在纯光学成像领域中被广泛应用于功能成像和异常组织诊断的研究中. 外源对照剂可以增强系统的检测灵敏度, 帮助定位识别特定的组织. 本文利用 800 nm 波长的脉冲激光作为光声成像的激发源, 以吲哚菁绿作为血管的显影增强剂, 首先在模拟血管中分析吲哚菁绿对光

* 长江学者与创新团队发展计划(批准号: JRT0829), 国家自然科学基金面上项目(批准号: 30870676, 30627003)和广东省自然科学基金(批准号: 7117865)资助的课题.

[†] 通讯联系人, E-mail: yangsh@scnu.edu.cn

声信号及光声重建图像的增强效果,然后进行在体血管的光声造影成像,获得高清晰高对比度的小鼠脑皮层微血管网络造影图像。

2. 光吸收增强剂

吲哚菁绿(indocyanine green, ICG),又称靛青绿,是一种合成的花青系红外感光染料。ICG 静脉注入体内后,迅速和血浆蛋白结合,随血液循环迅速分布于全身血管内,而后被肝细胞摄取,又从肝细胞以游离形式排泄到胆汁中,经胆道入肠,随粪便排出体外。由于 ICG 与血浆蛋白结合率高,又具有不被肝外组织吸收的特点,因而成为一种高效的血管标记染料,已被广泛应用于眼科血管造影研究^[11]及肿瘤检测^[12]。

如图 1 所示为实验测得 ICG 水溶液、小鼠全血、ICG 和全血混合溶液的吸收光谱。由图发现小鼠全血在近红外吸收光谱中没有明显的特征吸收峰,ICG 溶于水后其吸收峰位于 780 nm 处,而 ICG 溶于血液中后其吸收峰值发生偏移,位于 800 nm 左右。因此,实验选用吸收效率最高的 800 nm 作为光声血管造影的激发光波长。

3. 实验装置及步骤

3.1. 实验装置

如图 2 所示为光声成像实验装置图。脉冲激光从激光器(VIBRANT B 532 I, OPOTEK, USA)发出,经反射扩束后垂直照射到样品耦合池中部。实验时,池

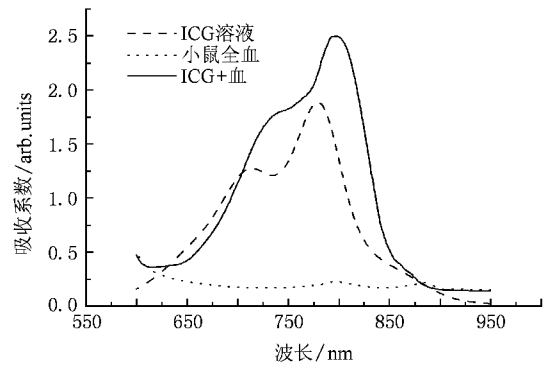


图 1 ICG 水溶液、小鼠全血、ICG 和血混合溶液的吸收光谱

中充满纯净水作为超声传播耦合介质。超声换能器固定于与耦合池上方旋转平台相连的金属支架上,由步进电机驱动旋转扫描采集光声信号,然后经放大器对信号进行放大滤波,再由示波器进行模数转换后储存到计算机,最后利用滤波反投影算法^[13]对采集到的信号进行数据处理和图像重建。实验时,电机的转动,数据采集、储存及激光器的触发统一由软件 Labview 程序控制实现。所用的脉冲激光波长设定为 800 nm,激光脉冲宽度为 10 ns,激光射到生物组织上的平均能量密度为 $\sim 15 \text{ mJ/cm}^2$ 。

为了精确测量光致超声信号,实验中采用单元精密水听器旋转采集 200 个位置 360° 全方位的光声信号。针状 PVDF (Polyvinylidene difluoride) 膜的水听器(Precision Acoustics LTD),其探测灵敏度为 850 nV/Pa,接收面积直径为 1 mm,频谱响应范围为 200 kHz—15 MHz,能够宽带地接收光声信号,达到微细血管的精确成像。水听器旋转一周采集信号用时约 25 min。

