



基于快速激光序列光声泵浦的 肿瘤微环境研究*

郭健峰 张占军 崔星宇 王 波**

(中南大学湘雅基础医学院生物医学工程系, 长沙 410083)

摘要 **目的** 针对传统光声成像难以直接获取组织氧分压的问题, 构建基于快速激光序列的光声泵浦成像系统 (PP-PAT), 实现肿瘤微环境氧分压的快速定量动态监测。**方法** 利用亚甲基蓝三重态寿命对氧分压的敏感响应特性, 优化泵浦探测时序获取瞬态三重态差分 (TTD) 信号。通过亚甲基蓝单管仿体验证 TTD 信号获取的系统稳定性, 并用双管仿体模型与裸鼠皮下肿瘤模型验证系统对氧分压的定量成像监测能力。**结果** 仿体实验结果表明, TTD 信号可有效抑制背景干扰并稳定反映三重态动力学过程, 当平均次数为 50 次时获得较优信噪比。双管仿体结果显示, 光动力治疗过程中实验组 TTD 衰减速率减慢、三重态寿命增加, 对应氧分压持续下降, 而对照组变化稳定。活体实验实现肿瘤氧分压空间成像, 表现出肿瘤内部低氧、边缘相对高氧的异质性分布特征。**结论** 本研究所提出 PP-PAT 系统可实现组织氧分压的快速、非侵入式成像检测, 并可用于光动力治疗过程中氧耗效应的动态监测, 为肿瘤缺氧表征及精准治疗提供了新的成像手段。

关键词 光声成像, 光声泵浦, 快速激光序列, 肿瘤微环境, 氧分压, 光动力治疗

中图分类号 R318, TP391.41

DOI: 10.3724/j.pibb.2026.0305

CSTR: 32369.14.pibb.20260305

光声成像 (photoacoustic imaging, PAI) 是一种融合光学对比度与超声探测优势的新型生物医学成像技术, 兼具较高空间分辨率和较大组织穿透深度, 能够在厘米级组织深度范围内实现高质量功能成像^[1]。光声成像已在肿瘤微环境表征、血氧代谢监测、血管生成分析及疾病功能成像等领域形成较为丰富的应用基础^[2]。在肿瘤研究中, 氧分压 (oxygen partial pressure, pO_2) 是反映肿瘤缺氧状态的重要生理参数^[3]。大量研究表明, 肿瘤缺氧不仅与肿瘤增殖^[4]、侵袭及转移密切相关^[5], 而且直接影响放疗^[6]、化疗^[7]及光动力治疗等治疗方式的疗效^[8]。因此, 实现肿瘤组织氧分压的准确测量对于肿瘤精准诊疗具有重要意义。

传统光声成像主要通过多波长光谱分析实现血氧饱和度 (oxygen saturation, sO_2) 的定量估计^[9]。然而, 血氧饱和度仅反映血红蛋白结合氧的状态, 难以直接表征组织间质中的溶解氧分压水平^[10]。近年来, 基于光声泵浦机制的成像方法逐渐兴起^[11]。该方法通过引入具有三重态动力学特

性的外源光敏剂 (如亚甲基蓝^[12]), 利用其激发态寿命对氧分压的敏感响应, 实现组织氧分压的定量检测, 为肿瘤缺氧成像提供了新的技术路径。

然而, 现有光声泵浦成像系统 (PP-PAT) 通常受限于激光重复频率及脉冲时序控制方式, 其数据采集效率较低, 时间分辨率有限^[13], 难以满足光动力治疗过程中氧耗变化等快速生理过程的动态监测需求^[14-15]。因此, 开发高时间分辨率的快速光声泵浦激光序列, 提高氧分压检测效率, 已成为该领域的重要研究方向。针对上述问题, 本文提出一种基于快速激光序列优化的光声泵浦成像方法, 通过优化泵浦探测脉冲时序设计, 缩短延迟时间扫描周期, 提高氧分压检测效率, 实现肿瘤微环境氧分压变化的快速监测。该方法不仅提升了系统时间分辨率, 也为光动力治疗过程中肿瘤微环境的动态

* 国家重点研发计划 (2024YFC3405300) 和国家自然科学基金 (62527821) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 18569518984, E-mail: wangbo0302@csu.edu.cn

收稿日期: 2026-06-04, 接受日期: 2026-07-27

表征提供了新的技术手段。

1 实验方法

1.1 基于光声泵浦探测的氧分压测量原理

光声泵浦探测成像基于光敏分子的激发态动力学过程，其原理如图1a所示。当泵浦激光照射亚甲基蓝分子时，分子由基态单重态 (S_0) 跃迁至激发单重态 (S_1)。随后，部分分子通过系间窜越 (intersystem crossing, ISC) 进入寿命较长的三重态 (T_1)^[16]。

由于氧分子对三重态分子具有显著的猝灭作用， T_1 态寿命对环境氧分压表现出高度敏感性。在泵浦激光激发后的延迟时间 Δt 处施加探测激光，探测三重态分子的吸收变化并激发相应光声信号。通过差分处理获得瞬态三重态差分 (transient triplet differential, TTD) 信号，其表达式为：

$$S_{\text{TTD}, t=\tau} = S_{\text{pump} + \text{probe}, t=\tau} - S_{\text{pump}, t=\tau} - S_{\text{probe}, t=\tau} \quad (1)$$

其中， $S_{\text{pump} + \text{probe}, t=\tau}$ 表示泵浦光与探测光共同作用时产生的光声信号 (M)， $S_{\text{probe}, t=\tau}$ 表示仅由探测光产生的光声信号 (T)， $S_{\text{pump}, t=\tau}$ 表示仅由泵浦光产生的光声信号 (P)， $S_{\text{TTD}, t=\tau}$ 为差分处理后的光声信号 (TTD)； τ 为探测光相对于泵浦光的延迟时间。实际采集时，系统记录每次激发后的完整射频光声波形，并在相同空间位置和相同声学飞行时间

