

# 高分辨率光声显微成像评估结直肠癌肝转移瘤的血液供应模式

王宽宏<sup>1</sup>, 郭婷<sup>2</sup>, 谢辰仪<sup>2</sup>, 吴曼琪<sup>3</sup>, 陈鑫<sup>1</sup>

1. 华南理工大学附属第二医院放射科, 广东 广州 510180; 2. 南方医科大学附属广东省人民医院(广东省医学科学院)放射科, 广东 广州 510080; 3. 华南师范大学光电科学与工程学院, 广东 广州 510631

**【摘要】** 目的 探讨血管生成型与血管共选型肝转移灶的建模方法, 并评估高分辨率光声显微成像区分两种血供模式的可行性。方法 将 24 只雄性裸鼠随机均分 4 组, 分别通过肝脏注射和脾脏注射 HT29-LUC 及 HCT116-LUC 细胞, 建立不同肿瘤模型。成瘤后行光声显微成像, 定量分析血管面积占比、半径等指标, 并行病理验证。结果 光声图像清晰显示病灶血管形态。肝脏注射模型中, 两组肿瘤光声参数差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 病理形态相似。脾脏注射模型中, HT29-LUC 组血管面积占比、半径及分形维数均显著区别于 HCT116-LUC 组 ( $P<0.05$ ); 病理证实 HT29-LUC 组细胞沿肝固有血道生长, 为血管共选型, 而 HCT116-LUC 组挤压肝组织, 为血管新生型。结论 脾脏注射法可稳定建立两种血供模式肝转移瘤模型; 高分辨率光声显微成像可将其有效区分。

**【关键词】** 结直肠肿瘤; 光声技术; 血管

**【中图分类号】** R735.3<sup>+</sup>7

**【文献标志码】** A

**【文章编号】** 1672-6170(2026)03-0061-05

## Assessment of blood supply patterns in colorectal cancer liver metastases using high-resolution photoacoustic microscopy

WANG Kuan-hong<sup>1</sup>, GUO Ting<sup>2</sup>, XIE Chen-yi<sup>2</sup>, WU Man-qi<sup>3</sup>, CHEN Xin<sup>1</sup>

1. Department of Radiology, The Second Affiliated Hospital of South China University of Technology, Guangzhou 510180, China; 2. Department of Radiology, Guangdong Provincial People's Hospital (Guangdong Academy of Medical Sciences), Southern Medical University, Guangzhou 510080, China; 3. College of Biophotonics, School of Optoelectronic Science and Engineering, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

**【Corresponding author】** CHEN Xin

**【Abstract】** **Objective** To explore modeling methods for angiogenic and vasculogenic liver metastases, and to evaluate the feasibility of high-resolution photoacoustic microscopy in distinguishing the two vascular supply modes. **Methods** Twenty-four male nude mice were randomly divided into four groups. HT29-LUC and HCT116-LUC cells were injected into the liver and spleen respectively to establish different tumor models. After tumor formation, photoacoustic microscopy imaging was performed to quantitatively analyze indicators such as vascular area ratio and radius. Pathological validation was performed. **Results** Photoacoustic images clearly displayed the vascular morphology of the lesions. In the intrahepatic injection models, no significant differences were observed in the photoacoustic parameters between the two tumor groups ( $P>0.05$ ). Their pathological morphologies were similar. In the intrasplenic injection models, the vascular area fraction, vessel radius and fractal dimension in the HT29-LUC group were significantly different from those in the HCT116-LUC group ( $P<0.05$ ). Pathological examination confirmed that HT29-LUC cells grew along the native hepatic vasculature, indicating vessel co-selection, whereas HCT116-LUC cells compressed the hepatic parenchyma, indicating angiogenesis. **Conclusions** The intrasplenic injection method can stably establish liver metastasis models representing two distinct vascular supply patterns. High resolution photoacoustic microscopy imaging can effectively distinguish it.

