

基于小鼠背脊皮翼视窗的肿瘤微环境活体可视化研究

江一航¹, 肖辉雨^{1,2}, 曹仲林^{1,3}, 翟鹏⁴, 徐周睿¹, 李丽⁵, 邹晓敏¹, 马名泽¹, 王晓梅⁵, 林桂森⁵, 许改霞¹

1. 深圳大学医学部生物医学工程学院, 广东 深圳 518055; 2. 深圳市药品检验研究院, 广东 深圳 518057; 3. 贵州民族大学材料科学与工程学院, 贵州 贵阳 550025; 4. 深圳大学医学部, 广东 深圳 518055; 5. 深圳大学医学部基础医学院生理学系, 广东 深圳 518055

【摘要】目的:构建小鼠背脊皮翼视窗(DSFC)模型,对肿瘤微环境进行持续动态监测,研究肿瘤增殖、扩散以及提供一种评估抗肿瘤药物的技术手段。**方法:**利用转染绿色荧光蛋白的小鼠乳腺癌4T1细胞构建小鼠DSFC肿瘤模型,对肿瘤微环境内肿瘤尺寸、血管形变、血流灌注量等参数进行实时动态连续监测,获得肿瘤微环境内的精确信息。同时评估纳米基因治疗药物PCL-PDEM-siRNA的治疗效果。**结果:**在裸鼠DSFC模型接种4T1乳腺癌细胞的成瘤率可达90%以上。肿瘤接种后2 d即可见接种区域毛细血管增多,4 d后可观察到边界清晰的肿瘤形态,第4~8天可见肿瘤区域血流灌注量显著提高。纳米药物注射4 d后肿瘤区域增长速度减缓,出现明显的肿瘤抑制效应,8 d后肿瘤内部新生血管减少,血流灌注量趋于稳定。**结论:**本研究为肿瘤微环境的精细化成像提供了新的策略,对肿瘤生物学的基础研究和抗肿瘤药物研发具有重要意义。

【关键词】肿瘤微环境;背脊皮翼视窗;活体成像;纳米基因治疗;药物治疗评估

【中图分类号】R318;R73-37

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2021)09-1077-07

In vivo visualization of tumor microenvironment based on mouse dorsal skin-fold window chamber

JIANG Yihang¹, XIAO Huiyu^{1,2}, CAO Zhonglin^{1,3}, ZHAI Peng⁴, XU Zhouhui¹, LI Li⁵, ZOU Xiaomin¹, MA Mingze¹, WANG Xiaomei⁵, LIN Guimiao⁵, XU Gaixia¹

1. School of Biomedical Engineering, Health Science Center, Shenzhen University, Shenzhen 518055, China; 2. Shenzhen Institute for Drug Control, Shenzhen 518057, China; 3. School of Materials Science and Engineering, Guizhou Minzu University, Guiyang 550025, China; 4. Health Science Center, Shenzhen University, Shenzhen 518055, China; 5. Department of Physiology, School of Basic Medical Sciences, Health Science Center, Shenzhen University, Shenzhen 518055, China

Abstract: Objective To construct a mouse dorsal skin-fold window chamber (DSFC) model for monitoring the tumor microenvironment continuously, researching tumor proliferation and spread, and providing a technical method to evaluate the efficacy of anti-tumor drugs. **Methods** The mouse 4T1 breast cancer cells transfected with green fluorescent protein were used to construct a mouse DSFC tumor model for the real-time dynamic and continuous monitoring of tumor size, vascular deformation, blood perfusion and other parameters in the tumor microenvironment, thereby obtaining the precise tumor microenvironment information. Meanwhile, the proposed model was also used for evaluating the therapeutic effect of PCL-PDEM-siRNA in nano-gene therapy. **Results** The tumorigenesis rate of 4T1 breast cancer cells inoculated in the DSFC model of nude mice was higher than 90%. Two days after tumor inoculation, the capillaries in the inoculated area were increased. On the 4th day after tumor inoculation, the tumor morphology with clear boundaries could be observed, and the blood perfusion volume at the tumor area was increased significantly on the 4th to 8th days after tumor inoculation. Four days after nanomedicine injection, the growth rate of the tumor area slowed down, and a significant tumor suppressor effect appeared; and 8 days after nanomedicine injection, the neovascularization inside the tumor was decreased, and the blood perfusion volume was beginning to stabilize. **Conclusion** The study provides a new strategy for the refined imaging of the tumor microenvironment, and is of great significance to the basic research of tumor biology and the development of anti-tumor drugs.