窗内进行配准后提取幅值特征用于差分计算。在该差分框架中，M信号中由泵浦光直接诱导的基态吸收背景与P信号对应，探测光直接诱导的背景光声贡献与T信号对应。因此，经M-P-T差分后，可主要保留由泵浦光预先形成的 T_1 态分子在探测光作用下产生的三重态相关光声贡献。通过上述差分处理，可有效消除组织背景吸收、血液吸收以及基态分子的光声贡献，实现对三重态分子的高特异性检测。TTD信号强度与三重态分子浓度成正比，其衰减过程满足指数规律：

$$A(t) = A^0 e^{-t/T} \quad (2)$$

其中， $A(t)$ 表示延迟时间为 $\tau = t$ 时的 TTD 信号强度， A^0 为初始时刻的 TTD 信号， T 是三重态寿命。根据 Stern-Volmer 方程^[17]，寿命 T 与生物组织中的 pO_2 存在如下定量关系：

$$T^0/T = 1 + k_Q T^0 pO_2 \quad (3)$$

其中， T^0 为无氧状态 ($pO_2=0$ mmHg) 时的 T_1 态寿命， k_Q 为猝灭速率常数。对于本研究采用的亚甲基蓝，其参数设置为： $T^0=79.6 \mu\text{s}$ ， $k_Q=0.0036 \mu\text{s}^{-1} \cdot \text{mmHg}^{-1}$ 。通过拟合 TTD 信号衰减曲线获得三重态寿命后，即可进一步计算组织氧分压，实现氧分压定量成像。此外，本系统采用了 GPU 并行化方法对上述反演算法进行加速，以满足快速成像的需求。

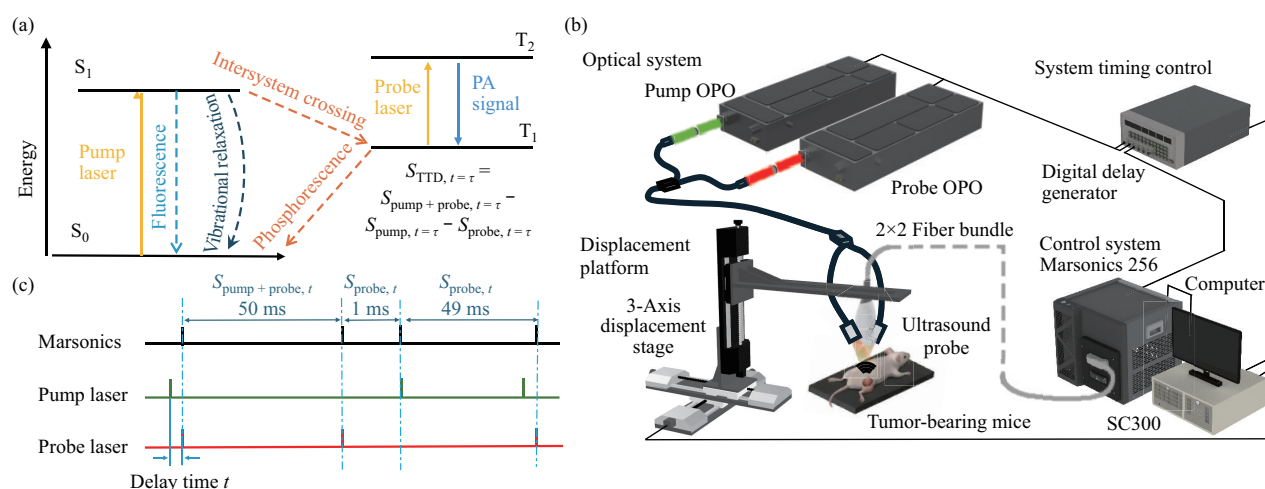


Fig. 1 Experimental setup and principle of the PP-PAT system

(a) Excited-state dynamics of methylene blue molecules, including singlet excitation, intersystem crossing, triplet-state formation, and oxygen quenching processes. (b) Experimental setup for *in vitro* oxygen partial pressure measurement. (c) Fast laser pulse sequence used for pump-probe photoacoustic acquisition.

1.2 快速光声泵浦监测氧分压系统

系统硬件架构如图1b所示，主要由两台光学

参量振荡器 (optical parametric oscillator, OPO) 激光器 (SpitLight OPO 600)、一台数字延迟脉冲

发生器 (DG645, Stanford Research Systems, USA)、一个 7.5 MHz 线阵超声探头 (L11-5v, Marsonics 定制) 以及 Marsonics 256 通道超声数据采集平台组成。泵浦激光器采用 355 nm 激光泵浦, 通过 OPO 产生 660 nm 激发光, 用于激发亚甲基蓝分子; 探测激光器采用 532 nm 激光泵浦, 通过 OPO 产生 800 nm 探测光, 用于探测三重态吸收变化, 泵浦光和探测光在样品表面的单脉冲能量密度分别约为 6 mJ/cm^2 和 8 mJ/cm^2 , 并参照 ANSI Z136.1 激光安全标准进行安全性评估^[18]。两台激光器的重复频率均设置为 20 Hz。泵浦光与探测光通过二向色镜进行光路合束后耦合至 1×2 光纤束。光纤输出端由两个尺寸为 $1.5 \text{ mm} \times 2.0 \text{ cm}$ 的矩形光斑组成, 并固定于线阵超声探头两侧, 实现组织区域的均匀照射与同步光声信号采集。

为实现高时间分辨率的瞬态三重态动力学成像, 本文基于双 20 Hz 脉冲激光器与 Marsonics 采集平台, 设计了快速同步泵浦探测光声采集时序 (图 1c)。该序列以 Marsonics 平台每 50 ms 输出一同步触发信号作为系统时序基准, 并由 DG645 数字延迟脉冲发生器对各路触发信号进行硬件级时序编排, 使重构 TTD 信号所需的 3 次独立信号采集 (M、T、P) 能够在 100 ms 内完成。具体而言, 在周期内第一次同步触发到来时, DG645 首先触发泵浦脉冲, 并在设定延迟时间 Δt 后触发探测脉冲, 记录泵浦-探测联合作用下的光声响应信号 (M), 经历一个激光重复周期 (50 ms) 后, Marsonics 输出第二次同步触发信号, DG645 首先触发探测光获取背景探测信号 (T), 随后约 1 ms 触发泵浦光获取背景泵浦信号 (P)。之后系统等待约 49 ms, 直至下一次 50 ms 同步触发信号到来, 进入下一轮采集循环。1 ms 与 49 ms 仅为 DG645 在单个 50 ms 激光重复周期内对触发事件的时间分配, 其中约 1 ms 对应 T、P 信号的触发及采集过程, 约 49 ms 对应等待下一次同步触发的时间, 两者共同构成完整的 50 ms 重复周期。该同步交错式时序在保持激光重复频率的前提下, 可在 100 ms 内完成单一延迟条件下一帧 TTD 图像的数据采集。同时, 氧分压定量反演还需进一步采集多个延迟时间下的 TTD 衰减曲线, 因此完整的氧分压成像时间还取决于延迟点数量及重复平均次数。