**【Key words】** Colorectal neoplasms; Photoacoustic techniques; Blood vessels

结直肠癌肝转移 (colorectal cancer liver metastases, CRCLM) 是导致结直肠癌患者死亡的主要原因之一<sup>[1]</sup>, 贝伐珠单抗联合化疗仅使部分患者获益。近年研究发现, 组织病理分型为替代型的结直肠癌肝转移瘤通过血管共选供血, 对贝伐珠单抗天然耐药<sup>[2, 3]</sup>; 而促纤维增生型与推动型依赖血管生成, 对贝伐珠单抗敏感<sup>[3, 4]</sup>, 所以血供模式鉴别对治疗决策至关重要<sup>[2, 3]</sup>。目前区分血供模式依赖术后病

理<sup>[5]</sup>, CT、MRI 仅能评估病灶形态, 无法直接可视化微血管结构<sup>[6]</sup>。光声显微成像 (photoacoustic microscopy, PAM) 利用光声效应<sup>[7]</sup>, 无需对比剂和电离辐射, 可实现微米级分辨率的三维血管重建。本研究旨在通过不同接种方式建立血管生成型与血管共选型 CRCLM 模型, 并初步评估 PAM 在活体、无标记条件下区分这两种血供模式的可行性, 以期精准抗血管生成治疗提供新的影像学工具。

### 1 材料与方法

**1.1 动物分组及建模** 本研究于 2025 年 8 月至 2026 年 1 月在华南师范大学光电科学与工程学院进行。实验选用 6 周龄的 BALB/c 雄性裸鼠 [体重 ( $20\pm 2.5$ )g] 24 只, 在 26 °C、无特定病原体条件下

**【基金项目】** 国家自然科学基金资助项目 (编号: 82371954、T2541066); 广州市科技计划项目 (编号: 2025A04J5147); 广东省特支计划青年拔尖人才 (编号: 2024TQ08A495)

**【通讯作者】** 陈鑫

饲养。本实验所用动物均购自百试通生物技术有限公司。实验方案经华南师范大学伦理委员会批准,并符合所有相关伦理标准。小鼠随机分成 4 组(每组 6 只)。无菌条件下,经消毒、麻醉后,于 12 只小鼠肝脏原位注射  $2 \times 10^5$  个 ( $50 \mu\text{l}$ ) HT29-LUC 或 HCT116-LUC 细胞;另 12 只小鼠行脾脏注射,细胞类型与数量同上。缝合小鼠腹部伤口,给予抗生素

治疗并观察 3 天。注射后第 7 天起,每周使用 IVIS Lumina LT 成像系统进行体内肿瘤生长的生物发光成像监测。在异氟烷麻醉前,向携带 HCT116-luc 或 HT29-luc CRCLM 异种移植肿瘤的小鼠腹腔注射  $150 \text{ mg/kg}$  的 D-荧光素(阿拉丁),10 分钟后进行活体动物成像。确认肿瘤长出后,即可开始后光声成像实验。本研究实验原理及流程如图 1 所示。

