

纪念王威琪院士诞辰 85 周年

超声定位显微成像对肿瘤演进及磁热疗效的评估*

冯宇康¹ 王罗军¹ 郑 罕¹ 孔新丽¹ 杨思琦¹ 陈海鑫¹
陈 冕^{1,2,3} 陈 昕^{1,2,3} 陈思平^{1,2,3} 林浩铭^{1,2,3†}

(1 深圳大学医学部生物医学工程学院 深圳 518060)

(2 医学超声关键技术国家地方联合工程实验室 深圳 518060)

(3 广东省生物医学信息检测与超声成像重点实验室 深圳 518060)

2023 年 12 月 31 日收到

2024 年 4 月 1 日定稿

摘要 肿瘤的演进和消融伴随着微血管网络的变化,因此使用超声定位显微成像技术评估肿瘤区域微血管及其在磁热疗作用下的变化。通过构建小鼠肿瘤动物模型,搭建实验平台进行超声动物实验,实现肿瘤内部细微血管成像。通过向肿瘤部位注射磁纳米粒子,在外部磁场的作用下产生热效应,实现对肿瘤的磁热治疗。实验结果表明,超声定位显微镜成像能观察到肿瘤生长演进过程中微血管网络的变化,且其变化情况与免疫组化结果具有一致性。此外,磁热治疗后肿瘤内部血管明显减少,与病理切片结果相符,验证了磁热治疗的可行性。

关键词 超声定位显微成像,微血管图像,肿瘤演进,磁热治疗

PACS 数 43.35, 43.60

DOI: 10.12395/0371-0025.2023318

Evaluation of tumor progression and magnetic hyperthermia therapy efficacy with ultrasound localization microscopy

FENG Yukang¹ WANG Luojun¹ ZHENG Han¹ KONG Xinli¹ YANG Siqi¹ CHEN Haixin¹
CHEN Mian^{1,2,3} CHEN Xin^{1,2,3} CHEN Siping^{1,2,3} LIN Haoming^{1,2,3†}

(1 School of Biomedical Engineering, Shenzhen University Medical School, Shenzhen University Shenzhen 518060)

(2 National-Regional Key Technology Engineering Laboratory for Medical Ultrasound Shenzhen 518060)

(3 Guangdong Key Laboratory for Biomedical Measurements and Ultrasound Imaging Shenzhen 518060)

Received Dec. 31, 2023

Revised Apr. 1, 2024

Abstract Tumor progression and ablation are accompanied by changes in the microvascular network. Ultrasound localization microscopy (ULM) is a promising tool for observing such changes. This study aims to use this method to evaluate the microvasculature in tumor regions and its changes under magnetic hyperthermia treatment. By establishing a mouse tumor animal model and setting up an experimental platform for ultrasound experiments, imaging of the intratumoral microvasculature is achieved. Magnetic hyperthermia treatment combines an external magnetic field and injected magnetic nanoparticles, which causes heat effect on the tumor tissue. Experiment results show that the changes of intratumoral microvasculature during tumor evolution can be observed by the ULM, which was consistent with the results of immunohistochemistry. Furthermore, comparing the microvascular images of the tumor area before and after magnetic hyperthermia treatment, a significant reduction in blood vessels is found, which is also consistent with the pathological slice results. The results verified the feasibility of magnetic hyperthermia treatment.

Keywords Ultrasound localization microscopy, Microvascular image, Tumor progression, Magnetic hyperthermia treatment

* 国家自然科学基金项目 (82272014, 62071310) 和深圳市基础研究项目 (JCY20220818095612027, JCYJ20210324093006017) 资助

† 通讯作者: 林浩铭, hm_lin@szu.edu.cn

引言

癌症是全球主要的公共卫生问题,对恶性肿瘤进行早期诊断和治疗评估具有重要的临床意义。在肿瘤诊断方面,近年来提出的超声超快平面波成像技术^[1],能够提供安全、快速的功能性信息,有利于发现肿瘤,并评估其性质^[2]。然而,其成像分辨率较低,对早期肿瘤的诊断存在局限性^[3]。在癌症治疗方面,热消融技术^[4],作为一种新兴的肿瘤治疗方法,因其侵入性低、痛苦小、安全性高以及短期内治疗效果明显而受到关注。高强度聚焦超声是实现热消融治疗的方式之一^[5-6]。而磁热治疗^[7]是实现热消融治疗的另一种方式,其利用磁性纳米颗粒在外部磁场的作用下产生热量,以破坏肿瘤细胞,进而实现肿瘤治疗的效果。磁热治疗可设计成具有靶向性的磁性材料,在提升肿瘤治疗效果的同时保护正常组织。在磁热疗过程中及时评估治疗效果,对于治疗计划的优化和安全评估具有重要的意义。

