

多光子显微技术在医学诊断中的应用

林宏心, 左宁, 卓双木, 陈建新

福建师范大学医学光电科学与技术教育部重点实验室, 福建省光子技术重点实验室, 福建 福州 350007

摘要 多光子显微(MPM)技术通过探测由飞秒激光与生物组织内在成分相互作用而产生的双光子激发荧光和二次谐波等光信号,可实现对组织的无损、非标记成像。MPM 具有对组织微结构灵敏度和可实现高空间分辨成像、对生物组织杀伤性低和成像深度深、能够获取组织的生化信息等优点,在疾病诊断中具有很大的应用潜力。简要介绍 MPM 的基本原理,总结其在消化道肿瘤、皮肤疾病,以及角膜疾病诊断中的应用,并对 MPM 的发展前景进行展望。

关键词 医用光学; 生物光学; 多光子显微技术; 疾病诊断

中图分类号 O437

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201845.0207014

Application of Multiphoton Microscopy in Disease Diagnosis

Lin Hongxin, Zuo Ning, Zhuo Shuangmu, Chen Jianxin

Key Laboratory of Opto-Electronic Science and Technology for Medicine of Ministry of Education, Fujian Provincial Key Laboratory of Photonics Technology, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350007, China

Abstract Multiphoton microscopy (MPM) technology offers non-destructive, non-labeled imaging of tissue by detecting optical signals such as two-photon excitation fluorescence and second harmonic produced by the interaction of femtosecond laser with internal components of biological tissue. MPM has the advantages of tissue microstructure sensitivity, high spatial resolution imaging, low killing of biological tissues, deep imaging depth, and the ability to obtain the biochemical information of the tissue. It has great potential in disease diagnosis. The review mainly focuses on the principle of MPM and its applications in disease diagnosis of gastrointestinal cancer, skin diseases and corneal diseases, and looks forward to the development of MPM.

Key words medical optics; biotechnology; multiphoton microscopy technology; disease diagnosis

OCIS codes 170.4580; 180.4315; 170.6935

1 引 言

随着光子技术的发展,利用光学手段对疾病进行诊断有望在临床医学中成为现实。光子技术在疾病诊断应用方面已展现出越来越大的潜力,也成为当今医学光子学的重要研究课题^[1-5],其中,尤以多光子显微技术(MPM)的发展前景最引人注目^[6-12]。

MPM 是基于飞秒激光与生物组织内在成分相互作用后发生激发荧光和谐波产生等非线性光学效应而发展起来的一种新兴的非线性光学成像技术,

具有高空间分辨率、低细胞损伤、大成像深度和可应用于组织三维成像等优点^[5,7]。MPM 集显微成像技术和光谱测量技术的优点于一身,可同时获得组织内在成分的微结构和光谱特性。由于 MPM 技术基于飞秒激光与物质相互作用发生的二次谐波(SHG)和双光子激发荧光(TPEF)等不同物理机制的非线性光学效应,因此,在一台非线性光学显微镜中通过简单设置探测器的滤波片即可同时获得组织的高对比度 SHG 与 TPEF 复合成像。与传统单光子显微技术相比,MPM 有着很大的优势^[13-15]:

收稿日期: 2017-09-07; **收到修改稿日期:** 2017-10-10

基金项目: 国家自然科学基金(81771881)、教育部创新团队发展计划(IRT_15R10)

作者简介: 林宏心(1983—),女,博士研究生,主要从事生物医学光子学方面的研究。E-mail: linhongxin@fjnu.edu.cn

导师简介: 卓双木(1981—),男,博士,教授,博士生导师,主要从事生物医学光子学方面的研究。

E-mail: shuangmuzhuo@gmail.com(通信联系人)

1)MPM采用波长较长且在生物组织中穿透能力较强的红外激光作为激发光源,可以解决生物组织中深层物质的层析成像问题;2)由于多光子荧光波长远离激发光波长,因此MPM可以实现暗场成像;3)MPM可以避免普通荧光成像中的荧光漂白问题和对生物细胞的光致毒问题;4)多光子跃迁具有很强的选择激发性,有利于对生物组织中一些特殊物质进行成像研究;5)MPM对胶原纤维产生的谐波信号成像,可用于监控疾病进程中胶原纤维的变化,而这些变化在“金标准”组织病理学上表现不明显^[16-17]。由此可知,MPM在疾病诊断中具有很大的应用潜力,已成为当今国际医学光学研究的热点^[11-18]。

目前,MPM在医学诊断中的应用主要集中在消化道肿瘤^[11,19-30]、皮肤疾病^[5,6,31-44]和角膜疾病^[45-58]。这些疾病的病变多始于皮下几百微米处,MPM完全可达此深度。本文简要介绍MPM的基本原理,总结其在消化道肿瘤、皮肤疾病以及角膜疾病诊断中的应用,并对MPM的发展前景进行展望。

2 MPM的工作原理

分子的TPEF是一种非线性过程:分子同时吸收2个光子,从基态跃迁到激发态,经过能量弛豫后,发射一个长波长的光子回到基态,如图1所示。从量子机制来讲,TPEF过程首先是分子被一个光子激发到中间虚能态,然后被第二个光子激发到末态激发态。Goppert-Mayer于1931年率先提出TPEF的理论,同时给出这种现象的物理机制^[59-60]。

SHG是重要的非线性光学现象^[61],也称倍频。如图1所示,一个处于基态的电子吸收了两个频率相同的光子之后到达虚能态,然后再由虚能态放出一个倍频的光子。根据非线性光学知识^[61],产生SHG非线性光学效应需要两个前提:1)入射光是高强度的相干光;2)一个材料如要产生SHG信号,需具有非中心对称结构。由于SHG与二阶极化率的存在有关,而二阶极化率与材料本身的特性有关,它可反映介质的电子态,以及分子的对称性、旋向及排列等,从而揭示介质的局部细微结构,因此,SHG信号可作为组织材料的一种灵敏的特性指标。