Keywords: tumor microenvironment; dorsal skin-fold window chamber; *in vivo* imaging; nano-gene therapy; medication evaluation

【收稿日期】2021-03-18

【基金项目】国家自然科学基金(31671491, 81801859);广东省自然科学基金面上项目(2021A1010012159);深圳市基础研究项目(JCYJ2017081710263496, JCYJ20180305125254860);深圳大学高水平大学建设项目(860-000002100156);研究生创新发展基金(315-0000470832)

【作者简介】江一航, 硕士, 主要从事生物光子学与纳米医学方面的研究, E-mail: jiangyihang2019@email.szu.edu.cn

【通信作者】许改霞, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事生物光子学与纳米医学方面的研究, E-mail: xugaixia@szu.edu.cn

前言

肿瘤微环境是肿瘤发生、生长和转移的内环境,是由肿瘤细胞、肿瘤相关的成纤维细胞及其周围的组织、免疫细胞、血管、细胞外基质等共同形成的动态网络^[1-3]。其中,肿瘤新生血管将提供肿瘤组织新陈代谢所必需的氧气和营养,以促进肿瘤的迅速生长。如果可以清晰观察肿瘤新生血管的形状及变化,便可实现肿瘤治疗及转移监测。肿瘤生长中血管的监测和成像对解析和干预肿瘤生长,相关药物研制、筛选和评价具有重要意义^[4-6]。

背脊皮翼视窗(Dorsal Skin Fold Window Chamber, DSFC)是一种小动物活体原位光学成像的辅助工具,通过在小鼠或兔子身上构建可以进行光学成像的透明窗口,拓展成像深度,使肿瘤微环境的血管、细胞甚至血流状况得以可视化,大大提高了对病理生理学中微观血管化的理解^[7-10]。Palmer等^[11]介绍了DSFC用于活体小鼠光学功能成像的方法,指出视窗模型对于研究活体的基因表达、血管重塑、血管新生以及肿瘤生长和侵袭具有一定的应用价值。2018年,Staresinic等^[12]利用DSFC模型评价钙电穿孔法的抗肿瘤效果,结果表明,钙电穿孔法对正常血管和肿瘤局部血管具有相同程度的作用,主要通过破坏血管导致肿瘤坏死。

活体光学成像是一种在亚细胞水平上研究生理和病理过程的无损、微扰的成像方法,已被证明是一种能够实现肿瘤发展监测、肿瘤治疗评估的强大工具^[13-14]。活体光学成像技术具有高分辨率、高灵敏度、可视化、能够实时监测等优点,但是其成像深度浅,无法在传统小鼠肿瘤模型中获得肿瘤微环境的精确信息。

本研究利用转染了绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein, GFP)的小鼠乳腺癌细胞(4T1)构建了DSFC的乳腺癌荧光肿瘤模型,结合体视荧光显微镜和激光散斑成像(Laser Speckle Imaging, LSI)仪,连续监测活体小鼠肿瘤生长及肿瘤局部血管状态,同时采集肿瘤面积、体积、血管流量等参数随时间的动态变化数据。在此基础上,评价实验室前期开发的抗肿瘤基因纳米药物PCL-PDEM-siRNA^[15]对小鼠视窗内肿瘤和肿瘤血管的抑制效果,揭示了该药物对4T1乳腺肿瘤生长的连续动态作用效果。本研究为肿瘤微环境的精细化成像和定量分析提供了新的策略,对肿瘤生物学的基础研究和抗肿瘤药物研发具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 细胞实验

细胞培养液由89%的RPMI-1640培养液(购买

于美国Gibco公司)加入10%胎牛血清(购买于美国Thermo Scientific公司)和1%双抗(购买于美国Thermo Scientific公司)混合而成,37℃、5% CO₂的细胞培养箱中预热。4T1细胞系(小鼠乳腺癌细胞,转染绿色荧光蛋白GFP)购于广州吉妮欧生物科技有限公司。按0.5×10⁴个/孔密度将肿瘤细胞接种在12孔板,置于37℃、5% CO₂的细胞培养箱中培养。

1.2 裸鼠背脊翼视窗肿瘤模型构建

根据实验的要求和目的,实验动物采用购自于广东省实验动物中心6~8周龄22~25 g的BALB/c裸鼠于SPF条件下饲养,目的在于保证植入背脊翼视窗后裸鼠可以进行正常的饮食和作息,有利于实现活体动态连续监测。本研究中所有的动物手术和实验操作过程都严格遵照深圳大学实验室设备部和医学部动物实验伦理委员会的规定。在DSFC手术和成像过程中,小鼠持续吸入1.5%异氟醚和30%氧气以及70%氮气的混合气体麻醉,维持核心温度为37℃。如图1所示,小鼠麻醉状态下实施DSFC手术,使用缝合线将皮肤固定于视窗框架,视窗玻片直接嵌入皮肤开口处^[16-18]。待小鼠生长状态稳定后,微量进样针取5.5×10⁵个4T1细胞从视窗区域外部皮下注射,将细胞注射在于视窗中央血管交汇处。肿瘤生长至第4天,根据视窗内图像判断肿瘤视窗模型是否构建成功,成功模型应用于后续药物治疗效果动态成像观察。

1.3 实验动物分组及治疗

如图1所示,对成功构建视窗后的小鼠随机分为空白组、磷酸缓冲液组、肿瘤组以及纳米药物治疗组,每组3~4只。其中,空白组作为对照不进行任何操作。磷酸缓冲液组在空白组的基础上第0天进行磷酸缓冲液注射,旨在研究注射操作对视窗内毛细血管血流灌注量的影响。而肿瘤组以及纳米药物治疗组均在第0天开始,在视窗内接种4T1肿瘤细胞,不同的是纳米药物治疗组在第4天开始注射纳米药物PCL-PDEM-siRNA。从第0天到第18天持续对各组进行活体成像。

