

双光子荧光寿命成像在肿瘤诊断研究中的应用

李慧¹, 夏先园¹, 陈廷爱¹, 余佳¹, 李曦², 郑炜¹

¹中国科学院深圳先进技术研究院生物医学光学与分子影像研究室, 广东 深圳 518055;

²北京大学深圳医院消化内科, 广东 深圳 518036

摘要 双光子荧光寿命成像技术在对生物组织进行高分辨三维成像的同时能获得生物组织的生化特性信息, 实现结构和功能的精细定量表征, 为生物组织的非侵入、无标记、活体成像提供了一种强有力的工具。该技术在肿瘤检测方面具有广阔的临床应用前景, 已成为当前生物医学领域研究的热点之一。首先简要介绍了双光子荧光寿命的概念和常用检测方法; 其次, 结合课题组开展的胃癌和神经胶质瘤诊断等相关研究成果, 详细介绍了双光子荧光寿命成像技术在消化道肿瘤、脑肿瘤及皮肤癌等肿瘤检测方面的最新研究进展; 最后展望了该技术在未临床应用中的潜在优势和可能面临的挑战。

关键词 生物光学; 双光子显微成像; 荧光寿命成像; 肿瘤诊断; 自发荧光

中图分类号 O437

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201845.0207010

Applications of Two-Photon Excitation Fluorescence Lifetime Imaging in Tumor Diagnosis

Li Hui¹, Xia Xianyuan¹, Chen Tingai¹, Yu Jia¹, Li Xi², Zheng Wei¹

¹Research Laboratory for Biomedical Optics and Molecular Imaging, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen, Guangdong 518055, China;

²Department of Gastroenterology, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen, Guangdong 518036, China

Abstract Two-photon excitation fluorescence lifetime imaging is an ingenious technique which can provide both morphological and biochemical information of tissues in three-dimensional space with subcellular resolution. The structural and functional properties of tissue can be quantitatively characterized in detail. Therefore, this technique provides a powerful tool for the noninvasive, label-free, intravital imaging of biological tissues, and which is promising to be applied in clinical diagnosis of tumors. In recent years, this technology has been used to detect tumors, and which has already become one of the research foci in the field of biomedicine. In this review paper, firstly, the concept of the two-photon excitation fluorescence lifetime and common fluorescence lifetime detection methods are introduced simply; secondly, we summarize the recent progresses of using two-photon excitation fluorescence lifetime imaging to detect various tumors, including digestive tract tumors, brain tumors, skin tumors, and so on, and among them, our results on the detection of gastric cancers and glioma are elaborately depicted; Finally, the potential advantages and possible challenges of this technology in future clinical application are provided and discussed.

Key words biotechnology; two-photon excitation fluorescence microscopy; fluorescence lifetime imaging; tumor diagnosis; autofluorescence

OCIS codes 180.4315; 170.6920

收稿日期: 2017-08-29; 收到修改稿日期: 2017-09-17

基金项目: 国家自然科学基金(81471702, 81701744)、国家重点研发计划(2017YFC0110200)、中国博士后科学基金资助项目(2017M612763)、广东省自然科学基金博士启动项目(2017A030310308)、深圳市科技计划项目基础研究(JCYJ20150403091443326, YJ20150521144321005, JCYJ20150401145529037, JCYJ20160608214524052)、SIAT 优秀青年创新基金(2016020)

作者简介: 李慧(1987—), 女, 博士后, 主要从事双光子显微成像、荧光寿命和光谱成像技术及其应用方面的研究。

E-mail: hui.li@siat.ac.cn

导师简介: 郑炜(1980—), 男, 博士, 研究员, 主要从事生物医学光子学、荧光多参量显微成像技术及应用, 以及非线性光学显微技术及应用等方面的研究。E-mail: zhengwei@siat.ac.cn(通信联系人)

1 引 言

光学显微镜凭借其高分辨率、非接触、无损伤、快速成像的优点,成为生物医学研究的重要工具。光学显微成像技术的每一次进步都极大地推动了生命科学、基础医学及临床诊断学的发展。20世纪以来,光学显微成像领域取得了突飞猛进的发展,涌现出了众多新的技术和方法,包括共聚焦显微成像、双光子显微成像、光片照明显微成像、超分辨显微成像等等(对这些技术的详细介绍和对比参见文献[1-3])。在这些显微成像技术中,双光子显微成像是最具里程碑意义的技术之一,而荧光寿命检测技术则为双光子显微成像开辟了全新的探测功能。

双光子显微成像技术是由 Webb 教授^[4]于1990年最先实现的,该技术利用双光子激发的荧光信号进行三维显微成像。利用低散射的近红外光进行局域激发的特性使得这项技术具有低的光漂白和光毒性、超强的组织穿透能力、亚细胞水平的分辨率以及固有的层析能力等优势。此外,该技术还能够利用内源性光学标志物获得对比度,实现无标记成像^[5-7]。鉴于以上优势,双光子显微成像技术被认为是目前最适宜于活体光学显微成像的技术之一^[6],该技术逐步成为研究肿瘤以及老年痴呆症等疾病发生、发展和潜在治疗方法的有力工具^[5]。此外,双光子显微成像技术非侵入性和能够实现无标记成像的特点,以及在成像深度和分辨率方面的优势使其成为了最具应用潜力的临床研究工具之一。目前,该技术已经成功用于肿瘤、组织病变、控制药物释放、活体药物筛选等的临床研究中^[8]。

荧光寿命检测是指利用时间分辨技术来检测荧光强度衰减的动态过程。在高能量光的激发下,荧光物质会跃迁至不稳定的激发态,在其返回至稳定基态的过程中会辐射出荧光光子。所以,荧光寿命反映了荧光物质在激发态停留的平均时间^[9]。类似于荧光光谱,荧光寿命是荧光物质的另一项重要特性。荧光寿命探测突破了传统稳态荧光探测的限制,为荧光成像增加了一个独立维度的全新信息^[10-12]。由于荧光团从激发态到基态的跃迁过程极易受分子局部环境的影响,所以荧光寿命还能够灵敏地反映分子所处环境的 pH、温度、氧浓度、离子浓度、酶活性以及分子构型等^[11-14]。例如,自由态还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)的荧光寿命为几百皮秒,而蛋白绑定 NADH 则有几个纳秒的荧光寿命^[15]。另外,荧光寿命测量通常独立于荧光

物质的浓度和量子产率^[11-14]。因此,利用时间分辨荧光探测技术研究生物系统具有诸多独特优势:1) 荧光寿命特性为区分发射光谱重叠的荧光物质提供了一个额外的对比参数,使得光谱重叠但荧光衰减时间不同的生物分子能够得到有效分辨^[11,16];2) 荧光寿命测量对生物组织微环境各项参数的敏感性使其能够用于检测局部环境参数和研究蛋白之间的相互作用^[11,13];3) 由于组织中荧光物质的浓度通常是未知的、不断变化的,因而荧光寿命独立于荧光物质浓度和量子产率的特性使其相比于稳态荧光探测技术,能够实现更为准确的在体定量测量^[11,13]。基于以上优势,荧光寿命成像技术获得了研究人员的极大关注,该技术已被广泛应用于生物物理学和医学诊断研究中^[16]。

双光子显微成像技术与荧光寿命探测技术的结合开创了一个优势互补的共赢局面。一方面,双光子显微成像技术不仅能够提供荧光寿命探测所需的脉冲激发光源,而且得益于其固有的层析能力,该技术能够有效避免对厚组织进行荧光寿命测量时,不同深度信号之间的串扰^[13];另一方面,与荧光寿命探测技术的结合使得双光子显微成像技术能够提供多个维度的荧光信号探测模式,无论是功能还是应用范围都得到了拓展,进而为生物医学以及临床诊断提供了一种全新的研究手段^[12]。国际上许多领先的科研团队已在积极开展与双光子荧光寿命成像相关的仪器设备、数据分析技术,以及生物医学和临床应用等方面的研究,并取得了诸多突破^[12]。国内目前还处于起步阶段,仅有少数几个科研团队在从事相关研究。其中,深圳大学屈军乐教授团队长期致力于双光子荧光寿命成像技术及其在生物医学应用方面的研究,目前已经将该技术应用于肿瘤的机理和诊断方法研究以及分子诊断技术研究上^[17-20]。本课题组在这方面也有着深厚的积累,当前正在开展基于双光子荧光寿命的消化道良恶性疾病及脑肿瘤诊断方面的研究。本文将简要概述双光子荧光寿命的概念和常用检测方法,结合本课题组的最新研究成果,总结双光子荧光寿命成像应用于肿瘤检测方面的研究进展,最后展望该技术在未临床应用中可能面临的挑战与潜在优势。

2 双光子荧光寿命原理、检测方法和成像系统

2.1 双光子荧光寿命基本原理

双光子显微成像基于双光子激发实现。双光子

激发是一个非线性光学过程,即荧光分子同时(约0.5 fs之内)吸收两个光子,从基态跃迁至激发态,然后通过各种辐射或非辐射衰变路径返回至基态。其中一种衰变路径是自发辐射,分子通过这种方式发出一个光子,即产生双光子激发荧光^[5]。双光子荧光寿命就是指双光子激发荧光的寿命。从概念上讲,荧光寿命是荧光物质被激发后停留在激发态的平均时间^[11],物理上定义为荧光强度衰减到其最大强度的1/e所需的时间^[12,14,21]。具体来讲,激发停止后,分子的荧光强度会随时间衰减。对于特定的荧光分子而言,这一过程可以用一个单指数函数来描述:

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau}, \quad (1)$$

式中 τ 为荧光寿命; t 为时间; I_0 为最大荧光强度,即 $t=0$ 时的荧光强度。

其中,

$$1/\tau = \sum k_i, \quad (2)$$

k_i 为每种衰变路径的比率,至少包含自发辐射比率 k_f ^[12,14,21]。

生物样本包含了大量的内源性荧光分子,同时生物医学研究常常需要引入外源性荧光标记。因此,生物组织中细胞的荧光衰减通常近似于一个由若干种荧光分子的单指数衰减函数线性叠加得到的多指数函数 $F(t)$,其表达式为

$$F(t) = \sum_i a_i e^{-t/\tau_i}, \quad (3)$$

式中 τ_i 为第 i 种荧光分子的荧光寿命, a_i 为权重因子^[21]。

2.2 双光子荧光寿命主要检测方法

目前,国际上已经发展了一系列能够与双光子显微成像结合起来的荧光寿命检测技术。从信号处理的角度出发,这些技术大致可以分为频域检测技术和时域检测技术两类^[11,13,21]。

2.2.1 频域检测技术

频域检测技术采用经过调制的激发光激发样品,并通过测量在一个或多个调制频率下荧光信号相对于调制激发光的相移和调制度来计算荧光寿命。样品产生的荧光信号与经过调制的激发光具有相同的频率,但相位会发生延迟,调制度降低。相位和调制度的改变均依赖于荧光寿命 τ 和调制频率 ω :

$$\tan \Delta\varphi = \omega\tau, \quad (4)$$

$$\frac{M_f}{M_{ex}} = \frac{A_f/D_f}{A_{ex}/D_{ex}} = \frac{1}{\sqrt{1 + \omega^2 \tau^2}}, \quad (5)$$

式中 $\Delta\varphi$ 为荧光相对于激发光的相移, M_{ex} 和 M_f 分别为激发光和荧光的调制度, A_{ex} 和 A_f 分别为激发

光信号和荧光信号的振幅, D_{ex} 和 D_f 分别为激发光信号和荧光信号的平均值。因此,通过测量相移或调制度都能够计算出荧光寿命(如图1(a)所示)^[11,13,16,21]。在荧光分子种类不唯一的情况下,为了得到不同组分的荧光寿命,必须测量多个调制频率下的相移和调制度。虽然相移和调制度都可以用来确定荧光寿命,但在实践中,采用相移测量荧光寿命能够获得更加准确的结果,因而其应用更为普遍。在双光子显微成像中,激发光源为高重复频率(78~90 MHz)的飞秒脉冲激光。该激光信号包含重复频率所有级次的谐波。采用频域技术检测双光子荧光寿命,即测量双光子荧光信号在激发光多次谐波下的相移和调制度^[13]。

值得注意的是,频域技术能够适应较宽的荧光强度变化范围,耐受极高的荧光强度,但是在荧光较弱的情况下,其探测效率会急剧下降。这涉及到复杂的电子设计原理及相关应用,具体可参见文献^[13]。

2.2.2 时域检测技术

时域技术直接记录荧光分子被一个极短的脉冲光激发之后,其荧光强度随时间的变化过程,即荧光衰减曲线,可通过对其进行单指数或多指数拟合计算出荧光寿命。从电子学角度来讲,具体的记录方法又可以分为模拟技术和数字(光子计数)技术两类^[13]。模拟技术将探测信号视为一个连续的波形,通过控制时间门在信号上顺序偏移并记录时间门内信号的幅度来获取荧光衰减曲线^[13,22]。光子计数技术将探测信号视为单个光子脉冲的随机序列。探测器输出一个脉冲就表示探测到了一个光子。累计光子脉冲在一系列序列时间通道内的个数,即通过脉冲信号的密度而不是幅度来对输入探测器的荧光强度进行时域记录^[13,22]。

相对于模拟技术而言,光子计数技术具有若干优势。1)探测器的随机放大过程会造成单光子脉冲的幅度出现显著抖动,即增益噪声,同时测量系统中还存在电子噪声。在模拟记录中,增益噪声和电子噪声都会叠加到测量结果上。光子计数技术仅考虑光子脉冲的个数,增益噪声不会对其产生干扰;而电子噪声的幅度又小于光子脉冲的幅度,也不影响光子计数。因此,相对于模拟技术而言,光子计数技术具有显著提升的信噪比。2)光子计数技术能够精确地测量光子脉冲到达的时间,因而其测量带宽仅受限于探测器输出脉冲的渡越时间涨落而非光子脉冲的宽度。探测器单光子脉冲的渡越时间涨落通常比其脉冲宽度小一个数量级。因此,对于相同的探测

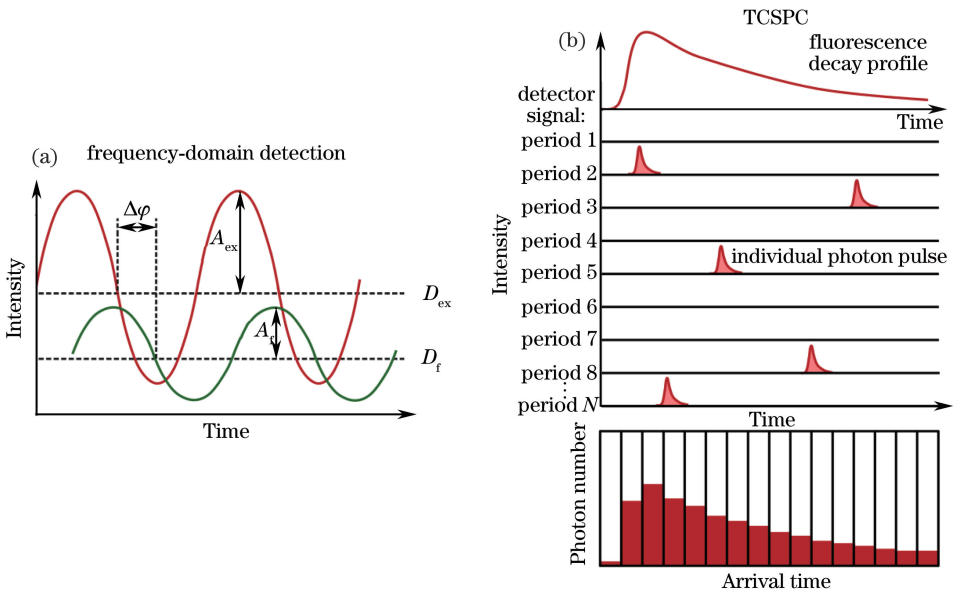


图 1 常用荧光寿命检测方法的基本原理^[11,13-14,16,22]。(a)频域检测技术;(b)时间相关单光子计数技术

Fig. 1 Principle of common fluorescence lifetime detection methods^[11,13-14,16,22]. (a) Frequency-domain detection technique; (b) time-correlated single photon counting (TCSPC) technique

器而言,光子计数技术具有比模拟技术更高的时间分辨率和信噪比,这些特点使得光子计数技术在探测寿命较短且信号微弱的荧光方面独具优势^[13,22]。

时间相关单光子计数(TCSPC)是光子计数技术的最典型代表。TCSPC 技术适用于探测低强度、高重复频率的荧光信号,如生物组织的双光子激发荧光。凭借记录单个光子脉冲在信号周期内出现的时间,并在每个时间点累计有光子脉冲出现的信号周期的个数,就可以建立起光子数随时间分布的直方图,从而得到荧光衰减曲线,进而可以计算荧光寿命(图 1(b))。TCSPC 技术能够以极高的时间分辨率和接近理想的效率记录荧光信号,是目前唯一能够可靠地分辨组织自发荧光寿命组分的荧光寿命检测技术。随着电子技术的迅猛发展,TCSPC 技术取得了突破性进展,进入到了高级 TCSPC 阶段。高级 TCSPC 器件将所有必需的模块集成在一个电路板上,采用多维记录方法对荧光信号进行记录。该技术不仅能够记录信号周期内光子密度随时间的变化,还能够同步记录光子密度随波长、空间坐标、距离成像开始时间等其他参数的变化。高级 TCSPC 技术具有的高时间分辨率、高精度、高灵敏度、高效率,以及多维探测的优势使其在生物医学领域得到了广泛应用^[11,13,21-22]。

2.3 双光子荧光寿命典型成像系统

典型的双光子荧光寿命成像系统^[23]如图 2 所示。当分别采用时域和频域技术进行荧光寿命探测

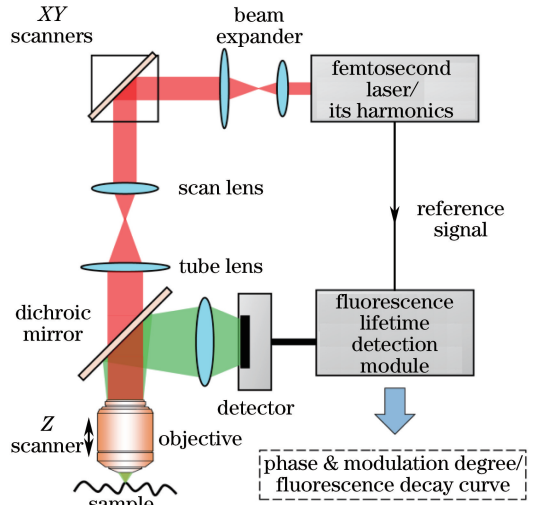


图 2 典型的双光子荧光寿命成像系统示意图
Fig. 2 Schematic of typical two-photon excitation fluorescence lifetime imaging system

