

# CellPress 综述：光学显微技术和相干断层扫描技术在活体癌症研究中的应用

活体显微成像（IVM）和光学相干断层扫描（OCT）是两种强大的光学成像工具，能够在活体动物中，观察亚细胞水平的动态活动。结合标记和无标记技术的，IVM 和 OCT 在临床前和临床癌症成像方面得到非常广泛的应用，包括肿瘤的解剖学、生理学、肿瘤内细胞迁移和肿瘤的分子学动力。这些应用对阐明癌症生物机制、研究肿瘤的复杂生理、细胞和分子行为起到了极大帮助。同时 IVM 和 OCT 技术也在不断发展进步以适用于更多领域。如非线性光学显微镜技术的发展使得能用无标签的 IVM 对癌症胞外基质进行成像。新的光学设计和算法推动了无标签的 OCT 技术的发展，使得 OCT 能够精确的检测肿瘤边缘和脉管系统。同时荧光标签技术促使 IVM 可用于追踪肿瘤干细胞、观察肿瘤进展中肿瘤内遗传多样性、追踪治疗过程中各种免疫细胞的迁移。OCT 造影剂提高了 OCT 的灵敏度，使其能够对肿瘤及其周围的生理、分子表达、细胞行为进行成像。此外在双模内窥镜中结合使用 IVM 和 OCT，使得我们能够对一些腔内位置进行更有效更彻底的癌症筛查，如胃肠道和膀胱，本文意在阐明每种成像技术的优缺点，重点关注过去 5 年来 IVM 和 OCT 在活体癌症成像领域的重要进展、关键技术的发展以及在基础癌症生物学研究和临床肿瘤学研究中的新兴应用。这些技术在解剖、生理、细胞和分子研究角度的成像应用，帮助我们极大提高了对癌症生物学的理解，为临床前和临床管理提供了更多思

## 路。 高分辨率体内癌症成像技术

影像学是肿瘤临床管理和临床前研究不可或缺的工具。磁共振成像（magnetic resonance imaging, MRI）和超声等临床成像技术能够对癌症的位置、解剖结构及其随时间的变化情况进行宏观测量，但无法测量病变的细胞和分子尺度细节。活体显微（intravital microscopy, IVM）和光学相干断层扫描（optical coherency tomography, OCT）采用不同的成像机制，能达到亚细胞尺度的分辨率，促进临床和临床前的广泛研究（图 1）。

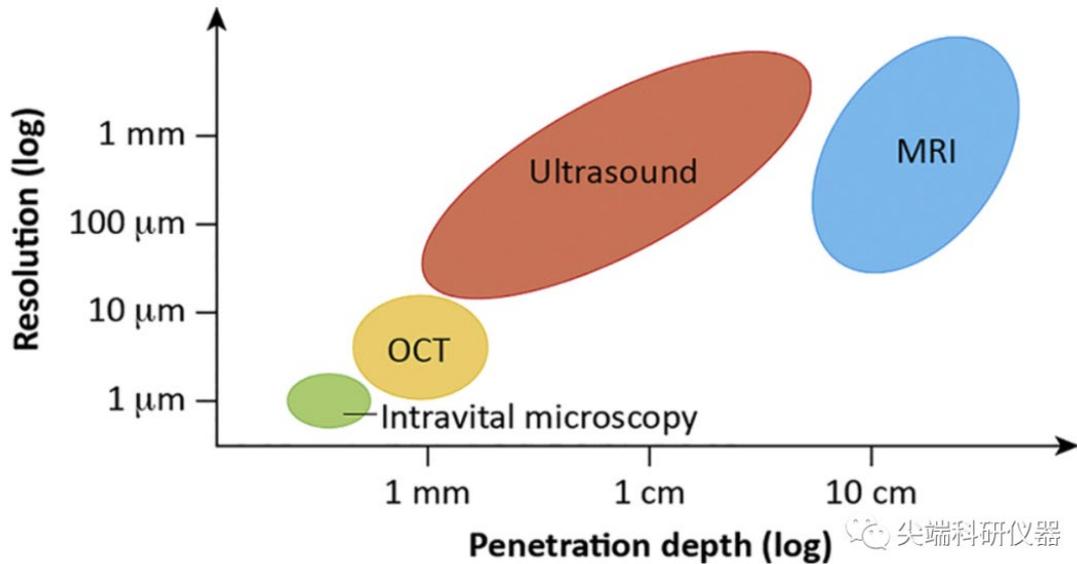


图 1. IVM、OCT 和标准临床成像模式间，空间分辨率与成像深度的对比示意图。

IVM 依赖单光子或多光子荧光显微镜（multiphoton fluorescent microscopy, MPM）对活体组织进行扫描，可以在单个时间点进行急性观察，也可以在几天到几个月内对组织位点进行长期观察。OCT 采用双光束干涉来捕捉通过组织的光散射模式。结合先进的荧光标签技术，IVM 可用于临床前癌症生物学研究中，实时表征复杂的肿瘤微环境（tumor microenvironment, TME），包括跟踪肿瘤进展、跟踪肿瘤脉管系统生长和退化、癌细胞转移、肿瘤干细胞的增殖、肿瘤相关免疫细胞的迁移、癌症治疗因子与癌症和免疫细胞之间的相互作用等等。非线性光学显微镜的发展使得 IVM 不用荧光标签就能够观测到肿瘤的细胞外基质。与临床前癌症研究中的应用相比，IVM 在临床中应用没那么普遍，主要集中在胃肠癌内镜评估和膀胱肿瘤的膀胱镜评估。OCT 常用来非侵袭性地表征浅表皮肤癌和腔内肿瘤的解剖结构。与 IVM 相比 OCT 的组织渗透性更好、视野更宽、成像速度更快（表 1），是临床肿瘤研究的有力工具，如可探测肿瘤边缘作为术中手术指导。结合最近出现的造影剂，OCT 技术极大扩展了其对癌症细胞和分子的成像能力，对肿瘤相关白细胞的实时跟踪，对过表达的癌症生物标记分子成像等。使用 IVM 和 OCT 进行临床前癌症成像研究可以帮助我们更深入探究一些基本的癌症生物学问题。如 Karagiannis 等利用 IVM 研究了化疗后常驻巨噬细胞的动态变化，发现化疗会增加巨噬细胞促进乳腺癌转移扩散的速度。SoRelle 等使用 OCT 发现金纳米颗粒造影后可以绘制出多性胶质母细胞瘤的肿瘤相关巨噬细胞的迁移轨迹。临床上结合使用 IVM 和 OCT 能够更有效更准确的进行癌症筛查，也能够更好的表征肿瘤病变的形态学和分子特征。很多癌症成像研究可以通过 OCT 和 IVM 进行，但二者在时间和空间分辨成像深度、视野、标签和可复用性等方面各有优劣势（表 1）。