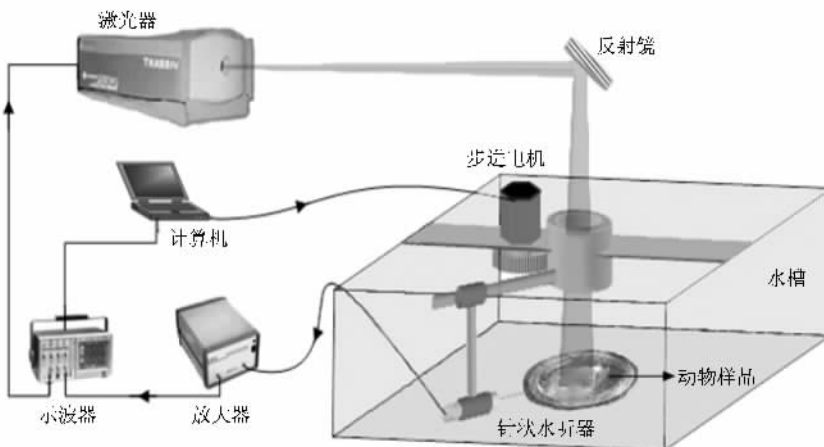


图 2 光声成像装置图

3.2. 实验样品

离体成像实验用内外径分别为 0.3 mm 和 0.5 mm 的硅胶管模拟血管. 三根硅胶管内分别被注入抗凝处理过的离体老鼠全血, ICG 水溶液 (200 μM) 及 ICG 和老鼠全血的混合溶液 (245 μM). 三根模拟血管平行排列并水平地埋在厚度约为 10 mm 深的鸡胸脯肉内 (如图 3(d) 所示). 样品固定于水槽中央, 调整水听器与三根模拟血管位于同一水平面并将水听器放置在离旋转中心 6 cm 处旋转采集光声信号.

活体动物实验采用重量约为 30 g 的昆明小白鼠作为实验模型. 实验前, 小鼠脑部毛发用脱毛剂清除干净而不损伤脑部表皮和骨骼. 用戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉小鼠. 麻醉后的小鼠安放在一个可垂直升降的自制支架上, 将小鼠的身体和头部固定好, 然后再放置到耦合池底部中央, 通过底部圆孔中的透明聚乙烯薄膜伸入到耦合池中, 透明

薄膜和小鼠头部间充满医用超声耦合液, 用于将脑部产生的超声信号耦合到耦合池中. 校准换能器旋转扫描的平面, 使之与小鼠的脑皮层位于同一平面. 实验过程中, 利用输液针通过老鼠尾巴静脉注射 ICG 到小鼠血液循环系统. 实验对同一只小鼠进行三次完整的信号采集, 第一次在未注射 ICG 情况下完成, 第二次静脉注射一针 80 μL ICG (200 μM) 后进行采集, 第三次静脉注射 30 μL ICG (200 μM) 后开始采集信号, 采集过程中每隔 5 min 注射同样剂量的 ICG, 共注射 5 次. 实验完成后, 小鼠苏醒并恢复正常. 最后, 小鼠被过量麻醉 (200 mg/kg) 致死, 取其脑部解剖照片用作实验对照.