时,系统分别采用飞秒激光和飞秒激光的多次谐波作为样品的激发光源^[13]。在系统中,激发光通过一对扫描振镜扫描样本平面实现成像。具体来讲,经过扫描振镜的激发光在通过二向色镜之后,由物镜聚焦到样本上。激发出的双光子激发荧光信号被同一物镜收集;接着,荧光信号经上述二向色镜反射之后与激发光分离,随后进入探测器;最后,探测器将探测到的信号输入荧光寿命探测模块进行处理。就频域探测而言,荧光寿命探测模块测量荧光信号相对于激发光信号的相位和调制度;而在时域探测中,

该模块记录荧光信号的衰减曲线^[13]。对以上测量结果进行处理和分析后,系统将输出样品具体的荧光寿命信息和荧光寿命图像等。

3 双光子荧光寿命成像在肿瘤检测方面的应用

双光子荧光寿命成像的一个关键优势是能够基于自发荧光反映细胞和组织的代谢状态^[22],这为该技术用于肿瘤诊断提供了基础。具体来讲,细胞的能量主要来自糖代谢。正常细胞在有氧条件下通过氧化磷酸化进行代谢,而在缺氧条件下采用糖酵解方式进行代谢。与正常细胞不同,肿瘤细胞即使在供氧充足的条件下也多选择糖酵解途径作为主要的产能方式,这种现象被称为“Warburg 效应”^[24]。NADH 和氧化型腺嘌呤黄素二核苷酸(FAD)作为细胞内自发荧光的主要来源^[7],在细胞代谢过程中分别扮演主要电子供体和受体的重要角色^[25]。众所周知,自由和蛋白绑定 NADH 的比率以及 NADH 和 FAD 的比率能够反映细胞的代谢状态^[26-27]。正常细胞和肿瘤细胞不同的代谢方式导致两者所含 NADH、FAD 等内源性光学标志物的浓度和状态存在差异^[28-29],而蛋白绑定、与细胞膜或脂质颗粒关联等状态的改变可能会导致这些物质在活体内的荧光量子产率^[7]和荧光衰减时间发生显著变化^[15,30]。另外,细胞色素氧化磷酸化受血红素管控,肿瘤细胞优先通过糖酵解途径产能使其对血红素的需求量较正常细胞明显降低,所以肿瘤细胞能够选择性地积累血红素的前体(PpIX)。PpIX 也是一种内源性光学标志物,能够产生红色荧光。但一般情况下,肿瘤组织自然积累的 PpIX 量较少,荧光信号较弱。成像中通常需要外源引入 PpIX 的前体——氨基酮戊酸(ALA),使 PpIX 在肿瘤组织中有足够的积累,才能使正常组织和肿瘤组织具有较好的对比度^[31]。因此,依赖 NADH、FAD、PpIX 等内源性光学标志物对组织进行双光子荧光寿命成像能够揭示正常细胞和肿瘤细胞的代谢差异,在实现细胞水平的肿瘤精确诊断上具有一定潜力,临床应用意义重大。目前,NADH 和 FAD 的双光子荧光寿命成像已经被用于癌前病变以及癌症的检测^[32-35],而癌细胞水平以及肿瘤动物模型水平的 PpIX 双光子荧光寿命成像研究也在积极开展^[36-37]。

基于上述内源性光学标志物的双光子荧光寿命成像研究所覆盖的肿瘤检测领域涉及消化道肿瘤、脑肿瘤以及皮肤癌等多种肿瘤。在消化道肿瘤和脑

肿瘤检测方面,虽然目前的研究还十分有限,但具有巨大的临床转化和应用前景。皮肤癌变,尤其是黑色素瘤、基底细胞癌等已成为当前双光子荧光寿命成像应用的主要检测领域之一,具有相对较多的临床试验数据支持。

3.1 消化道肿瘤

消化道是消化系统的重要组成部分,起自口腔,终于肛门,包括口腔、食管、胃、小肠(十二指肠、空肠、回肠)和大肠(盲肠、结肠、直肠、肛管)等部分^[38]。在我国发病率和死亡率排名前五及全球发病率和死亡率排名前十的癌症中,消化道肿瘤就占了三个^[39-40]。因此,消化道肿瘤的早期诊断和治疗意义重大。

目前,已有研究将双光子荧光寿命成像技术应用用于口腔癌、结肠直肠癌等消化道恶性肿瘤的检测,并取得了较好的效果,如图 3 所示。在口腔癌检测方面,Rück 等^[41]基于自由和蛋白绑定的 NADH 从代谢的角度研究了不同类型鳞状细胞癌细胞系和正常口腔黏膜细胞的差异。结果表明,与正常细胞相比,癌变细胞的平均荧光寿命更长,NADH 总量减少,自由和蛋白绑定 NADH 的比率下降。Teh^[23]和 Skala 等^[33,42]基于 NADH 和 FAD 同样从细胞代谢的角度出发,通过二甲基苯并蒽(DMBA)诱导的仓鼠颊囊黏膜癌模型证实了双光子荧光寿命成像技术具有分辨口腔癌癌前病变以及早期癌症的能力(如图 3(a~c)所示,右下角数字表示距离组织表面的深度,单位为 μm)。除了基于 NADH 和 FAD 这两种与细胞代谢紧密相关的内源性荧光物质以外,利用其他内源性荧光标志物的研究也在积极开展。例如,Shen 等^[43]基于内源性胆红素进行了细胞水平的口腔癌检测研究,发现口腔癌细胞($>330\text{ ps}$)比正常口腔胶质细胞(250 ps)具有更长的荧光寿命。Teh 等^[23]基于角蛋白、胶原蛋白、色氨酸等开展了动物模型水平的口腔癌检测研究,提炼出了包含组织结构(荧光强度和光谱的三维空间分布)和生化特性信息(与荧光寿命相关的参数)的十多个癌前病变及早期癌症诊断指标。在结肠直肠癌的检测方面,Lakner 等^[44]基于人克隆结肠腺癌细胞(Caco-2 细胞)在体外构建了结肠直肠癌的三维腔体模型,通过对 NADH 信号成像,阐述了双光子荧光寿命成像能很好地表征组织代谢状态的变化。这再次证实了该技术应用于肿瘤检测的潜力。Adur 等^[45]基于 NADH 和 FAD 对正常和癌变的人体结肠隐窝进行双光子荧光寿命成像,结果表明,与正

常结肠黏膜相比,结肠腺癌细胞的平均荧光寿命更长(如图 3(d~g)所示,方框标记区域所示为荧光寿命编码图像,其右侧所示为相应的荧光寿命概率分布图),细胞外基质胶原纤维的含量和排布角度显著改变。以上研究表明,正常组织、癌变前病变组织以及癌变组织在双光子荧光强度和光谱

三维空间分布表征的形态结构方面,以及双光子荧光寿命相关参数表征的内在生化特性方面存在差异,利用该技术有可能实现口腔癌、结肠癌和直肠癌等消化道肿瘤的诊断。然而,将该技术应用用于食管癌和小肠癌检测的研究目前还未见报道,应用于胃癌相关的研究也十分罕见。

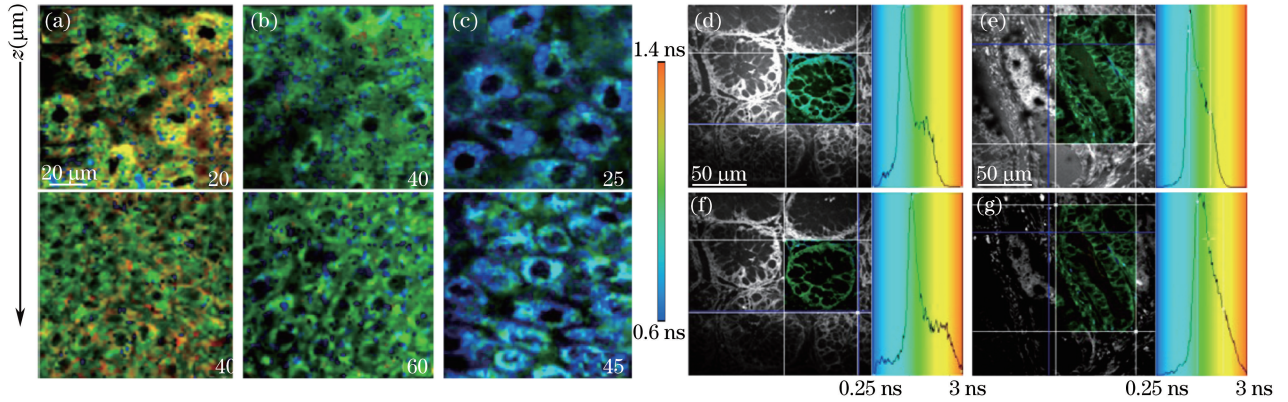


图 3 基于仓鼠颊囊口腔癌模型活体获取的诊断为(a)正常、(b)低级别癌前病变和

(c)高级别癌前病变组织的 NADH 荧光寿命编码图像^[33];基于 NADH 信号获取的(d)正常的和(e)癌变的人结肠隐窝组织的离体成像结果;基于 FAD 信号获取的(f)正常的和(g)癌变的人结肠隐窝组织的离体成像结果^[45]