表 1. IVM 和 OCT 的成像特点。

	IVM techniques	OCT techniques
Spatial resolution	<0.5 $\mu\text{m}$	<10 $\mu\text{m}$
Depth of penetration	<600 $\mu\text{m}$	2–3 mm
Temporal resolution	<7 million pixels/second	>50 million pixels/second
Multiplexability	High (5–10 fluorescent signals)	Low (up to three OCT spectral signals)
Contrast agents	Fluorochromes (Rhodamine-B, FITC, Alexa®, ICG, etc.); genetically encoded fluorescent proteins; nanoparticles (quantum dots, upconversion nanoparticles)	Gold nanoparticles, magnetic nanoparticles, microbeads, intralipid, fluorescent dyes (i.e., ICG)
Photobleaching of contrast agents	High (small molecule fluorophores) Low (fluorescent proteins and nanoparticles)	Low
Toxicity of contrast agents	Low (ICG has been FDA approved)	Low
Label-free techniques	SHG and THG	OCT, angiography, lymphangiography

## 活体显微技术（intravital microscopy, IVM）

19 世纪科学家们就已经开始用明场共聚焦显微镜利用组织反射信号进行成像，或使用多光子荧光显微镜（Multiphoton fluorescent microscopy, MPM）利用二/三次谐波产生对特定的组织结构进行成像。但明场共聚焦依赖高度半透明的组织，如内耳或眼睛，多谐波产生也依赖具有强谐波发射光谱的组织结构，如胶原和细胞脂质。因此人们又结合了荧光标签，实现了对活体细胞和分子成像。单光子荧光显微镜（1-photon fluorescent microscopy, 1PM）和 MPM 都能激发荧光基团，1PM 能够同时对不同发射光谱的荧光基团进行成像，MPM 多重性不高但组织穿透性好。荧光基团也被设计成能够在脉管系统中长时间循环、分子靶向特定的细胞表面标记、能够穿透细胞膜并留在细胞中，或者作为报告基因被嵌入，无论迁移到哪里都不断表达荧光蛋白。还有“智能”纳米技术，能够根据微环境条件变化来部署荧光基团和淬灭剂。但使用荧光基团需要注意激发和发射光谱，使用对应的光源和滤光片组，同时背景自发荧光也可能影响成像。荧光寿命成像显微技术（fluorescence-lifetime imaging microscopy）通过使用不同寿命的荧光基团来区分将周围组织，相当于一种“时间门控”增加了成像对比度，结合标准波长过滤能够极大便利荧光基团的鉴别，方便进行肿瘤微环境的形成和动力学研究。

IVM 通常是在动物身上制作一个窗口或背部皮肤褶小室，来对表面肿瘤如皮肤肿瘤等进行成像。但仍有大部分癌症处于组织内部，如结肠癌、肝癌、胰腺癌等，可能需要穿透高达约 600 $\mu\text{m}$  深度。只能借助外科手术将需要成像的部位暴露出来，这需要准备好动物模型并严格制定好操作和成像步骤。 **光学相干**

## 断层扫描（optical coherency tomography, OCT）

与 IVM 相对简单的光学系统不同，光学相干断层扫描是一种基于干涉测量的技术，用近红外 near-infrared（NIR）低相干光照射组织并检测来自组织的反向散射光子，反射光与参考光束发生干涉，记录干涉图中不同深度组织反向散射光子的时间延迟，使用傅立叶变换将其重建为组织扫描图像。OCT 的扫描原理

与超声波类似，都在组织的 z 轴方向平面捕获连续的线性图像。改变扫描仪的角度，使光束沿 x 或 y 轴方向移动完成 3D 结构扫描。OCT 可以在没有造影剂的情况下对活体组织进行解剖学和生理学成像，常被用作一种无标签成像技术。但图像质量和信息水平高度依赖扫描程序和后续处理算法。如为了检测血管，必须在相同的成像位置进行重复扫描并使用特定算法处理扫描信号以计算重复扫描的信号差。结合了造影技术之后，OCT 分辨率得到显著提高并可以扩展用于细胞和分子成像。如通过使用纳米造影剂 LGNR (large gold nanorods) 或 GNPR (gold nanoprisms) 作血管内造影剂，OCT 能够观察到皮肤表面 1 mm 以下的毛细血管，这是使用传统无标记 OCT 无法做到的。Si 等使用 microbeads 作为造影剂，成功监测了淋巴管内皮透明质酸受体 (LYVE-1) 的动态表达。OCT 仪器的改进也增强了其分辨能力，因为图像质量可能受散斑噪声影响，光学改进后的 OCT 扫描系统 SM-OCT (speckle-modulation OCT) 能够显著增强图像对比度和分辨率。de la Zerda 等人结合 SM-OCT 和造影剂 GLNR，实现了对脑肿瘤小鼠模型中肿瘤细胞相关巨噬细胞的体内成像，极大扩展了 OCT 对细胞成像的能力。John 等人结合水冷电磁体，并使用铁磁力作为造影剂，实现了对大鼠乳腺癌模型中过表达的 HER2 生物标志物进行分子靶向成像。