3 MPM在医学诊断中的应用

3.1 消化道肿瘤诊断

随着微光纤技术的发展^[62-66],将MPM与光纤技术相结合,用于人体内窥镜检查,能够在细胞及亚细

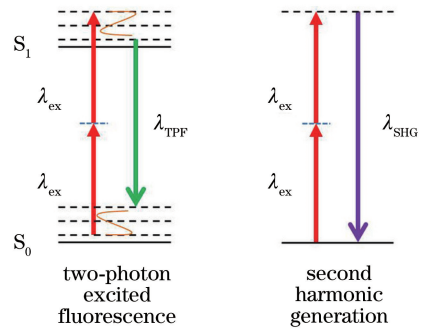


图1 TPEF与SHG的能级示意图^[60]

Fig. 1 Energy level diagram of TPEF and SHG^[60]

胞水平上对活体生物进行成像,实现生物体内深处组织信息的可视化。因此,基于MPM进行消化道肿瘤的诊断具有很强的可行性和广阔的应用前景。

目前,许多研究小组已经利用飞秒激光与组织内在成分相互作用发生的谐波和多光子激发荧光等非线性光学效应,提取和量化消化道肿瘤的诊断特征^[24-27]。Zhuo等^[25]已建立人体食管癌基质的诊断特征。图2分别展示了正常人和癌变病人食管基质部分的典型多光子图像。根据以前的研究可知^[13-17],SHG信号主要来源于胶原纤维,而TPEF信号主要来源于弹性纤维。从图2可得到一系列有意义的结果:1)正常基质的胶原纤维为精致的、细长的丝状结构,总体排列也更加紧密有序,而侵入瘤变基质的胶原纤维结构松散、排列紊乱;2)正常基质的弹性纤维为绳状结构,在组织中分布较为均匀,而侵入瘤变基质的弹性纤维具有更短、更碎的结构,并且有聚集趋势,类似基质的弹性组织变性^[67];3)从SHG/TPEF复合图像可以看出,胶原纤维和弹性纤

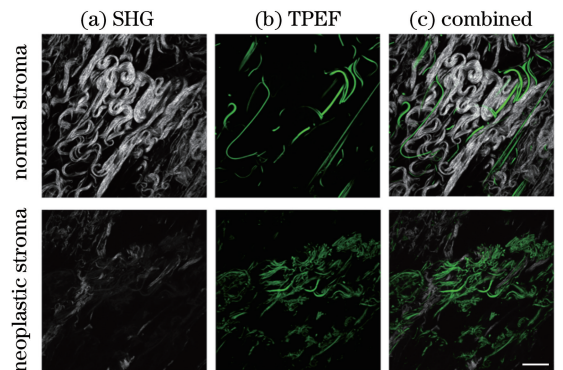


图2 人体食管基质的(a)SHG图像,(b)TPEF图像,(c)SHG(灰色)/TPEF(绿色)复合图像^[25]
(激发波长为850nm,标尺为20μm)

Fig. 2 (a) SHG, (b) TPEF, (c) combined SHG (grey) and TPEF (green) images of the human esophageal stroma^[25]
(excitation wavelength is 850 nm, scale bar is 20 μm)

维含量的比率在侵入瘤变基质过程中发生了明显变化,与先前的报道一致^[68]。

Chen 等^[26]利用 MPM 对正常与癌变的胃柱状上皮黏膜和黏膜下层进行研究,提取了一系列可用于定量描述正常和癌变胃柱状上皮的诊断特征参数。如图 3 所示,异常细胞易形成腺体样的管状结构,这是腺癌的典型特征。

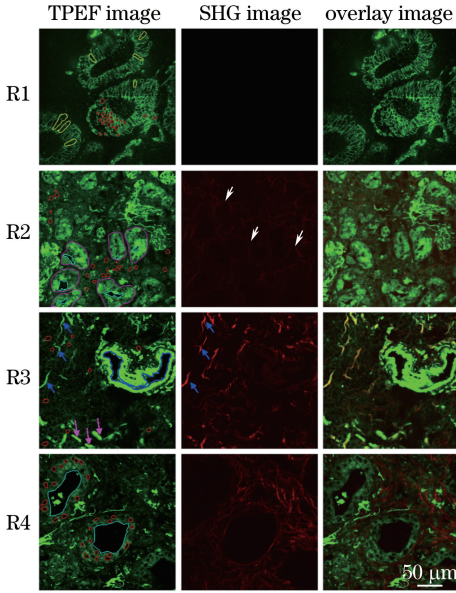


图 3 癌变的胃黏膜和黏膜下层的典型 TPEF/SHG 复合图像^[26](标尺为 50 μm)

Fig. 3 Representative TPEF/SHG images of cancerous gastric mucosa and submucosa^[26] (scale bar is 50 μm)

消化道肿瘤的发生发展是一个多阶段过程,包括正常阶段、非侵入瘤变阶段、侵入瘤变阶段^[69-70]。如果消化道肿瘤能在侵入瘤变前的任何一个阶段诊出,那么治愈率将会非常高^[71]。换言之,如果能监测消化肿瘤的发展进程,就能改善消化道肿瘤的早期诊断和治疗。Zhuo 等^[19]以人体结肠柱状上皮为例,探讨 MPM 用于监测消化道肿瘤发生发展进程的可行性。图 4(a)~(c)分别给出了正常、非侵入瘤变、侵入瘤变的柱状上皮的典型 TPEF 图像。如图所示,在肿瘤发生发展过程中,上皮细胞层的形态差异很大:1)正常上皮具有尺寸均匀、蜂窝状排列的圆形隐窝,杯细胞和上皮细胞核能清楚识别(如红色箭头所指),隐窝由致密的胞间隙隔开,此外,在间隙基质中可观察到少量的细胞浸润,其荧光峰值处在长波段范围,这些细胞很有可能是间隙的淋巴细胞(如白色箭头所指)^[11];2)非侵入瘤变上皮具有扭曲、拉长的隐窝和稀少的杯细胞,上皮细胞之间的连接已丢失,细胞核呈现椭圆形状,隐窝由稀疏、无规则的胞间隙隔开,间隙基质中几乎没有细胞浸润;3)侵入瘤变上皮已完全没有正常上皮中的隐窝和杯细胞,观察到的细胞具有不规则的大小和形状,并且核仁较大、核浆比率增大,单个细胞之间的空隙已无法识别,此外,能够清楚地看到一些细胞正在经历有丝分裂,显现出肿瘤细胞的快速增殖。综上所述,研究结果表明,非标记、定性的 TPEF 成像技术能提供细胞和亚细胞层次的信息,并可有效监测结肠肿瘤的发展进程。