4. 实验结果

4.1. 离体模拟血管成像

为了验证 ICG 在血液对于光声信号强度的增

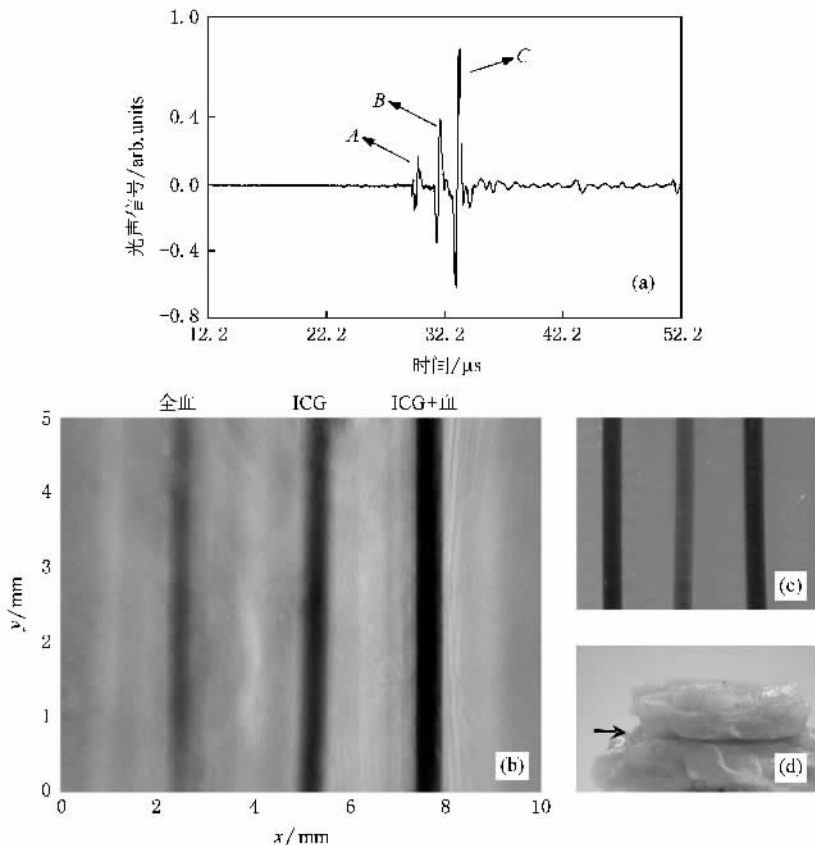


图3 (a) 三根模拟血管的光声信号, 其中 A, B, C 分别对应小鼠全血、ICG 水溶液、ICG 和全血溶液的光声信号 (b) 模拟血管的光声成像 (c) 模拟血管样品横截面照片, 图中三根模拟血管从左至右分别充满小鼠全血、ICG 水溶液、ICG 和全血溶液 (d) 样品侧面照片, 箭头所示为模拟血管埋藏的位置

强效果, 三根分别充满全血、ICG 水溶液、ICG 与血混合溶液的模拟血管被进行光声成像比较. 调整探测器的轴向方向与模拟血管垂直, 然后记录此位置产生的光声信号. 如图 3(a) 所示, 图中 A、B、C 分别对应充满全血、ICG 水溶液、ICG 与血混合溶液的模拟血管的光声信号. 可见 ICG 溶解于血液后其光声信号有明显的增强, 由图计算得模拟血管信号 C 与信号 A 的幅值比约为 5:1. 让探测器旋转扫描采集, 记录 200 个位置的光声信号, 然后利用滤波反投影算法重建出光声图像如图 3(b) 所示, 重建的光声图像与其截面照片(图 3(c))对应吻合. 由于 ICG 对 800 nm 波长的光具有很强的吸收, 溶于血液后能增强血管的光声信号, 因此, 重建图像中 ICG 溶于血液中的模拟血管边缘清晰, 与周围背景对比差异大, 血管轮廓清楚明显. 实验证明, ICG 溶于血液后能明显增强血管的光声信号强度, 提高血管显像的对比度和分辨率.

4.2. 在体小鼠脑皮层血管造影

小鼠麻醉固定后, 静脉注射 80 μ L ICG (200 μ M), 调整探测器位置记录小鼠脑中动脉不同时间段的光声信号. 如图 4 所示, 是在示波器上不同时间截获的光声信号图. 在 1 μ s 左右出现的信号是激光照射到小鼠头部散射出来的光在探测器接收表面上产生的声压. 位于图中部的信号即是小鼠脑中动脉的光声信号. 注射 ICG 后, 被测血管光声信号迅速增强, 而后由于 ICG 在体内逐渐被代谢, 被测血管光声信号的强度亦逐渐降低. 观察发现直到注射 ICG 18 min 后, 其血管光声信号基本与注射前相等. 血管光声信号随 ICG 注射时间的强度分布如图 5 中 A 线所示, 光声信号强度在注射 ICG 后 1—2 min 内达到峰值, 其后逐渐下降, 到 15—18 min 内回复到未注射前的强度. 考虑到目前系统采集一周完整的数据需时 25 min, 同时为探测器在不同位置接收信号时 ICG 对的血管光声信号的增强程度尽量均匀, 我们在活体检测实验中采用了小剂量分时多次注射 ICG 到小鼠体内的方法. 每次注射 30 μ L 的 ICG (200 μ M), 每隔 5 min 注射一次, 共注射 5 次, 其血管光声信号强度随时间分布如图 5 中 B 线所示. 在注射第一针 ICG 后约 5 min, 血管光声信号的强度约降到峰值的一半时, 再注射第二针 ICG 使信号增强, 连续注射 5 次可以确保在整个信号采集过程所测得的血管光声信号都有 ICG 的贡献. 由所测量数据计算得, 血

管光声信号在 25 min 内的平均强度约是未注射 ICG 前强度的 1.8 倍.