传统超声的分辨率受限于衍射极限,这一局限随着超声定位显微镜 (ULM) 技术的发展得到了显著突破^[8]。2015 年,ERRICO 等^[9]开创性地提出了 ULM,实现了大鼠全脑血管网络的重建,分辨率高达 $10\ \mu\text{m}$ 。其后,研究人员对该技术的关键环节,如微泡信号提取^[10]、定位^[11]、追踪^[12]和抗运动干扰^[13-14]等,进行了大量的研究,不断提升成像性能。而在 ULM 的应用领域,Wei 等^[15]成功展示了兔子肝脏 VX2 肿瘤的微血管结构,识别出血管供应不足的肿瘤核心区域。Matthew 等^[16]阐明了 ULM 在评估结直肠癌中抗血管生成和化疗治疗效果上的作用,尤

其是在理解肿瘤微血管变化方面的潜力。Lin 等^[17]使用 ULM 技术,结合微血管形态定量分析,观察到与恶性肿瘤生长相关的微血管模式变化。以上研究表明 ULM 在肿瘤诊断上具有重要的临床应用价值。

本研究利用 ULM 评估肿瘤内部的微血管变化,包括肿瘤正常生长过程中的变化以及磁热治疗前后的变化。在肿瘤生长的过程中,对不同天数的肿瘤组织进行 ULM 成像,评估其微血管网络变化,验证 ULM 技术对于肿瘤早期诊断的作用。此外,使用磁热技术进行肿瘤治疗,同时使用 ULM 技术评估治疗前后微血管网络变化,验证磁热治疗的疗效。

1 超声定位显微成像方法

与传统超声血流成像不同,ULM 通过捕获离散空间中大量的微泡事件,重建血管图像。如图 1 所示,在对小鼠注射微泡造影剂后,连续采集大量超声 RF 信号数据,对数据离线处理后得到微血管图像。

1.1 微泡提取

对采集到的 RF 信号进行延时叠加和解调之后可获得波束合成后的 IQ 信号。此时的信号中同时包含组织信号、微泡信号和随机噪声^[18]。超声快速成像可获得大量时空数据,且组织信号和血流信号在时间相干性特点方面存在差异^[19],因此目前常使用基于奇异值分解 (SVD) 的时空滤波器提取微泡信号^[20]。首先将波束合成后的数据重新排列为二维 Casorati 矩阵 S ,其维度是 $[N_z \times N_x, N_t]$,其中 N_z 和 N_x 分别是超声 IQ 数据沿深度和宽度方向的采样点数, N_t 是相干复合后的帧数。对矩阵 S 进行奇异值分解:

$$S = U\Sigma V^T, \quad (1)$$

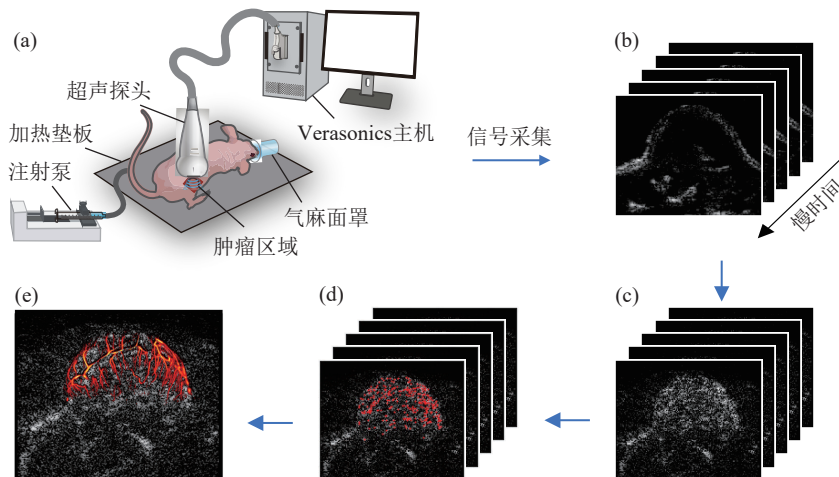


图 1 超声定位显微成像肿瘤评估实验平台及成像流程示意图 (a) 超声采集平台示意图; (b) 多帧 B-mode 图像; (c) ULM 微血管结果; (d) 微泡定位结果; (e) 杂波抑制结果