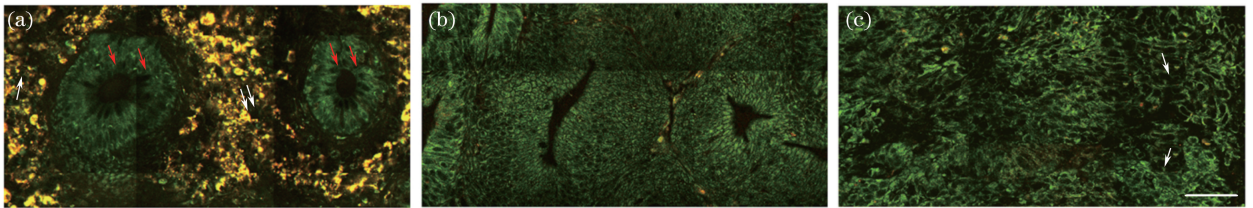


图 4 (a)正常,(b)非侵入瘤变,(c)侵入瘤变的结肠柱状上皮的典型 TPEF 图像^[19](标尺为 50 μm)

Fig. 4 (a) Representative multiphoton images of normal, (b) precancerous, (c) cancerous colonic tissues at depth of 0 μm^[19] (scale bar is 50 μm)

Zhuo 等^[18]除了比较细胞形态学差异外,还分析了细胞的氧化还原比率来量化结肠肿瘤的发展进程。由于肿瘤细胞在胞浆中分解葡萄糖生成乳酸的过程(糖酵解过程)会产生更多的能量,导致肿瘤细胞代谢活动表现出差异,因此氧化还原比率分析可以定量地监测肿瘤发展进程^[3,72]。其实现过程如下:将 NADH 和 FAD 发射光谱带的强度分别定义为 A 和 B,然后通过计算 A/B 得到氧化还原比率值。选择细胞可以被识别的区域作氧化还原比率分

析。此外,考虑到氧化还原比率值会随成像深度的改变而变化,对于每个样品,分析 3 个深度(0, 10, 30 μm)的光切面。结果显示,正常上皮的氧化还原比率值是 1.82 ± 0.12 ,非侵入瘤变上皮的氧化还原比率值是 2.57 ± 0.19 ,侵入瘤变上皮的氧化还原比率值是 3.26 ± 0.28 。换言之,氧化还原比率值随结肠肿瘤发展进程而增大。这些结果证实,上皮细胞的代谢活动会随着结肠癌发展进程而增强。这些结果与先前的研究报道一致^[3,72-74]。因此,细胞氧化

还原比率可作为量化结肠肿瘤发展进程的一个有用的指标。

在结肠肿瘤发展进程中,肿瘤细胞会导致基底膜变化,比如基底膜尺寸和密度的变化、基底膜的丢失等^[75]。基底膜的改变是结肠肿瘤发展进程中最重要的指标之一^[75-76]。然而,这些先兆症状目前仅能通过组织病理活检探测得到^[75,77]。因此,发展可用于探测这些先兆症状的无损、原位的新光学成像技术具有重大的医学意义。Zhuo 等^[22]利用 MPM

研究基底膜在结肠肿瘤发展进程中的变化情况。图 5 给出了正常、非侵入瘤变、侵入瘤变结肠上皮的典型纵向剖面 SHG 图像。SHG 成像技术很好地显示基底膜的轮廓(红色环形)。如图 5 所示,在肿瘤发生发展过程中,基底膜的轮廓在形态上存在明显的差异:在正常上皮中,基底膜呈圆形,并具有规则、蜂窝状的排列;在非侵入瘤变组织中,基底膜尺寸变大、数量减少,且呈管状形态;在侵入瘤变上皮中,基底膜已完全丢失。

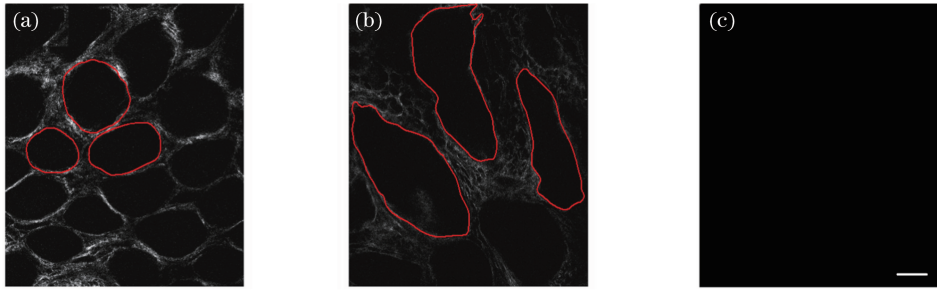


图 5 (a)正常,(b)非侵入瘤变,(c)侵入瘤变结肠柱状上皮的典型 SHG 图像(激发波长为 800 nm^[22], 图像尺寸为 415 μm×490 μm,标尺为 50 μm)

Fig. 5 (a) Representative SHG images of normal, (b) precancerous, (c) cancerous colonic tissues^[22] (excitation wavelength is 800 nm, image size is 415 μm×490 μm, scale bar is 50 μm)

3.2 皮肤疾病诊断

虽然人们普遍认为紫外光照射是造成皮肤光老化的主要原因,但在临床上,至今仍然缺乏一种能够直接、无标记地评价皮肤光老化程度的实时诊断工具。从形态上来看,许多症状都与皮肤老化联系在一起,比如色素沉着、干燥和皱纹的形成。从显微镜下观察,随着年龄的增长,皮肤内结缔组织的结构也会发生改变,其中胶原纤维的密度会减小,弹性纤维会增多^[78]。皮肤真皮主要由胶原纤维和弹性纤维组成,胶原纤维主要产生 SHG 信号,弹性纤维能够产生 TPEF 信号。Lin 等^[42]意识到能够用光谱区分这 2 个信号,从而评估不同皮肤的光老化程度,并在实验中用来自 20、40、70 岁 3 个年龄段病人的离

体皮肤样本证实了这一想法。如图 6(a)所示,产生 SHG 信号的胶原纤维在 20 岁时最多,产生 TPEF 信号的弹性纤维则在 70 岁时最多。除了定性检测以外,数字化的指标也可以用来量化皮肤光老化程度。SHG-TPEF 老化指数(SAAID)的计算公式为

$$I_{\text{SAAID}} = (P_{\text{SHG}} - P_{\text{TPEF}}) / (P_{\text{SHG}} + P_{\text{TPEF}}), \quad (1)$$

