

视窗模型分类及其在影像学中的研究进展

高乙惠, 姜立新

(上海交通大学附属第六人民医院, 上海 200030)

摘要: 视窗模型(Window Chamber, WC)是直接于动物活体上研究疾病的发生、发展、及其对治疗药物的反应, 尤其对各种肿瘤的研究, 提供了很好的平台。目前常用的视窗模型有脊背视窗模型、乳腺视窗模型、脊柱视窗模型以及颅脑视窗模型, 目前对其成像方式多种多样, 包括荧光成像、超声成像、磁共振(Magnetic Resonance Imaging, MRI)及核医学(Positron Emission Tomography, PET)成像。这些成像方法的发展对于研究视窗内组织的血管、代谢及药物的治疗效果具有重要意义, 有利于深入了解疾病进展及研究疾病治疗新方法。

关键词: 视窗模型; 荧光成像; 超声成像; 光声成像

中图分类号: R443.†1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3630(2018)-04-0326-04

DOI 编码: 10.16300/j.cnki.1000-3630.2018.04.006

Classification of window chamber model and its research progress in iconography

GAO Yi-hui, JIANG Li-xin

(Shanghai Jiaotong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200030, China)

Abstract: The window chamber models, including the mammary window chamber model, the spine window chamber model and the craniocerebral window chamber model, are widely used in iconography, such as fluorescence imaging, ultrasound imaging, magnetic resonance imaging and PET imaging. The development of these imaging methods is of great importance to the study of the vascularity, metabolism, and drug therapy of the tissues in the windows, which is helpful to deepen understanding the progress of disease and the research on new treatment methods.

Key words: window chamber; fluorescence imaging; ultrasound imaging; photoacoustic imaging

0 引言

视窗模型在研究血管生成、肿瘤微环境及药物治疗反应等方面已经有 70 多年的应用^[1]。现在已经发展为可以研究肿瘤发生、增殖和转移的一种方式, 使得活体模型在细胞和分子水平的研究成为现实^[2]。其主要优势在于可以在 2~3 周的时间内动态观察肿瘤及其微环境的变化^[3], 对肿瘤生长检测、肿瘤治疗新药物等方面都有一定的意义^[4]。

1 视窗模型分类

20 世纪 20 年代, Sandison^[5]制作出第一个视窗模型, 用来观察兔耳微循环及炎症反应。Goodall 等^[6]于 1965 年第一次将视窗模型安装在仓鼠脸颊上

以观察肿瘤血管。视窗模型发展至今, 种类及用途多种多样, 比如研究多种肿瘤的脊背视窗模型(Dorsal Skinfold Window Chamber, DSWC)、研究乳腺癌的乳腺视窗模型(Mammary Window Chamber, MWC)、研究脊髓血管及轴突的脊柱视窗模型(Spinal Cord Window Chamber, SCWC)以及研究大脑的颅内视窗模型(Intracranial Window Chamber, ICWC)。

1.1 脊背视窗模型

脊背视窗模型(DSWC)是一种活体模型, 过去三十多年在研究微血管方面一直发挥着重要的作用。Moy 等^[7]在 1943 年提出脊背视窗模型的概念, 使用两个铝框架固定在大鼠背部制作成为视窗模型。通过不断改进, 已经制作出可以应用于体型更小动物的脊背视窗模型, 比如应用于小鼠及仓鼠。固定装置也由铝框架改为由钛或更轻的材料制作的框架, 并且具有更高的物理稳定性。

脊背视窗模型的主要优点是可以在活体直接观察微血管的情况, 研究活体在正常及患病情况下微血管的变化情况。脊背视窗模型在生物医学研究

收稿日期: 2018-03-02; 修回日期: 2018-04-18

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81371574、81771850)。

作者简介: 高乙惠(1992—), 女, 河南商丘人, 研究方向为胰腺癌的超声治疗。

通讯作者: 姜立新, E-mail: jinger_28@sina.com

中应用广泛,例如, Laschke 等^[8]研究血管生成, Yuan 等^[9]研究肿瘤进展及微血管靶向分子生物治疗的评价等。 Dewhirst 等^[10]通过将肿瘤细胞系或原发肿瘤细胞移植入脊背视窗进行肿瘤研究,可以直接观察肿瘤及其周围血管。对脊背视窗模型的很多研究都表明肿瘤血管与正常血管的诸多不同,并通过诸多测量参数进行量化,例如血管通透性,血红蛋白饱和度,红细胞通量,氧分压等,这些参数被作为肿瘤治疗后的生物标志物进行研究^[2]。