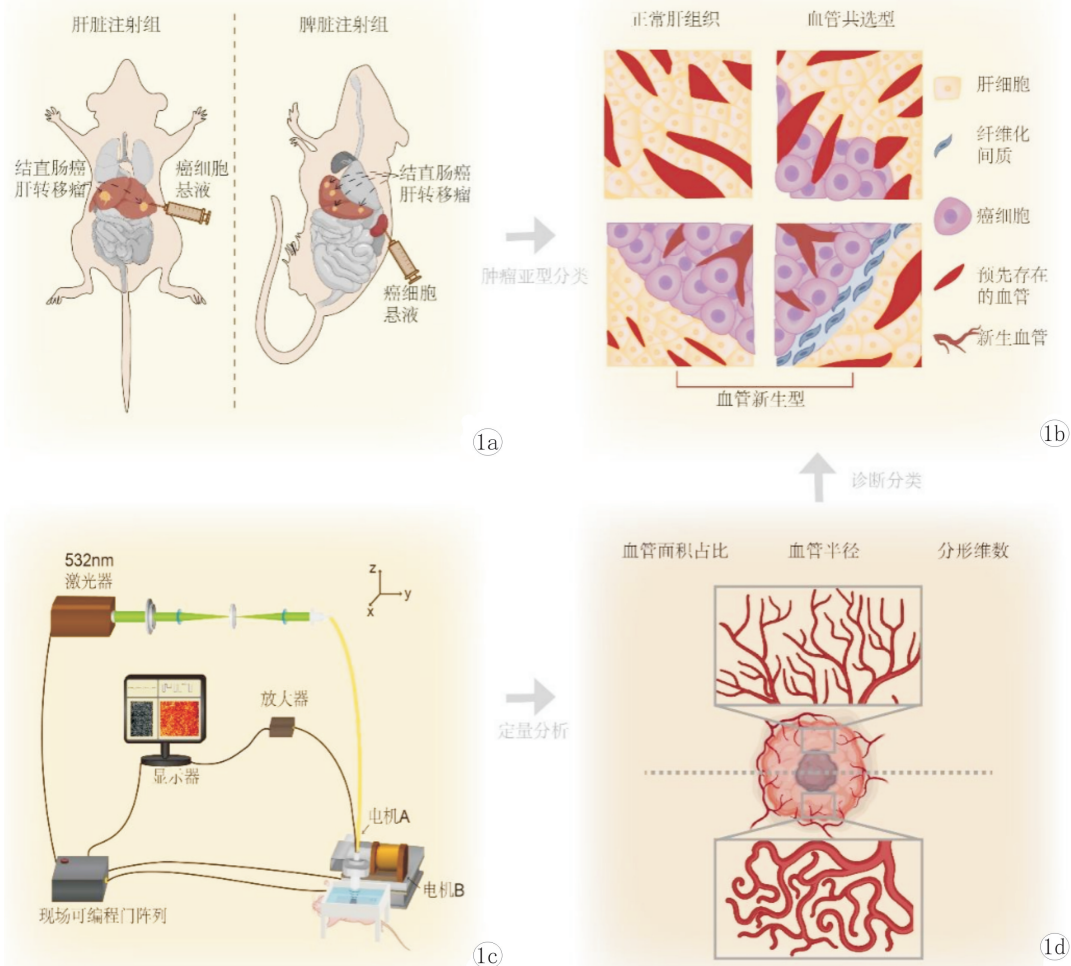


图 1 实验原理图 a:本研究肿瘤模型构建示意图;b:结直肠癌肝转移瘤的两种血液供应模式示意图;c:对小鼠肝脏肿瘤进行 PAM 的实验装置示意图;d:PAM 后定量分析的三种血管参数示意图

**1.2 实验装置** 本研究所用 PAM 系统结构如图 1 所示。光源选用 Nd:YAG 激光器 (DTL-319QT, Laser-export), 工作波长为  $532 \text{ nm}$ <sup>[8]</sup>, 脉冲宽度  $10 \text{ ns}$ 。该激光束经扩束及滤波处理后,由光纤耦合器 (PAF-X-15-PC-A, Thorlabs, USA) 聚焦耦合至单模光纤 (single-mode fiber, SMF)。系统同步由现场可编程门阵列 (field programmable gate array, FPGA) 控制,其产生的触发信号以最高  $10 \text{ KHz}$  的重复频率协调激光器与数据采集系统 (data acquisition system, DAS) 的工作时序。

产生的光声信号首先经  $60 \text{ dB}$  增益的宽带低噪声放大器 (PE15A63014, Pasternack, USA) 放大,随后

利用单通道高速数据采集卡 (M4i.4420, Spectrum, Germany) 以  $200 \text{ MS/s}$  采样率进行数字化并存储。成像使用中心频率为  $50 \text{ MHz}$  的超声换能器,其光学分辨率约为  $5 \mu\text{m}$ ,最大探测深度为  $1.0 \text{ mm}$ 。