## 应用 01-肿瘤解剖学成像

肿瘤解剖学包括形状、大小、边缘、血管和淋巴管，是临床和临床前肿瘤学研究的重要领域。肿瘤边缘或边界可视化对分析肿瘤进程、监测治疗反应、指导癌症手术中起到非常重要的作用。IVM 通过基因编码或静脉注射荧光团使肿瘤细胞带上标签进行检测，OCT 通常用于检测肿瘤与其周围组织的内在对比差异确定肿瘤的边缘。IVM 常用于临床前动物来研究肿瘤微环境，但最近有研究发现其在人胃肠癌和膀胱癌等内腔部位癌症研究，以及检测微小转移性肿瘤中的临床适用性。但临床 IVM 仍面临几个问题，如染料漂白、组织自发光和非特异性结合荧光标签导致的假阳性信号。OCT 的优势在于快速无标签，可以大视野检测肿瘤，使其在术中和术后评估肿瘤边缘中很有优势。

肿瘤脉管系统是扩散癌细胞转移、运输免疫细胞和提供抗癌治疗的主要路径。因此无论是在基础癌症研究，还是在临床检测肿瘤进展、了解病理状态、提供预后、测量治疗反应方面，肿瘤脉管系统可视化都非常重要。活体血管成像是 IVM 和 OCT 最重要的功能之一。IVM 能够将红细胞作为天然造影剂，使用线性极化或常规透照方法，测量出血管的直径、长度、毛细血管间距、分支模式。long-circulating AngioSense 或葡聚糖偶联的荧光染料等高分子示踪剂，可以用来在血管泄露到血管外腔之前显示出血管边界。在一项术中 IVM 研究中，对黑色素瘤患者静脉注射荧光染料发现，约 50% 的肿瘤血管并不支持血流，而且人肿瘤血管的直径比之前通过免疫组化方法预测的直径要大。使用 OCT 对肿瘤脉管系统进行无标签成像的方法很多，如斑点强度方差、相位方差、复信号方差等。这些方法都基于对血管中红细胞动态散射的检测。Bouma 等同时使用 OCT 和 IVM，对临床前小鼠移植模型的 MCalV 肿瘤脉管系统进行

了成像，发现对最小的表面毛细血管进行成像时多光子荧光显微镜表现优越，但 OCT 在识别肿瘤中心区域更深处血管和一些荧光示踪剂泄露的区域方面具有优势（图 2）。OCT 能够轻易观察到深度 1 mm 以上的血管，但多光子荧光显微镜只能达到约 600  $\mu\text{m}$ 。OCT 的瞬时分辨率是 IVM 的十倍左右。OCT 能够快速显示肿瘤的脉管系统，包括与主血管的连接性，这可以弥补 IVM 的分辨率高但深度不够。

无标签 OCT 除了可以应用于肿瘤血管成像，还能用于检测光线显著减弱的深处肿瘤血管和血细胞比容低的精细血管结构。Relle 等静脉注射 LGNRs 作为外源性造影剂，使用 OCT 扫描显示出了传统 OCT 方法无法检测到的更深处的肿瘤微血管（图 3A-D）。Si 等报道称金纳米棱镜（gold nanoprisms, GNPRs）做血管内造影剂，与无标签 OCT 方法相比，分别在黑色素瘤和肿瘤周围组织中多检测到约 60% 的血管和约 40% 的毛细血管（图 3E-H）。

除研究血管生成外，IVM 和 OCT 在淋巴管内皮发育和肿瘤周围淋巴管生成的生理病理学研究中也有值得注意的发现。IVM 对小鼠尾部肿瘤进行微淋巴管造影术发现，肿瘤周围的淋巴管是增生的。这些肿瘤周围淋巴管的直径甚至比过表达 VEGFC 的肿瘤里的还大。但过表达 VEGFC 并不会诱导肿瘤内功能性淋巴管的形成。IVM 微淋巴管造影技术通常要局部注射荧光染料并拍摄淋巴管对染料的吸收和排出（表 2），但这会使注射部位附近精细结构模糊。无标签 OCT 对淋巴管成型的方法是检测含有血管形状和低 OCT 信号的组织结构，因为淋巴液是光学透明的，与周围组织相比几乎不反射光。利用这种独特的光学特性，已经开发了很多无标签 OCT 淋巴管造影技术。Vakoc 等发现可以用该方法分离肿瘤周围的淋巴管网络。皮下注射 OCT 造影剂能够增强对淋巴结构的造影。例如，在小鼠耳朵离散位置分别注射两种不同类型的 LGNRs，可以看到淋巴管。IVM 和 OCT 方法是研究肿瘤周围淋巴网络的有力工具，但活体肿瘤内淋巴网络由于脉管更深、管腔塌陷和无功能的肿瘤内淋巴管等原因，还是很难进行成像。