Fig. 3 NADH lifetime-coded images of tissues diagnosed as (a) normal, (b) low-grade precancer, and (c) high-grade precancer acquired from the hamster cheek pouch model of oral cancer *in vivo*^[33];

ex vivo imaging of healthy (d) and cancerous (e) human colonic crypts based on NADH; *ex vivo* imaging of (f) healthy and (g) cancerous human colonic crypts based on FAD^[45]

Li 等^[46]首次基于时间与光谱分辨的双光子显微成像系统研究了双光子成像技术应用于胃癌诊断的可行性。该系统采用 TCSPC 模块 (SPC-150, Becker & Hickl GmbH) 获取荧光寿命信息,同时结合分光模块和 16 通道高灵敏度光电倍增管 (PMT) (PML-16-C, Becker & Hickl GmbH) 实现荧光光谱探测。系统横向、纵向的分辨率分别为 280 nm 和 1.5 μm,时间分辨率为皮秒量级,光谱分辨率和光谱探测宽度分别为 12.5 nm 和 200 nm。通过 750 nm 波长的激发,重点基于内源性 NADH 信号和胶原纤维产生的二次谐波信号对正常和癌变的新鲜人体胃黏膜组织进行了成像研究,结果如图 4 所示。在图 4 中:黄色、品红色和大红色箭头分别指示黏膜上皮细胞、癌变的肠细胞和癌变的杯状细胞;“*”和“△”分别指示间质组织和胃小凹。实验发现,依据双光子荧光寿命和光谱信息能够清楚地分辨黏膜上皮、间质组织、胃小凹等黏膜表面结构组分,如图 4(a)、(d)、(g)所示。基于对以上结构组分的识别,正常和癌变组织表现出截然不同的三维结构特征。在正常组织中,分布于黏膜上皮细胞细胞质顶部的黏液分泌颗粒没有荧光信号,依据其顶部

的空泡状结构,单个黏膜上皮细胞清晰可辨。胃小凹之间的间质组织较窄,含极少量的胶原纤维和浆细胞,甚至在浅层不可见。胃小凹在浅层呈现分枝状的开口,在底部呈卵圆形,如图 4(a)、(d)、(g)所示。肠型腺癌组织的上皮呈现出与肠上皮极为相似的结构,可见癌变的空泡状杯状细胞和肠细胞。肠细胞的细胞质表现出较强的荧光信号,而其底部的细胞核信号微弱。间质组织明显变宽,其中可见胶原纤维和大量炎性细胞。胶原纤维在荧光光谱图中呈现蓝紫色,炎性细胞在荧光寿命和荧光光谱图中分别呈现橘黄色和黄色。胃小凹变得模糊不清,如图 4(b)、(e)、(h)所示。神经内分泌癌组织完全失去了规则的黏膜表面结构,仅可见密集排布且难以分辨的肿瘤细胞聚集成团块状,如图 4(c)、(f)、(i)所示。整体而言,与正常组织相比,癌变组织的荧光寿命明显变短,荧光光谱发生红移,神经内分泌癌组织尤为明显(图 4)。这与癌变导致的细胞代谢状态的改变紧密相关。以上结果表明,仅仅依赖内源性荧光物质,时间和光谱分辨的双光子显微成像技术能够揭示新鲜胃黏膜组织亚细胞水平的三维形态结构和生化特性,因而在诊断各种类型的胃癌方面具

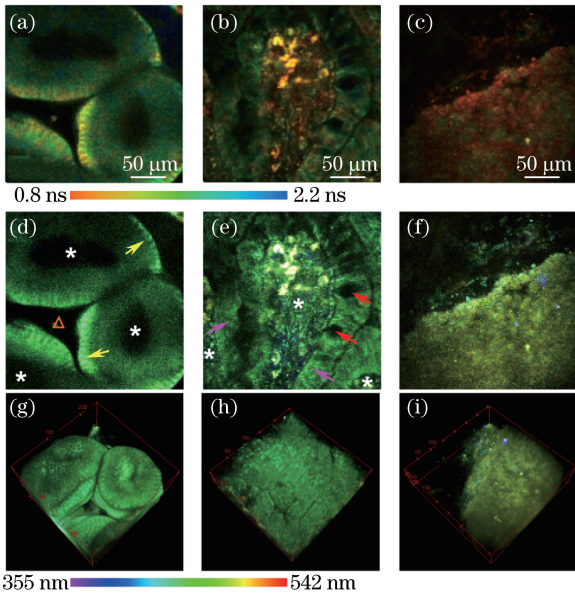


图 4 正常和癌变人体胃黏膜组织的(a~c)荧光寿命编码图像和(d~i)荧光光谱编码图像。(a)、(d)、(g)正常组织；(b)、(e)、(h)肠型腺癌；(c)、(f)、(i)神经内分泌癌
Fig. 4 (a-c) Fluorescence lifetime-coded images and (d-i) fluorescence spectra-coded images of normal and cancerous human gastric mucosa. (a), (d), (g) normal tissue; (b), (e), (h) intestinal-type adenocarcinoma; (c), (f), (i) neuroendocrine carcinoma

有巨大潜力。

3.2 脑肿瘤

脑肿瘤是我国十大常见癌症之一^[39],大多呈浸润性生长,无明显边界,导致手术难以彻底切除,且容易伤及正常脑功能^[47]。检测脑肿瘤,实现其边界的精准识别,从而在彻底切除肿瘤组织的同时,最大程度地保留脑功能区和神经传导束,能够有效降低复发率,显著提高预后^[48]。

目前,国际上已经涌现出若干基于双光子荧光寿命成像技术检测脑肿瘤的探索性研究。自 2006 年起,Kantelhardt 等^[32,34,37,49]从细胞、动物模型、人离体组织到活体临床试验,开展了一系列针对神经胶质瘤边界识别的双光子荧光寿命成像研究(图 5)。首先,他们基于内源性荧光标志物,通过培养的神神经胶质瘤细胞、正常小鼠脑组织切片、小鼠原位神经胶质瘤组织以及不同类型的人体神经胶质瘤样本研究了肿瘤细胞、正常脑组织、实体瘤以及肿瘤边界的结构和光化学特征。结果显示,内源性荧光标志物的双光子荧光寿命成像能够提供肿瘤、肿瘤入侵区域以及邻近正常脑组织细胞水平的高分辨显微结构,并依赖荧光寿命区分肿瘤组织和正常脑组织,如

图 5(a~c)所示^[32,34]。进一步为了实现更具特异性的脑肿瘤识别,Kantelhardt 等^[37]在研究中引入了 5-ALA 诱导的 PpIX。与正常组织相比,肿瘤细胞能够选择性地积累 PpIX^[31],因而具有明显增强的 PpIX 荧光。通过对小鼠原位神经胶质瘤组织的离体成像研究,他们发现双光子显微成像能够实现肿瘤细胞和邻近正常脑实质亚细胞水平的区分,并且与正常组织相比,肿瘤组织的双光子荧光寿命明显更长。这表明仅仅依赖荧光寿命这一个定量参数就能够定义和显示脑肿瘤边界^[37]。2016 年,Kantelhardt 等^[49]开始了相关的活体临床试验。他们采用 Jenlab GmbH 公司研发的双光子荧光寿命成像系统——MPTflexTM,基于内源性荧光物质对胶质母细胞瘤患者进行了术中成像,这是目前首次将双光子荧光寿命成像技术应用于术中脑肿瘤成像的研究。他们在活体中观察到了蛛网膜和实体瘤组织,并发现两者的显微结构和荧光寿命存在差异,如图 5(d~(g)所示。此外,Zanello 等^[50]同样基于双光子自发荧光信号,对世界卫生组织分级为 I 级和 II 级的人体脑膜瘤样本进行了成像研究。他们的分析结果显示,所探测到的自发荧光包含 NADH、FAD、脂褐素、卟啉,以及氯信号,基于检测这些内源性荧光物质的双光子显微成像能够提供与临床诊断“金标准”——组织病理学成像非常近似的组织结构。另外,从 I 级到 II 级,自发荧光强度明显上升,荧光寿命也发生了显著变化。以上研究表明,双光子荧光寿命成像提供了一种高分辨率且能够同时输出结构和光化学信息的非侵入式光学组织分析技术,依赖该技术能够实现正常脑组织和脑肿瘤组织的区分。该技术的进一步发展将有可能为术中脑肿瘤切除边界的识别和残余肿瘤组织的检测提供强有力的工具。

然而,代谢状态是机体的生命特征,Kantelhardt^[32,34,37,49]以及 Zanello 等^[50]从培养的细胞和离体组织中获得的结论无法直接推演到活体状态下;而 Kantelhardt 等^[49]的活体研究一方面缺乏典型正常脑组织结构和脑肿瘤边界的成像结果,另一方面 MPTflexTM系统的时间分辨率(200 ps)^[49]与脑肿瘤和正常脑组织双光子自发荧光的寿命差异(200~400 ps)^[32,34]相当,无法满足脑肿瘤边界识别研究的需求。总而言之,目前对利用双光子荧光寿命成像技术实现脑肿瘤检测的探索缺乏正常和癌变脑组织的活体长时程对比研究和系统性量化分析,致使肿瘤区分特性尚不明确,阻碍了这