1.4 肿瘤尺寸的测量方法

在DSFC肿瘤模型实验中,我们根据传统小鼠肿瘤模型的肿瘤体积计算方法:利用ImageJ软件读取明场或荧光图片上肿瘤的长(L)和宽(W),公式如下:

$$V = \frac{L \times W^2}{2} \quad (1)$$

根据式(1)计算得到肿瘤的体积。此外,考虑到DSFC肿瘤模型中,肿瘤在垂直于视窗的方向上生长受限,且生长区域并不规则,我们也用ImageJ软件勾选出明场和荧光图像中肿瘤区域,对肿瘤的面积进行计算。

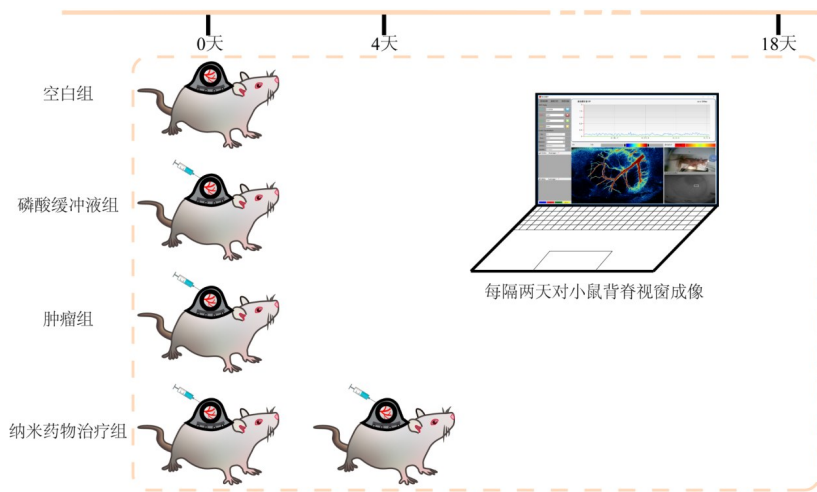


图1 实验动物分组及治疗

Fig.1 Grouping of experimental mice and the corresponding treatment strategy

1.5 血流灌注量的计算方法

根据激光散斑成像仪拍摄出的图像,用软件自带微血管管径测量工具测量感兴趣血管的直径(D)及流速(v)。将感兴趣血管直径的软件读数(R)换算为单位 μm ,记放大倍数为 M ,计算公式如下:

$$D = \frac{14.8R}{M}$$

(2)

根据转换得到的 D 值和软件读数(v)值,计算出单根血管单位时间内的灌注量即血流灌注量 Q ,计算公式如下^[19-20]:

$$Q = v \times \frac{\pi D^2}{4}$$

(3)

1.6 主要实验仪器

实验仪器主要包括:台式高速冷冻离心机(H-1850R, Eppendorf),超净工作台(SW-CJ-2FD, Airtech),共聚焦显微镜(TCS SP5 II, Leica),二氧化碳培养箱(HERAcell vios 160i, Thermo Fisher Scientific),移动式麻醉机(R520, 瑞沃德),荧光分光光度计(Cary Eclipse, Aglien),超纯水仪(Milli-Q, Millipore),流式细胞仪(FACS Calibur, BD),荧光显微镜(BX51, OLYMPUS),体视显微镜(SZX16, OLYMPUS),激光散斑成像系统(BVI, TEK SQRAY),马尔文激光粒度仪(Zetasizer-Nano-ZS-90, Malvern Panalytical)。

1.7 统计学分析

采用 SPSS19.0 统计软件对数据进行统计学分析。实验组间的数据比较采用单方差分析法(ANOVA), $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤视窗模型的构建

首先在小鼠背部构建 DSFC 视窗,明场下利用体

视显微镜观察视窗内是否有水肿、血管是否清晰、边缘有无出血等;然后将 4T1 肿瘤细胞接种到视窗中心,观察小鼠的进食习惯及行为状态,并在接种 4 d 后在体视显微镜下观察接种区域局部血管形貌及新生血管情况。

结果表明,DSFC 术后小鼠状态良好,视窗不影响小鼠正常进食和行动。DSFC 构建成功 30 min 后,可在体视显微镜明场下观察到视窗内血管形态,血管细长且形状规则(图 2b),视窗皮下和边缘缝合区无出血无水肿,视窗中央与边缘厚度均匀。接种 4T1 细胞后 4 d,肉眼可见接种部位隆起增厚,接种点周围直径小于 20 μm 的毛细血管明显增多,血管细且弯曲(图 2d),根据经验判断 4T1 乳腺癌 DSFC 小鼠模型已构建成功。重复实验表明,接种 4T1 细胞 3~5 d 后,DSFC 小鼠成瘤率可达 90% 以上。