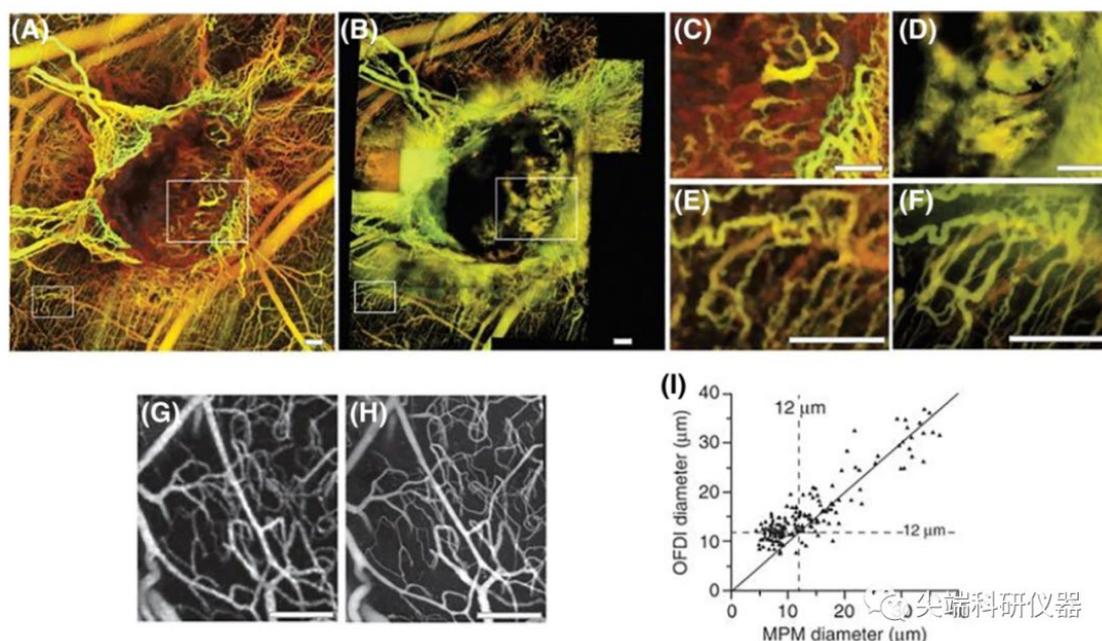


图 2. 小鼠 MCalV 肿瘤模型的 OCT 和 IVM 做造影图像。(A, B) 对移植在背部皮肤褶皱室中的 MCalV 肿瘤使用 OCT 和 MPM 进行宽视野成像。MPM 图像需要收集并将 30-40 张 3D 图像堆叠以制成与 OCT 一致的视野。MPM 能分辨出组织中深达 400  $\mu\text{m}$  的血管。OCT 成像时间 10 min, MPM 成像时间 2 h。使用低放大率透镜可减少 MPM 成像时间, 但要牺牲分辨率和穿透深度。(C, D) A 和 B 图中上部方框区域的高倍放大, OCT 被增强能看到深层血管, MPM 血管渗透区域形态学区分清晰。(E, F) A 和 B 图中下部方框区高倍放大, MPM 和 OCT 获得的更精细血管结构的更多细节。(G-I) 将自动血管追踪用于 OCT 和 MPM 得到的图像上, 量化 OCT 造影的分辨率, 同时验证 OCT 的形态学测量。

## 应用 02-肿瘤生理学成像

通过血液散播造影剂需要通过脉管系统输送, 经血管交换进入组织, 扩散或对流穿过间隙空间, 并被肿瘤边缘的淋巴管清除, 药物向肿瘤的有效输送也要遵循相同的路径。IVM 成像研究发现, 肿瘤中的血液灌注在空间和时间上是不均匀的, 这表明肿瘤内资源分布不均可能导致肿瘤性质不均一, 导致药物处理和疾病进展出现差异。此外一些肿瘤中, 平均红细胞速度低于宿主血管, 且与血管直径无关, 表明血液和间质压力发生了变化。

OCT 作为一种测量血流速度和血流动力学的定量工具已经得到了大量的应用。Doppler OCT (D-OCT) 被用于测量动脉和静脉中的轴向血流速度, 但是这种技术不能检测垂直角度和容易受到组织运动影响的血流。Merkle 等人开发了动态对比光学相干断层扫描 (DyC-OCT), 对在血管内示踪剂 (静脉注射脂肪乳剂) 通过视野时对其进行成像克服了这一限制。这项技术也可用于测量微血管血流动力学。

了解肿瘤淋巴流动模式为研究肿瘤淋巴结转移提供了生理学基础。活体技术可精确测量毛淋巴管中的流体速度（表 2）。IVM 研究发现过表达 VEGFC 诱导小鼠皮肤淋巴管增生会减弱淋巴流动，并且肿瘤内没有引流淋巴液的功能性淋巴管。

使用无标签 OCT 或造影剂增强的 OCT 都能够看到淋巴液。Blatter 和同事开发了一种无标签 D-OCT 方法测量淋巴液流速。最新研究中，出现了基于 GNBP 的多路复用 OCT 造影剂，允许观测多种生物过程如肿瘤内和肿瘤周围的淋巴流动。一项研究表明，肿瘤内注射的造影剂会流到周围淋巴管和前哨淋巴结中，皮下注射的造影剂也能够流入肿瘤内部、周围淋巴管和同样的前哨淋巴结（图 3K）。

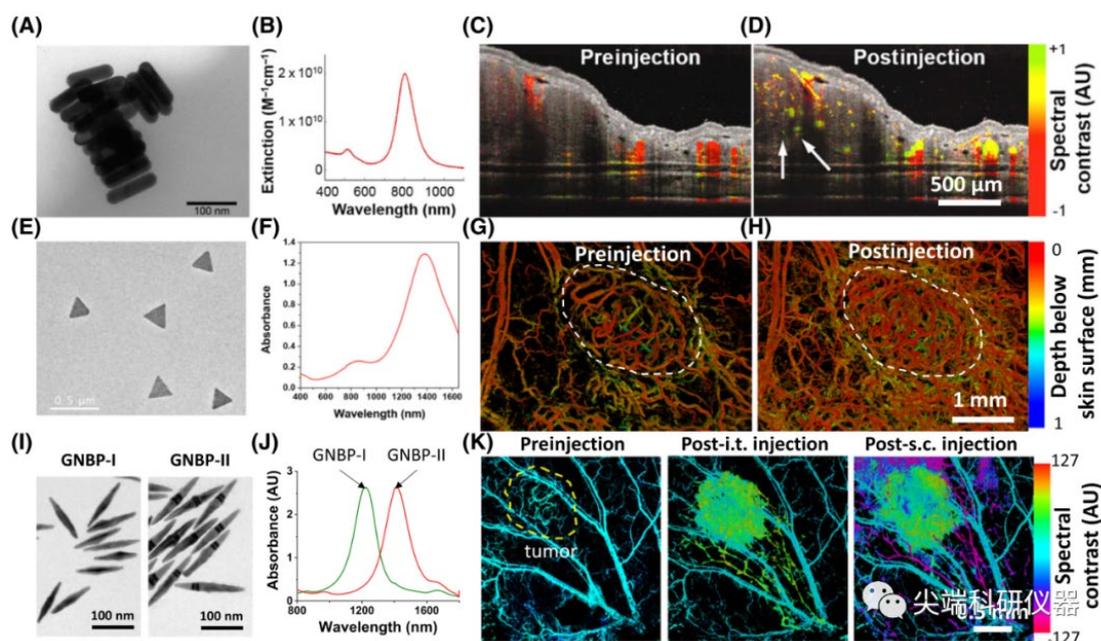


图 3. 几种可用于增强 OCT 肿瘤血管造影和多路淋巴造影的 OCT 造影剂。

(A) LGNRs 的透射电子显微镜图像，平均长度  $107 \pm 7$  nm，平均宽度  $32 \pm 2$  nm，平均纵横比 3.4。(B) LGNRs 的可见近红外 (Vis-NIR) 吸收光谱，在 815 nm 处显示出纵向等离子共振峰。(C, D) 静脉注射 LGNRs 前后，小鼠耳移植的 U87MG 肿瘤的光谱对比 OCT 图像。LGNRs 提高了 OCT 图像中血管的对比度，使 OCT 能够检测肿瘤深处的小血管（白色箭头）。