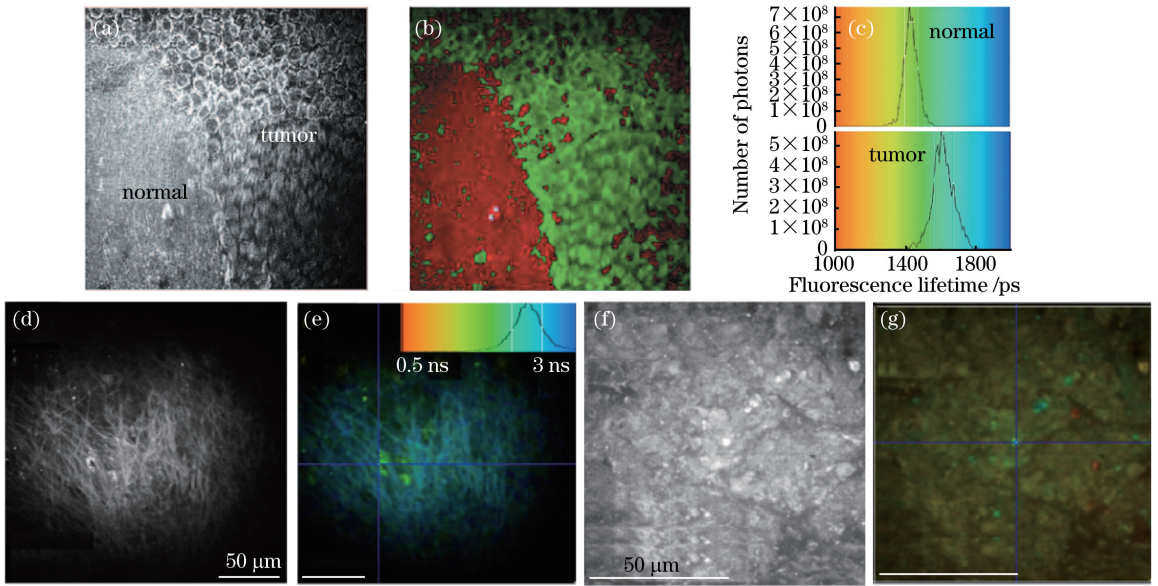


图 5 (a~c)小鼠神经胶质瘤边界离体成像和(d~g)人胶质母细胞瘤术中成像。(a)荧光强度图;(b)荧光寿命双色编码图;(c)正常区域和肿瘤区域荧光寿命概率分布曲线^[34];(d)蛛网膜荧光强度图;(e)蛛网膜荧光寿命编码图;(f)胶质母细胞瘤的荧光强度图;(g)胶质母细胞瘤的荧光寿命编码图

Fig. 5 (a-c) *Ex vivo* imaging of the tumor-to-brain interface of mouse glioma and (d-g) intraoperative imaging of a human glioblastoma. (a) Fluorescence intensity image; (b) two color-coded fluorescence lifetime image; (c) Fluorescence lifetime probability distribution histograms; (d) fluorescence intensity image of arachnoid; (e) fluorescence lifetime-coded image of arachnoid; (f) fluorescence intensity image of solid tumor; (g) fluorescence lifetime-coded image of solid tumor

项技术进一步向临床应用方向发展。

本课题组利用自主研发的时间与光谱分辨的双光子显微成像系统开展了脑肿瘤诊断和边界识别相关的离体、活体研究。该系统皮秒量级的时间分辨率完全能够满足脑肿瘤边界识别研究的需求。基于 NADH 这种内源性荧光分子,首先分别研究了新鲜切除的小鼠离体正常脑组织和皮下 U87 神经胶质瘤组织的光学特征。结果表明,两者在由 NADH 信号强度分布所反映的形态结构方面存在显著差异。正常脑组织表现为单一形态中散布着大小不一的孔洞状结构,而脑肿瘤组织则由密集排布的肿瘤细胞组成,如图 6(a)、(d)所示。另一方面,通过分析荧光寿命和荧光光谱发现,与脑肿瘤组织相比,正常脑组织的荧光寿命偏短,而荧光光谱则发生了红移,如图 6(b)、(c)、(e)、(f)所示。这些信息对于脑肿瘤的诊断和边界识别具有很好的辅助作用。进一步地,基于小鼠原位 U87 神经胶质瘤模型对肿瘤及其周边正常脑组织进行了活体研究,如图 6(g)~(k)所示。活体中获得的形态学特征(如图 6(g)~(i)所示)与离体情况下的基本一致,但可见肿瘤周边正常脑组织中有大量血管分布,如图 6(g)中的无

信号区域。在荧光寿命和荧光光谱方面,相对于肿瘤周边正常的脑组织,肿瘤边界区域和纯粹的肿瘤区域具有略长的荧光寿命(如图 6(j)所示),而荧光光谱从正常到肿瘤边界区域,再到纯粹的肿瘤区域逐渐蓝移(如图 6(k)所示)。这与离体情况下获得的结论也基本一致。以上工作在活体中证实了依赖内源性双光子荧光寿命和光谱信息实现脑肿瘤边界识别的可行性,为光谱分辨的双光子荧光寿命成像技术应用于未来临床中脑肿瘤的诊断和术中边界识别奠定了基础。

3.3 其他肿瘤

相对于消化道、脑等组织器官,皮肤的易到达性使得利用双光子荧光寿命成像技术进行皮肤相关疾病的诊断更容易实现临床转化。因此,皮肤癌的诊断也成为了该技术目前应用最为广泛的肿瘤检测领域。皮肤癌主要包括三种类型:黑色素瘤、基底细胞癌和鳞状细胞癌。其中,黑色素瘤是所有皮肤癌类型中侵略性最强、致死率最高的癌症^[51]。在过去的几十年中,黑色素瘤的发病率在白种人中急剧上升^[51],而且每 54 min 就有一人因黑色素瘤死亡^[52]。基底细胞癌是最为常见的皮肤癌^[53]。这种病变会

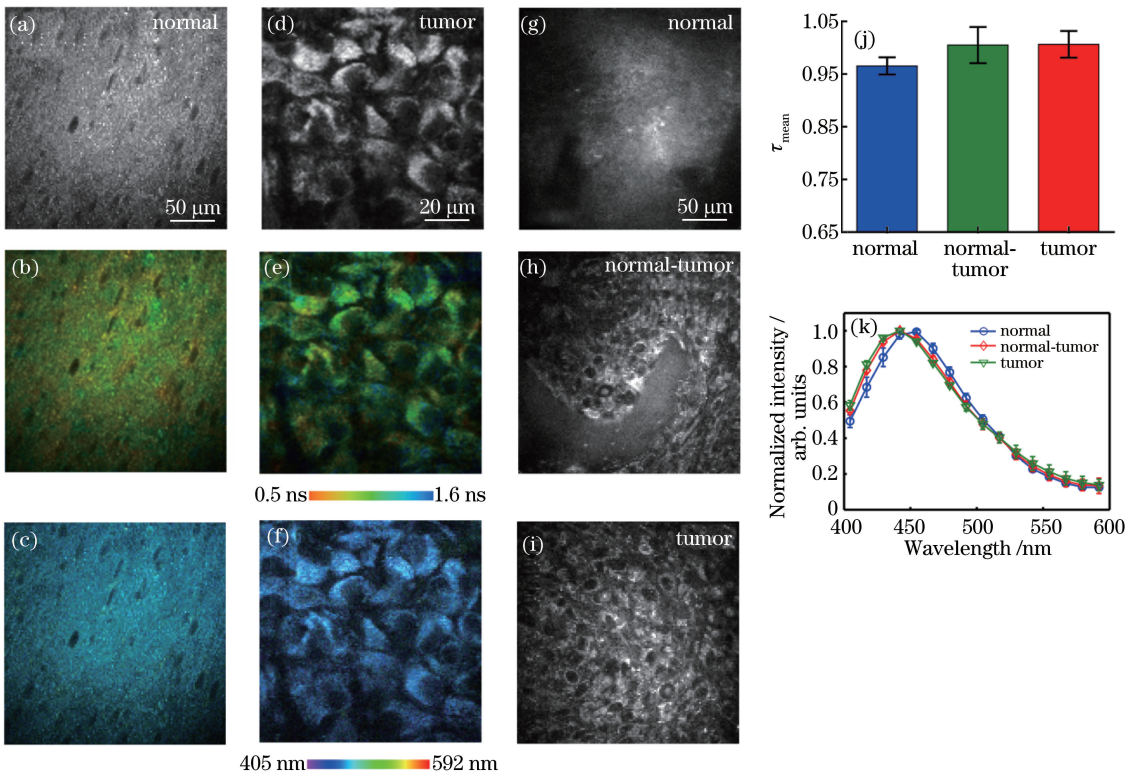


图 6 (a~c)小鼠正常脑组织、(d~f)小鼠神经胶质瘤皮下肿瘤组织的离体成像结果以及(g~k)小鼠原位神经胶质瘤与其周边正常脑组织的活体成像及分析结果。(a)(d)荧光强度图;(b)(e)荧光寿命编码图;(c)(f)荧光光谱编码图;(g)肿瘤周边正常脑组织的荧光强度图;(h)肿瘤边界的荧光强度图;(i)肿瘤的荧光强度图;(j) NADH 荧光寿命;(k)荧光光谱