**1.3 实验方法** 实验小鼠术前使用异氟烷麻醉,经腹部小切口暴露肝脏表面。采用薄层塑料膜及生理盐水 ( $0.9\% \text{ NaCl}$ ) 作为激光传输与声波传播的耦合介质。电机 A 作为移动平台,沿 X 轴方向以  $1.6 \mu\text{m/s}$  的速度平移。搭载于其上的电机 B 驱动探头,沿 Y 轴方向以  $3.2 \mu\text{m/s}$  的扫描速度执行往复扫描运动,以实现目标区域的精密扫描。PAM 后,立即对小鼠实施安乐死,并收集其肝组织进行后续组织学分析。

将小鼠结肠癌肝转移组织的福尔马林固定样本包埋于石蜡中,并切成 5  $\mu\text{m}$  厚的切片。按照标准程序进行苏木精和伊红染色 [hematoxylin and eosin (H&E) stains] 及免疫荧光染色。

**1.4 血管形态学参数分析** 原始数据在 LabVIEW 及 MATLAB R2021b (MathWorks) 平台进行后处理,重建肝小叶血管网络。使用 Image J 软件对重建后的光声显微图像进行分析。首先对原始图像进行背景二值化处理。采用内置的“Analyze Particles”功能计算血管面积占比。使用“Straight”功能计算血管半径。分形维数则采用“Fractal Box Count”插件进行计算。所有图像分析参数设置保持一致,并由同一观察者在盲法条件下完成。

**1.5 统计学方法** 采用 Origin 软件 (2025 版) 及 GraphPad Prism 10 进行统计分析。连续变量的正态性采用 Shapiro-Wilk 检验进行评估。符合正态分布的数据以均数 $\pm$ 标准差表示,两组间比较采用独立样本  $t$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 肝脏原位注射模型的光声图像分析及病理结果** 12 只裸鼠均建模成功。PAM 显示,两组肝脏原位移植瘤在血管形态上高度相似,均表现为粗

大、紊乱的新生血管网络 (图 2a、2b)。定量分析显示,HT29-LUC 与 HCT116-LUC 组肿瘤的血管面积占比、平均血管半径及分形维数差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 1。

HE 染色进一步验证了光声成像结果。两组肿瘤均呈膨胀性生长,肿瘤细胞紧密排列,挤压周围肝组织,未见沿肝血窦浸润现象,符合血管新生型肿瘤的组织学特征 (图 3a、3b)。以上结果表明,肝脏原位注射模型中,HCT116-LUC 与 HT29-LUC 诱导的移植瘤血管表型均一,对细胞株差异不敏感。

表 1 肝脏原位注射组小鼠结肠癌肝转移瘤的光声扫描定量分析参数比较 ( $n=6$ )

注射细胞类型	血管面积占比 (%)	血管半径 ( $\mu\text{m}$ )	分形维数 (a. u.)
HT29-LUC	14.93 $\pm$ 4.24	35.03 $\pm$ 5.77	1.60 $\pm$ 0.06
HCT116-LUC	14.60 $\pm$ 1.61	27.25 $\pm$ 6.99	1.52 $\pm$ 0.08
$t$	-0.18	-2.1	-1.96
$P$	0.86	0.06	0.08