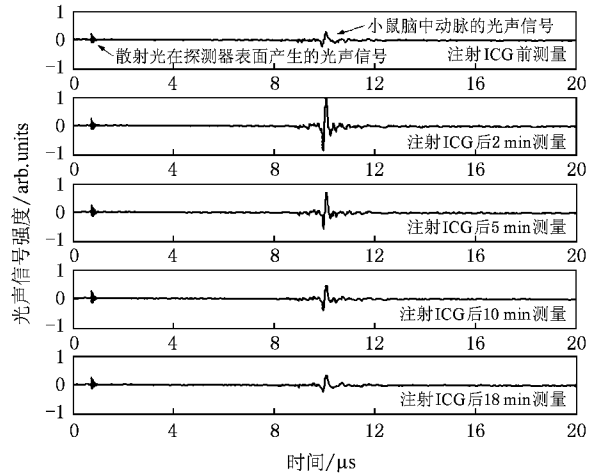


图 4 小鼠注射 ICG 后不同时间测得脑中动脉的光声信号

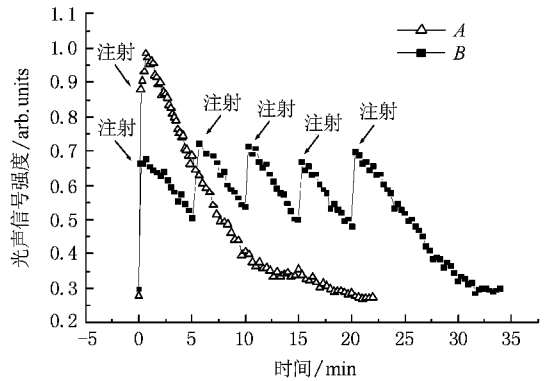


图 5 血管光声信号随 ICG 注射时间的强度分布

图 6 所示为小鼠脑皮层的光声血管造影图像. 其中 (a) 是没有注射 ICG 的光声重建图像, (b) 是注射一针 ICG 的光声重建图像, 而 (c) 是分 5 次注射 ICG 后的光声重建图像. 图像右边的灰度标注为图像像素的真实数值对比. 由图像比较可见, 在没有注射 ICG 的情况下, 血管对近红外光吸收较少, 光声信号较弱, 导致血管网络模糊, 除脑中动脉外, 其他血管分支及微细血管基本辨别不清. 在图 6(b) 中注射一次 ICG 的情况下, 图像整体对比度有所增加, 但采集过程随着 ICG 的代谢, 血管光声信号会逐渐降低, 因此 ICG 对血管光声信号的增强效果只有在采集开始的一段时间内被一定扫描范围的探测器所响应, 所以图像可见局部的脑皮层血管相对于 (a) 清晰; 同时, 由于整个采集过程只有在一段时间内才有 ICG 贡献的信号增强效果, 信号起伏相对较大, 造成图像

伪迹较重及背景显示不均匀.在利用多次分时注射 ICG 的情况下 (c) 图获得了较为清晰的脑皮层血管网络成像,图中脑中动脉的主要分支及细小的微血管都能明显地显示开来.对比对应的脑部解剖照片 (d),光声重建图像与其血管分布相当符合.上述实验证明,利用 ICG 作为光声血管显影剂,能很好地获得清晰的血管网络图像.

5. 讨论及结论

光声成像技术结合了纯光学成像和纯超声成像的优点,既具有高的光学对比度又有深的超声穿透

特性,可以获得高对比高分辨率的组织影像,为研究生物组织的结构形态、生理特征、代谢功能、病理特征等提供了重要的手段.利用组织深穿透特性的近红外光照射入组织内部,结合外源光学吸收增强剂增加组织内血管对光的吸收,从而达到增强光声信号强度的目的,提高光声系统的检测灵敏度.实验无损地对小鼠脑部进行光声血管造影成像,获得了清晰的脑皮层血管网络分布图像.这种技术可以扩展应用于光吸收增强剂上捆绑肿瘤抗体、蛋白质、激素、药物或其他生物适应剂.通过抗体带动光学对照剂定位肿瘤位置,实现肿瘤特异性检测.同样也可以通过光声信号研究药物在体内的新陈代谢情况等.