1.3 材料与光动力治疗原理

亚甲基蓝 (methylene blue, MB) 是一种具有良好生物相容性和临床应用基础的光敏剂, 在肿瘤

光动力治疗领域受到广泛关注^[19]。本研究选用亚甲基蓝作为光敏剂主要基于以下两方面考虑: a. 亚甲基蓝具有较长的三重态寿命, 其理论寿命约为 $79.6 \mu\text{s}$, 能够满足光声泵浦成像对长寿命激发态的检测需求; b. 亚甲基蓝介导的光动力治疗 (MB-PDT) 已被广泛研究, 具有良好的临床转化潜力, 便于未来实现治疗与监测一体化应用^[20]。

在光动力治疗过程中, 亚甲基蓝吸收特定波长激光后进入激发态, 并通过能量转移产生单线态氧等活性氧类 (reactive oxygen species, ROS), 诱导肿瘤细胞凋亡或坏死^[21]。该过程伴随着局部氧气持续消耗, 因此能够通过氧分压变化反映治疗过程中的肿瘤微环境响应^[22]。

1.4 光动力治疗仿体实验设计

为验证所构建快速光声泵浦系统的稳定性及氧分压检测能力, 本研究首先开展单管仿体实验。实验采用浓度为 $400 \mu\text{mol/L}$ 的 MB 溶液作为样品, 泵浦光波长设置为 660 nm, 探测光波长设置为 800 nm。对仿体管进行了 200 次连续重复测量, 分别采集泵浦与探测光共同激发产生的光声信号 (M)、仅探测光激发产生的光声信号 (T) 以及仅泵浦光激发产生的光声信号 (P), 用于评估系统信号稳定性及重复性。

在完成系统稳定性验证后, 为进一步评估快速光声泵浦成像技术对氧分压变化的检测能力, 本研究开展了双管仿体实验。实验过程中, 在常温常压条件 (25°C , 101 kPa) 下配制含 $400 \mu\text{mol/L}$ 亚甲基蓝和 8 g/L 牛血红蛋白的混合溶液, 并分别注入两根直径 2.5 mm 的塑料管中构建双管仿体模型。牛血红蛋白用于模拟生物组织中的血液吸收背景, 亚甲基蓝作为光敏剂和氧分压探针。

其中, 一根仿体管作为对照组, 不进行额外的光动力治疗照射; 另一根仿体管作为实验组, 在 PP-PAT 成像检测前接受光动力治疗照射, 用于诱导光敏剂介导的氧消耗过程, 两组均接受 PP-PAT 检测脉冲, 差异仅在检测前是否接受额外治疗照射。由于两组仿体管初始成分及浓度完全一致, 因此后续检测到的 TTD 信号衰减差异主要来源于额外的光动力治疗过程中氧气消耗所引起的氧分压变化。

为了模拟光动力治疗过程中氧分压的动态变化, 利用所搭建的 PP-PAT 系统分别在治疗前 (0 min)、治疗 5 min、治疗 15 min 及治疗 30 min 四个时间点进行氧分压测量。每组数据均采用 50 次

重复平均以提高信噪比。实验中设置泵浦-探测激光延迟时间序列为0.05、0.25、0.5、1、1.5、2、4、8及16 μs ，共9个采样延时，与后续氧分压反演分析所采用的采集参数保持一致。在本时序下，单个延迟点的TTD图像采集周期为100 ms，50次平均对应约5 s，完整获取9个延迟点的TTD衰减曲线约需45 s。本文所述100 ms/帧主要指单一延迟条件下TTD图像采集速度，氧分压定量成像的时间分辨率由延迟点数量和平均次数共同决定。通过获取不同延迟时间下的TTD衰减曲线，并结合指数衰减模型及Stern-Volmer方程计算样品氧分压，可实现对光动力治疗过程中氧耗效应的动态监测。

1.5 活体肿瘤氧分压检测实验设计

为验证快速光声泵浦成像技术在活体肿瘤氧分压检测中的应用能力，本研究进一步开展裸鼠皮下肿瘤模型实验。实验选用8周龄BALB/c-Nude裸鼠，在其后肢皮下注射0.1 ml HCT-116结直肠癌肿瘤细胞（数量约为 3×10^6 ）。经1~2周培养后形成直径5~10 mm的皮下肿瘤模型。成像实验前，首先对实验动物进行麻醉并固定于成像平台。采用瘤内注射方式，向肿瘤中心区域缓慢注入0.1 ml浓度为5 mmol/L MB的溶液。等待约15 min使MB分子在肿瘤间质内充分扩散后，启动PP-PAT系统进行活体氧分压成像。实验过程中采集不同泵浦探测延迟时间下的TTD图像，通过分析亚甲基蓝三重态寿命衰减过程，实现肿瘤组织氧分压的定量重建及空间分布可视化。本研究涉及的所有动物实验均严格遵循国家实验动物管理条例及实验动物福利相关规定，并经中南大学湘雅基础医学院实验动物伦理委员会批准（伦理审批号：2024-KT167）。

2 结 果

2.1 光声泵浦系统性能验证

本研究首先开展亚甲基蓝仿体实验，对系统稳定性及信号重复性进行验证。图2a~d展示了在4 μs 延时下的泵浦探测信号（M）、泵浦信号（P）、探测信号（T）以及差分信号（TTD）的光声成像结果。图2a、b中部分信号在深度方向上相对仿体管位置发生偏移，主要来源于泵浦光与探测光采集时刻不同所引入的声学飞行时间差。由于亚甲基蓝在泵浦波长处具有较强吸收，因此M图像和P图像均表现出明显信号，而T图像信号相对较弱。经过差分运算后获得的TTD图像有效去除了背景吸收成

分，仅保留与三重态分子相关的特异性信号。图2e进一步提取仿体管区域的深度方向信号进行分析。结果表明，TTD信号能够有效反映亚甲基蓝三重态吸收特征，验证了光声泵浦成像的分子特异性检测能力。