(E) GNPR 的 TEM 图像，平均边长约 140 nm。(F) GNPR 的可见近红外吸收光谱，1385 nm 处显示出纵向等离子共振峰。(G, H) 静脉注射 0.75 nMPEGylated GNPR 前和注射 5 min 后，带有黑色素瘤的小鼠耳朵组织的正面投影 OCT 血管造影图片。彩色图显示组织表面下方的脉管深度。注射后，可见肿瘤内约 60% 以上的微血管。(I) 纵横比不同的 GNBP 的 TEM 图像。(J) GNBP-I 和 GNBP-II 的近红外光谱。(K) 移植肿瘤的小鼠耳朵血管网络流量门控光谱 OCT 图像，左为注射造

影剂前，中为肿瘤内注射 GNPB- I 的肿瘤及周围淋巴管，右为皮下注射 GNPB- I 和 GNPB- II 的肿瘤及周围淋巴管。

表 2. 使用 IVM 和 OCT 技术进行的体内肿瘤成像

Parameter	IVM techniques	OCT techniques
<b>Anatomical imaging</b>		
Tumor boundary	MPM imaging of fluorescent GBM in mouse brains by transfecting GFP expressing plasmid in U87 MG cells [2]; MPM imaging of the margin of melanoma tumor in a xenograft murine model generated by implanting CFP-B16 cell on the right flank of C57BL/6 mice [6]	Detecting the tumor margins in murine GBM models and human glioma samples using optical attenuation [14] Detecting the margins of mouse GBM xenograft and human low-grade glioma using label-free SM-OCT [13]
Tumor blood vessels	Label-free imaging of blood vessels using MPM excited endogenous tryptophan fluorescence [129] Imaging tumor blood vessels using Rhodamine- or FITC-dextran [2] or AngioSense 680/750 as fluorescent dye [23,130]	Imaging blood vessels in mouse GBM xenograft using LGNR contrast-enhanced OCT [36] Imaging blood vessels in mouse melanoma xenograft using GNPR contrast-enhanced OCT [37]
Peritumoral lymphatic vessels	MPM imaging of peritumoral lymphatic vessels on a mouse ear by subcutaneous injection of anti-LYVE-1 antibody coupled to eFluor® 660 [76] 1PM/MPM imaging of peritumoral lymphatic vessels on mouse tail or footpad by injecting FITC- or tetramethylrhodamine-dextran subcutaneously [51,53,131,132]	Lymphangiography of murine mammary adenocarcinoma using label-free OCT [31] Visualizing peritumoral lymphatic drainage by intratumoral and subcutaneous injection of gold nanobipyramids as contrast agents [71]
Tumor extracellular matrix	Imaging collagen surrounding metastatic cancer cells using SHG [8,22]	Revealing collagen structures associated with bladder and skin cancers using PS-OCT [133] and CP-OCT [134]
<b>Functional imaging</b>		
Blood flow speed	Vessel isolation and repeated imaging in an optical window with movement correction [21,135]	Measuring blood flow velocity in human retina using label-free Doppler OCT [61,62,64,136] Measuring microvascular flow speed in mouse cortex and rat retina using DyC-OCT [63,66]
Lymphatic flow speed	Measuring fluorescence intensity profiles as a function of time after injecting fluorescent dyes [67,137,138]	Measuring lymph velocity in mouse ear using label-free Doppler OCT [54]
<b>Cellular imaging</b>		
Tumor microenvironment (tumor subclones and tumor-associated leukocytes)	Imaging tumor stem cells [5,139] and intratumor genetic heterogeneity [26,140] using fluorescent lineage tracing 1PM imaging of monocytes and TAMs using single-walled carbon nanotubes and dextran-coated iron oxide nanoparticles, respectively [23,24] Tracking TAMs using MPM and F4/80 antibody-conjugated fluorescent dye [25] Tracking adoptive CTLs using confocal laser scanning microscopy and cell membrane penetrating dyes [6]	Imaging the migration of TAMs spatiotemporally using SM-OCT and LGNR as OCT contrast agents [15]
Tumor cell metastasis	Tracking tumor cells expressing fluorescent reporter genes using MPM [4,22]	Imaging metastatic choroidal tumor using label-free OCT [141,142]
Circulating tumor cell	Imaging circulating EXPC3 tumor cells in mouse peritumoral blood vessels using MPM and anti-CD24 antibody conjugated quantum dots [143] Intravital flow cytometry [144–146]	Myeloma detection using LGNR contrast-enhanced OCT [41]
<b>Molecular imaging</b>		
Tumor surface biomarkers	Imaging HER2 on xenograft mouse breast tumor model using single-cell IVM [84]	Imaging HER2 on rat breast cancer xenograft using magnetomotive OCT [16]
Lymphatic vessel biomarkers	Imaging LYVE-1, VEGFR3, and PECAM1 using 1PM/MPM with fluorophore-conjugated antibodies [77,147,148]	Imaging LYVE-1 using base-catalyzed CATT (Wu) microbeads as contrast agent [134]

### 应用 03-肿瘤细胞和肿瘤相关白细胞成像

了解肿瘤微环境中的细胞行为对于揭示肿瘤发育的潜在机制和开发新疗法非常关键。IVM 是研究肿瘤微环境中细胞行为的常用技术，包括肿瘤细胞和相关免疫细胞的迁移。了解肿瘤微环境的细胞行为对于阐明肿瘤发展的潜在机制和开