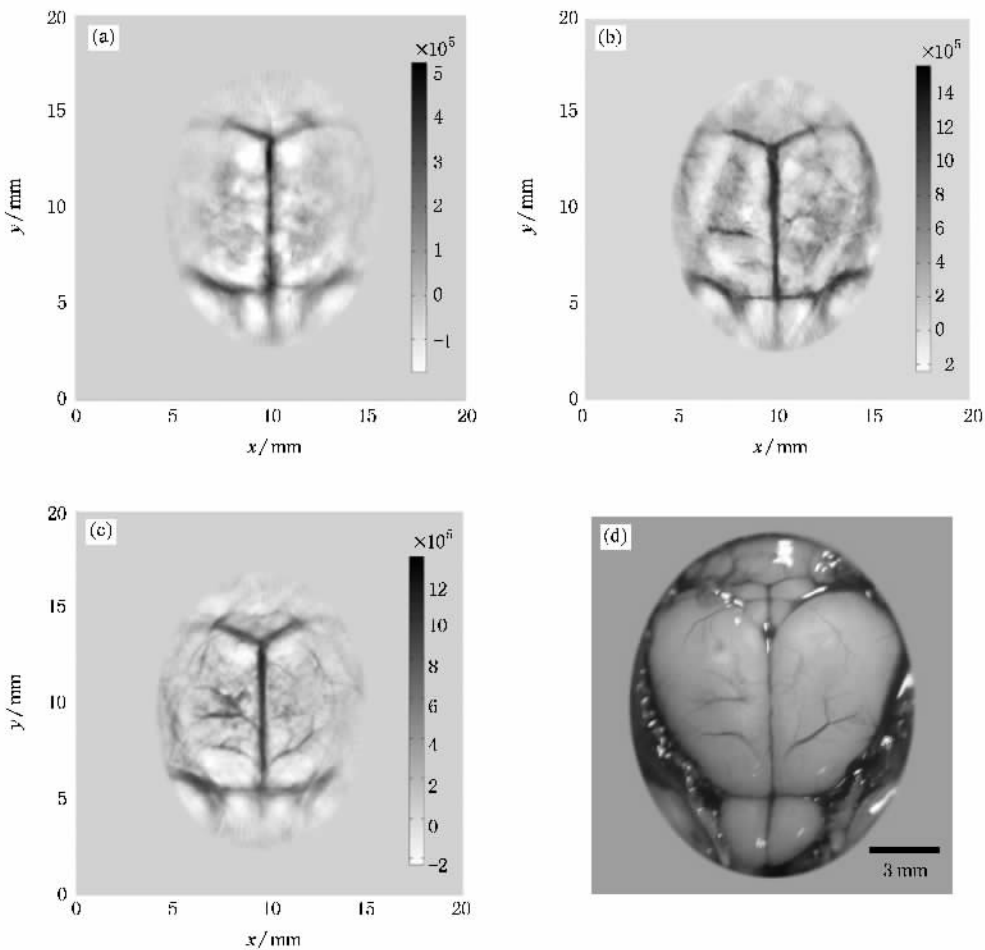


图6 小鼠脑皮层血管光声重建图像 (a)未注射 ICG 的光声重建图像 (b)注射一次 ICG 后的光声重建图像 (c) 间隔 5 min 注射 5 次 ICG 后的光声重建图像 (d)实验后小鼠脑部解剖照片

目前系统采用单一探测元对被检测样品作旋转扫描采集光声信号,360°扫描采集的方式能够确保数据的完整性,反映被测样品各个部位不同侧面的信息,但另一方面增加了扫描采集的时间.而且外源光学染料在组织体内随着时间不断被代谢,因此系

统所获得的血管分布图状是在采集时间内的平均光能吸收的强度分布.在此情况下,采用分时多次注射外源染料能够减少染料代谢对血管光声信号强度不均匀的影响.下一步工作,我们将主要集中于利用多元相控电子探头来代替单一探测元来进行信号采

集. 多元探头利用相控聚焦技术大大地提高信噪比, 而且采用电子扫描的方式极大地提高了信号采集的速度^[14-18], 这将有利于进行光声定量血液动力学检测和实时光声成像.