为进一步评估系统稳定性与重复性，图2f~i对不同信号在不同平均次数条件下的幅值变化进行了分析。结果表明，随着平均次数增加，各类光声信号中的随机噪声逐渐降低，信噪比持续改善，当平均次数达到约50次后，信号波动趋于稳定，继续增加平均次数带来的提升有限。图2j~m进一步比较了不同泵浦-探测延迟条件下TTD信号在200次重复重建中的稳定性表现。具体而言，通过提取每次重建结果中峰值位置对应的数据列，并按照重复采集顺序进行横向拼接，可以直观观察TTD信号在多次重复采集过程中的空间一致性和强度波动特征。结果显示，随着泵浦-探测延迟时间的增加，三重态分子逐步衰减，TTD信号幅值相应下降，噪声占比升高，因此重复性波动略有增强。图2n综合展示了不同延迟条件下平均次数对成像稳定性的影响。在单次重建情况下，由于激光系统轻微抖动，图像存在一定随机波动；随着重复平均次数增加，噪声得到有效抑制，结构信息逐渐清晰。当平均次数达到50次时，各延迟条件下图像质量均趋于稳定，信号轮廓得以良好保留。因此，综合成像质量与采集效率，本研究选取50次平均值作为后续实验的标准参数。

2.2 仿体氧分压动态检测结果

为验证快速光声泵浦序列对氧分压变化的检测能力，本研究进一步开展了光动力治疗条件下的双管仿体实验。图3a为氧分压测量仿体实验示意图，其中一根仿体管作为对照组，另一根仿体管接受额外的光动力治疗照射。图3b展示了不同治疗时间下两根仿体管的TTD成像结果。随着光动力治疗时间增加，实验组仿体管中的TTD信号衰减逐渐减缓，而对照组变化较小。这表明光动力治疗过程中持续发生氧气消耗，导致局部氧分压下降，从而延长亚甲基蓝三重态寿命。图3c给出了不同治疗阶段TTD信号随延迟时间的衰减曲线。结果显示，对照组始终保持较为一致的衰减速率，而实验组随着治疗时间延长，其TTD衰减速率逐渐减慢，表明三重态寿命不断增加。根据式（2）进行指数拟合后，可获得对应的寿命参数，4组TTD曲线都显示出较好的指数衰减趋势，其拟合后曲线的 R^2 均

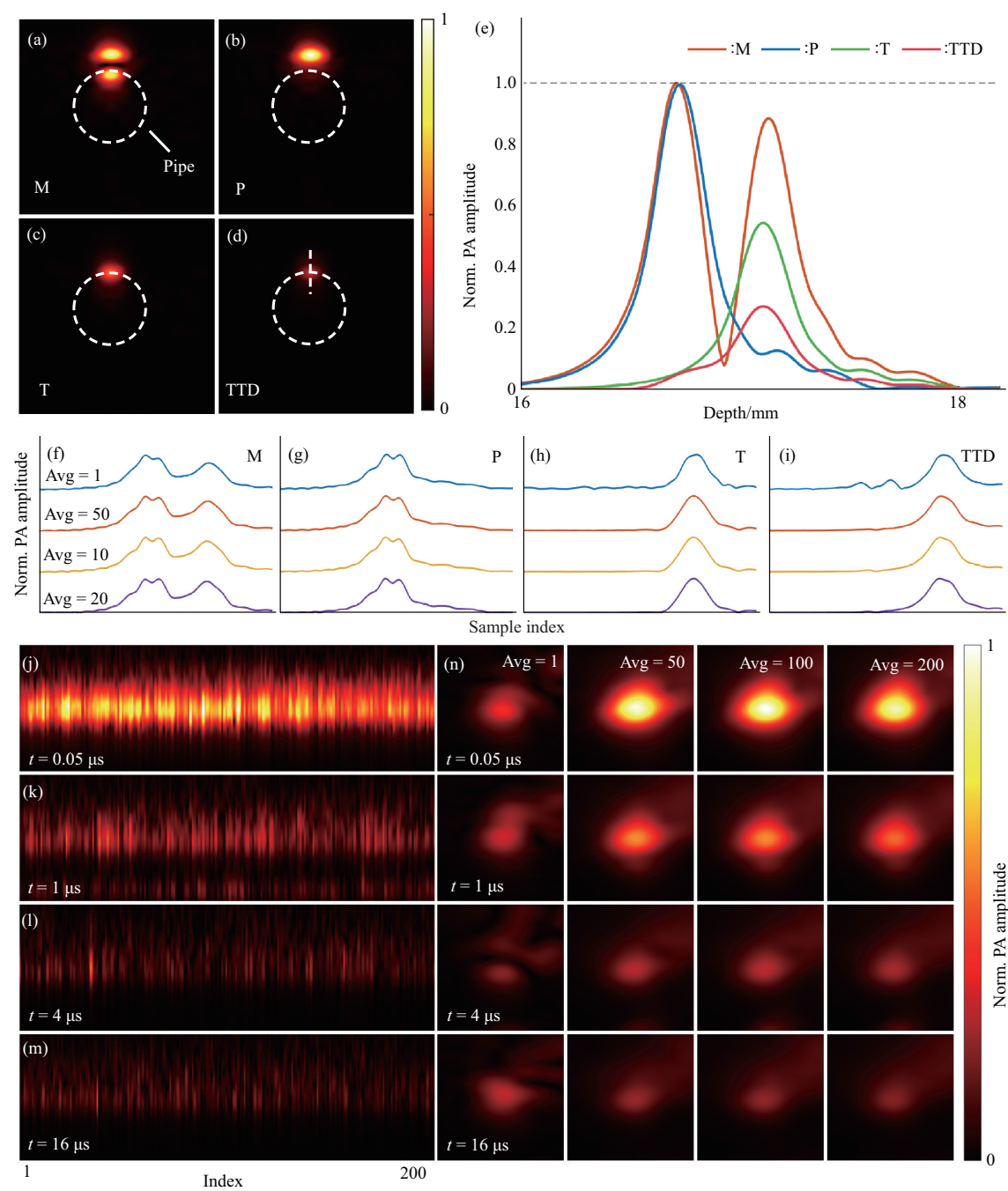


Fig. 2 Performance validation of the photoacoustic pump-probe system

(a–d) Photoacoustic images reconstructed from the pump-probe combined signal (M), pump-only signal (P), probe-only signal (T), and transient triplet-state differential (TTD) signal at a pump-probe delay of $\Delta t=4 \mu s$. (e) One-dimensional intensity profiles of M, P, T, and TTD extracted along the depth direction of the catheter phantom. (f–i) Amplitude variations of M, P, T, and TTD as a function of the number of signal averages. (j–m) Peak-signal columns extracted from 200 repeated reconstructions were laterally concatenated, where the horizontal axis represents the repeated acquisition index, the vertical axis represents depth position, and the image intensity represents the normalized TTD signal amplitude. (n) Comparison of TTD signal stability under different signal averaging numbers and pump-probe delay settings.