每只动物取 1 个感兴趣区进行测量。若动物仅形成单个肿瘤,则扫描该肿瘤;若形成多个肿瘤,则扫描其中体积最大的肿瘤

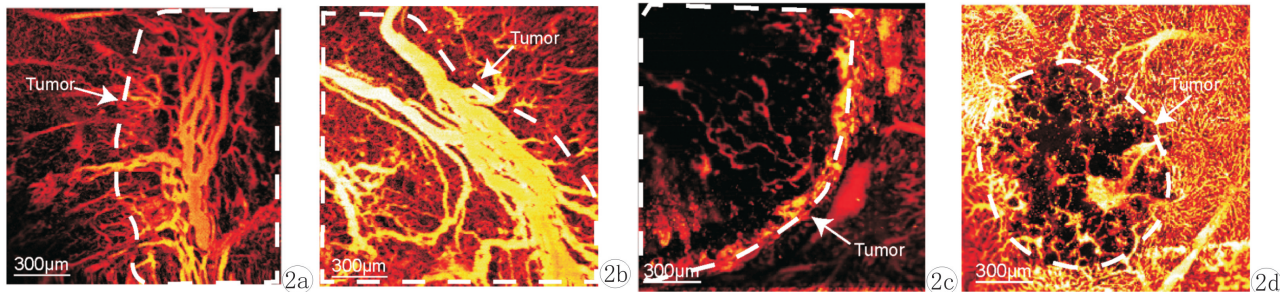


图 2 各实验组肿瘤区域高分辨率 PAM 图像 a: 肝脏原位注射 HCT116-LUC 细胞后的肿瘤区域血管的光声显微图像; b: 肝脏原位注射 HT29-LUC 细胞后的肿瘤区域血管的光声显微图像; c: 脾脏注射 HCT116-LUC 细胞后的肿瘤区域血管的光声显微图像; d: 脾脏注射 HT29-LUC 细胞后的肿瘤区域血管的光声显微图像

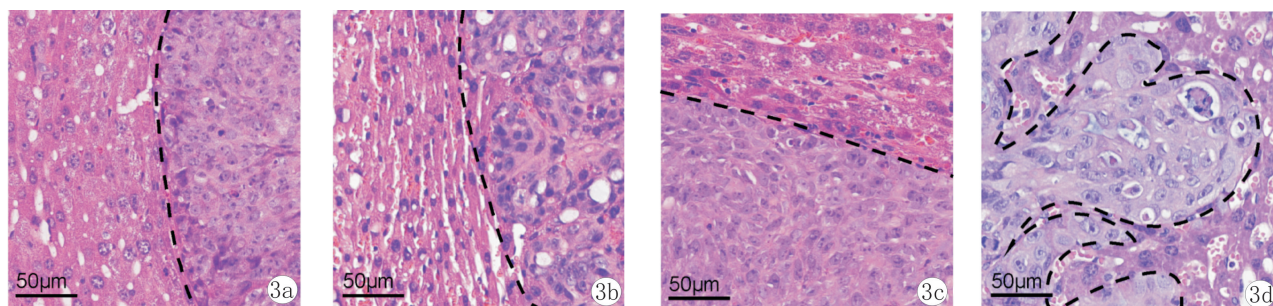


图 3 各实验组肿瘤区域 HE 染色图像 a: 肝脏原位注射 HCT116-LUC 细胞后的肿瘤区域血管的 PAM 图像。肿瘤呈膨胀性生长,直接推挤周围肝实质,但不侵入肝细胞板,其为血管新生型肿瘤特征; b: 肝脏原位注射 HT29-LUC 细胞后的肿瘤区域血管的光声显微图像。肿瘤呈膨胀性生长,直接推挤周围肝实质,但不侵入肝细胞板,其为血管新生型肿瘤特征; c: 脾脏注射 HCT116-LUC 细胞后的肿瘤区域血管的光声显微图像。肿瘤呈膨胀性生长,直接推挤周围肝实质,但不侵入肝细胞板,其为血管新生型肿瘤特征; d: 脾脏注射 HT29-LUC 细胞后的肿瘤区域血管的光声显微图像。癌细胞直接与肝细胞接触,穿插于血窦之间,并侵入肝细胞板,其为血管共选型肿瘤特征。病理证实脾脏注射组成功造模血管新生型和血管共选型肿瘤

## 2.2 脾脏注射模型的光声图像分析及病理结果

光声显微成像显示,脾脏注射后,HT29-LUC 与 HCT116-LUC 组肝转移灶的血管形态存在显著差异(图 2c、2d)。HT29-LUC 组转移灶血管网络密集、分支复杂,肿瘤-肝脏交界区域血管呈肝血窦样分布,未见明显受压;而 HCT116-LUC 组血管呈稀疏、粗大的新生血管特征,交界区肝血窦出现弧形受压改变。HT29-LUC 组血管面积占比、分形维数均大于 HCT116-LUC 组,而平均血管半径小于 HCT116-LUC 组( $P<0.05$ )。见表 2。