本文通过利用近红外光结合外源光学对照剂,

无损在体地获得了脑部皮层血管的网络分布图像. 这种基于光声成像的血管造影技术以超声作为信息载体能够获得一定组织深度的血管显像, 更重要地提供了一种无损检测血管病变、肿瘤血管新生及监控血液学动力变化的可行性研究手段.

- [1] Su Y X , Wang R K , Zhang F 2006 *Chin . Phys . Lett .* **23** 512
- [2] Chen Z X , Tang Z L , Wang H 2007 *Opt . Express .* **15** 4966
- [3] Zeng Y G , Xing D , Wang Y , Yin B Z , Chen Q 2004 *Opt . Lett .* **29** 1760
- [4] Ku G , Wang L H 2005 *Opt . Lett .* **30** 507
- [5] Siphanto R I , Thumma K K , Kolkman R G M 2005 *Opt . Express .* **13** 89
- [6] Wang X , Xie X , Ku G 2006 *J . Biomed . Opt .* **11** 024015
- [7] Xiang L Z , Xing D , Gu H M , Yang D W , Yang S H , Zeng L V 2007 *Acta . Phys . Sin .* **56** 3911 (in Chinese) [向良忠、邢 达、谷怀民、杨迪武、杨思华、曾吕明 2007 物理学报 **56** 3911]
- [8] Xing L Z , Xing D , Gu H M , Zhou F F , Yang D W , Zeng L V , Yang S H 2007 *Chin . Phys . Lett .* **24** 751
- [9] Yang S H , Xing D , Zhou Q , Xiang L Z , Lao Y Q 2007 *Med . Phys .* **34** 3294
- [10] Xiang L Z , Xing D , Gu H M , Yang D W , Yang S H , Zeng L V , Chen W 2007 *J . Biomed . Opt .* **12** 014001
- [11] Horiguchi M , Nagata S , Yamamoto N 2003 *Arch . Ophthalmol .* **121** 327
- [12] Haglund M M , Berger M B , Hochman D W 1996 *Neurosurgery* **38** 308
- [13] Wang Y , Xing D , Zeng Y G , Chen Q 2004 *Phys . Med . Biol .* **49** 3117
- [14] Yin B Z , Xing D , Wang Y , Zeng Y G , Tan Y , Chen Q 2004 *Phys . Med . Biol .* **49** 1399
- [15] Yang D W , Xing D , Gu H M , Tan Y , Zeng L M 2005 *Appl . Phys . Lett .* **87** 194101
- [16] Yang D W , Xing D , Yang S H , Xiang L Z 2007 *Opt . Express .* **15** 15566
- [17] Nie L M , Xing D , Zhou Q *et al* 2008 *Med . Phys .* **35** 4026
- [18] Nie L M , Xing D , Lao Y Q *et al* 2007 *Appl . Phys . Lett .* **15** 15566

Photoacoustic angiography for mouse brain cortex using near-infrared light *

Yang Si-Hua[†] Yin Guang-Zhi

(MOE Key Laboratory of Laser Life Science , South China Normal University , Guangzhou 510631 , China)

(Received 3 March 2008 ; revised manuscript received 3 November 2008)

Abstract

Photoacoustic imaging is a novel noninvasive imaging technique of biological tissue that overcomes the overwhelming scattering of light in biological tissue by utilizing ultrasonic wave to translate the image signal. In this study , near-infrared light and indocyanine green as an optical contrast agent were used to achieve the cerebrovascular distribution by photoacoustic imaging. Near-infrared light penetrates deep into the brain tissues through the skin and skull , and the indocyanine green enhances the photoacoustic signals of the blood vessels. A photoacoustic angiography of vascular distribution in the mouse brain *in vivo* was acquired that matches the anatomical photograph well. The experimental result demonstrates the photoacoustic imaging with near-infrared light and optical contrast agent has the potential for functional and molecular biomedical imaging.

Keywords : photoacoustic imaging , near-infrared contrast agent , angiography , photoacoustic signal

PACC : 4337G , 8170

* Project supported by the Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (Grant No. IRT0829) , the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 30870676 , 30627003) and the Natural Science Foundation of Guangdong Province (Grant No. 7117865).

[†] Corresponding author. E-mail : yangsh@sncu.edu.cn