其中, U 和 V 分别是时间和空间奇异向量基, Σ 是特征值矩阵。组织信号相对于流动微泡信号具有更高的时空相干性, 而组织信号和血流信号表现为较高和较低的奇异值。SVD 分解运算后, 按特征值递减的方式对特征向量进行排序, 并通过阈值选择与重建, 可得到提取微泡信号后的图像 (图 1(c))。

1.2 微泡定位

微泡在图像中的显示并非理想点源, 而是呈点扩散函数分布, 微泡定位旨在找出真实的微泡中心位置。镜像对称法^[21]是一种高效且准确的定位方法。对于经过前述步骤得到的图像 (图 1(c)), 可通过局部最大值的方法获得粗略的微泡位置, 为了进一步提高微泡定位精度, 还需要根据其点扩散函数对微泡进行亚像素级的定位。选取局部最大值邻近 $N \times N$ 大小的图像区域, 使用一个大小为 2×2 的滑动窗口计算窗口中心点 (x_k, z_k) 的梯度斜率:

$$m_k = \frac{(I_{i+1,j+1} - I_{i,j}) + (I_{i,j+1} - I_{i+1,j})}{(I_{i+1,j+1} - I_{i,j}) - (I_{i,j+1} - I_{i+1,j})}, \quad (2)$$

其中, $\{I_{i,j}, I_{i+1,j}, I_{i,j+1}, I_{i+1,j+1}\}$ 分别是滑动窗口中左上、右上、左下和右下四个点的强度值, k 是滑动窗口处于不同位置时的标号, 可以理解为对于每个窗口中心点 (x_k, z_k) 都有一条斜率为 m_k 的直线穿过其中。存在某个点到所有这些直线的距离最小:

$$\arg \min_{(x,z)} \chi^2 = \sum_k d_k^2(x,z), \quad (3)$$

其中, $d_k(x,z)$ 是点到直线的距离。这个距离最小的点就是微泡真正的中心点。

1.3 微泡追踪和叠加

在定位到每帧图像中的微泡后, 需对帧间微泡进行匹配和追踪。本研究采用匈牙利算法^[22], 计算过程如下, 计算每个微泡点与后续帧中所有微泡点的平方距离, 并通过最小化总平方距离来找到最佳匹配的微泡点。在匹配的两个点之间进行插值, 从而得到微泡的运动轨迹。连续 IQ 数据处理后, 获得血管内微泡运动轨迹图像, 将微泡运动的位移除以帧间时间间隔, 算出微泡运动速度, 进而反映微血管中血流的速度。

2 实验设计

2.1 动物实验

本实验采用五周龄的 Balab/c 雌性小鼠, 所有实验均获得深圳大学医学部动物伦理委员会的批准。

每只小鼠背部左侧接种 0.1 mL 浓度为 7×10^7 个/mL 的 4T1 细胞悬液, 以建立乳腺癌动物模型。在接种肿瘤细胞一周后, 若观察到接种部位出现结节状凸起, 即表明肿瘤模型成功建立。随后, 每隔三天对这批小鼠进行 ULM 成像, 共进行五次。超声实验后, 取肿瘤组织样本并进行免疫组化染色, 分析血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达水平, 以此作为评判血管生长情况的标准^[23]。由于需要采集已实验动物的病理切片, 因此每一组实验的结果来自不同的动物。为消除个体差异的影响, 每一组均选取了四只动物进行重复实验。

另取一批小鼠, 使用同样的方法制作动物模型。其中, 两只小鼠注射 100 μ L 的 PBS 缓冲液作为对照组, 其余七只注射 100 μ L 浓度为 5 mg/mL 的磁纳米粒子, 作为实验组。在磁热治疗前后, 分别对肿瘤部位进行 ULM 成像的数据采集, 用以评估治疗效果。通过采集肿瘤组织样本, 进行 H&E 染色, 得到肿瘤细胞的变化情况。

2.2 超声数据采集与处理

本实验通过静脉注射的方式, 将微泡造影剂注射到小鼠体内。为了保证血管中的微泡浓度处于合理的水平, 采用了间隔注射的方式, 在实时 B 模式图像中看到明显的微泡流动后才开始数据采集。实验前, 通过腹腔注射巴比妥钠溶液将小鼠麻醉, 同时在实验中配合使用气麻装置保证麻醉效果稳定。将小鼠置于实验平台的加热垫上, 使其在实验过程中保持体温恒定。