式中 P_{SHG} 和 P_{TPEF} 分别代表 SHG 信号和 TPEF 信号的像素数(SHG 信号和 TPEF 信号的强度都大于预先设定的强度阈值)。相对于使用绝对的 SHG 和 TPEF 信号强度进行计算,在深层成像时使用像素计数的方法更有优势,这是由于存在组织散射和样品诱导的球面像差,因而绝对的 SHG 和 TPEF 信号强度值会存在误差。相反,适当地

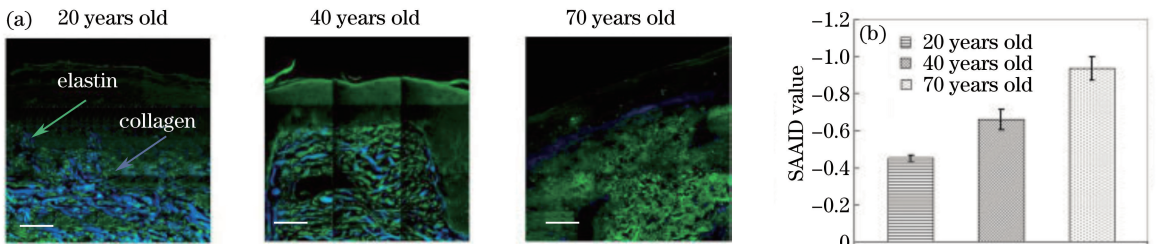


图 6 (a)不同年龄(20、40、70 岁)病人离体真皮的 MPM 图像(蓝色代表 SHG 信号,绿色代表 TPEF 信号); (b)皮肤老化程度的 SAAID 指数图^[42]

Fig. 6 (a) SHG and multiphoton imaging of *ex-vivo* human dermis in 20, 40, and 70 years-old patients (blue is SHG and green is TPEF); (b) skin aging quantification of these tissues using SAAID metric^[42]

选择背景强度,像素计数的方法更加准确。年龄越长者,因为皮肤组织的弹性纤维多于胶原纤维, SAAID 相应的负值就会越大。图 6 (b) 通过 SAAID 展示了 20、40、70 岁 3 个年龄段病人的皮肤老化程度,随着年龄的增加, SAAID 值逐渐减小,其中 70 岁病人的 SAAID 值减小为 -0.93 ^[42]。这一结果与预期的趋势一致。因此, MPM 是一种能有效定量皮肤光老化程度的新技术。将这一诊断方法运用到 18 个病人的活体研究中,结果表明, SAAID 值随年龄增加的关系与离体研究结果一致。研究者还发现,在女性病人中, SAAID 与年龄的相关性更强^[38]。

基底皮肤癌(BCC)是一种常见的皮肤恶性肿瘤,在真皮内聚集成结节状。临床上,外科医生依靠一系列先进技术,如 Mohs 显微手术方式,对 BCC 实施切除、诊断,再切除。若有一种能够实时监测肿瘤边缘的直接诊断方法,则既能节省时间,又能减少

组织切除面积。通过对各组病人的离体 BCC 样本成像,证实使用 MPM 对皮肤癌进行诊断是可行的^[44,79-80]。如图 7 所示,密集的癌细胞聚集在一起形成了结节状 BCC 肿瘤,可以清楚地从周围的正常组织中将其区分开来。将 MPM 图与相应的 H&E 病理图进行对比,证明 SHG(蓝色)和 TPEF(绿色)成像技术在无需外源标记的情况下就能识别肿瘤区域。从 MPM 图像可以看出, SHG 信号主要分布在远离肿瘤区域的正常基质中, TPEF 信号则分布在肿瘤和肿瘤附近的真皮组织。选取肿瘤、肿瘤真皮层和正常区域分别进行定量。 SAAID 定义的逆定义表明,离肿瘤越远的位置,指数越小,说明胶原纤维含量越高。在肿瘤内, 0.93 的指数值表明肿瘤主要由癌细胞组成。这一观察结果表明,在远离肿瘤区域的正常基质中胶原纤维含量较高,证实入侵肿瘤增加的金属蛋白酶(MMP)活性可改变周围正常组织的细胞外基质。

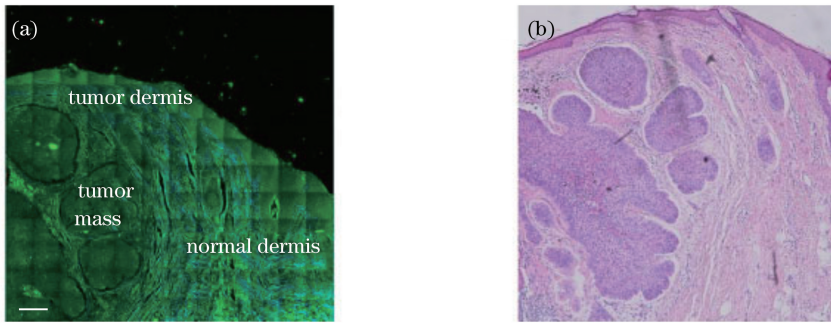


图 7 (a) 基于 MPM 的离体人体基底细胞癌光诊断(蓝色代表 SHG 信号,绿色代表 TPEF 信号);(b) 相邻切片的 H&E 染色图^[44]
 Fig. 7 (a) Optical diagnosis of *ex-vivo* human basal cell carcinoma using MPM imaging (blue is SHG, green is TPEF);
 (b) adjacent H & E histological section^[44]

3.3 角膜疾病诊断

角膜是另一种可以有效应用 MPM 的组织。作为人类视觉系统中最前端的部分,厚度约为 $520 \mu\text{m}$ 的角膜实现了眼睛的大部分折射功能。角膜独特的光学性质(90%可见光透射)^[81-82]阻碍了标准单光子显微成像模式的广泛应用。虽然反射共聚焦显微技术已被证明能对角膜上皮有效成像,但在单光子技术中,胶原纤维(角膜的主要成分)实际上是不可见的^[83]。此外,考虑到角膜在视力中的重要性,传统的组织学方法无法应用于角膜病变的诊断。这些因素造成了眼科病理诊断的困难:在进行有效的治疗之前,医生为了明确致病的病原体而不得不进行耗时的体外培养研究。这种识别过程大约需要一周时间,可导致错失最佳诊断时机。因此,开发一种可用于角膜病理诊断的非侵入式成像方法是十分必要