Fig. 6 *Ex vivo* imaging of(a-c) normal brain tissue and (d-f) subcutaneous glioma tissue and (g-k) *in vivo* imaging of orthotopic glioma and glioma-adjacent brain. (a)(d) Fluorescence intensity images; (b)(e) fluorescence lifetime-coded images; (c)(f) fluorescence spectra-coded images; (g) fluorescence intensity image of tumor-adjacent brain tissue; (h) fluorescence intensity image of tumor-to-brain interface; (i) fluorescence intensity image of tumor; (j) NADH fluorescence lifetime; (k) fluorescence spectra

造成局部组织功能的破坏和皮肤形态的畸变,但极少导致死亡^[51]。目前,利用双光子荧光寿命成像技术诊断皮肤癌的相关研究主要集中在黑色素瘤和基底细胞癌这两个方面(如图 7 所示)^[54-55]。

就黑色素瘤而言,从细胞水平、动物模型水平,到人离体组织乃至在体临床试验水平的研究都有团队在积极开展。表皮细胞主要包含角质细胞和黑色素细胞^[56]。Dancik 等^[57]对联合培养的人体黑色素瘤细胞和正常胶质细胞进行了双光子荧光寿命成像研究。结果表明,黑色素瘤细胞的自发荧光主要来自黑色素,荧光寿命相对较短,而角质细胞的自发荧光主要来自 FAD,荧光寿命相对较长。两者的差异有助于从正常的皮肤组织环境中检测出癌变的黑色素细胞。Pastore 等^[54]利用黑色素瘤小鼠模型,基于 NADH 信号对小鼠正常皮肤组织和不同发展阶段的黑色素瘤组织的代谢状态进行了对比研究。他们发现,随着黑色素瘤的发展,自由和蛋白绑定

NADH 的比率显著上升,同时两者的平均荧光寿命逐渐变短,如图 7(a)~(d)所示。这项研究表明,利用双光子荧光寿命成像检测 NADH 表征的代谢状态,能够快速、灵敏地反映黑色素瘤的发展阶段,因而有潜力成为黑色素瘤诊断和辅助分级的有力工具。Cicchi 等^[58]以及 Dimitrow 等^[56]对比了离体条件下,人体黑色素瘤和黑色素细胞痣的双光子荧光寿命。通过对荧光衰减曲线的双指数拟合分析,Cicchi 等^[58]发现,两者的长荧光寿命组分具有相似的寿命概率分布,而短荧光寿命组分的寿命概率分布差异显著。通过选择性激发黑色素信号,Dimitrow 等^[56]发现,相对于角质细胞,黑色素细胞的荧光寿命明显更短。由于黑色素瘤中黑色素细胞与角质细胞的比率明显高于黑色素细胞痣,因而具有更短的荧光寿命。这表明双光子荧光寿命成像能够从组成上区分良性和恶性的黑色素细胞相关皮肤病变。进一步地,Riemann 等^[59]进行了这方面的

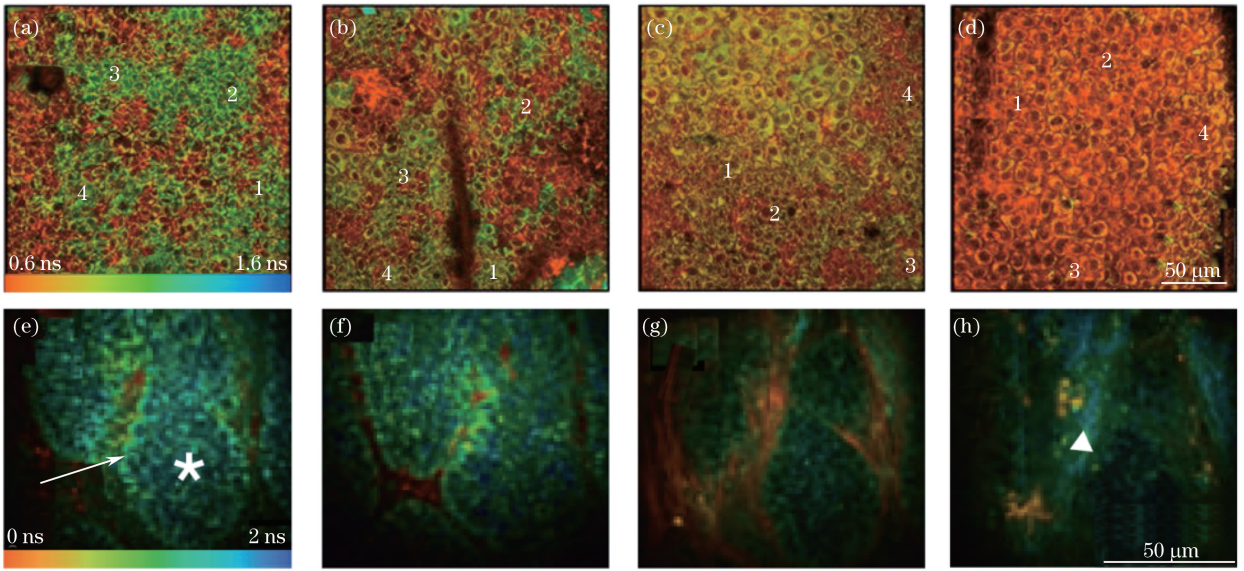


图 7 (a~d)处于不同发展阶段的小鼠黑色素瘤组织的荧光寿命编码图像以及 (e~h)人离体基底细胞癌样本不同深度的荧光寿命编码图像(间隔深度为 $30\ \mu\text{m}$)^[55]。(a)正常组织; (b) $<0.5\ \text{mm}$ 的肿瘤(约 12 d);(c) 1.5 mm 肿瘤(约 20 d);(d) 2.0~2.5 mm 肿瘤(约 22 d)^[54]

Fig. 7 (a-d) Fluorescence lifetime-coded images of freshly excised mouse ear skin for different stages of melanoma development and (e-h) fluorescence lifetime-coded images of excised human sample of basal cell carcinoma with different depth (step size of $30\ \mu\text{m}$)^[55]. (a) Normal tissue; (b) $<0.5\ \text{mm}$ lesion (about 12 days); (c) 1.5 mm lesion (about 20 days); (d) 2.0-2.5 mm lesion (about 22 days)^[54]

在体临床试验研究,研究发现,正常痣、还未发生显著形态学改变的黑色素瘤以及典型的黑色素瘤,在蛋白绑定 NADH 的荧光寿命概率分布方面具有显著差异。这说明双光子荧光寿命成像能够揭示正常皮肤组织和黑色素瘤组织的特征差异,甚至能够在可见的形态学改变发生之前检测出黑色素瘤组织。

对基底细胞癌的检测目前主要集中在人离体组织水平的研究。Patalay^[60-61]、Cicchi^[58,62]以及 Fan 等^[18-19]通过对内源性荧光物质的双光子荧光寿命成像发现,相对于正常皮肤组织,基底细胞癌组织具有更长的荧光寿命。同时, Cicchi^[62]和 Fan^[18]等的研究表明,双光子自发荧光图像所提供的亚细胞水平的组织结构特征展现出与传统组织学分析结果具有很好的相关性。基于双光子自发荧光图像,他们发现,与正常皮肤组织相比,基底细胞癌组织具有显著不同的形态特征。进一步地, Patalay 等^[60]从双光子荧光寿命图像中提取出一些能够有效区分基底细胞癌和正常皮肤组织的特征,灵敏度和特异性分别可以达到 79%和 93%。Seidenari 等^[55]也基于双光子荧光寿命成像提取出若干能够区分基底细胞癌[如图 7(e)~(h)所示,星号、箭头和三角分别指示肿瘤细胞形成的巢状结构、巢状结构的边界和卷

曲的弹性纤维]和其他皮肤病变的形态学指标和量化指标。此外, Cicchi 等^[62]通过在皮肤局部涂抹 ALA 诱导产生在肿瘤组织中特异性富积的 PpIX。得益于 PpIX 荧光,基底细胞癌组织和周边正常皮肤组织的对比度从荧光强度和荧光寿命两个方面都得到了有效提升。

同时,有一些研究基于内源性荧光物质的双光子荧光寿命成像对正常皮肤、痣、黑色素瘤以及基底细胞癌进行了综合对比分析。Giorgi 等^[63]发现,相对于正常皮肤组织,黑色素瘤的荧光寿命明显更短,而基底细胞癌的荧光寿命略长。另外,三者的形态特征也存在显著差异。这与两种癌症、正常皮肤组织分别比较的结果一致^[18,54,58,60-62]。Patalay 等^[64]发现,活体正常皮肤和离体基底细胞癌、复合痣以及黑色素瘤的自发荧光寿命具有显著差异,并且从正常皮肤到黑色素瘤,不同波段的自发荧光表现出一致的荧光寿命变化趋势。

以上研究表明,能够同时输出形态学特征和荧光寿命特征的双光子荧光寿命成像技术为皮肤病变的活体分析提供了一种可靠的、非侵入式的工具,有潜力应用于组织活检之前的直接诊断引导和手术过程中肿瘤边界的识别^[18,55,62,64]。