超声数据采集主要基于 Verasonics 公司的 Vantage 128 HF 可编程超声系统, 所用的探头为具有 128 阵元的 L35-16v 线阵探头, 中心频率为 28 MHz, 间隔发射交错采集后的采样频率为 125 MHz, 脉冲重复频率为 10 kHz, 成像方式为多角度平面波 ($-4^\circ, -2^\circ, 0^\circ, 2^\circ, 4^\circ$), 角度复合后的成像帧率为 1 kHz^[24]。数据以多组形式采集, 每组采集 1000 帧数据, 重复采集 100 组, 共计 10 万帧数据。所有数据采集完后, 在主机上进行离线重建。

在采集到超声 RF 通道数据后, 首先对其进行波束合成得到 IQ 数据。以每组 IQ 数据的第一帧为参考值, 对随后的所有帧进行相关性分析, 计算其相关系数, 那些相关系数低于 0.75 的帧被认为受到显著运动干扰, 从后续计算中排除。然后, 使用 SVD 分解进行杂波抑制, 通过分析奇异值曲线的拐点, 确定了低阶和高阶阈值分别为 20 和 800。接下来, 对 IQ 数据执行相邻帧差分处理, 以滤除组织和静止微泡的

信号。在镜像对称定位中,用于计算微泡中心点的相邻区域大小为 $N=5$ 。在微泡追踪时,设置帧间追踪最大距离的阈值为 2 个波长,另外还规定了连续追踪到 10 个点以上的轨迹线才被采纳。经过以上处理之后可重建得到 ULM 图像。

2.3 磁热治疗平台

磁热治疗的原理是基于注入肿瘤部位的磁性材料在交变磁场作用下产生热效应,致使肿瘤细胞经历凝固性坏死,从而实现肿瘤治疗的目的。磁热治疗平台主要分为三个部分:高频激励电路、高频线圈、水冷系统。高频电路的频率定为 600 kHz,功率定为 3 kW。在实际操作过程中,实验小鼠被固定于加热平台之上,其肿瘤区域完全被激励线圈所覆盖。磁热消融的过程每次持续五分钟,每隔一天重复执行一次,共计进行三次,以确保热消融的完全进行。

3 结果

3.1 肿瘤生长演进过程评估

图 2 是肿瘤接种后不同天数采集到的肿瘤内部微血管图像。由于需要采集病理结果作比较,因此不同天数的结果来自不同的小鼠。结果显示,随着肿瘤的生长,微血管形态在前期较为丰满,微血管密

度较高,而后期肿瘤逐渐在中心区域出现空洞,从第 14 天开始已有中心区坏死的趋势,到第 20 天能够看到中心区域微血管明显减少。

在超声微血管成像实验后,采集肿瘤组织样本,通过免疫组化实验分析不同时期肿瘤部位的 VEGF 的阳性表达结果,如图 3 所示。随着肿瘤的生长,VEGF 阳性区域面积降低,且同样是先从中心区域开始变化。

针对所重建的微血管图像和免疫分析图像,分别使用 Aipathwell 软件(武汉赛维尔)和 AngioTool 软件^[25]进行量化分析。其中 Aipathwell 能够计算 VEGF 阳性细胞占比,而 AngioTool 能提取包括血管数量、血管长度、血管面积占比和弯曲度等量化特征。量化特征的统计结果如图 4 所示,可知血管的面积占比和总长度在肿瘤生长后期明显变小,与 VEGF 金标准变化趋势一致。而血管的分支点数在第二个阶段达到峰值,随后逐渐降低。

3.2 肿瘤磁热治疗评估

肿瘤小鼠被分为实验组(注射磁纳米粒子)和对照组(注射 PBS 缓冲液)。在磁热消融前后,分别对小鼠肿瘤接种区域的微血管进行成像。图 5(a)(b)的结果显示,实验组由于磁热消融作用,肿瘤区域大多已坏死,血管结构被破坏,仅在边缘区域观察到残存的微血管。相比之下,图 5(c)(d)中对照组的小鼠在