的。由于角膜基质的组成成分主要是 I 型胶原纤维^[81],因此可以利用 MPM 对角膜病理结构进行无标记成像和诊断。

Yeh 等^[84]最先确认了 MPM 在角膜成像中的可行性。基于背向散射的 TPEF 和 SHG 信号成像,他们发现 MPM 可以对角膜基质的胶原纤维进行成像,并将该基质与角膜的上皮细胞和角膜细胞区分开来。随后, Teng 等^[85]通过实验证明, TPEF 和 SHG 成像相结合可用于整个猪眼球表面各种结构的成像。具体地: TPEF 信号可用于描绘角膜上皮、角膜缘和结膜等; SHG 信号可有效地对角膜基质和巩膜的胶原基质进行成像。该研究还表明,虽然背向 SHG 的成像深度能够贯穿整个角膜厚度,但固有的不透明度却将巩膜的成像深度限制在约 $200 \mu\text{m}$ 处。 Lo 等^[53]采用上述工作中的大面积成

像方法,对 GFP 小鼠的整个角膜进行 TPEF 和 SHG 成像,获得了组织所有结构的高分辨率图像,证明了小鼠的角膜是由平行于角膜表面的若干重叠层构成的,如图 8 所示。

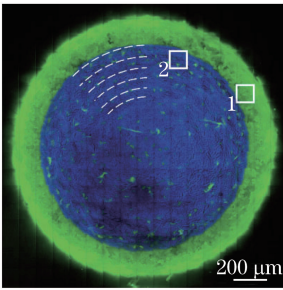


图 8 整个 GFP 小鼠角膜的 MPM 图像 (绿色代表 TPEF 信号,蓝色代表 SHG 信号^[53])

Fig. 8 Multiphoton image across entire cornea of GFP mouse (green is TPEF, blue is SHG ^[53])

差异仍是一个亟待解决的重要问题。Han 等^[86] 研究揭示,虽然结构较少并且不透明的巩膜有类似的胶原纤维结构,但前向和背向 SHG 图像还是呈现出显著的差异。特别地,前向 SHG 图像中角膜表现为纤维状结构,而在背向 SHG 图像中对照观察到的却是弥散结构。鉴于背向 SHG 成像是适用于临床的成像模式,因此,MPM 在此模式下是角膜疾病临床诊断的可行技术。

目前,不同研究小组已经成功运用 MPM 来评估离体角膜疾病的进展程度。感染性角膜炎是 MPM 应用的一个成功例子。Tan 等^[87] 的研究表明,SHG 信号可用于表征胶原纤维的破坏程度,同时 TPEF 信号可用于无标记地识别感染病原体的形态结构,如图 9 所示。这种方法已经被应用于在体外条件下表征被细菌(沙雷氏菌属沙门氏菌)、真菌(链格孢)和原生动物/细菌(棘阿米巴/绿脓假单胞菌/铜绿假单胞菌)感染的角膜病例^[87]。

然而,角膜前向和背向 SHG 图像之间的形态

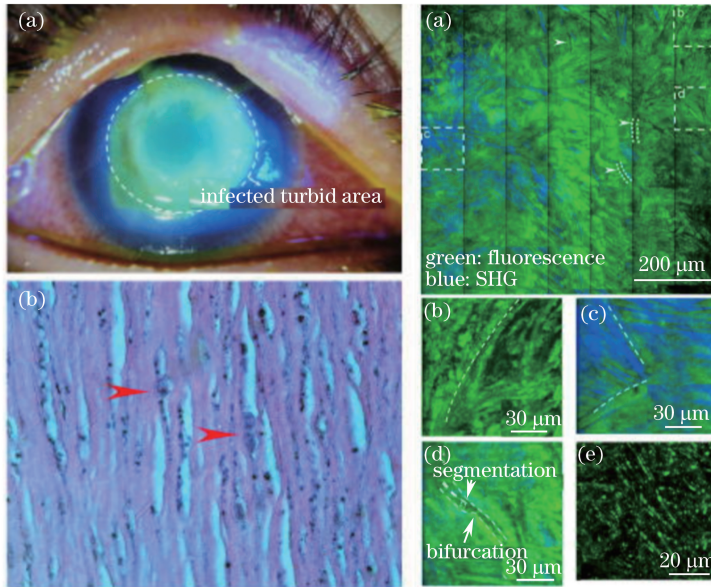


图 9 角膜炎的临床图片(a)和 MPM 图像(b)^[78]

Fig. 9 Clinical photography (a) and multiphoton images (b) of keratitis^[78]

MPM 研究的另一个有意义的病例是圆锥角膜,它可能是由于相邻胶原纤维之间不充分的交联而造成角膜胶原纤维的异常重组。通过使用 MPM, Tan 等^[88] 展示了角膜胶原纤维的整体重组可以通过 SHG 信号来表征。他们发现通过 MPM 获得的全角膜形态特征与相应的临床病理诊断结果一致。他们还发现,在圆锥顶点附近,角膜细胞更倾向于按改变的胶原纤维层方向平行排列,并形成纺锤状。这一现象表明,胶原纤维重组可以很大地影响局部细胞的形态。MPM 成像的一些后续研究表

明,异常胶原纤维组织会出现在前述基质中^[89]。另外,其他的一些角膜病变与视力矫正的损伤或屈光手术过程引起的角膜胶原纤维组织的不规则疤痕有关。在第一种情况下, Teng 等^[49] 发现在没有外源标记的情况下, Bowman 层的折叠结构和平行于伤口边缘深部的胶原纤维方向均可被可视化。在另一研究中, Brown 等^[90] 揭示 MPM 可用于监测由眼内压引起的视神经胶原纤维的运动。在第二种情况下, 屈光性角膜切除术(PRK)后形成疤痕所带来的角膜病变影响更令人担忧。PRK 是用于治疗近视

患者的主要技术之一,使用激光去除多余的角膜基质,形成一个更负透镜,从而得以聚焦到视网膜上。为了研究 MPM 是否可用于表征 PRK 术后的角膜, Farid 等^[91]成功实现了对准分子激光烧蚀角膜后纤维化过程的成像。同时,他们还证明了丝裂霉素 C 的治疗方案可以显著地减少角膜混浊的形成。