为了连续、动态观察肿瘤及肿瘤微环境内血管的生长情况,我们利用体视显微镜对同一肿瘤小鼠视窗进行 22 d 连续成像。如图 3 所示,接种当天为第 0 天,当天视窗内血管清晰,接种区域无水肿;接种第 2 天可见接种区域增厚,局部毛细血管数量增加,远端毛细血管变形连接,周边大血管增粗;从第 4 天到第 22 天,显微镜可下观察到肿瘤区域逐步增厚扩大,部分靠近接种区域的血管因与肿瘤位置重叠已无法观测,肿瘤周边的毛细血管增多、变粗。

2.2 肿瘤视窗活体动态成像

为了进一步研究该视窗在肿瘤药物疗效中的功能,我们选择实验室前期开发的抗肿瘤基因纳米药物 PCL-PDEM-siRNA 对视窗内肿瘤进行治疗,利用荧光体视显微镜和激光散斑成像仪,对视窗内血管形态、肿瘤尺寸、血流灌注量等参数进行持续动态监测,从而研究该纳米药物的抗肿瘤特性。

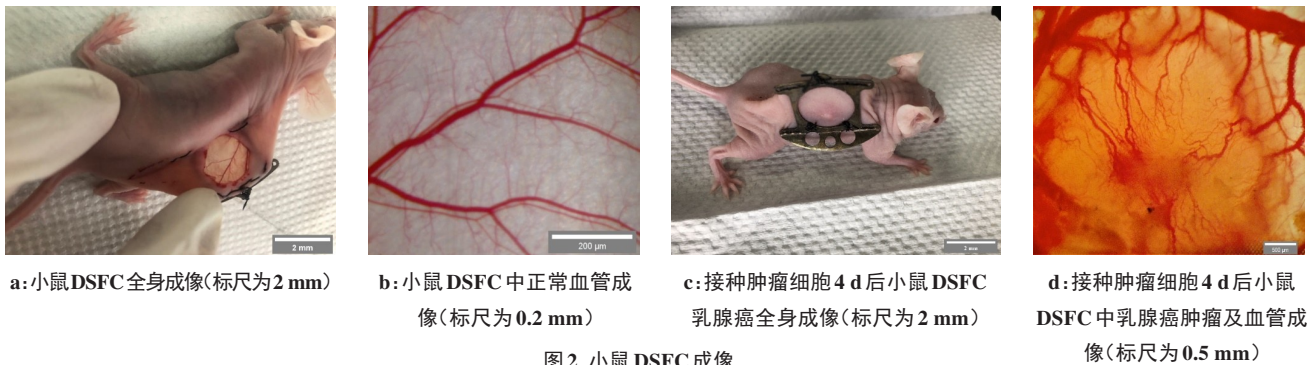


图 2 小鼠 DSFC 成像

Fig.2 Typical images of mouse dorsal skin-fold window chamber (DSFC)

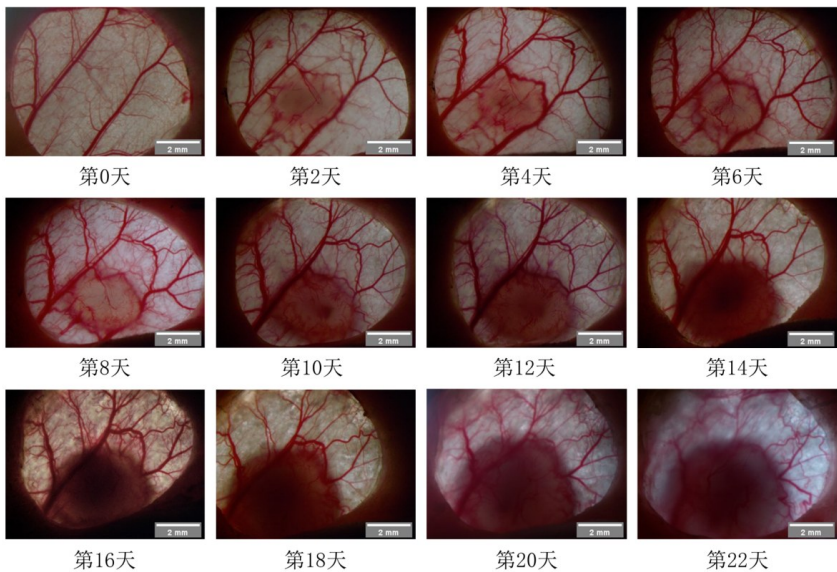


图 3 体视显微镜下第 0~22 天肿瘤生长变化(标尺为 2 mm)

Fig.3 Tumor growth observed under stereomicroscope from day 0 to day 22 (Scale bar: 2 mm)

首先在体视显微镜明场下观察各组实验小鼠视窗内的血管形态,并定量分析视窗内肿瘤的面积和体积,如图 4 所示。图 4 显示的是典型的体视显微镜明场成像结果:由图 4a 可见,空白组血管形态、数量随时间延长均无明显变化;磷酸缓冲液组注射区域在第 8 天出现直径 900 μm 的小片阴影,且阴影区域毛细血管增多,在第 12 天,阴影区域变淡减小,而毛细血管继续增多变粗。而在第 16 天,阴影区域完全消失,血管形态恢复到第 4 天的状态,推测是针头注射引起的短暂炎症,炎症发生在针头注射的第 4~8 天。