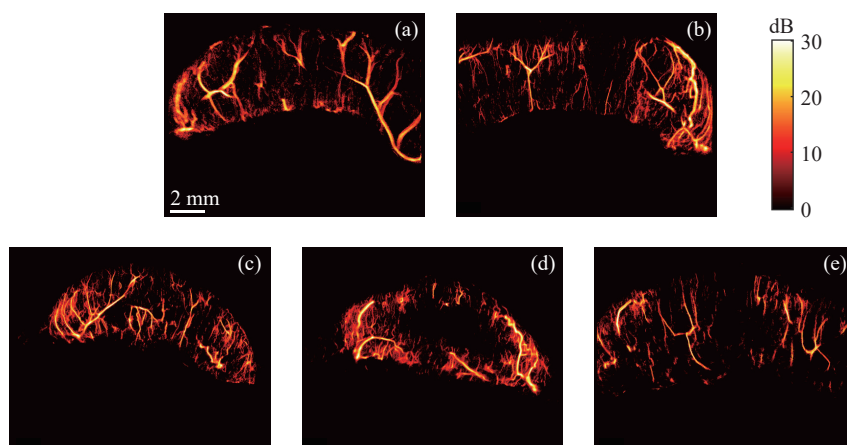


图 2 肿瘤生长演进过程中的微血管图像 (a) 第 8 天; (b) 第 11 天; (c) 第 14 天; (d) 第 17 天; (e) 第 20 天

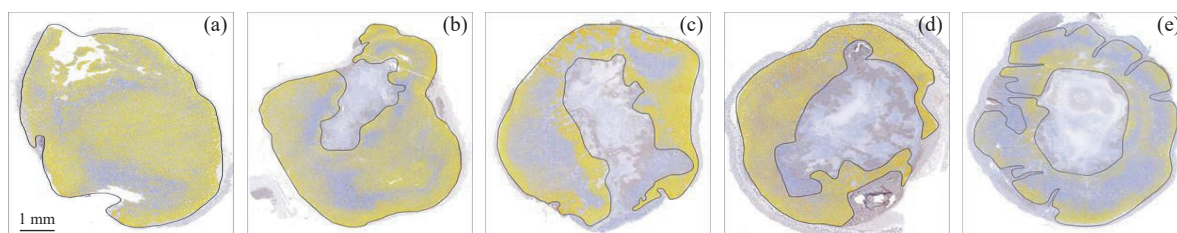


图 3 肿瘤生长演进过程中 VEGF 表达情况 (a) 第 8 天; (b) 第 11 天; (c) 第 14 天; (d) 第 17 天; (e) 第 20 天

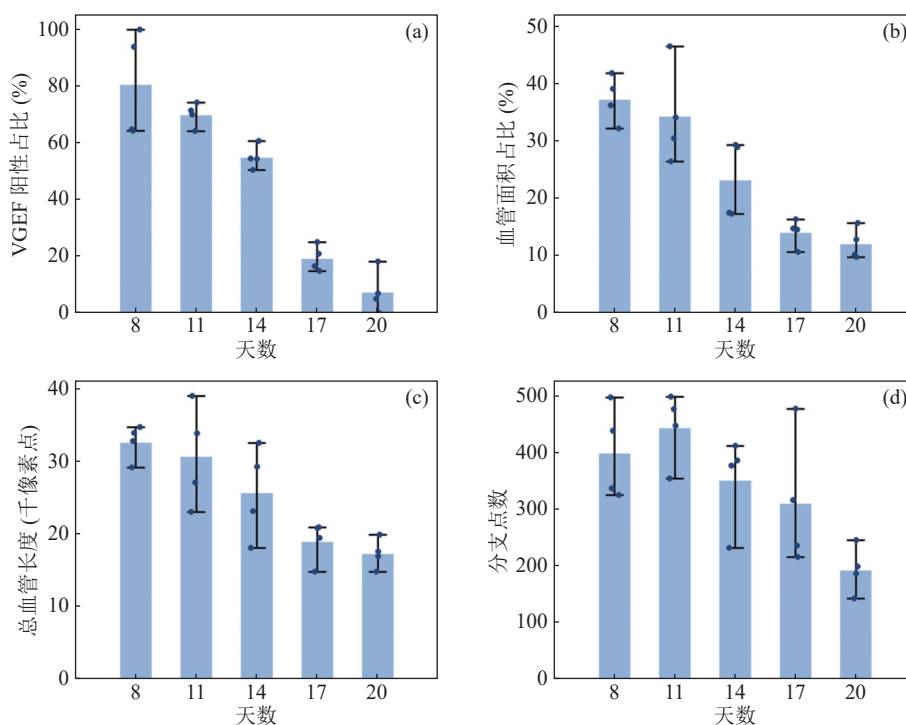


图4 肿瘤生长演进过程中免疫组化和超声微血管图像中的血管特征变化的对比 (a) VEGF 阳性占比 (金标准); (b) 血管面积占比; (c) 总血管长度; (d) 分支点数 (不同天数各有 4 只小鼠 ($n=4$))