大于0.95。

进一步结合 Stern-Volmer 方程计算氧分压, 结果如图 3d 所示。随着光动力治疗时间延长, 实验组氧分压呈持续下降趋势, 而对照组氧分压基本保持稳定。该结果验证了快速光声泵浦系统能够准确反映氧分压动态变化过程, 并具备动态监测光动力治疗氧耗效应的能力。

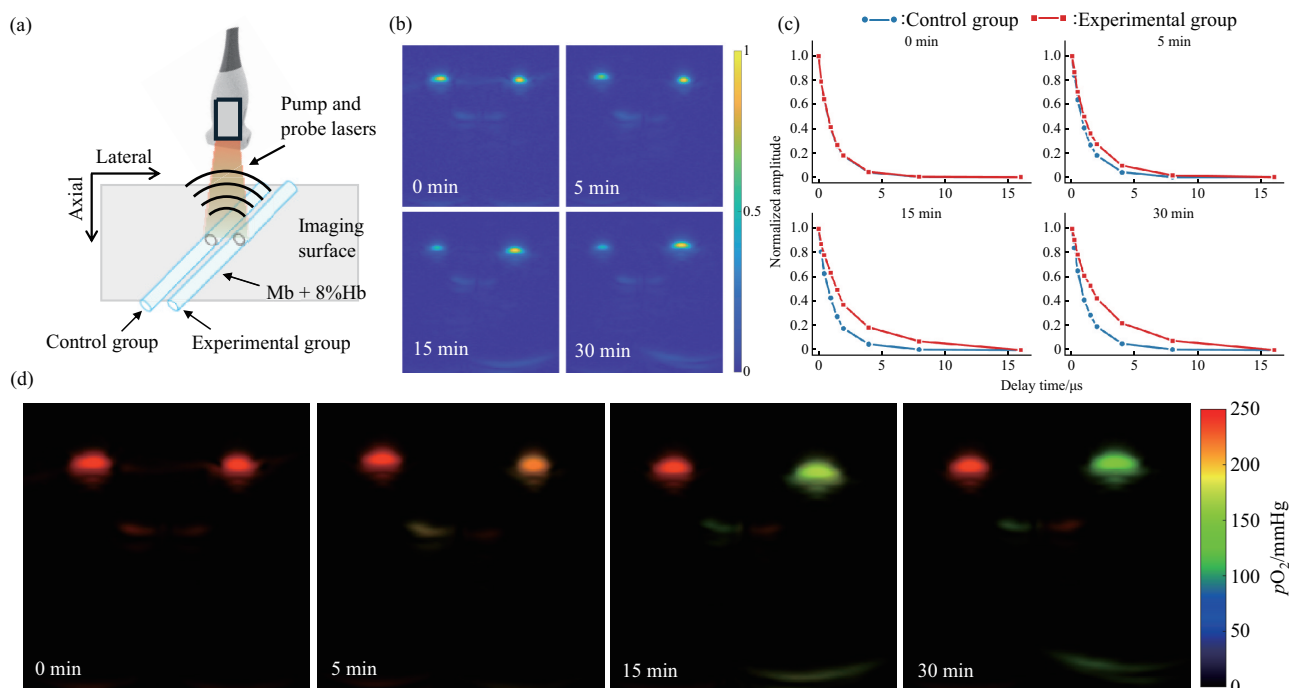


Fig. 3 Phantom validation of pO_2 measurement using PP-PAT

(a) Schematic illustration of the dual-tube phantom experiment. (b) TTD images acquired at different photodynamic therapy (PDT) time points. (c) TTD decay curves obtained from the phantom tubes. (d) Quantitative oxygen partial pressure measurements derived from TTD lifetime fitting.

2.3 活体肿瘤氧分压成像结果

为了进一步验证该方法在生物组织中的应用能力,本研究开展了裸鼠皮下肿瘤模型活体实验。图4a~c分别为泵浦探测光声图像、泵浦光声图像和探测光声图像。由于肿瘤组织内同时存在亚甲基蓝吸收和组织背景吸收,因此传统光声图像难以直接反映氧分压分布。图4d~l展示了不同泵浦探测延迟时间下获得的TTD图像。经过差分处理后,组织背景信号得到有效抑制,仅保留亚甲基蓝三重态相关信号。随着延迟时间增加,TTD信号逐渐衰减,反映出三重态分子的动态衰减过程。基于各像素点TTD信号的时间衰减曲线,采用拟合算法分别估计TTD幅值和三重态寿命参数,并进一步计算氧分压分布。由于TTD信号衰减寿命,反映的是组织不同位置由于氧分压不同所造成的 T_1 态寿命的差异,与组织中的光通量大小无关,因此光声泵浦方法可以实现定量的组织氧分压成像,其最终计算获得的氧分压伪彩图如图4m所示。

结果显示,肿瘤边缘区域氧分压相对较高,而肿瘤内部区域氧分压明显降低。这一结果与肿瘤组织中普遍存在的缺氧微环境特征相一致。由于肿瘤内部血管分布稀疏、氧扩散受限,因此形成明显的

低氧区域。为进一步验证拟合结果,本研究选取高氧区域 P_A 和低氧区域 P_B 两个代表性像素进行分析,其结果如图4n所示。拟合结果显示, P_A 区域氧分压大小约为98.6 mmHg,而 P_B 区域氧分压大小约为12.9 mmHg,反映出显著的氧分压差异。实验结果证明,本研究建立的快速光声泵浦成像系统能够实现活体肿瘤氧分压的定量检测与空间分布表征。

3 讨 论

肿瘤微环境中的缺氧状态是影响肿瘤恶性进展和治疗响应的重要因素。特别是在光动力治疗过程中,活性氧的产生依赖于局部氧供给水平,因此动态监测氧分压变化对于治疗方案优化具有重要意义。

目前常用的氧分压检测技术均存在一定局限性。极谱氧电极虽然能够实现氧分压定量测量,但属于有创检测,仅能获得局部单点信息;磷光寿命成像具有较高灵敏度,但受光散射限制,其成像深度通常不足1 mm;光谱光声成像能够实现深层组织血氧饱和度检测,但难以直接反映组织实际氧分压水平;PET及BOLD-MRI等分子影像技术虽然能够间接评估组织氧代谢状态,但设备成本较高,