肿瘤视窗模型在接种 4T1 肿瘤细胞第 4 天后分为 2 组,观察 PCL-PDEM-siRNA 药物对肿瘤的抑制作用。由图 4a 后两行图像可见,与肿瘤组相比,纳米药物治疗组在第 8 天开始肿瘤区域停止增大,血管形态基本稳定且毛细血管的数量开始减少,也没有出现远端毛细血管连接、血管向肿瘤部位收缩的现象。为准确把握肿瘤的变化情况,我们对肿瘤组和纳米药物治疗组的肿瘤面积与体积进行定量分析。图 4b

是利用传统肿瘤计算公式计算得到的肿瘤体积变化趋势图,可见纳米药物治疗组在第 8 天后,可以抑制肿瘤细胞生长,从而使肿瘤的尺寸维持在一定范围内不变化;考虑到 DSFC 视窗模型会使肿瘤纵向生长受限,我们同时也对视窗内肿瘤面积进行计算,如图 4c 所示,肿瘤面积的变化与体积变化总体趋势是相同的,纳米药物治疗组的明显肿瘤抑制效应发生在药物注射后第 4 天。

为避免手动划分肿瘤区域的人为误差,我们对肿瘤视窗区域进行荧光成像,利用 4T1 细胞转染的绿色荧光蛋白,可以清晰勾勒出肿瘤生长情况(图 5)。由图 5 可知,在肿瘤组接种肿瘤细胞后第 4 天可观察到边界清晰的肿瘤形态;第 8 天肿瘤组的肿瘤尺寸持续增大,绿色的肿瘤区域内部出现黑色的管状结构为无荧光的新生血管;相对于第 4 天的注射纳米药物治疗组,第 8 天的治疗组的肿瘤也增大,但肿瘤内部新生血管的数量明显少于肿瘤组;第 12 天肿瘤组的肿瘤继续增大,肿瘤内部的新生血管数量增多且更为粗大,而纳米药物治疗组的肿瘤尺寸与第 8 天无显