4 结束语

MPM 因具有对组织微结构高灵敏度、高空间分辨成像、低杀伤性和成像深度深等优点,在体表疾病诊断中具有很大发展潜力。本文综述了 MPM 作为成像诊断工具的应用,包括用于检查消化道肿瘤、皮肤疾病、角膜疾病等。

然而,在应用于临床之前,还有以下几个问题需要改进:1)在设备尺寸与人性化方面,MPM 需要与临床实践相互兼容。目前,波长可调谐的钛宝石飞秒激光器已商业化,同时具有特定波长的小型化固态飞秒激光也已经出现。随着光子晶体光纤和 GRIN 透镜技术的发展,微型化的扫描系统可以通过直径小于 1 mm 的内窥镜进行多光子激发荧光成像,实现真正的体内图像采集。例如, Llewellyn 等^[92]最近展示了基于 MPM 的内窥镜可以实现活体小鼠肌节长度变化的测量。2)MPM 的成像深度需进一步提高。利用钛宝石飞秒激光器(波长为 700~1000 nm)作为激发光源,MPM 在高散射组织的成像深度最多达到几百微米。最近, Campagnola 等^[93-94]已经证实由组织散射而导致的激光损失,即最初的滤波效应,是成像深度受限的主要因素。通过自适应光学或光透明的方法可以解决这一问题,如采用多元微镜补偿由于随着成像深度增加而导致的图像畸变,或利用超渗透剂作用于生物组织致使折射率匹配以降低散射系数并增加平均自由程^[95]。许多研究已证明,这 2 种方法对提高 MPM 的成像深度是非常有效的^[96-98]。3)获取客观、定量的图像信息方法需要不断的发展与改进,比如通过结合亥姆赫兹分析、小波分析和纹理分析等算法来增强 MPM 的应用性。同时,MPM 的物理机理及其与组织结构之间的关系需要进一步研究,以便能从图像数据中提取出更为详细和量化的信息。

随着 MPM 的兴起和发展,以及该技术在病理诊断应用中的不断探索,在不久的将来,MPM 有望成为一种可为临床手术提供实时决策的诊断新技术,可为选择哪个组织区域进行活检等提供决策支持,这也将促使一些长期以来存在争议的基础生物

学问题得到解决。

参 考 文 献

- [1] Keahey P, Ramalingam P, Schmeler K, *et al.* Differential structured illumination microendoscopy for *in vivo* imaging of molecular contrast agents[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(39): 10769-10773.
- [2] Quang T, Schwarz R A, Dawsey S M, *et al.* A tablet-interfaced high-resolution microendoscope with automated image interpretation for real-time evaluation of esophageal squamous cell neoplasia[J]. Gastrointestinal Endoscopy, 2016, 84(5): 834-841.
- [3] Skala M C, Squirrell J M, Vrotsos K M, *et al.* Multiphoton microscopy of endogenous fluorescence differentiates normal, precancerous, and cancerous squamous epithelial tissues [J]. Cancer Research, 2005, 65(4): 1180-1186.
- [4] Leggett C L, Wang K K. Computer-aided diagnosis in GI endoscopy: looking into the future [J]. Gastrointestinal Endoscopy, 2016, 84(5): 842-844.
- [5] Paoli J, Smedh M, Wennberg A M, *et al.* Multiphoton laser scanning microscopy on non-melanoma skin cancer: morphologic features for future non-invasive diagnostics [J]. Journal of Investigative Dermatology, 2008, 128(5): 1248-1255.
- [6] Dimitrow E, Ziemer M, Koehler M J, *et al.* Sensitivity and specificity of multiphoton laser tomography for *in vivo* and *ex vivo* diagnosis of malignant melanoma [J]. Journal of Investigative Dermatology, 2009, 129(7): 1752-1758.
- [7] Cicchi R, Vogler N, Kapsokalyvas D, *et al.* From molecular structure to tissue architecture: collagen organization probed by SHG microscopy[J]. Journal of Biophotonics, 2013, 6(2): 129-142.
- [8] Chen S Y, Chen S U, Wu H Y, *et al.* *In vivo* virtual biopsy of human skin by using noninvasive higher harmonic generation microscopy [J]. IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics, 2010, 16(3): 478-492.
- [9] Jung J C, Mehta A D, Aksay E, *et al.* *In vivo* mammalian brain imaging using one- and two-photon fluorescence microendoscopy [J]. Journal of Neurophysiology, 2004, 92(5): 3121-3133.
- [10] Lee H S, Liu Y, Chen H C, *et al.* Optical biopsy of liver fibrosis by use of multiphoton microscopy[J]. Optics Letters, 2004, 29(22): 2614-2616.
- [11] Rogart J N, Nagata J, Loeser C S, *et al.* Multiphoton imaging can be used for microscopic