HE 染色显示,HCT116-LUC 组肝转移灶呈膨胀性生长,肿瘤细胞紧密排列,挤压周围肝组织,符合血管新生依赖型肿瘤特征(图 3c);HT29-LUC 组肿瘤细胞则沿肝板间浸润,保留原有肝血窦结构,呈

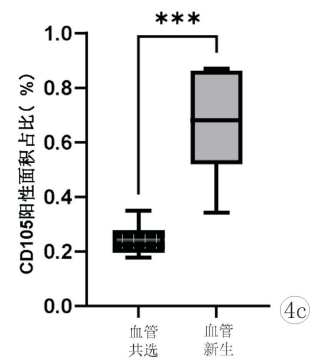
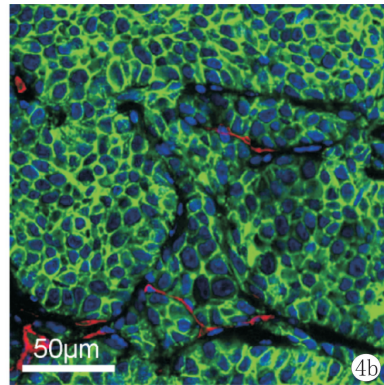
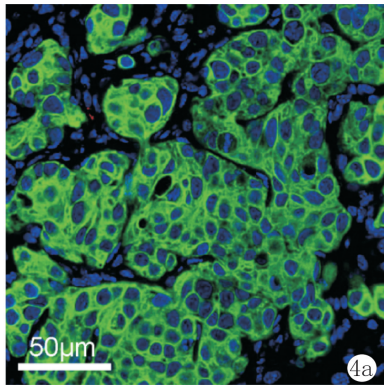


图 4 血管共选型和血管新生型肿瘤的未成熟活跃新生血管比较 a:血管共选型肿瘤的免疫荧光图片(绿色:CK20,标记 HT29-LUC 细胞,红色:CD105,标记未成熟的增生活跃的血管);b:血管新生型肿瘤的免疫荧光图片(绿色:EPCAM,标记 HCT116-LUC 细胞,红色:CD105,标记未成熟的增生活跃的血管);c:血管新生型和血管共选型肿瘤内 CD105 阳性面积占比。\*\*\* $P<0.001$

## 3 讨论

肿瘤血供模式是影响抗血管生成治疗疗效的关键因素,血管新生型肿瘤对贝伐珠单抗等 VEGF 抑制剂敏感,而血管共选型肿瘤则常表现为天然耐药<sup>[2, 9, 10]</sup>。因此,建立能够稳定模拟不同血供模式的动物模型,并在活体水平实现无创区分,对于优化结肠癌肝转移个体化治疗策略具有重要意义。本研究通过对比不同接种方式下 HT29-LUC 与 HCT116-LUC 结肠癌细胞在肝内的生长特征,成功建立了血管新生与血管共选两种血供模式的肝转移模型,并证实高分辨率光声显微成像可在活体水平有效区分这两种模式。

与既往研究发现一致,脾脏注射模型中 HT29-LUC 与 HCT116-LUC 细胞可以呈现不同的组织病理学分型,即形成具有显著差异的血管表型<sup>[11]</sup>。本研究通过光声显微镜直接可视化获取了两种血管表型的差异特征,且病理证实 HT29-LUC 肿瘤细胞沿肝板间浸润、保留原有肝血窦结构,CD105 阳性

现血管共选型生长模式(图 3d)。CD105 免疫荧光染色证实,HCT116-LUC 组肿瘤血管 CD105 阳性面积显著高于 HT29-LUC 组( $P<0.001$ ,图 4),提示 HCT116-LUC 组肿瘤以新生血管为主,而 HT29-LUC 组更倾向于利用原有肝血窦。