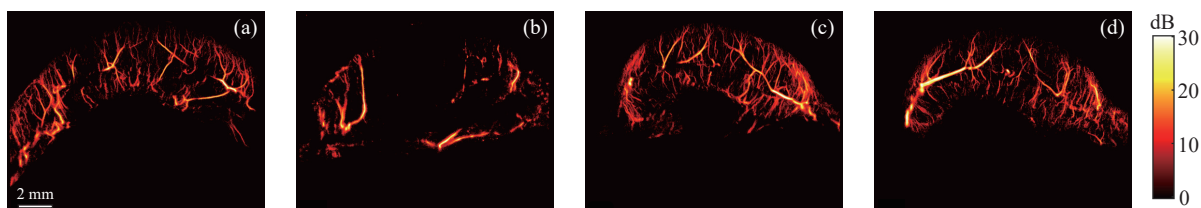


图5 磁热治疗前后微血管图像对比 (a) 实验组磁热治疗前; (b) 实验组磁热治疗后; (c) 对照组磁热治疗前; (d) 对照组磁热治疗后

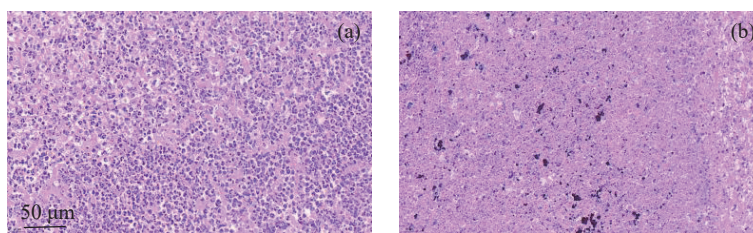


图6 磁热治疗后 H&E 染色结果对比 (a) 对照组; (b) 实验组

实验前后微血管结构变化不大, 仍然维持较丰富的微血管组织。

在完成磁热消融试验后, 分别对实验组和对照组进行 H&E 染色实验。如图 6(a) 所示, 对照组细胞形态和组织结构保持良好, 未见明显异常。而图 6(b) 所示实验组由于高温作用, 细胞和组织结构出现不同程度的变化和破坏, 细胞核形态和染色异常, 细胞大量破裂, 出现空隙、断裂和纤维化现象。H&E 染色结果表明, 磁热消融可以有效地破坏肿瘤组织。

使用 AngioTool 血管量化分析软件, 分别对实验

组和对照组的微血管图像进行特征提取。统计结果如图 7 所示, 肿瘤在磁热消融后, 微血管的面积占比、总长度、分支点数及末端点数等特征均显著减少, 与对照组相比, 变化趋势明显。

4 讨论

本文基于超声定位显微镜技术评估了肿瘤演进生长及治疗前后肿瘤内部微血管分布, 探讨其在肿瘤诊断及治疗评估中的应用价值。建立动物模型, 并采用 ULM 技术, 观察肿瘤在不同时间点的生长状

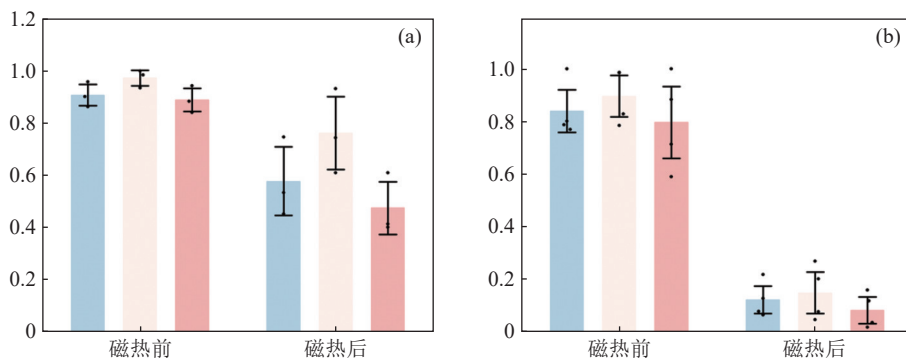


图7 (a) 对照组磁热治疗前后血管特征变化 ($n=3$); (b) 实验组磁热治疗前后血管特征变化 ($n=4$)

态。由实验结果可知, ULM 可实现对肿瘤内部血管的高分辨率成像, 血管成像分辨率可达 $10\ \mu\text{m}$, 高于以往研究中的 $100\ \mu\text{m}$ 分辨率^[26]。对比从 ULM 图像中提取的微血管特征与通过免疫组化技术得到的量化指标, 显示肿瘤生长过程中某些微血管参数(如微血管的面积占比、总长度等)与 VEGF 的阳性表达结果之间存在显著相关性, 两者变化趋势一致。另外, 经磁热消融治疗后, 肿瘤组织内部出现明显坏死现象, 通过 ULM 成像观察到微血管数量显著减少且主要发生在肿瘤坏死区域。本研究在肿瘤细胞植入后第 8 天开始肿瘤演进 ULM 成像实验, 此时肿瘤内部血管已经较为丰富, 未能观察到肿瘤演进前期的血管分布是本研究的一个局限。