4 双光子荧光寿命成像临床应用展望

双光子荧光寿命成像技术结合了双光子成像和荧光寿命成像的优势。双光子成像一方面具有非侵入、光漂白和光毒性低、组织穿透能力强、亚细胞水平的分辨率、固有的层析能力等特点,另一方面能够利用内源性光学标志物进行无标记成像^[5-7]。荧光寿命成像具有分辨不同荧光标志物的能力,而且能够反映细胞、组织的生化特性,并能提供比稳态技术更加准确的在体定量测量^[11,13,16]。这两者的结合为生物组织的非侵入、无标记、活体成像提供了一种强有力的工具,能够输出高分辨的三维组织形态信息和生化特性信息,实现生物组织结构和功能的精细定量表征。基于以上优势,双光子荧光寿命成像技术在肿瘤检测方面具有巨大的临床应用前景。

德国 Jenlab GmbH 公司是探索将双光子荧光寿命成像应用于临床研究的先驱^[15,32,34]。该公司推出的 DermaInspect (JenLab GmbH, Jena, Germany) 系统是世界上首台面向临床皮肤病变检测的双光子荧光寿命成像设备^[15,61]。该系统不仅能够在前所未有的深度获得活体皮肤组织病理成像水平的三维结构,而且其输出的空间分辨的荧光强度、荧光寿命、胶原纤维和弹性纤维的比率、二次谐波和自发荧光的比率等能够为皮肤病变的诊断提供全新的参数^[15]。目前,该系统不仅在皮肤癌检测相关的离体、活体研究中得到了广泛应用^[15,56-57,59,60-62,64],而且被用于脑肿瘤诊断和边界识别相关的离体研究上^[32,34]。进一步地,为了适应更为广泛的成像需求, Jenlab GmbH 公司推出了 MPTflex™ 双光子荧光寿命成像系统。通过切换不同的探头,该系统不仅能够实现皮肤组织的活体成像,还能够满足浅层显微内窥成像的需求。Kantelhardt 等^[49]就采用该系统实现了脑肿瘤的首次术中成像。

尽管如此,双光子荧光寿命成像技术在肿瘤诊断方面的潜在价值还没有被完全挖掘出来,该技术的临床转化仍面临诸多挑战。具体来讲,主要包括以下三个方面。

1) 复杂而庞大的硬件系统

双光子荧光寿命成像系统相对较为复杂,并且对光源、探测器等都有较高的要求,因而整体成本比较高昂^[11,65]。另外,其庞大的硬件系统也限制了该技术应用于临床诊断的灵活性。具体来讲,对于消化道肿瘤的检测而言,系统探测模块必须制成光纤

式内窥探头,同时能够和常规消化道成像设备,如胃镜、肠镜等整合在一起。在脑肿瘤的术中诊断和边界识别,以及深层皮肤溃疡^[66]或癌变的检测方面,设计灵活、紧凑、小型化的探头也是该技术实现临床转化的关键。

2) 耗时的数据获取和分析

首先,受到组织自身荧光信号强度和系统探测效率的限制,在双光子荧光寿命成像中,获取一帧高质量的图像通常需要几秒钟,而要获得一定深度的三维信息则可能需要几十分钟^[11,46]。这不仅会增加患者的痛苦,同时也限制了医生从成像中获取的信息量。在组织中引入外源性标记来提高荧光信号的强度,能够使这一问题得到一定程度的改善,而该技术成像速度的突破还有赖于探测器探测效率的进一步提升或者新型探测原理的出现。其次,目前分析一帧双光子荧光寿命成像数据大约需要几秒钟到几分钟的时间,而大量成像数据的分析和定量参数的提取则更加耗时。可行的解决方法是通过批量处理的方式,或者采用无需对荧光衰减曲线进行拟合的频域分析方法,如荧光寿命相量图^[67]等来提升数据分析的速度。再者,组织荧光衰减信息通常难以解释且存在诸多争议^[11,46]。双光子荧光寿命成像技术未来临床应用的实现有赖于对荧光寿命信息与组织生理、病理特征具体关联的进一步研究和大量临床数据的积累。

3) 有限的组织穿透深度

双光子成像技术采用近红外波段的激发光,而生物组织对该波段光的吸收和散射都比较低。因此,该技术相对于单光子成像等其他采用可见光波段进行激发的光学显微成像技术而言,具有更强的组织穿透能力^[5]。尽管如此,其成像深度仍然限制在几百微米以内,这导致双光子荧光寿命成像技术只能用于皮肤或黏膜表面癌变的检测。但是,相对于传统方法,该技术高分辨率和能够提供功能信息的优势使其在上述癌变的早期诊断方面更具优势^[11]。另一方面,引入适用于活体组织的光透明技术或自适应光学技术等有望提升其穿透深度。同时,与其他能够提供组织深层信息的技术如超声、光声成像相结合,发展新型多模态成像系统也有望扩展其诊断能力。

5 结束语

双光子荧光寿命成像能够提供活体组织高分辨的三维结构和生化特性信息。基于内源性荧光标志

物,该技术有潜力实现正常细胞和肿瘤细胞的有效区分。目前,双光子荧光寿命成像技术已经被用于口腔癌、结肠直肠癌等消化道肿瘤,神经胶质瘤、脑膜瘤等脑肿瘤,以及黑色素瘤和基底细胞癌等皮肤肿瘤检测相关的研究中,并且具有应用于临床的趋势。本课题组也基于人体胃黏膜组织临床样本和原位神经胶质瘤小鼠模型开展了利用双光子荧光寿命成像技术进行胃癌检测和脑肿瘤在体诊断研究的相关工作。这些研究成果有力地证实了该技术应用于临床肿瘤诊断的巨大潜力。然而,自身软、硬件系统和成像原理的限制,当前实验研究积累的不足,导致双光子荧光寿命成像技术的临床转化仍面临巨大挑战。未来荧光寿命探测技术和数据分析技术的突破,分子水平生理、病理过程的深入研究,以及临床研究团队与仪器开发团队的紧密合作,有望推动该技术在临床肿瘤诊断中的广泛应用。

参 考 文 献

- [1] Ntziachristos V. Going deeper than microscopy: The optical imaging frontier in biology [J]. *Nature Methods*, 2010, 7(8): 603-614.
- [2] Nienhaus K, Nienhaus G U. Where do we stand with super-resolution optical microscopy? [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2016, 428(2): 308-322.
- [3] Zhang X X. Imaging technology in modern microsystems [J]. *Optical Instruments*, 2015, 37(6): 550-560.
张祥翔. 现代显微成像技术综述 [J]. *光学仪器*, 2015, 37(6): 550-560.
- [4] Denk W, Strickler J H, Webb W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy [J]. *Science*, 1990, 248(4951): 73-76.
- [5] Helmchen F, Denk W. Deep tissue two-photon microscopy [J]. *Nature Methods*, 2005, 2(12): 932-940.
- [6] Pittet M J, Weissleder R. Intravital imaging [J]. *Cell*, 2011, 147(5): 983-991.
- [7] Zipfel W R, Williams R M, Christie R, *et al.* Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100(12): 7075-7080.
- [8] Wang B G, König K, Halbhauer K J. Two-photon microscopy of deep intravital tissues and its merits in clinical research [J]. *Journal of Microscopy*, 2010, 238(1): 1-20.
- [9] Kantere D, Guldbbrand S, Paoli J, *et al.* Anti-stokes fluorescence from endogenously formed protoporphyrin IX—implications for clinical multiphoton diagnostics [J]. *Journal of Biophotonics*, 2013, 6(5): 409-415.
- [10] Berezin M Y, Achilefu S. Fluorescence lifetime measurements and biological imaging [J]. *Chemical Reviews*, 2010, 110(5): 2641-2684.
- [11] Marcu L. Fluorescence lifetime techniques in medical applications [J]. *Annals of Biomedical Engineering*, 2012, 40(2): 304-331.
- [12] Chorvat D, Chorvatova A. Multi-wavelength fluorescence lifetime spectroscopy: A new approach to the study of endogenous fluorescence in living cells and tissues [J]. *Laser Physics Letters*, 2009, 6(3): 175-193.
- [13] Becker W, Bergmann A. *Handbook of biomedical nonlinear optical microscopy* [M]. Oxford: Oxford University Press, 2008:499-556.
- [14] Lakowicz J R. *Principles of fluorescence spectroscopy* [M]. 3rd ed. New York: Springer, 2006.
- [15] König K. Clinical multiphoton tomography [J]. *Journal of Biophotonics*, 2008, 1(1): 13-23.
- [16] Seah L K, Wang P, Murukeshan V M, *et al.* Application of fluorescence lifetime imaging (FLIM) in latent finger mark detection [J]. *Forensic Science International*, 2006, 160(2/3): 109-114.
- [17] Pan W, Qu J, Chen T, *et al.* FLIM and emission spectral analysis of caspase-3 activation inside single living cell during anticancer drug-induced cell death [J]. *European Biophysics Journal*, 2009, 38(4): 447-456.
- [18] Fan S, Peng X, Liu L, *et al.* Diagnosis of basal cell carcinoma by two photon excited fluorescence combined with lifetime imaging [C]. *SPIE*, 2014, 8948: 89482E.
- [19] 范顺萍, 彭晓, 陆原, 等. 基于双光子激发荧光与荧光寿命成像的基底细胞癌诊 [C] // 广东省生物物理学会 2013 年学术研讨会论文集. 广州: [s. n.], 2013: 91-92.
- [20] Pliss A, Peng X, Liu L, *et al.* Single cell assay for molecular diagnostics and medicine: Monitoring intracellular concentrations of macromolecules by two-photon fluorescence lifetime imaging [J]. *Theranostics*, 2015, 5(9): 919-930.
- [21] Niesner R, Gericke K H. Fluorescence lifetime imaging in biosciences: Technologies and applications [J]. *Frontiers of Physics in China*, 2008, 3(1): 88-104.
- [22] Becker W. *Advanced time-correlated single-photon counting techniques* [M]. Berlin: Springer, 2005.
- [23] Teh S K, Zheng W, Li S, *et al.* Multimodal nonlinear optical microscopy improves the accuracy of