1.2 乳腺视窗模型

越来越多的研究表明,原位和异位器官环境的差异性将会影响肿瘤细胞基因表达肿瘤生长、侵袭力、血管生成、转移、药物的输送和对许多肿瘤类型中治疗药物的敏感性。乳腺视窗模型是将乳腺癌细胞系移植入雌性动物的乳房,可以重复、持续并且无侵入性地动态观察原位乳腺癌的生长及血管生成,对研究原位肿瘤的特性有更大的优势。原位乳腺癌模型已广泛应用于研究,如用于研究乳腺癌新型转移模型,新型分子靶点、生长因子对血管生成和乳腺癌肿瘤生长的影响、乳腺及基因治疗等方面^[11]。 Kedrin 等^[12]使用可以稳定表达光转化荧光蛋白 Dendra2 的乳腺癌细胞系 MTLn3 与乳腺视窗模型相结合,以研究肿瘤的转移特性。该实验表明肿瘤血管周围微环境(血管周围的肿瘤组织)富含肿瘤相关的巨噬细胞和细胞外基质,刺激乳腺癌细胞的转移和侵袭。 Schafer 等^[13]在视窗盖玻片表面涂上铂卟啉,使用 MDA-MB-231/eGFP 乳腺癌细胞系,在与盖玻片接触的乳腺癌组织和正常乳腺组织的范围内测量氧分压水平。

1.3 脊柱视窗模型

脊柱视窗模型(SCWC)用于研究脊髓损伤、脊髓肿瘤、脊髓炎及脊髓缺血后血管、轴突的变化。目前对小鼠脊髓的研究是通过手术暴露脊髓,利用显微镜等显示脊髓结构,但需要重复手术进行成像,对脊髓进行长期观察将会增加脊髓感染,引起脊髓损伤并对动物造成额外的疼痛^[14-15]。脊柱视窗模型的优势是可以在活体情况下将视窗固定在脊柱的特定部位进行连续观察,避免重复手术对动物的伤害。 Fenrich 等^[16]对 43 只成年 C57 小鼠安装脊柱视窗模型。他们研究发现在植入视窗后的数小时内小鼠动作活跃,小鼠体重随着时间持续增加,视窗对脊髓细胞的结构几乎没有影响,且在成像中伪影明显减少,是长时间研究小鼠脊髓的有用工具。 Farrar 等^[15]使用脊柱视窗模型研究激光诱导小鼠脊髓损伤之后小胶质细胞及血管的变化,进行多次长

时间的连续成像观察,发现小胶质细胞的数量和范围随着时间不断增加,且在损伤后 24 小时内变化最大。

1.4 颅内视窗模型

颅内视窗模型(ICWC)常用于通过光学成像研究动物大脑的结构及其皮质功能、脑肿瘤以及大脑对药物治疗的反应等方面。 Bok 等^[17]使用双光子显微镜观察颅内视窗模型局灶性脑缺血小鼠大脑中小胶质细胞的活动,并成功在局灶性脑缺血区域观察到 Iba-1 阳性小胶质细胞的活动,这有助于开发抑制小胶质细胞活性的药物。 Burrell 等^[18]采用小鼠颅内视窗模型研究肿瘤生长及药物对颅内结构的影响,发现骨髓起源的细胞在脑肿瘤组织血管形成中的作用,并在长达 8 周的时间内对大脑进行重复观察。

2 视窗模型的影像学研究

解剖学成像和功能性成像是研究肿瘤生物学的两种主要成像手段。解剖学成像常用于测量肿瘤大小、内部结构及其对周围组织的侵袭,如超声、磁共振(Magnetic Resonance Imaging, MRI)以及核医学(Positron Emission Tomography, PET)成像等。但是在形态学变化之前常伴随着肿瘤微环境的变化,如细胞受体表达失调、异常代谢途径、血管形成及组织氧合的变化^[19],这些功能变化的成像被称为功能性成像,如荧光成像和光声成像等。解剖学及功能性成像相互结合,能够更加全面地研究肿瘤的发生和发展、对治疗药物的反应等。