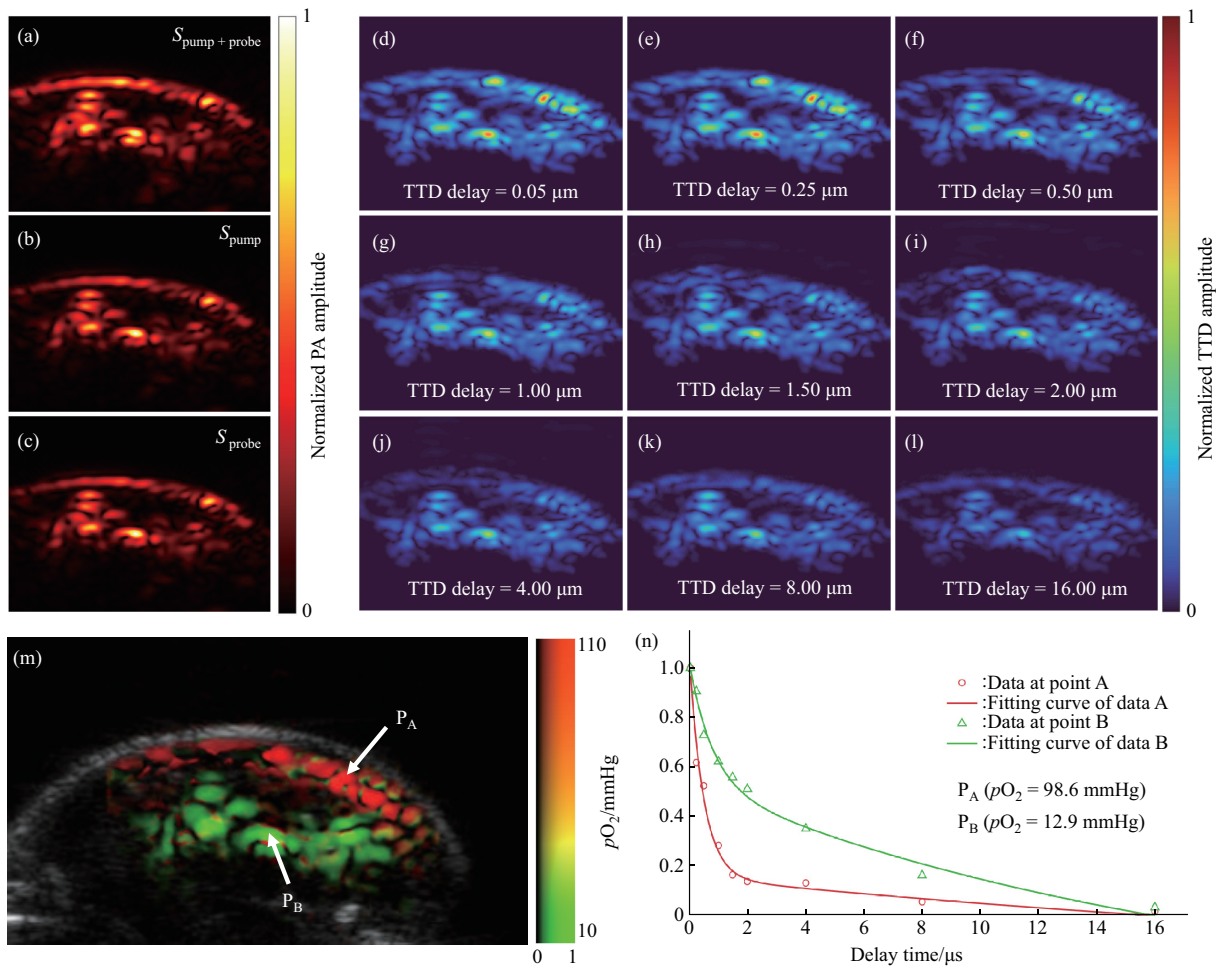


Fig. 4 In vivo tumor $p\text{O}_2$ imaging using PP-PAT

(a) Pump+probe photoacoustic image of the tumor-bearing mouse. (b) Pump photoacoustic image. (c) Probe photoacoustic image. (d–l) TTD images acquired at different pump-probe delay times. (m) Reconstructed oxygen partial pressure map of the tumor. (n) Comparison of TTD decay curves and lifetime fitting results at selected high-oxygen (P_A) and low-oxygen (P_B) regions.

且难以与光动力治疗系统实现实时联用。

相比上述方法，本研究提出的PP-PAT技术具有以下优势：a. 能够直接利用光敏剂三重态寿命反演氧分压，实现组织氧分压定量检测；b. 继承了光声成像厘米级成像深度优势，可实现深层组织氧分压可视化；c. 采用快速激光序列设计，显著提高数据采集效率，满足动态过程监测需求；d. 实现治疗与监测一体化，可同步获取光动力治疗过程中氧分压变化信息。

实验结果表明，在光动力治疗过程中，随着持续光照作用，肿瘤组织氧耗速率不断增加，导致局部氧分压持续下降。这种缺氧状态会进一步限制活性氧生成效率，从而降低光动力治疗效果。因此，动态氧分压监测有望为临床个体化治疗提供指导依据，如通过动态调节光照强度、采用间歇式照射策

略或联合供氧治疗等方式，提高治疗效率。

4 结 论

本文构建了基于快速激光序列的光声泵浦探测成像系统，实现了肿瘤微环境氧分压的定量检测与空间可视化。通过优化泵浦-探测激光触发时序，系统能够在单一延迟条件下快速获取TTD信号，并在多延迟采集基础上反演三重态寿命及氧分压分布。仿体实验和活体肿瘤实验表明，该方法能够有效抑制背景吸收干扰，稳定提取亚甲基蓝三重态动力学信息，并揭示肿瘤内部低氧、边缘相对高氧的空间异质性。相较于传统血氧饱和度光声成像，PP-PAT为组织氧分压直接量化提供了新的工程实现路径，可为肿瘤缺氧表征、光动力治疗氧耗监测及精准个体化治疗策略制定提供技术支撑。未来工