表 2 脾脏注射组小鼠结肠癌肝转移瘤的光声扫描定量分析参数比较 ( $n=6$ )

注射细胞类型	血管面积占比 (%)	血管半径 ( $\mu\text{m}$ )	分形维数 (a. u.)
HT29-LUC	34.43 $\pm$ 4.95	6.56 $\pm$ 0.73	1.95 $\pm$ 0.01
HCT116-LUC	13.68 $\pm$ 2.80	16.57 $\pm$ 1.90	1.89 $\pm$ 0.05
<i>t</i>	-8.94	12.05	-2.80
<i>P</i>	<0.0001	<0.0001	0.03

每只动物取 1 个感兴趣区进行测量。若动物仅形成单个肿瘤,则扫描该肿瘤;若形成多个肿瘤,则扫描其中体积最大的肿瘤

面积低,符合血管共选型肿瘤特征;而 HCT116-LUC 组转移灶呈膨胀性生长、挤压周围肝组织,CD105 阳性面积高,为典型血管新生型肿瘤。相反,在肝脏原位注射模型中,两株细胞各项血管形态学参数无显著差异。一个可能的解释是,穿刺操作本身导致的肝组织损伤及随后的修复过程,可能诱发了局部的非特异性血管新生,从而掩盖了细胞系固有的血管表型特征<sup>[12]</sup>。这一结果表明,肿瘤血供模式并非完全由细胞株内在特性决定,肿瘤造模方式在血管表型塑造中发挥重要作用。这一现象提示,在研究肿瘤血管生成时,应充分考虑造模方式对微环境的影响。不同建模方法各有其适用范围与局限性。肝脏原位注射法操作简便、成瘤稳定,可模拟原发性肝癌或肝内局部转移灶的生长特征,但难以再现血行播散过程中肿瘤细胞与肝血窦内皮早期相互作用的动态过程<sup>[13, 14]</sup>。脾脏注射法则通过门静脉系统模拟结肠癌血行转移路径,能更真实地反映肝转移灶的形成微环境<sup>[13, 15]</sup>,本研究中 HT29-LUC

细胞在该模型下呈现的血管共选表型即印证了这一点。然而,脾脏注射法易导致脾脏成瘤,且其发生往往早于肝脏转移,这不仅会干扰实验结果的准确性,也限制了该方法在长周期药物评价中的应用<sup>[13]</sup>。因此,研究者应根据具体科学问题选择合适的建模方法,若聚焦于肿瘤在肝内的局部生长,原位注射模型可提供均一的实验背景;若旨在研究肝转移灶独特的血供模式及其对抗血管生成治疗的影响,脾脏注射模型则更具优势。本研究中,脾脏注射法通过模拟血行播散路径,成功再现了肝转移灶的两种血供模式,为后续机制探讨及干预研究提供了可靠的模型基础。

高分辨率 PAM 在本研究中成功区分了两种血供模式。光声成像结合了光学成像的高对比度和超声成像的高穿透深度,可微创获取肿瘤微血管网络的三维形态信息。本研究中,PAM 所见的血管形态特征与病理结果高度吻合,定量分析显示两组间血管面积占比、平均血管半径及分形维数差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。这一结果提示,PAM 可作为一种潜在的有效影像学生物标志物,用于活体水平鉴别结直肠癌肝转移的血供模式,为抗血管生成治疗疗效预测提供影像学依据。相比既往研究多依赖离体病理分析,光声成像实现了活体、动态、微创的血管表型评估<sup>[16]</sup>,具有明显的临床转化潜力。

从临床角度看,本研究结果具有重要提示意义。抗血管生成药物主要用于抑制新生血管形成,对血管共选型肿瘤疗效有限<sup>[2]</sup>。本研究中 HT29-LUC 细胞在脾注射模型中呈现的共选表型,提示部分结直肠癌肝转移灶可能天然对 VEGF 抑制剂不敏感。因此,识别转移灶的血液供应模式对于优化抗血管生成治疗决策具有重要意义。PAM 作为一种高分辨率、无辐射的活体成像技术,有望在未来临床中用于筛选抗血管生成治疗的适宜人群。