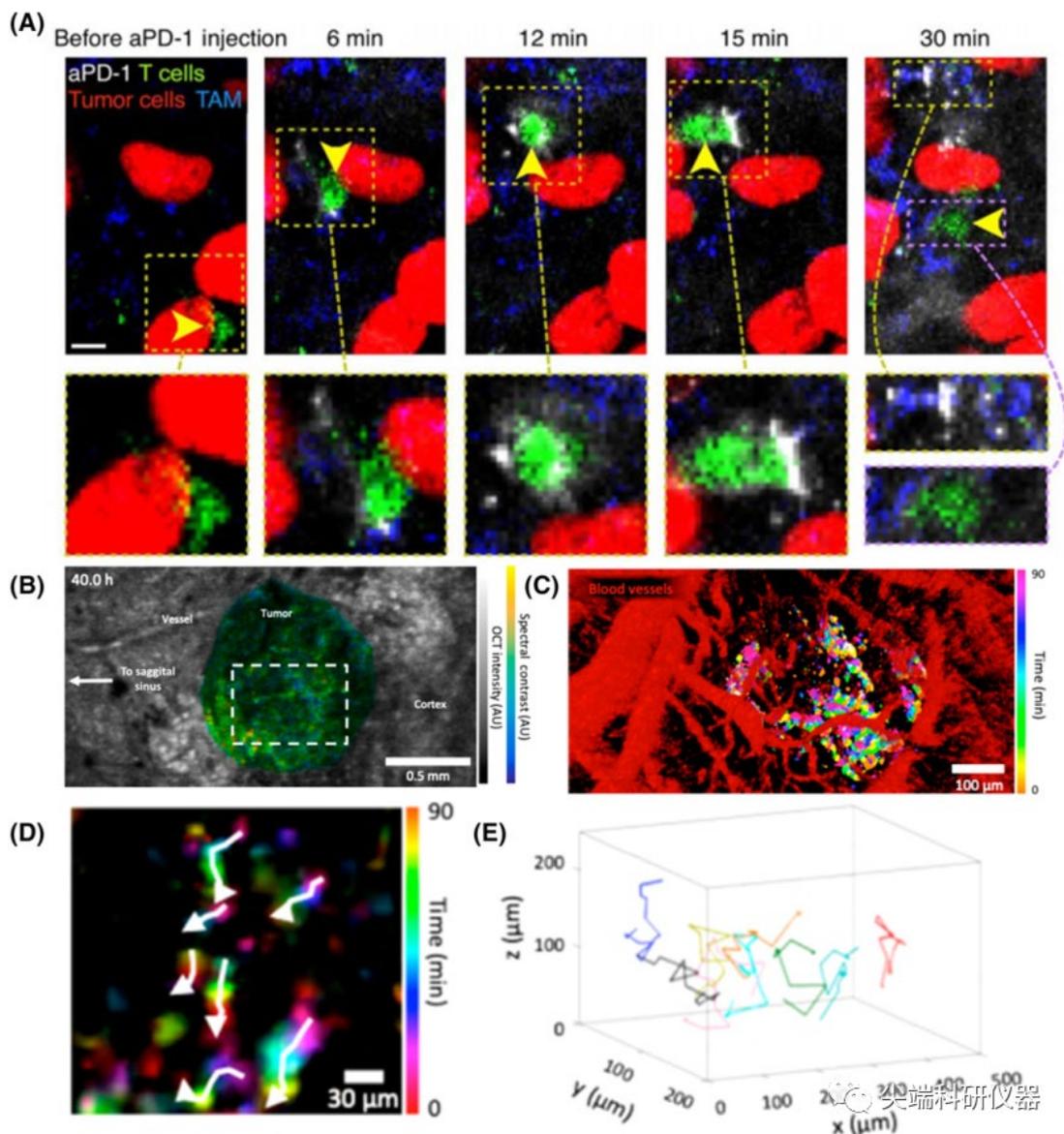
发新的治疗方法至关重要，可以帮助阐明癌症的进展、消退、转移以及对各种治疗的反应。淋巴转移是帮助肿瘤细胞从原始位置扩散到身体其他部位的关键过程。IVM 已被用于识别淋巴转移过程各步骤。例如，对鼠淋巴瘤模型中的淋巴结进行动态监测发现，脾和骨构建淋巴结后会产生浸润的肿瘤细胞，并不是我们之前假设的那样是从肿瘤原始位置运输过来的。通过使用表达肿瘤特异性报告荧光团的转基因小鼠，IVM 可以动态监测淋巴管中的肿瘤细胞转移。常规 IVM 必须在动物麻醉的情况下进行，但 **Pereira** 等也实现了某种情况下的无麻醉成像。随着研究的深入，这可能会逐渐成为一个受关注的问题，尤其是需要进行几天几周甚至更长时间的成像观察，或者需要对清醒或能够对刺激产生即时反应的动物进行成像，或者麻醉可能影响成像的细胞和分子时。

肿瘤相关白细胞介导癌症的原发过程和抗原发过程，在肿瘤微环境中发挥重要作用。肿瘤相关巨噬细胞和 **CD8+ T** 细胞是两种重要的免疫细胞，会对多种癌症免疫疗法的疗效产生实质性影响。通过利用先进的荧光标记技术，IVM 能够同时长期的追踪肿瘤微环境中多种白细胞和治疗因子，从而帮助阐明肿瘤微环境中白细胞的募集、粘附和行行为，量化白细胞对各种治疗剂的反应，同时帮助阐明导致癌症免疫疗法耐药性的机制。**Junankar** 等人使用 **real-time 2-photon IVM** 发现 TAMs 会吞噬结合到乳腺肿瘤小颗粒微钙化上的双膦酸盐药物。**Arlaukas** 等人在抗 **PD-1** 免疫疗法中同时对 TAMs、**CD8+ T** 细胞和治疗因子的分布进行了 **30 min** 的跟踪，发现抗 **PD-1** 单克隆抗体 (**aPD-1 mAbs**) 在注射后 **6-15 min** 会短暂结合 **CD8+ T** 细胞，但最终这些抗体会被临近的 TAMs 捕获并保留 (图 4A)。随着过度表达或缺乏相关分子的基因工程小鼠模型越来越多，前有荧光谱系追踪模型和后有基因敲除模型，IVM 能够继续帮助人们对肿瘤微环境进行更深入了解，揭开肿瘤-免疫系统相互作用的神秘面纱，改进癌症治疗方法。