- examination of intact human gastrointestinal mucosa *ex vivo* [J]. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2008, 6(1): 95-101.
- [12] Williams R M, Flesken-Nikitin A, Ellenson L H, *et al.* Strategies for high resolution imaging of epithelial ovarian cancer by laparoscopic nonlinear microscopy [J]. *Translational Oncology*, 2010, 3(3): 181-194.
- [13] Zipfel W R, Williams R M, Webb W W. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences [J]. *Nature biotechnology*, 2003, 21 (11): 1369-1377.
- [14] Ni M, Zhuo S M. Nonlinear optical microscopy: Endogenous signals and exogenous probes [J]. *Annalen der Physik*, 2015, 527(7/8): 471-489.
- [15] König K. Multiphoton microscopy in life sciences[J]. *Journal of microscopy*, 2000, 200(2): 83-104.
- [16] Adur J, Pelegati V B, de Thomaz A A, *et al.* Quantitative changes in human epithelial cancers and osteogenesis imperfecta disease detected using nonlinear multicontrast microscopy [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2012, 17(8): 081407.
- [17] Zhuo S M, Chen J X, Wu G Z, *et al.* Quantitatively linking collagen alteration and epithelial tumor progression by second harmonic generation microscopy[J]. *Applied Physics Letters*, 2010, 96 (21): 213704.
- [18] Zhuo S M, Zheng L Q, Chen J X, *et al.* Depth-cumulated epithelial redox ratio and stromal collagen quantity as quantitative intrinsic indicators for differentiating normal, inflammatory, and dysplastic epithelial tissues[J]. *Applied Physics Letters*, 2010, 97(17): 173701.
- [19] Zhuo S M, Yan J, Chen G, *et al.* Label-free monitoring of colonic cancer progression using multiphoton microscopy [J]. *Biomedical Optics Express*, 2011, 2(3): 615-619.
- [20] Coda S, Thompson A J, Kennedy G T, *et al.* Fluorescence lifetime spectroscopy of tissue autofluorescence in normal and diseased colon measured *ex vivo* using a fiber-optic probe [J]. *Biomedical Optics Express*, 2014, 5(2): 515-538.
- [21] Cicchi R, Sturiale A, Nesi G, *et al.* Multiphoton morpho-functional imaging of healthy colon mucosa, adenomatous polyp and adenocarcinoma [J]. *Biomedical Optics Express*, 2013, 4(7): 1204-1213.
- [22] Zhuo S M, Yan J, Chen G, *et al.* Label-free imaging of basement membranes differentiates normal, precancerous, and cancerous colonic tissues by second-harmonic generation microscopy [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38655.
- [23] Li L H, Chen Z F, Wang X F, *et al.* Detection of morphologic alterations in rectal carcinoma following preoperative radiochemotherapy based on multiphoton microscopy imaging[J]. *BMC cancer*, 2015, 15(1): 142.
- [24] Yan J, Zhuo S M, Chen G, *et al.* Real-time optical diagnosis for surgical margin in low rectal cancer using multiphoton microscopy [J]. *Surgical Endoscopy*, 2014, 28(1): 36-41.
- [25] Zhuo S M, Chen J X, Xie S S, *et al.* Extracting diagnostic stromal organization features based on intrinsic two-photon excited fluorescence and second-harmonic generation signals [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2009, 14(2): 020503.
- [26] Chen J X, Zhuo S M, Chen G, *et al.* Establishing diagnostic features for identifying the mucosa and submucosa of normal and cancerous gastric tissues by multiphoton microscopy [J]. *Gastrointestinal Endoscopy*, 2011, 73(4): 802-807.
- [27] Xu J, Kang D Y, Zeng Y P, *et al.* Multiphoton microscopy for label-free identification of intramural metastasis in human esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Biomedical Optics Express*, 2017, 8 (7): 3360-3368.
- [28] Yan J, Zheng Y, Zheng X L, *et al.* Real-time optical diagnosis of gastric cancer with serosal invasion using multiphoton imaging [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 31004.
- [29] Matsui T, Mizuno H, Sudo T, *et al.* Non-labeling multiphoton excitation microscopy as a novel diagnostic tool for discriminating normal tissue and colorectal cancer lesions [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 6959.
- [30] Xia G W, Zhi W J, Zou Y, *et al.* Non-linear optical imaging and quantitative analysis of the pathological changes in normal and carcinomatous human colorectal muscularis [J]. *Pathology*, 2017, 49(6): 627-632.
- [31] Shirshin E A, Gurfinkel Y I, Priezhev A V, *et al.* Two-photon autofluorescence lifetime imaging of human skin papillary dermis in vivo: assessment of blood capillaries and structural proteins localization [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 1171.
- [32] Czekalla C, Schönborn K H, Döge N, *et al.* Body regions have an impact on the collagen/elastin index of the skin measured by non-invasive *in vivo* vertical two-photon microscopy [J]. *Experimental Dermatology*, 2017, 26(9): 822-824.
- [33] Czekalla C, Schönborn K H, Döge N, *et al.* Impact of body site, age, and gender on the collagen/elastin index by noninvasive *in vivo* vertical two-photon microscopy[J]. *Skin Pharmacology and Physiology*,