- early diagnosis of squamous intraepithelial neoplasia [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2013, 18(3): 036001.
- [24] Koppenol W H, Bounds P L, Dang C V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2011, 11(5): 325-337.
- [25] Wu Y, Zheng W, Qu J Y. Sensing cell metabolism by time-resolved autofluorescence [J]. *Optics Letters*, 2006, 31(21): 3122-3124.
- [26] Bird D K, Yan L, Vrotsos K M, *et al.* Metabolic mapping of MCF10A human breast cells via multiphoton fluorescence lifetime imaging of the coenzyme NADH [J]. *Cancer Research*, 2005, 65(19): 8766-8773.
- [27] Chance B, Schoener B, Oshino R, *et al.* Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1979, 254: 4764-4771.
- [28] Chance B, Cohen P, Jobsis F, *et al.* Intracellular oxidation-reduction states *in vivo* [J]. *Science*, 1962, 137(3529): 499-508.
- [29] Galeotti T, van Rossum G D V, Mayer D H, *et al.* On the fluorescence of NAD(P)H in whole-cell preparations of tumours and normal tissues [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1970, 17(3): 485-496.
- [30] Lakowicz J R, Szmajcinski H, Nowaczyk K, *et al.* Fluorescence lifetime imaging of free and protein-bound NADH [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992, 89(4): 1271-1275.
- [31] Colditz M J, Leyen K, Jeffree R L. Aminolevulinic acid (ALA)-protoporphyrin IX fluorescence guided tumour resection. Part 2: Theoretical, biochemical and practical aspects [J]. *Journal of Clinical Neuroscience*, 2012, 19(12): 1611-1616.
- [32] Kantelhardt S R, Leppert J, Krajewski J, *et al.* Imaging of brain and brain tumor specimens by time-resolved multiphoton excitation microscopy *ex vivo* [J]. *Neuro-Oncology*, 2007, 9(2): 103-112.
- [33] Skala M C, Ricking K M, Gendron-Fitzpatrick A, *et al.* *In vivo* multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(49): 19494-19499.
- [34] Leppert J, Krajewski J, Kantelhardt S R, *et al.* Multiphoton excitation of autofluorescence for microscopy of glioma tissue [J]. *Neurosurgery*, 2006, 58(4): 759-767.
- [35] Provenzano P P, Rueden C T, Trier S M, *et al.* Nonlinear optical imaging and spectral-lifetime computational analysis of endogenous and exogenous fluorophores in breast cancer[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2008, 13(3): 031220.
- [36] Russell J A, Diamond K R, Collins T J, *et al.* Characterization of fluorescence lifetime of photofrin and delta-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX in living cells using single- and two-photon excitation[J]. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 2008, 14(1): 158-166.
- [37] Kantelhardt S R, Diddens H, Leppert J, *et al.* Multiphoton excitation fluorescence microscopy of 5-aminolevulinic acid induced fluorescence in experimental gliomas [J]. *Lasers in Surgery and Medicine*, 2008, 40(4): 273-281.
- [38] Zhang S X. An atlas of histology[M]. New York: Springer-Verlag New York, 1999.
- [39] Chen W, Zheng R, Baade P D, *et al.* Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2016, 66(2): 115-132.
- [40] Torre L A, Bray F, Siegel R L, *et al.* Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2015, 65(2): 87-108.
- [41] Rück A, Hauser C, Mosch S, *et al.* Spectrally resolved fluorescence lifetime imaging to investigate cell metabolism in malignant and nonmalignant oral mucosa cells[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2014, 19(9): 96005.
- [42] Skala M C, Ricking K M, Bird D K, *et al.* *In vivo* multiphoton fluorescence lifetime imaging of protein-bound and free nicotinamide adenine dinucleotide in normal and precancerous epithelia [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2007, 12(2): 024014.
- [43] Shen Y F, Tsai M R, Chen S C, *et al.* Imaging endogenous bilirubins with two-photon fluorescence of bilirubin dimers[J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(15): 7575-7582.
- [44] Lakner P H, Monaghan M G, Moller Y, *et al.* Applying phasor approach analysis of multiphoton FLIM measurements to probe the metabolic activity of three-dimensional *in vitro* cell culture models[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 42730.
- [45] Adur J, Pelegati V B, Bianchi M, *et al.* Multimodal nonlinear optical microscopy used to discriminate human colon cancer[C]. *SPIE*, 2013, 8588: UNSP 85881J.
- [46] Li X, Li H, He X, *et al.* Spectrum- and time-resolved endogenous multiphoton signals reveal quantitative differentiation of premalignant and malignant gastric mucosa [J]. *Biomedical Optics*

- Express, 2018, 9(2): 453-471.
- [47] Bekelis K, Valdés P A, Erkmen K, *et al.* Quantitative and qualitative 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence in skull base meningiomas [J]. Neurosurgical Focus, 2011, 30 (5): E8.
- [48] Barone D G, Lawrie T A, Hart M G. Image guided surgery for the resection of brain tumours [J]. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2014, 1 (1): CD009685.
- [49] Kantelhardt S R, Kalasauskas D, König K, *et al.* *In vivo* multiphoton tomography and fluorescence lifetime imaging of human brain tumor tissue [J]. Journal of Neuro-Oncology, 2016, 127(3): 473-482.
- [50] Zanello M, Poulon F, Varlet P, *et al.* Multimodal optical analysis of meningioma and comparison with histopathology[J]. Journal of Biophotonics, 2017, 10 (2): 253-263.
- [51] Stewart B W, Wild C P. World cancer report 2014 [M]. [S.l.]:WHO Press, 2015.
- [52] American cancer society. Cancer facts & figures 2017 [M]. Atlanta: American Cancer Society, 2017.
- [53] Mohan S V, Chang A L S. Advanced basal cell carcinoma: Epidemiology and therapeutic innovations [J]. Current Dermatology Reports, 2014, 3(1): 40-45.
- [54] Pastore M N, Studier H, Bonder C S, *et al.* Non-invasive metabolic imaging of melanoma progression [J]. Experimental Dermatology, 2017, 26(7): 607-614.
- [55] Seidenari S, Arginelli F, Dunsby C, *et al.* Multiphoton laser tomography and fluorescence lifetime imaging of basal cell carcinoma: Morphologic features for non-invasive diagnostics [J]. Experimental Dermatology, 2012, 21(11): 831-836.
- [56] Dimitrow E, Riemann I, Ehlers A, *et al.* Spectral fluorescence lifetime detection and selective melanin imaging by multiphoton laser tomography for melanoma diagnosis[J]. Experimental Dermatology, 2009, 18(6): 509-515.
- [57] Dancik Y, Favre A, Loy C J, *et al.* Use of multiphoton tomography and fluorescence lifetime imaging to investigate skin pigmentation *in vivo* [J]. Journal of Biomedical Optics, 2013, 18(2): 26022.
- [58] Cicchi R, Sestini S, de Giorgi V, *et al.* Multidimensional two-photon imaging of diseased skin[C]. SPIE, 2008, 6859: 85903.
- [59] Riemann I, Ehlers A, le Harzic R, *et al.* Non-invasive analysis/diagnosis of human normal and melanoma skin tissues with two-photon FLIM *in vivo* [C]. SPIE, 2008, 6842: 684205.
- [60] Patalay R, Talbot C, Alexandrov Y, *et al.* Multiphoton multispectral fluorescence lifetime tomography for the evaluation of basal cell carcinomas[J]. Plos One, 2012, 7(9): e43460.
- [61] Patalay R, Talbot C, Alexandrov Y, *et al.* Quantification of cellular autofluorescence of human skin using multiphoton tomography and fluorescence lifetime imaging in two spectral detection channels [J]. Biomedical Optics Express, 2011, 2(12): 3295-3308.
- [62] Cicchi R, Sestini S, de Giorgi V, *et al.* Time-resolved multiphoton imaging of basal cell carcinoma [C]. SPIE, 2007, 6442: 64421I.
- [63] de Giorgi V, Massi D, Sestini S, *et al.* Combined non-linear laser imaging (two-photon excitation fluorescence microscopy, fluorescence lifetime imaging microscopy, multispectral multiphoton microscopy) in cutaneous tumours: First experiences [J]. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2009, 23 (3): 314-316.
- [64] Patalay R, Talbot C, Alexandrov Y, *et al.* Non-invasive imaging of skin cancer with fluorescence lifetime imaging using two photon tomography[C]. SPIE, 2011, 8087: UNSP808718.
- [65] Roberts M S, Dancik Y, Prow T W, *et al.* Non-invasive imaging of skin physiology and percutaneous penetration using fluorescence spectral and lifetime imaging with multiphoton and confocal microscopy [J]. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2011, 77(3): 469-488.
- [66] König K, Ehlers A, Riemann I, *et al.* Clinical two-photon microendoscopy[J]. Microscopy Research and Technique, 2007, 70(5): 398-402.
- [67] Datta R, Heylman C, George S C, *et al.* Label-free imaging of metabolism and oxidative stress in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes [J]. Biomedical Optics Express, 2016, 7(5): 1690-1701.