2.1 荧光成像

荧光成像在肿瘤研究中应用广泛,包括研究肿瘤的转移及侵袭、研究肿瘤细胞与宿主微环境的相互作用、细胞受体的检测以及肿瘤血管等方面。视窗模型的发展有助于使用光学技术来研究肿瘤在体内的动态变化^[20]。常用的荧光成像手段包括荧光显微镜、激光共聚焦荧光显微镜以及高光谱荧光显微镜等。

2.1.1 荧光显微镜

Oye 等^[21]使用荧光显微镜观察裸鼠脊背视窗模型。视窗内种植可以稳定表达 A-07-GFP 人黑色素瘤细胞,在成像时尾静脉注射 TRITC-dextran 后观察视窗内部血管,通过连续观察看到视窗内肿瘤组织周边六种血管的显示:正常组织小动脉,正常组织毛细血管,正常组织小静脉,肿瘤组织小动脉,

肿瘤组织毛细血管和肿瘤组织小静脉。并绘制出这六种血管内荧光强度与时间相关曲线,测量视窗内不同血管内的血流速度,这对研究肿瘤内部血管及其对治疗药物的代谢提供一个很好的平台。

2.1.2 激光共聚焦荧光显微镜成像

Azusa Maeda 等^[3]使用激光共聚焦显微镜观察裸鼠脊背视窗模型,将 DsRed-BxPC-3 人胰腺癌细胞种植到脊背视窗模型中,成像前通过尾静脉注射 FITC-Dextran 以显示功能性血管,并使用 4 倍物镜用于共聚焦成像。他们研究发现,在相同大小的感兴趣区域内,与荷瘤小鼠相比,正常小鼠的功能血管面积更大,且在视窗模型安装后的第 21 天差异最为显著。使用骨化算法来分析血管网络,研究表明与相同大小的正常区域相比,肿瘤血管比正常的血管更加扭曲,肿瘤血管的长度及扭曲度会随着肿瘤的生长而增加。Oraevsky 等^[4]用白光及小于 400 nm 的光分别从视窗底部照射对表达绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein, GFP)的前列腺肿瘤进行成像以检测肿瘤生长。荧光图像可以更加清楚地显示肿瘤的位置、肿瘤内部及其周围的血管,并可以测量肿瘤组织的大小。

2.1.3 高光谱荧光成像

高光谱成像常用来显示组织中的血液灌注,并绘制出血红蛋白饱和度的图像,能够以逐个像素为基础获得荧光发射或反射/透射光谱,其主要优点在于它可以使用化学计量算法定量分离多种对比度来源。Sorg 等^[22]使用高光谱荧光成像观察种植有 4T1 乳腺癌细胞,其可以稳定表达红色荧光蛋白(Red Fluorescent Protein, RFP)并可在缺氧调控启动子(Hypoxia Regulatory Element, HRE)作用下于细胞缺氧时诱导 GFP 的表达,实验过程中分别给予小鼠空气、氧气及处死后进行成像,用以测量不同情况下视窗内肿瘤微血管的血红蛋白饱和度,并通过 GFP 的表达量来区分肿瘤乏氧区域。

2.2 光声成像

光声学(Photoacoustics, PA)是一种新兴的生物医学研究模式,具有强大的癌症检测和鉴定潜力。在光声成像(Photoacoustic Imaging, PAI)中,通常以高能脉冲激光照射生物样品。光声成像的原理是,当光照射生物组织时,其能量部分被吸收并转化成热,产生热弹性膨胀和声波。其产生超声波与生物组织的光吸收系数成比例,通过对超声信号的检测,从而形成样品相对光吸收的图像。Oraevsky 等^[4]用光声成像观察脊背视窗模型中的 GFP-PC-3 前

列腺肿瘤组织。他们发现光声成像可以显示肿瘤血管网并且使组织较深层的血管显示更加清晰。

2.3 超声成像

超声成像是利用超声声束扫描组织,通过对反射信号的接收及处理以获取组织内部的图像。Oraevsky 等^[4]使用超声探测器发射并检测超声信号以获取视窗模型内前列腺肿瘤的超声图像。超声图像可以显示视窗内肿瘤组织的结构及其内部回声随时间的变化情况。