OCT 最近才被用于研究肿瘤微环境免疫细胞的迁移。与 IVM 相比，OCT 成像视野更大，分辨率更高 (表 1)，如扫描 **300 × 20 × 200 μm** 体积的组，IVM 通常需要 **1 秒**，而 OCT 通常需要 **0.02 秒**。**de la Zerda** 等人报道了基于 **contrast-enhanced SM-OCT** 技术的白细胞纵向成像。用 **LGNR** 造影剂在小鼠原位胶质母细胞瘤模型中对 TAMs 和活化的小胶质细胞进行体内标记，由此对肿瘤内 TAM 迁移和分布进行了实时跟踪 (图 4B)。这使我们能够详细研究 TAMs 在体内的基本行为，包括它们在肿瘤内的分布异质性以及调节增殖中的作用。除了白细胞追踪，研究人员还实现了循环肿瘤细胞的体内追踪。这项研究标志着 OCT 首次用于检测体内血液中的单个细胞。我们大可期待这一技术在动态检测和量化活体内循环的肿瘤细胞中的应用效果。

**Smith** 等人使用 IVM 结合荧光团标记的单壁碳纳米管 (**single-walled carbon nanotubes, SWNTs**)，静脉注射到小鼠中后，直接观察到单壁碳纳米管选择性积累到单核细胞中，并观测到了其自然运输、外渗和进入肿瘤过程 (图 4F-H)。研究发现单壁碳纳米管通过进入炎症单核细胞，作为“特洛伊木马”溢出并

进入肿瘤中，导致观察到非常高的肿瘤积聚性。或许这些单壁碳纳米管可用于对炎性单核细胞运输到的部位进行成像，或用于治疗这些炎性单核细胞，因为炎性单核细胞与许多疾病包括从癌症到动脉粥样硬化到神经退行性疾病还有关节炎，都有关系。因此，结合使用纳米材料，可以通过 IVM 在微尺度上实现血管和肿瘤动力学可视化，这为单核细胞/巨噬细胞成像，癌症及其他疾病的治疗提供了潜在基础。IVM 能做到多颜色和高分辨率，可用于确定单壁碳纳米管或其他纳米材料在疾病部位的定位，还可以通过评估细胞杀伤（如注射凋亡信号试剂）、激活和向其他细胞表型分化来进行治疗方法的调整。但要同时进行多维分析，要观察各种细胞类型、血管特征、细胞状态和分子的高度交互系统，则需要更多颜色，更新的算法。



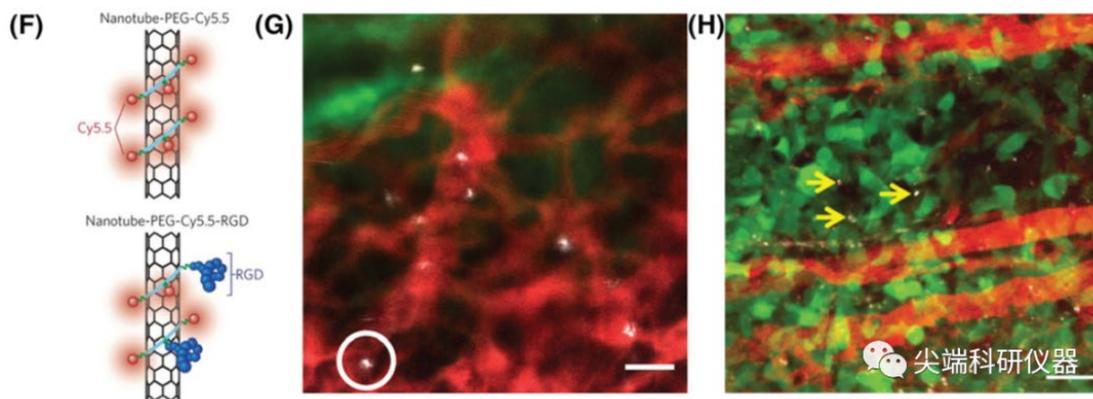


图 4. IVM 和 OCT 追踪肿瘤相关巨噬细胞 (TAM) 和单核细胞迁移。(A) 在使用 MC38-H2B-mApple 肿瘤小鼠模型进行抗 PD-1 免疫治疗期间, 对 TAMs (Pacific blue-dextran 纳米颗粒标记)、T 细胞 (YFP 标记) 和抗 PD-1 抗体 (AF647 标记) 进行纵向和同时 IVM 成像。黄色箭头表示 PD-1 抗体在 6-15min 时与 CD8+ T 细胞结合的位点, 21min 以后在巨噬细胞内的位点。比例尺 30  $\mu\text{m}$ 。(B) 注射 40h 后肿瘤 (带颜色) 和周围脑实质 (灰色) 的正面 SM-OCT 图像。(C) 脑肿瘤中 TAM 迁移的 time-resolved OCT 图像。斑点方差检测肿瘤脉管系统 (红色)。(D, E) 从注射后 40h 到注射后 41.5h 随机选择的 TAMs 的迁移轨迹图。(F) 单壁碳纳米管与 PEG 非共价包被示意图, 疏水段 (浅蓝色) 与单壁碳纳米管表面相连, 亲水段 (绿色) 与 Cy5.5 荧光染料 (红色球体) 和/或 RGD (或 RAD) 肽 (蓝色环状球结构) 相连。(G) 肿瘤脉管系统内, 负载单壁碳纳米管的循环单核细胞的 IVM 荧光图像 (圈出的细胞为例)。(H) 肿瘤区域的代表性活体显微图片。

## 应用 04-分子标志物和肿瘤动力学的成像

IVM 和 OCT 都能够通过使用合适的造影剂对肿瘤细胞表面过表达的生物标记物进行成像。已有研究使用 OCT 进行了单个癌症标志物的分子成像, 结合新的 OCT 造影剂有望在未来实现多重成像。IVM 已经广泛用于癌症生物标志物的多重标记和成像, 在肿瘤异质性研究中得出很多成果。由于 IVM 分辨率更高, 在监测药物输送和肿瘤进展中涉及的各种细胞内分子事件方面具有独特的优势, 如基因表达/调节、酶活性和信号通路。还可以用于监测许多其他纳米粒子, 新抗体或小分子药物的在体内的循环和生物效应。监测酶的活性需要分子探针, 可以通过与酶或其产物的特定相互作用来改变其光学性质。已有研究使用近红外光源监测组织蛋白酶 B 和许多其他酶的活性。为使基因表达可视化, 需要开发由特定启动子控制的各种荧光蛋白 (例如绿色荧光蛋白) 的转基因细胞系或动物。如 Leben 等人利用这种方法研究了神经系统疾病中 NAD (P) H 代谢的动力学。这些研究的测量显示, 癌症的基本分子驱动因素, 如对新治疗的遗传或酶反应, 可能是癌症治疗的关键靶标部分。