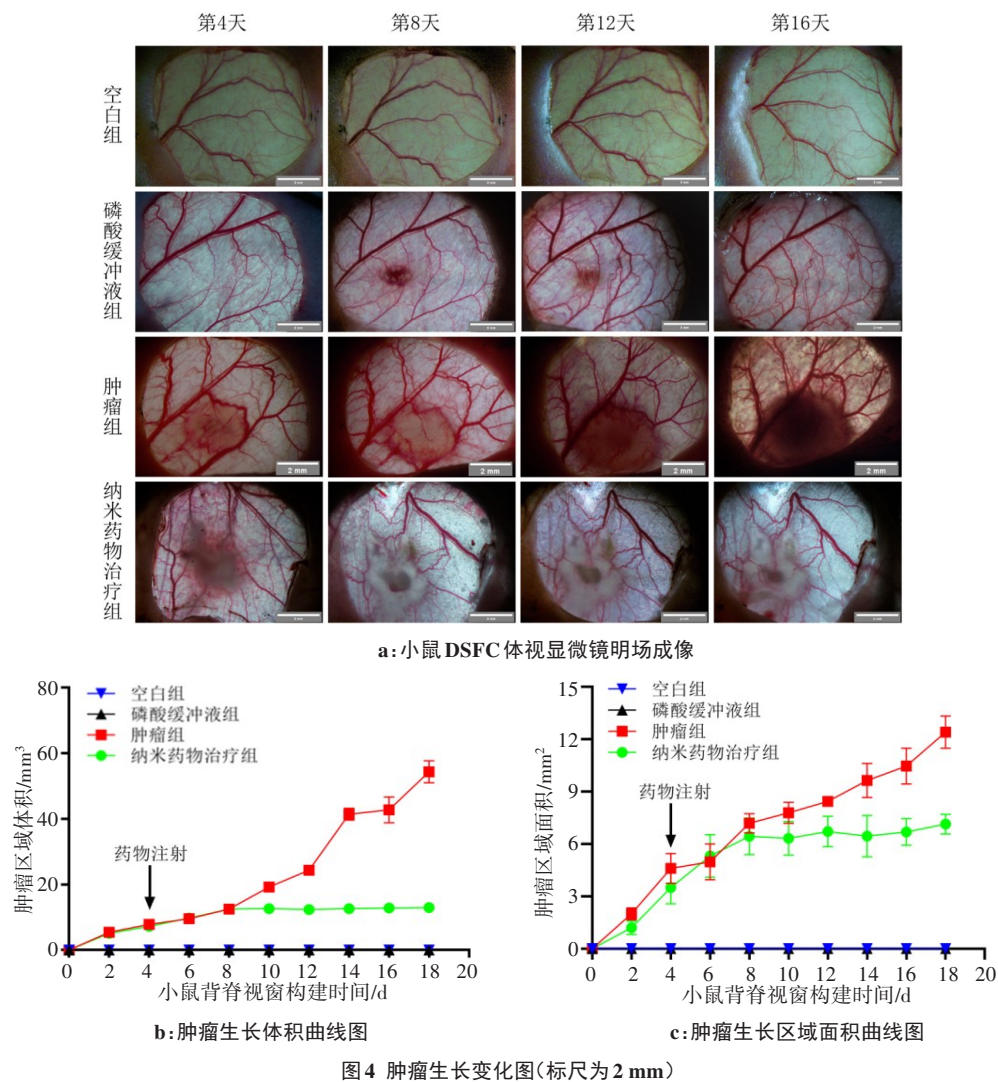


Fig.4 Typical stereomicroscope images and tumor growth curves (Scale bar: 2 mm)

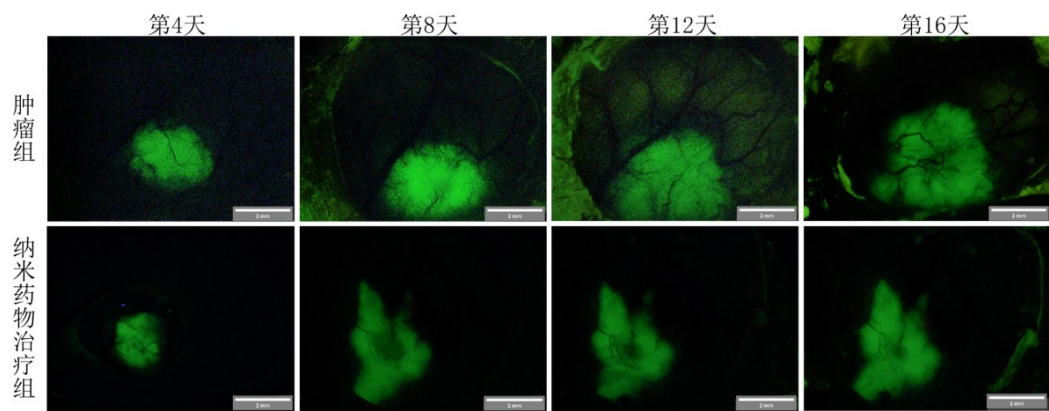
著差别,肿瘤内血管数量和形态维持稳定;第16天肿瘤组的肿瘤大小继续增大,肿瘤内部血管数量继续增加,中央细胞荧光强度明显减弱,推测中央区域发生细胞坏死;而纳米药物治疗组的肿瘤尺寸在药物注射第4天后就不再增加,肿瘤内部新生血管数量和形态无明显变化。对肿瘤区域的体积和面积的定量计算如图 5b 和图 5c 所示,纳米药物治疗组的肿瘤体积及面积从第8天开始趋于稳定,不再变化。该结果与荧光定性分析的结果一致,也与图 4 明场分析的结果一致。

由图 5 可知,视窗内荧光图像的形状和明场图像的形状不完全一致。明场下肿瘤区域大多为圆形,荧光图像下则不是,而且治疗后的形状则更加不规则。此外,由于肿瘤附近和肿瘤内部的血管及血流灌注量是反应肿瘤微环境的重要指标,我们利用激光散斑成像仪,对肿瘤视窗内血流灌注量也进行了定量分析。

图 6a 散斑成像可清晰分辨小鼠 DSFC 区域内血

流灌注量及轮廓。第4~8天,肿瘤组视野中心的信号明显变红,表明肿瘤附近区域的血流速度有了显著性提高;第8~12天,小鼠 DSFC 区域血流速度进一步加快,附近的毛细血管内血流速度也有大幅提高;第12~16天,肿瘤区域信号颜色趋于稳定,结合图 6b 定量分析可知血流灌注量依旧增大。空白组和磷酸缓冲液组血流速度无明显波动,但磷酸缓冲液组相较于空白组血流灌注量有明显提升,考虑两方面原因:一是磷酸缓冲液的注射增加了局部体液,使血流速度加快;另一方面,可能是针头对局部的刺激造成了血流灌注量的增加。肿瘤组视窗中心(接种点附近)血流灌注量随时间明显增大。而对于纳米药物治疗组,药物注射从第4天开始,血流灌注量相较于未治疗前略微增加,可能是由于药物注射及针头刺激引起的,在第6天之后,血流灌注量不再变化,与注射前基本一致,在第8天后,趋于稳定。