2.4 MRI 成像

MRI 成像是通过对静磁场中的生物体施加某种特定频率的射频脉冲,由于生物组织中含水量丰富,基于核磁共振的原理使氢质子受到激励^[19],停止脉冲后,质子在弛豫过程中产生 MR(Magnetic Resonance)信号,通过对 MR 信号的接收、空间编码和图像重建等过程成像。Leung^[19]通过对乳腺视窗模型进行 MRI 成像,视窗内种植 MDA-MD-231 乳腺癌细胞。使用多切面多回波序列(Multi-Slice Multi-Echo, MSME)及快速获取弛豫增强序列(Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement, RARE)来获得二维的 T1W(T1 weight)及 T2W(T2 weight)权图像,之后重建为视窗模型的三维图像。他们研究发现乳腺癌组织有长 T1 及长 T2 特性,因而在 T1 加权图像上比周围组织信号更弱,而在 T2 加权图像上比周围组织信号更强,并且在 T2 加权像中肿瘤组织内部信号不均,可能是因为肿瘤信号较弱的区域内含有较多的脱氧血红蛋白,信号较强的区域内含水量较多的原因。由于肿瘤与周围组织的高对比度,采用 T2 加权像来测量肿瘤大小并监测其生长速度。

2.5 PET 成像

PET 成像是核医学成像的一种,是功能成像模式,通过注射放射性标记药物提示示踪剂分布的成像方法。常用的放射性药物是 F-FDG^[18],其原理是利用恶性肿瘤常表现出异常高水平的糖酵解代谢,使 FDG(Fluorodeoxyglucose)在恶性肿瘤中的摄取率显著增加,在 PET 扫描中恶性肿瘤组织可摄取更多 FDG 而明显显示。Leung^[19]利用 PET 成像观察种植 MDA-MD-231 乳腺癌细胞的乳腺视窗模型,研究显示视窗内乳腺癌肿瘤及其周围组织对 FDG 的高摄取率,并提示乳腺癌对周围组织代谢的影响。

2.6 多模态成像

上述成像方法各有利弊,多模态成像可以综合上述成像方法的优点。多模态成像的目的是对同一

研究对象采用不同的影像学方法, 结合各个成像方法的优势, 经过数据处理将图像融合以显示更多影像学信息, 提高对肿瘤检测的精确度和灵敏性。目前常使用的较为成熟的多模态成像手段包括 MRI 或 PET 与荧光成像结合、荧光与光谱成像结合以及将光声、超声以及荧光成像相结合的三模态成像系统。Gaustad 等^[23]使用增强 MRI 与荧光显微镜相结合, 将 A-07-GFP 人黑色素瘤种植入脊背视窗模型内, 以获取肿瘤微血管的形态及功能信息。Schafer 等^[2]在研究乳腺癌时使用乳腺视窗模型与共聚焦荧光显微镜成像、PET 及 MRI 成像相结合, 该实验使三种成像手段的分辨率、成像深度与功能性成像相辅相成, 对研究乳腺癌的生物学特征及治疗药物的研发提供了很好的平台。

3 结语

综上所述, 各种视窗模型的建立及多种影像学的交叉研究对我们深入理解肿瘤尤其是肿瘤血管的生成、肿瘤微环境的变化、肿瘤的转移, 及对肿瘤治疗药物的进一步研究将提供更加有用的信息。