作将进一步结合光通量校正、实时重建算法优化及系统小型化设计,提升该技术在复杂生物组织和临床转化场景中的适用性。

数据可用性声明 本论文的关联数据 (DOI:10.57760/sciencedb.44220; CSTR: 31253.11. sciencedb.44220) 可在科学数据银行 (ScienceData Bank, ScienceDB) 数据库 <https://www.scidb.cn/s/Ez6Jj2> 中访问获取。

参 考 文 献

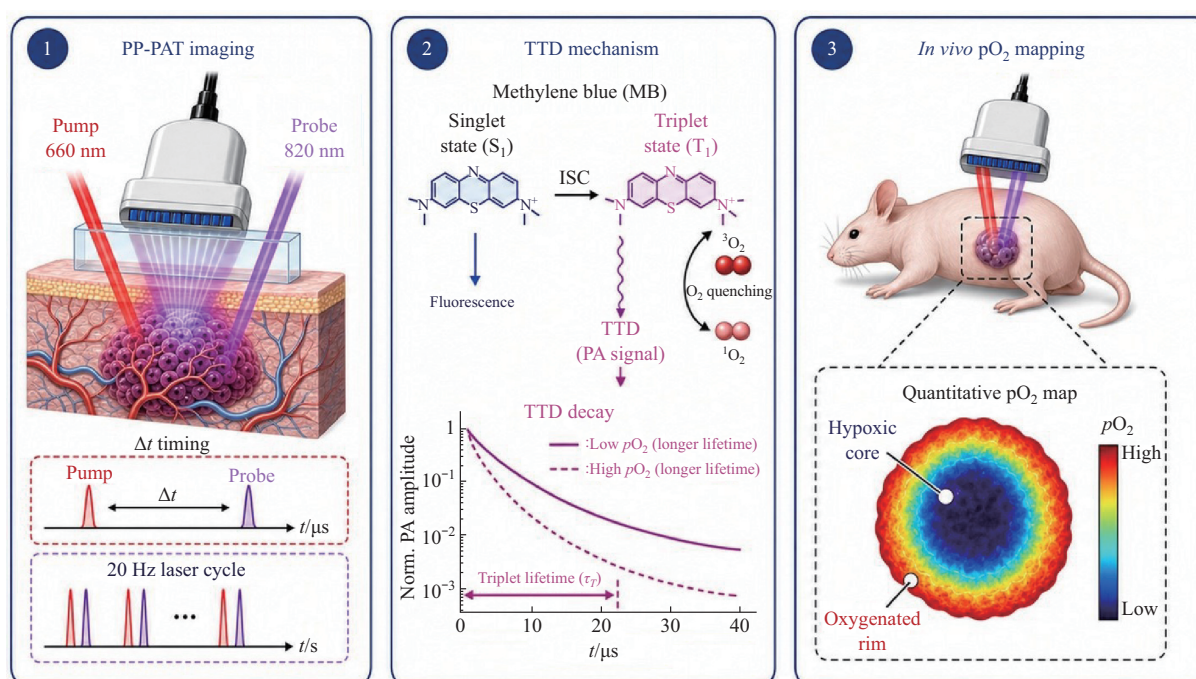
- [1] Wang L V, Hu S. Photoacoustic tomography: *in vivo* imaging from organelles to organs. *Science*, 2012, **335**(6075): 1458-1462
- [2] Tran R L, Liang X, de la Cerda J, *et al.* Potentiation of immune checkpoint blockade with an ITPP radiosensitizer studied with oxygen saturation measurements from photoacoustic imaging. *Sci Rep*, 2025, **15**: 21782
- [3] Wouters B G, Koritzinsky M, Brown J M, *et al.* The tumor microenvironment and cellular hypoxia responses//Joiner M C, van der Kogel A J. *Basic Clinical Radiobiology*. Boca Raton: CRC Press, 2024: 201-210
- [4] Bai R, Li Y, Jian L, *et al.* The hypoxia-driven crosstalk between tumor and tumor-associated macrophages: mechanisms and clinical treatment strategies. *Mol Cancer*, 2022, **21**(1): 177
- [5] Zhao Y, Zhong B, Cao J Y, *et al.* Tumor hypoxia: classification, detection, and its critical role in cancer progression. *Biomol Biomed*, 2025, **25**(8): 1672-1690
- [6] Moon E J, Petersson K, Olcina M M. The importance of hypoxia in radiotherapy for the immune response, metastatic potential and FLASH-RT. *Int J Radiat Biol*, 2022, **98**(3): 439-451
- [7] Chen Z, Han F, Du Y, *et al.* Hypoxic microenvironment in cancer: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Sig Transduct Target Ther*, 2023, **8**: 70
- [8] Abdukarimova G. Overcoming tumor hypoxia and acidic microenvironment to convert photodynamic therapy into a systemic antitumor immune response. *IJMHR*, 2026, **4**(1): 1-11
- [9] Jiang L, Chen Y, Han P, *et al.* Biomedical applications of full-spectrum photoacoustic imaging for wavelength-dependent endogenous molecules. *J Innov Opt Health Sci*, 2026, **19**(4): 2630002
- [10] Collins J A, Rudenski A, Gibson J, *et al.* Relating oxygen partial pressure, saturation and content: the haemoglobin-oxygen dissociation curve. *Breathe*, 2015, **11**(3): 194-201
- [11] Golmohamadi F G, Mehmood A, Phan H T, *et al.* Probing the photophysical properties of fluorescent proteins using photoacoustic pump-probe spectroscopy and imaging. *Photoacoustics*, 2025, **44**: 100738
- [12] Khan I, Saeed K, Zekker I, *et al.* Review on methylene blue: its properties, uses, toxicity and photodegradation. *Water*, 2022, **14**(2): 242
- [13] Velsink M C, Illienko M, Chaudhary K, *et al.* Improving signal-to-noise ratios in pump-probe spectroscopy on light-sensitive samples by adapting pulse repetition rates. *Opt Express*, 2025, **33**(11): 23632-23644
- [14] Li X, Ai J, Zhang Y, *et al.* NTR rapidly activated photosensitizers for high-signal-to-noise imaging and type I photodynamic therapy. *Nano Today*, 2025, **63**: 102768
- [15] Xiao J, He X, Xie Z, *et al.* Dynamic monitoring of oxygen partial pressure in photodynamic therapy using pump-probe-based photoacoustic tomography. *Opt Lett*, 2024, **49**(5): 1369-1372
- [16] Bollinger J C, Lima E C, Mouni L, *et al.* Molecular properties of methylene blue, a common probe in sorption and degradation studies: a review. *Environ Chem Lett*, 2025, **23**(5): 1403-1424
- [17] Kou M, Qin F, Wang Y, *et al.* Effects of excitation power density on the Stern-Volmer constant measurement. *Opt Lett*, 2023, **48**(19): 5133-5136
- [18] Thomas R J, Rockwell B A, Marshall W J, *et al.* A procedure for multiple-pulse maximum permissible exposure determination under the Z136.1-2000 American National Standard for Safe Use of Lasers. *J Laser Appl*, 2001, **13**(4): 134-140
- [19] Seitkazina A, Yang J K, Kim S. Clinical effectiveness and prospects of methylene blue: a systematic review. *Precis Future Med*, 2022, **6**(4): 193-208
- [20] Moreti L C T, Garcia L A, Fernandes K G C, *et al.* Methylene blue-mediated photodynamic therapy in the treatment of oral microbiota. A Systematic Review. *RSD*, 2022, **11**(6): e53411629001
- [21] Taldaev A, Terekhov R, Nikitin I, *et al.* Methylene blue in anticancer photodynamic therapy: systematic review of preclinical studies. *Front Pharmacol*, 2023, **14**: 1264961
- [22] Del Grande M P, Miyake A M, Nagamine M K, *et al.* Methylene blue and photodynamic therapy for melanomas: Inducing different rates of cell death (necrosis and apoptosis) in B16-F10 melanoma cells according to methylene blue concentration and energy dose. *Photodiagn Photodyn Ther*, 2022, **37**: 102635