综合以上体视显微镜的明场成像、荧光成像以及激光散斑成像数据,我们可以明确,抗肿瘤基因纳



a:小鼠 DSFC 体视显微镜荧光成像

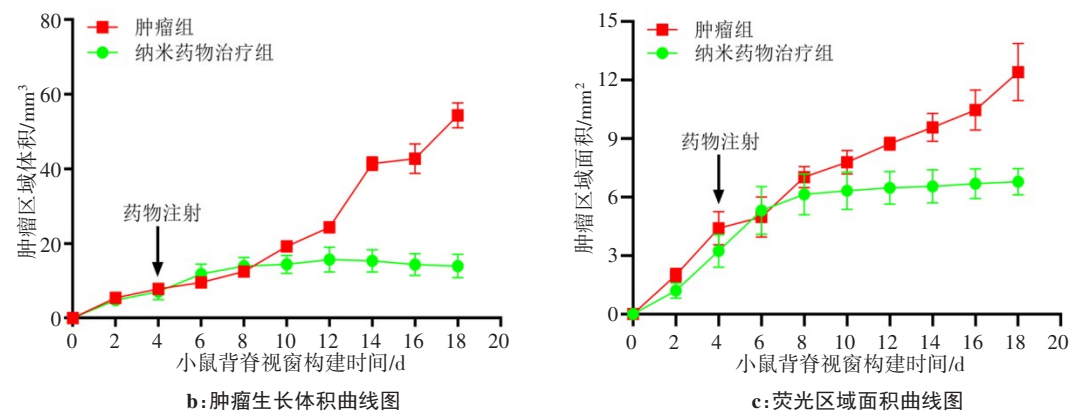


图5 肿瘤生长变化荧光图(标尺为2 mm)
Fig.5 Fluorescence images and tumor growth curves (Scale bar: 2 mm)

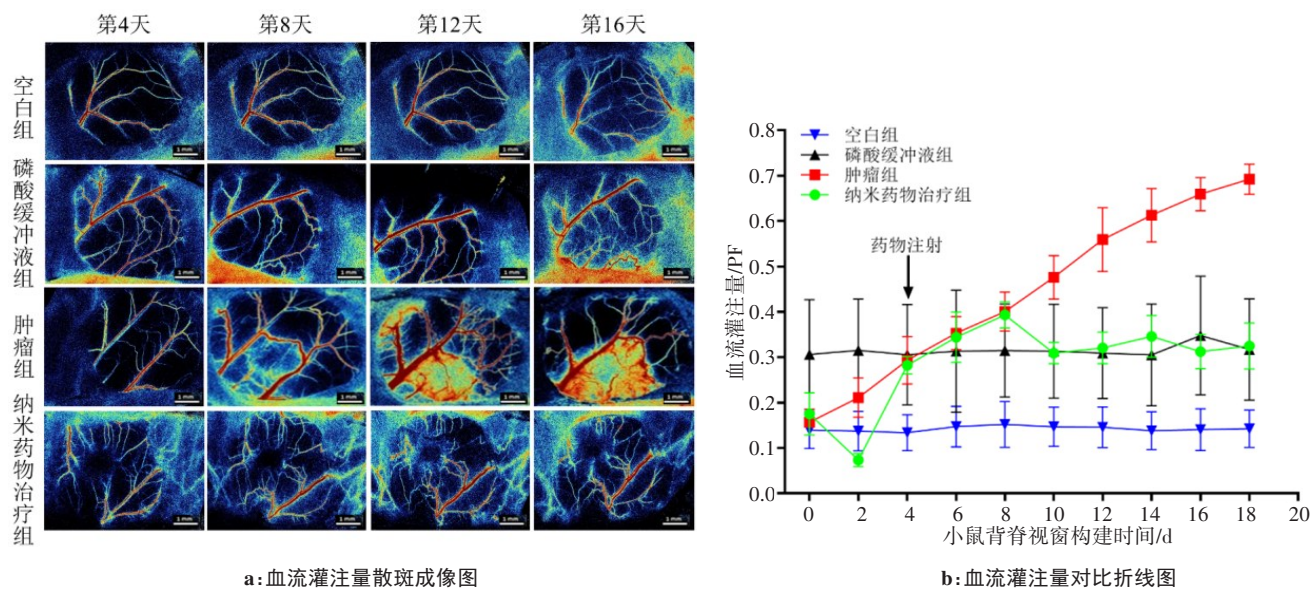


图6 小鼠 DSFC 激光散斑成像图(标尺为1 mm)
Fig.6 Laser speckle imaging of mouse DSFC (Scale bar: 1 mm)

米药物 PCL-PDEM-siRNA 对于 4T1 乳腺癌有抑制效果,在药物注射 4 d 后,肿瘤尺寸不再增大,生长被抑制,血流灌注量先升后降,纳米药物注射第 6 天后与磷酸缓冲液组基本一致。