本研究仍存在一定的局限性。首先,本模型依赖于永生单克隆细胞系,缺乏临床原发肿瘤的遗传多样性与肿瘤微环境复杂性;其次,尽管采用的腹部微创切口较传统肝活检创伤更小,但仍存在组织损伤风险。后续研究将在更具代表性的模型(如免疫健全系统、人源化小鼠模型等)中验证上述发现,并进一步开发微型化光声探头(如内窥式探头),以期最大限度地降低组织损伤。

综上,本研究通过脾脏注射法成功建立了血管新生与血管共选两种血供模式的结直肠癌肝转移模型,证实高分辨率 PAM 可在活体水平有效区分这

两种血供模式,是一种适用于抗血管生成治疗疗效预测的理想影像学手段。

#### 【参考文献】

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] Frentzas S, Simoneau E, Bridgeman VL, et al. Vessel co-option mediates resistance to anti-angiogenic therapy in liver metastases[J]. Nat Med, 2016, 22(11): 1294-1302.
- [3] Haas G, Fan S, Ghadimi M, et al. Different forms of tumor vascularization and their clinical implications focusing on vessel co-option in colorectal cancer liver metastases[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 612774.
- [4] Latacz E, Caspani E, Barnhill R, et al. Pathological features of vessel co-option versus sprouting angiogenesis[J]. Angiogenesis, 2020, 23(1): 43-54.
- [5] Nowak-sliwinska P, Alitalo K, Allen E, et al. Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays[J]. Angiogenesis, 2018, 21(3): 425-532.
- [6] 田一禾, 刘宏, 白亮彩. 结直肠癌肝转移的影像学评估研究进展[J]. 磁共振成像, 2023, 14(2): 191-196.
- [7] Steinberg I, Huland DM, Vermesh O, et al. Photoacoustic clinical imaging[J]. Photoacoustics, 2019, 14: 77-98.
- [8] Upputuri PK, Pramanik M. Recent advances in photoacoustic contrast agents for in vivo imaging[J]. WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2020, 12(4): e1618.
- [9] Galjart B, Nierop PMH, Van der stok EP, et al. Angiogenic desmoplastic histopathological growth pattern as a prognostic marker of good outcome in patients with colorectal liver metastases[J]. Angiogenesis, 2019, 22(2): 355-368.
- [10] Carrera-aguado I, Marcos-zazo L, Carrancio-salún P, et al. The inhibition of vessel co-option as an emerging strategy for cancer therapy[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(2): 921.
- [11] Fleten KG, Bakke KM, Mælandsmo GM, et al. Use of non-invasive imaging to monitor response to aflibercept treatment in murine models of colorectal cancer liver metastases[J]. Clin Exp Metastasis, 2016, 34(1): 51-62.
- [12] 张忠, 崔文. 病理学[M]. 南京: 江苏凤凰科学技术出版社, 2023: 388.
- [13] 乔大伟, 李玉芳, 李胜男, 等. 结直肠癌肝转移动物模型研究进展[J]. 实验动物科学, 2019, 36(3): 86-90.
- [14] 沈可, 胡晨. 结直肠癌肝转移异种移植小鼠模型研究进展[J]. 现代医药卫生, 2023, 39(3): 482-486.
- [15] 向彦臻, 陈欢, 殷佩浩, 等. 结直肠癌肝转移小鼠模型建立及应用现状[J]. 医学综述, 2020, 26(1): 71-75.
- [16] Attia ABE, Balasundaram G, Moothanchery M, et al. A review of clinical photoacoustic imaging: Current and future trends[J]. Photoacoustics, 2019, 16: 100144.

(收稿日期:2026-01-18;修回日期:2026-04-08)

(本文编辑:林 贇)