对比增强的 OCT 技术 (contrast-enhanced OCT) 能够对体内细胞生物标志物进行分子成像。Boppart 等人使用磁动 OCT (magnetomotive-OCT) 和结合了

抗体的铁磁氧化铁纳米粒子做造影剂，在乳腺癌大鼠模型中实现了 HER2 的靶向分子成像。随着外加磁场的变化，纳米粒子旋转并搅动周围细胞，因此通过 OCT 可以检测到的局部光学散射特性的变化。Si 等人研究发现，具有靶向性的聚苯乙烯 MBs 也可以用作光学相干断层扫描的分子造影剂。LYVE-1 是一种对肿瘤转移和炎症敏感的重要淋巴生物标志物。靶向结合了 LYVE-1 的 MBs 发生相位变化可使用 OCT 进行检测，从而实现 LYVE-1 在小鼠炎症模型中的动态表达可视化。这项技术还可能用于与肿瘤诱导的炎症和淋巴管生成相关的分子动力学研究中。已经有研究正在开发新的 contrast-enhanced OCT 方法，以实现监测更多肿瘤相关淋巴管和血管生物标志物，包括 VEGFR-2、VEGFR-3、血管细胞粘附分子 1、血小板和内皮细胞粘附分子 1 等等。

## 应用 05-IVM 和 OCT 在肿瘤成像中的结合

IVM 和 OCT 是互补的技术，将两者结合的多模式系统可以在临床前环境中增强癌症成像，并在临床环境中支持更好的恶性肿瘤诊断。已经有研究在内窥镜或膀胱镜中将二者结合起来，显示了增强肿瘤学特征的潜力。IVM 和 OCT 结合成像技术的一个关键优势是可以同时表征肿瘤的解剖结构和分子特征。Iftimia 等人报道了一种 fluorescence-guided OCT 方法，在结肠直肠癌的临床前小鼠模型中，皮内注射 RGD 肽结合的荧光微粒后，首次使用 IVM 筛查了结肠癌定位，然后使用 OCT 验证 IVM 识别的肿瘤组织并检查结肠癌形态学。还有研究人员进一步报道了 fluorescence-guided OCT 膀胱镜在大鼠膀胱癌早期检测中的应用。该方法还能够减少膀胱癌检测中的假阳性。Tang 等人将高灵敏度荧光层状光学断层成像（fluorescence laminar optical tomography）和 OCT 内窥镜用于 C57BL/6J-Apc<sup>Min</sup>/J 小鼠模型中结肠癌的结构和酶活性成像。Li 等人使用同步配准近红外荧光成像（simultaneous coregistered NIR fluorescence imaging）和 OCT，开发了一种多模式内窥镜系统，通过同时观察胃肠道的微血管和形态学变化，可以实现早期检测结直肠癌。在 F344-Apc<sup>Pirc</sup>Uwm 大鼠模型中，该成像技术能够成功识别和区分正常结肠、增生性息肉、腺瘤性息肉和恶性腺瘤。目前大多数 OCT 造影剂都是近年出现的，尚未得到 FDA 批准，但这并不妨碍我们期待在临床结合使用这两种技术，会对形态学和分子成像有极大改善。

## 结束语

IVM 和 OCT 在分辨率和成像深度方面是互补的光学成像技术，各自在基础癌症生物学研究和临床肿瘤学研究中具有独特引用。IVM 分辨率高（ $<0.5 \mu\text{m}$ ），但组织穿透有限（ $<600 \mu\text{m}$ ）。OCT 分辨率（ $5-10 \mu\text{m}$ ）较低，但组织穿透性好（ $2-3 \text{mm}$ ）、扫描速度更快、视野更宽。二者都可以标记和无标记方法使用。IVM 结合多种标记方法后能成为一种非常强大的工具，可用于癌症药物输送、基因表达和基础癌症研究中酶活性的细胞跟踪和分子成像。多谐波生成等无标记技术使 IVM 能够对肿瘤微环境的亚细胞结构成像，如细胞外基质和类脂体。OCT 与原本是一种无标记技术，用于肿瘤解剖成像和肿瘤边缘检测，更新

迭代的光学设计和成像算法使成像能力得到显著提高。新兴的造影剂和标记技术扩展了 OCT 在活体癌症的生理、细胞和分子成像方面的能力，开辟了基础癌症研究和临床肿瘤学研究的新领域。表 2 总结了各种新兴的 IVM 和 OCT 技术，这些技术已用于癌症的解剖学、生理学、细胞学和分子成像。

未来在光学设计、算法开发和造影剂方面创新使用，将进一步增强临床前和临床癌症成像效果，并实现更多临床肿瘤学应用。随着新的造影剂、标记技术和算法的进步，扩展可复用性可能是未来 IVM 和 OCT 的主要技术进步方向。例如，光谱分离技术的发展允许使用 MPM 同时激发和检测在不同细胞和组织区室中表达的七种荧光团，可以分辨更多的标记，并获取更多关于活体内癌细胞类型、细胞状态和组织结构的信息。将体内光学成像与电子显微镜成像、流式细胞术、RNA 测序和蛋白质组学相结合，可以进一步扩展 IVM 和 OCT 在分子癌症研究方面的应用。除此之外，先进的计算机算法、云计算和人工智能的发展也将极大促进未来大型 IVM 和 OCT 数据集的分析。最终会极大促进我们在早期癌症检测、癌症类型分类、肿瘤内异质性绘图、治疗反应监测以及成像结果与下游分子分析等研究中的进展。

#### 参考文献：

Si, P. , Honkala, A. , Zerda, A. D. L. , & Smith, B. R. . (2020). Optical microscopy and coherence tomography of cancer in living subjects.