3 结 论

监测肿瘤微环境对研究肿瘤发生发展的病理机制及预后具有至关重要的意义。本文通过将 DSFC 模型应用在乳腺癌肿瘤活体成像,将体视显微与激

光散斑成像应用于肿瘤微环境的监测,旨在为抗肿瘤药物治疗研究提供一种直观、可视化的动态观测方法。本研究工作选择生长速度较快的鼠源4T1乳腺癌细胞来构建小鼠肿瘤DSFC模型,在裸鼠DSFC视窗内接种4T1细胞3~5 d后,90%以上的DSFC小鼠可成功成瘤。利用此平台,对实验室前期合成的抗肿瘤纳米基因治疗药物PCL-PDEM-siRNA治疗小鼠乳腺癌的过程进行活体可视化连续观察,可以监测视窗达22 d以上。实验结果表明,视窗内肿瘤组的血流灌注量越来越大,肿瘤的体积和面积也增大,肿瘤内部新生血管增多,肿瘤周围毛细血管延长、连接、变粗;而纳米药物治疗组肿瘤的体积和面积在药物注射4 d后不再增大,肿瘤内部新生血管数量较肿瘤组少,血流灌注量在药物治疗6 d后趋于平稳,该研究从可视化定性和定量的角度揭示了基因治疗药物PCL-PDEM-siRNA对小鼠乳腺癌及其微环境的作用效果。为肿瘤微环境可视化及量化提供新的策略,对肿瘤生物学的基础研究和抗肿瘤药物研发具有重要意义。

【参考文献】

- [1] YOU S X, TU H H, CHANEY E J, et al. Intravital imaging by simultaneous label-free autofluorescence-multiharmonic microscopy [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 1-9.
- [2] ARNETH B. Tumor microenvironment[J]. Medicina (Kaunas), 2019, 56(1): 15.
- [3] THAKKAR S, SHARMA D, KALIA K, et al. Tumor microenvironment targeted nanotherapeutics for cancer therapy and diagnosis: a review[J]. Acta Biomater, 2020, 101: 43-68.
- [4] IKEDA W, SASAI K, AKAGI T. Imaging window device for subcutaneous implantation tumor[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1763: 153-163.
- [5] MEADS M B, OLIVEIRA P, DISTLER A, et al. Identification of target pathways induced by the multiple myeloma tumor microenvironment using activity-based protein profiling and *ex vivo* protein kinase inhibitor screening[J]. Blood, 2016, 128(22): 3288.
- [6] CACHO-DÍAZ B, GARCÍA-BOTELLO D R, WEGMAN-OSTROSKY T, et al. Tumor microenvironment differences between primary tumor and brain metastases[J]. J Transl Med, 2020, 18(1): 1-12.
- [7] 许改霞, 翟鹏, 林苏霞, 等. 透明背脊皮翼视窗在肿瘤活体成像中的应用[J]. 深圳大学学报(理工版), 2013, 30(5): 518-526.
- [8] SCKELL A, LEUNIG M. Dorsal skinfold chamber preparation in mice [J]. Methods Mol Med, 2001, 46: 95-105.
- [9] DEMIDOV V, MAEDA A, SUGITA M, et al. Preclinical longitudinal imaging of tumor microvascular radiobiological response with functional optical coherence tomography[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 1-12.
- [10] ROUFFIAC V, SER-LE ROUX K, SALOMÉ-DESNOULEZ S, et al. Multimodal imaging for tumour characterization from micro - to macroscopic level using a newly developed dorsal chamber designed for long-term follow-up[J]. J Biophotonics, 2020, 13(1): e201900217.
- [11] 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.
- [12] STARESINIC B, JESENKO T, KAMENSEK U, et al. Effect of calcium electroporation on tumour vasculature[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 1-14.
- [13] MCLUCKIE M, ROBOTTI F, SANCHEZ-MACEDO N, et al. Lipoconstruct surface topography grating size influences vascularization onset in the dorsal skinfold chamber model[J]. Acta Biomater, 2020, 106: 136-144.
- [14] CHEN D, YUAN W, PARK H-C, et al. *In vivo* assessment of vascular-targeted photodynamic therapy effects on tumor microvasculature using ultrahigh-resolution functional optical coherence tomography [J]. Biomed Opt Express, 2020, 11(8): 4316-4325.
- [15] CAO Z L, XIAO H Y, LI L, et al. The codelivery of siRNA and QDs by pH-responsive micelle for hepatoma cancer cells [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 1194.
- [16] KIANIAN B. A multimodal microvascular imaging system for the rodent dorsal skinfold window chamber: development, validation and application[D]. California: University of California, 2017.
- [17] KELLY A, PAI A, LERTSAKDADET B, et al. Microvascular effects of pulsed dye laser in combination with oxymetazoline[J]. Lasers Surg Med, 2020, 52(1): 17-22.
- [18] ESAM K, FADEL M, NAOUM L, et al. Thalidomide is better than Rapamycin in prevention of neovascularization after laser photocoagulation in dorsal window chamber rat model[J]. Eur J Mol Clin Med, 2021, 8(3): 863-878.
- [19] FRIESENECKER B E, TSAI A G, MARTINI J, et al. Arteriolar vasoconstrictive response: comparing the effects of arginine vasopressin and norepinephrine[J]. Crit Care, 2006, 10(3): 1-7.
- [20] 程海英, 朱茸, 骆清铭, 等. 血液灌注率动态变化的光学监测[J]. 中国激光, 2003, 30(7): 668-672.
- CHENG H Y, ZHU D, LUO Q M, et al. Optical monitoring of the dynamic change of blood perfusion[J]. Chinese Journal of Lasers, 2003, 30(7): 668-672.

(编辑:陈丽霞)