本实验选取的成像平面只覆盖肿瘤生长区域, 其中没有正常组织和血管。考虑到正常组织和肿瘤组织在血管形态上的差异^[27], 后续可以研究利用 ULM 技术进行肿瘤的早期诊断。磁热治疗实验中由于磁纳米注射位置和线圈摆放位置等因素的影响, 消融主要发生在肿瘤的中心区域, 而临床实际中很难确定肿瘤的具体位置, 为了避免伤害到正常组织, 后续研究需要改进磁纳米粒子对肿瘤组织的靶向聚集效果。

在本研究中, ULM 成像为二维成像, 实验过程中成像切面的选择非常关键。通常, 在实验过程中选择多个切面部位进行数据采集, 可降低成像切面随机性对实验结果的影响。另一方面, 虽然超声数据采集过程中标记了成像切面, 但这还是很仍难保证成像切面与实际的病理切片完全对应。三维 ULM 技术是实现肿瘤完整血管成像的有效方法^[28-29], 也是目前该领域研究的主要方向之一。

ULM 成像依赖于大量的时空数据来重建微血管图像, 存在数据量大, 重建时间长的问题。以本文使用的主机为例 (I9-13900K@5.80GHz, 128GB RAM), 离线处理所有数据大概需要三个小时。为了缩短成

像时间, 可考虑采用基于 GPU 的并行计算平台^[30]。此外, 有学者基于人工智能方法^[31]利用较少的图像数据实现接近 ULM 分辨率的图像重建, 这将有望进一步缩短 ULM 的成像时间^[32], 提高将来在临床上的适用性。

5 结论

通过超声定位显微成像技术观察和评估肿瘤的生长演进状态及磁热治疗效果。微血管图像中提取的特征与免疫组化分析的量化指标具有较高的相关性, 并且二者的变化趋势相符。此外, 肿瘤磁热消融实验结果表明, 通过超声图像观察到微血管数量显著减少, 与肿瘤坏死的区域一致。该方法有望成为肿瘤早期诊断及疗效评估的有力工具。

参 考 文 献

- 何琼, 罗建文. 超高速超声成像的研究进展. 中国医学影像技术, 2014; **30**(8): 1251-1255
- Lee S W, Choi H Y, Baek S Y, *et al.* Role of color and power doppler imaging in differentiating between malignant and benign solid breast masses. *J. Clin. Ultrasound.*, 2002; **30**(8): 459-464
- Yi H M, Lowerison M R, Song P F, *et al.* A review of clinical applications for super-resolution ultrasound localization microscopy. *Curr. Med. Sci.*, 2022; **42**(1): 1-16
- Prasanna P G, Stone H B, Wong R S, *et al.* Normal tissue protection for improving radiotherapy: Where are the gaps. *Transl. Cancer Res.*, 2012; **1**(1): 35
- Maloney E, Hwang J H. Emerging HIFU applications in cancer therapy. *Int. J. Hyperth.*, 2015; **31**(3): 302-309
- Yan S, Fu Y, Xu K. High-intensity focused ultrasound ablation monitoring using ultrafast doppler imaging: A preliminary study. IEEE International Ultrasonics Symposium, Montreal, Quebec, Canada, 2023
- 朱顺涛, 贺美娥, 杨广令, 等. 磁热治疗的最新研究进展. 上海师范大学学报:自然科学版, 2019; **48**(5): 536-549
- Christensen-Jeffries K, Couture O, Dayton P A, *et al.* Super-resolution ultrasound imaging. *Ultrasound. Med. Biol.*, 2020; **46**(4): 865-891
- Errico C, Pierre J, Pezet S, *et al.* Ultrafast ultrasound localization microscopy for deep super-resolution vascular imaging. *Nature*,