Study on Tumor Microenvironment With Pump-probe Photoacoustic Tomography Based on a Fast Acquisition Sequence*

GUO Jian-Feng, ZHANG Zhan-Jun, CUI Xing-Yu, WANG Bo**

(Department of Biomedical Engineering, Xiangya School of Basic Medical Sciences, Central South University, Changsha 410083, China)

Graphical abstract



Abstract Objective Oxygen partial pressure (pO_2) is a critical indicator of the tumor microenvironment and plays an essential role in regulating tumor progression and therapeutic response, particularly for oxygen-dependent treatments such as photodynamic therapy (PDT). Although photoacoustic imaging (PAI) has shown great potential for functional and molecular imaging, conventional oxygenation imaging approaches based on hemoglobin absorption mainly provide relative oxygen saturation information and cannot directly quantify tissue oxygen partial pressure. Therefore, this study aimed to develop a fast laser sequence-based pump-probe photoacoustic tomography (PP-PAT) system for quantitative, non-invasive, and dynamic monitoring of oxygen partial pressure in tumor tissues. **Methods** The proposed PP-PAT system was developed based on the oxygen-sensitive triplet-state lifetime characteristics of methylene blue (MB). Upon optical excitation, MB molecules

* This work was supported by grants from the National Key R&D Program of China (2024YFC3405300) and The National Natural Science Foundation of China (62527821).

** Corresponding author.

Tel: 86-18569518984, E-mail: wangbo0302@csu.edu.cn

Received: June 4, 2026 Accepted: July 27, 2026

undergo transitions from the ground state to an excited state and subsequently form metastable triplet states through intersystem crossing. The lifetime of the triplet state is strongly affected by surrounding oxygen concentration due to dynamic oxygen quenching, providing a direct correlation between triplet-state kinetics and local oxygen partial pressure. A dual-wavelength pump-probe excitation scheme was implemented to selectively interrogate MB triplet-state dynamics. The pump pulse was used to initiate the triplet-state population, while the delayed probe pulse was applied to detect the transient triplet-state response. By optimizing the temporal interval between the pump and probe pulses, transient triplet-state differential (TTD) signals were extracted to enhance the specificity of oxygen-dependent molecular information and suppress background interference from conventional photoacoustic signals. The performance of the PP-PAT system was systematically evaluated through phantom and *in vivo* experiments. First, a single-tube phantom containing MB solution was used to investigate signal stability, reproducibility, and the influence of signal averaging on imaging quality. Subsequently, a dual-tube phantom model was established to simulate oxygen consumption during PDT, where one MB-containing tube was exposed to laser irradiation and the other served as a control. Finally, *in vivo* experiments were performed using a subcutaneous tumor model in nude mice. MB was locally injected into the tumor region before imaging to evaluate the feasibility of tumor oxygen partial pressure mapping using the proposed PP-PAT system.

Results Phantom experiments demonstrated that the extracted TTD signals exhibited high stability and effectively reflected MB triplet-state dynamics while reducing non-specific background contributions. Signal averaging significantly improved the signal-to-noise ratio, and 50 repeated acquisitions provided an optimal compromise between image quality and acquisition efficiency. In the dual-tube phantom experiments, continuous PDT irradiation induced progressive oxygen depletion in the treated sample. The corresponding TTD decay rate gradually decreased, accompanied by an increase in the calculated triplet-state lifetime, indicating reduced oxygen quenching and decreased oxygen partial pressure. In contrast, the control sample showed relatively stable TTD kinetics and oxygenation levels during the same period. These results demonstrated that PP-PAT could quantitatively characterize oxygen consumption dynamics associated with photochemical reactions. *In vivo* experiments further demonstrated the capability of PP-PAT for spatially resolved oxygen partial pressure imaging in MB-injected tumor tissues. The reconstructed pO_2 maps revealed heterogeneous oxygen distributions within tumors, showing relatively hypoxic regions in the tumor core and higher oxygenation levels near the tumor boundary. This spatial oxygen distribution pattern was consistent with the typical physiological characteristics of solid tumors, where abnormal vascular structures and limited oxygen diffusion result in intratumoral oxygen gradients.

Conclusion This study presents a fast laser sequence-based PP-PAT system capable of quantitative and non-invasive imaging of tissue oxygen partial pressure. By utilizing the oxygen-dependent triplet-state lifetime of MB and extracting TTD signals, the proposed method provides molecularly specific information related to oxygen dynamics beyond conventional photoacoustic oxygenation imaging. The system enables dynamic monitoring of oxygen consumption during PDT and reveals spatial oxygen heterogeneity within tumors. This technique provides a promising imaging approach for tumor hypoxia characterization, evaluation of oxygen-dependent therapeutic responses, and precision-guided cancer treatment.

Key words photoacoustic tomography, pump-probe imaging, fast acquisition sequence, tumor microenvironment, oxygen partial pressure, photodynamic therapy

DOI: 10.3724/j.pibb.2026.0305

CSTR: 32369.14.pibb.20260305