参 考 文 献

- [1] PALMER G M, FONTANELLA A N, SHAN S, et al. In vivo optical molecular imaging and analysis in mice using dorsal window chamber models applied to hypoxia, vasculature and fluorescent reporters[J]. *Nat Protoc*, 2011, **6**(9): 1355-1366.
- [2] SCHAFFER R, LEUNG H M, GMITRO A F. Multi-modality imaging of a murine mammary window chamber for breast cancer research[J]. *Biotechniques*, 2014, **57**(1): 45-50.
- [3] MAEDA A, DACOSTA R S. Optimization of the dorsal skinfold window chamber model and multi-parametric characterization of tumor-associated vasculature[J]. *Intravital*, 2014, **3**(1): e27935.
- [4] ORAEVSKY A A, BAUER D R, WANG L V, et al. In vivo multi-modality photoacoustic and pulse echo tracking of prostate tumor growth using a window chamber[C]//*Proceedings of SPIE*, 2010, **7564**: 7564B1-10.
- [5] SANDISON J C. A new method for the microscopic study of living growing tissues by the introduction of a transparent chamber in the rabbit's ear[J]. *Anatomical Record*, 1924, **28**(4): 281-287.
- [6] GOODALL C M, SANDERS A G, SHUBIK P. Studies of vascular patterns in living tumors with a transparent chamber inserted in hamster cheek pouch[J]. *Journal of the National Cancer Institute*, 1965, **35**(3): 497-521.
- [7] MOY A. J, WHITE S M, INDRAMAN E S, et al. Wide-field functional imaging of blood flow and hemoglobin oxygen saturation in the rodent dorsal window chamber[J]. *Microvasc Res*, 2011, **82**(3): 199-209.
- [8] LASCHKE M W, MENGER M D. In vitro and in vivo approaches to study angiogenesis in the pathophysiology and therapy of endometriosis[J]. *Hum Reprod Update*, 2007, **13**(4): 331-342.
- [9] YUAN F, CHEN Y, DELLIAN M, et al. Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, **93**(25): 14765-14770.
- [10] DEWHIRST M W, KLITZMAN B, BRAUN R D, et al. Review of methods used to study oxygen transport at the microcirculatory level[J]. *International journal of cancer*, 2000, **90**(5): 237-255.
- [11] SHAN S, SORG B, DEWHIRST M W. A novel rodent mammary window of orthotopic breast cancer for intravital microscopy[J]. *Microvascular Research*, 2003, **65**(2): 109-117.
- [12] KEDRIN D, GLIGORJEVIC B, WYCKOFF J, et al. Intravital imaging of metastatic behavior through a mammary imaging window[J]. *Nat Methods*, 2008, **5**(12): 1019-1021.
- [13] SCHAFFER R, GMITRO A F. Dynamic oxygenation measurements using a phosphorescent coating within a mammary window chamber mouse model[J]. *Biomed Opt Express*, 2015, **6**(2): 639-650.
- [14] BAREYRE FM, GARZORZ N, LANG C, et al. In vivo imaging reveals a phase-specific role of STAT3 during central and peripheral nervous system axon regeneration[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, **108**(15): 6268-6287.
- [15] FARRAR M J, BERNSTEIN I M, SCHLAFFER D H, et al. Chronic in vivo imaging in the mouse spinal cord using an implanted chamber[J]. *Nat Methods*, 2012, **9**(3): 297-302.
- [16] FENRICH K K, WEBER P, HOCINE M, et al. Long-term in vivo imaging of normal and pathological mouse spinal cord with sub-cellular resolution using implanted glass windows[J]. *J Physiol*, 2012, **590**(16): 3665-3675.
- [17] BOK S, WANG T, LEE C J, et al. In vivo imaging of activated microglia in a mouse model of focal cerebral ischemia by two-photon microscopy[J]. *Biomed Opt Express*, 2015, **6**(9): 3303-3312.
- [18] BURRELL K, AGNIHOTRI S, LEUNG M, et al. A novel high-resolution in vivo imaging technique to study the dynamic response of intracranial structures to tumor growth and therapeutics[J]. *J Vis Exp*, 2013, (76): e50363.
- [19] LEUNG H M. Multimodal imaging of tumor microenvironment in murine window chamber models using optical, magnetic resonance, and nuclear imaging techniques[D]. Arizona: The University of Arizona, 2015.
- [20] LEUNG H M, GMITRO A F. Fluorescence and reflectance spectral imaging system for a murine mammary window chamber model[J]. *Biomed Opt Express*, 2015, **6**(8): 2887-2894.
- [21] OYE K S, GULATI G, GRAFF B A, et al. A novel method for mapping the heterogeneity in blood supply to normal and malignant tissues in the mouse dorsal window chamber[J]. *Microvasc Res*, 2008, **75**(2): 179-187.
- [22] SORG B S, MOELLER B J, DONOVAN O, et al. Hyperspectral imaging of hemoglobin saturation in tumor microvasculature and tumor hypoxia development[J]. *Journal of biomedical optics*, 2005, **10**(4): 044004.
- [23] GAUSTAD J V, BRURBERG K G, SIMONSEN T G, et al. Tumor vascularity assessed by magnetic resonance imaging and intravital microscopy imaging[J]. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 2008, **10**(4): 354-362.