- 2015; **527**: 499–502
- 10 Huang C, Lowerison M R, Trzasko J D, *et al.* Short acquisition time super-resolution ultrasound microvessel imaging via microbubble separation. *Sci. Rep.*, 2020; **10**(1): 6007
- 11 Liu X, Zhou T, Lu M, *et al.* Deep learning for ultrasound localization microscopy. *IEEE Trans. Med. Imaging.*, 2020; **39**(10): 3064–3078
- 12 Tang S, Song P, Trzasko J D, *et al.* Kalman filter-based microbubble tracking for robust super-resolution ultrasound microvessel imaging. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control.*, 2020; **67**(9): 1738–1751
- 13 Jensen J A, Andersen S B, Hoyos C A V, *et al.* Tissue motion estimation and correction in super resolution imaging. IEEE International Ultrasonics Symposium, Glasgow, Scotland, UK, 2019
- 14 Harput S, Christensen-Jeffries K, Brown J, *et al.* Two-stage motion correction for super-resolution ultrasound imaging in human lower limb. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control.*, 2018; **65**(5): 803–814
- 15 Zhang W, Lowerison M R, Dong Z, *et al.* Super-resolution ultrasound localization microscopy on a rabbit liver VX2 tumor model: An initial feasibility study. *Ultrasound. Med. Biol.*, 2021; **47**(8): 2416–2429
- 16 Lowerison M R, Zhang W, Chen X, *et al.* Characterization of anti-angiogenic chemo-sensitization via longitudinal ultrasound localization microscopy in colorectal carcinoma tumor xenografts. *IEEE Trans. Med. Imaging.*, 2021; **69**(4): 1449–1460
- 17 Fanglue L, Shelton S E, David E, *et al.* 3-D ultrasound localization microscopy for identifying microvascular morphology features of tumor angiogenesis at a resolution beyond the diffraction limit of conventional ultrasound. *Theranostics.*, 2017; **7**(1): 196–204
- 18 苏晓, 王钺媛, 万明习. 超声微小血管成像杂波抑制技术综述. *复旦学报: 自然科学版.*, 2023; **62**(4): 428–439
- 19 程慧, 胡海曼, 雷炳松, 等. 奇异值分解滤波对超声造影超微血管成像图像质量的影响. *中国医学影像技术.*, 2023; **39**(1): 90–93
- 20 Demené C, Deffieux T, Pernot M, *et al.* Spatiotemporal clutter filtering of ultrafast ultrasound data highly increases Doppler and Ultrasound sensitivity. *IEEE Trans. Med. Imaging.*, 2015; **34**(11): 2271–2285
- 21 Parthasarathy R. Rapid, accurate particle tracking by calculation of radial symmetry centers. *Nat. Methods.*, 2012; **9**(7): 724–726
- 22 Kuhn H W. The Hungarian method for the assignment problem. *Naval Res. Logist.*, 1955; **2**(1): 83–97
- 23 Bolat F, Kayaselcuk F, Nursal T, *et al.* Microvessel density, VEGF expression, and tumor-associated macrophages in breast tumors: Correlations with prognostic parameters. *Vascular.*, 2006; **25**(3): 365–372
- 24 Guo X, Ta D, Xu K. Frame rate effects and their compensation on super-resolution microvessel imaging using ultrasound localization microscopy. *Ultrasonics.*, 2023; **132**: 107009
- 25 Zudaire E, Gambardella L, Kurcz C, *et al.* A computational tool for quantitative analysis of vascular networks. *PLoS. One.*, 2011; **6**(11): 27385
- 26 Provost J, Garofalakis A, Sourdon J, *et al.* Simultaneous positron emission tomography and ultrafast ultrasound for hybrid molecular, anatomical and functional imaging. *Nat. Biomed. Eng.*, 2018; **2**(2): 85–94
- 27 Bullitt E, Lin N U, Ewend M G, *et al.* Tumor therapeutic response and vessel tortuosity: Preliminary report in metastatic breast cancer. *Med. Image Comput. Comput. Assist. Interv.*, 2006; **9**(2): 561–568
- 28 Rabut C, Correia M, Finel V, *et al.* 4D functional ultrasound imaging of whole-brain activity in rodents. *Nat. Methods.*, 2019; **16**(10): 994–997
- 29 Demeulenaere O, Bertolo A, Pezet S, *et al.* In vivo whole brain microvascular imaging in mice using transcranial 3D Ultrasound Localization Microscopy. *eBioMedicine.*, 2022; **79**: 103995
- 30 陈胤燃, 何琼, 罗建文. 基于 GPU 并行计算的超声波束合成方法. *中国生物医学工程学报.*, 2016; **35**(6): 677–683
- 31 Chen X, Lowerison M R, Dong Z, *et al.* Deep learning-based microbubble localization for ultrasound localization microscopy. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control.*, 2022; **69**(4): 1312–1325
- 32 Luan S, Yu X, Lei S, *et al.* Deep learning for fast super-resolution ultrasound microvessel imaging. *Phys. Med. Biol.*, 2023; **68**(24): 37934040