- 2017, 30(5): 260-267.
- [34] Vieira-Damiani G, Lage D, Christoforetti Daldon P É, *et al.* Idiopathic atrophoderma of Pasini and Pierini: A case study of collagen and elastin texture by multiphoton microscopy [J]. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2017, 77(5): 930-937.
- [35] Pena A M, Strupler M, Boulesteix T, *et al.* Spectroscopic analysis of keratin endogenous signal for skin multiphoton microscopy[J]. *Optics Express*, 2005, 13(16): 6268-6274.
- [36] Masters B R, So P T C. Confocal microscopy and multi-photon excitation microscopy of human skin *in vivo*[J]. *Optics Express*, 2001, 8(1): 2-10.
- [37] Koenig K, Riemann I. High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2003, 8(3): 432-439.
- [38] Koehler M J, König K, Elsner P, *et al.* *In vivo* assessment of human skin aging by multiphoton laser scanning tomography [J]. *Optics Letters*, 2006, 31(19): 2879-2881.
- [39] Breunig H G, Studier H, König K. Multiphoton excitation characteristics of cellular fluorophores of human skin *in vivo* [J]. *Optics Express*, 2010, 18(8): 7857-7871.
- [40] Koehler M J, Hahn S, Preller A, *et al.* Morphological skin ageing criteria by multiphoton laser scanning tomography: non-invasive *in vivo* scoring of the dermal fibre network[J]. *Experimental Dermatology*, 2008, 17(6): 519-523.
- [41] Masters B R, So P T C, Gratton E. Optical biopsy of *in vivo* human skin: multi-photon excitation microscopy[J]. *Lasers in Medical Science*, 1998, 13(3): 196-203.
- [42] Lin S J, Wu R Jr, Tan H Y, *et al.* Evaluating cutaneous photoaging by use of multiphoton fluorescence and second-harmonic generation microscopy[J]. *Optics Letters*, 2005, 30(17): 2275-2277.
- [43] Tsai T H, Jee S H, Dong C Y, *et al.* Multiphoton microscopy in dermatological imaging[J]. *Journal of Dermatological Science*, 2009, 56(1): 1-8.
- [44] Lin S J, Jee S H, Kuo C J, *et al.* Discrimination of basal cell carcinoma from normal dermal stroma by quantitative multiphoton imaging[J]. *Optics Letters*, 2006, 31(18): 2756-2758.
- [45] Robertson D M, Rogers N A, Petroll W M, *et al.* Second harmonic generation imaging of corneal stroma after infection by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 46116.
- [46] Zyablitskaya M, Takaoka A, Munteanu E L, *et al.* Evaluation of therapeutic tissue crosslinking (TXL) for myopia using second harmonic generation signal microscopy in rabbit sclera [J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2017, 58(1): 21-29.
- [47] Marando C M, Park C Y, Liao J A, *et al.* Revisiting the cornea and trabecular meshwork junction with 2-photon excitation fluorescence microscopy [J]. *Cornea*, 2017, 36(6): 704-711.
- [48] Chang Y L, Chen W L, Lo W, *et al.* Characterization of corneal damage from *Pseudomonas aeruginosa* infection by the use of multiphoton microscopy [J]. *Applied Physics Letters*, 2010, 97(18): 183703.
- [49] Teng S W, Tan H Y, Sun Y, *et al.* Multiphoton fluorescence and second-harmonic-generation microscopy for imaging structural alterations in corneal scar tissue in penetrating full-thickness wound [J]. *Archives of Ophthalmology*, 2007, 125(7): 977-978.
- [50] Lombardo M, Merino D, Loza-Alvarez P, *et al.* Translational label-free nonlinear imaging biomarkers to classify the human corneal microstructure [J]. *Biomedical Optics Express*, 2015, 6(8): 2803-2818.
- [51] McQuaid R, Li J J, Cummings A, *et al.* Second-harmonic reflection imaging of normal and accelerated corneal crosslinking using porcine corneas and the role of intraocular pressure [J]. *Cornea*, 2014, 33(2): 125-130.
- [52] Aptel F, Olivier N, Deniset-Besseau A, *et al.* Multimodal nonlinear imaging of the human cornea [J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2010, 51(5): 2459-2465.
- [53] Lo W, Teng S W, Tan H Y, *et al.* Intact corneal stroma visualization of GFP mouse revealed by multiphoton imaging [J]. *Microscopy Research and Technique*, 2006, 69(12): 973-975.
- [54] Nuzzo V, Plamann K, Savoldelli M, *et al.* *In situ* monitoring of second-harmonic generation in human corneas to compensate for femtosecond laser pulse attenuation in keratoplasty[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2007, 12(6): 064032.
- [55] Mercatelli R, Ratto F, Rossi F, *et al.* Three-dimensional mapping of the orientation of collagen corneal lamellae in healthy and keratoconic human corneas using SHG microscopy [J]. *Journal of Biophotonics*, 2017, 10(1): 75-83.
- [56] Wang T J, Lo W, Hsueh C M, *et al.* *Ex vivo* multiphoton analysis of rabbit corneal wound healing following conductive keratoplasty [J]. *Journal of*

- Biomedical Optics, 2008, 13(3): 034019.
- [57] Lo W, Chang Y L, Liu J S, *et al.* Multimodal, multiphoton microscopy and image correlation analysis for characterizing corneal thermal damage [J]. Journal of Biomedical Optics, 2009, 14(5): 054003.
- [58] Hsueh C M, Lo W, Lin S J, *et al.* Multiphoton microscopy: a new approach, in physiological studies and pathological diagnosis for ophthalmology [J]. Journal of Innovative Optical Health Sciences, 2009, 2(1): 45-60.
- [59] Göppert-Mayer M. Über elementarakte mit zwei quantensprüngen[J]. Annalen der Physik, 1931, 401(3): 273-294.
- [60] Hoover E E, Squier J A. Advances in multiphoton microscopy technology[J]. Nature Photonics, 2013, 7(2): 93-101.
- [61] Bloembergen N. Nonlinearoptics [M]. Singapore: World Scientific, 1996.
- [62] Hoy C L, Durr N J, Chen P Y, *et al.* Miniaturized probe for femtosecond laser microsurgery and two-photon imaging[J]. Optics Express, 2008, 16(13): 9996-10005.
- [63] Bao H C, Gu M. A 0.4-mm-diameter probe for nonlinear optical imaging[J]. Optics Express, 2009, 17(12): 10098-10104.
- [64] Bao H C, Allen J, Pattie R, *et al.* Fast handheld two-photon fluorescence microendoscope with a $475\ \mu\text{m}\times 475\ \mu\text{m}$ field of view for *in vivo* imaging [J]. Optics Letters, 2008, 33(12): 1333-1335.
- [65] Le Harzic R, Weinigel M, Riemann I, *et al.* Nonlinear optical endoscope based on a compact two axes piezo scanner and a miniature objective lens[J]. Optics Express, 2008, 16(25): 20588-20596.
- [66] Andresen E R, Bouwmans G, Monneret S, *et al.* Two-photon lensless endoscope[J]. Optics Express, 2013, 21(18): 20713-20721.
- [67] Kondo T, Nakazawa T, Murata S, *et al.* Stromal elastosis in papillary thyroid carcinomas[J]. Human Pathology, 2005, 36(5): 474-479.
- [68] Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer [J]. Nature Reviews Cancer, 2006, 6(5): 392-401.
- [69] Alberts B, Johnson A, Lewis J, *et al.* Molecular biology of the cell[M]. New York: Garland Science, 2002.
- [70] Kerr D. Clinical development of gene therapy for colorectal cancer[J]. Nature Reviews Cancer, 2003, 3(8): 615-622.
- [71] Ramzi S, Vinay K, Tucker C, *et al.* Robbins pathologic basis of disease [M]. Philadelphia: WB Saunders Company, 1999: 349-352.
- [72] Skala M C, Riching 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.
- [73] Ramanujam N. Fluorescence spectroscopy of neoplastic and non-neoplastic tissues[J]. Neoplasia, 2000, 2(1/2): 89-117.
- [74] Pavlova I, Williams M, El-Naggar A, *et al.* Understanding the biological basis of autofluorescence imaging for oral cancer detection: high-resolution fluorescence microscopy in viable tissue[J]. Clinical Cancer Research, 2008, 14(8): 2396-2404.
- [75] Hida J, Matsuda T, Kitaoka M, *et al.* The role of basement membrane in colorectal cancer invasion and liver metastasis[J]. Cancer, 1994, 74(2): 592-598.
- [76] Liotta L A, Tryggvason K, Garbisa S, *et al.* Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen [J]. Nature, 1980, 284(5751): 67-68.
- [77] Visser R, Arends J W, Leigh I M, *et al.* Patterns and composition of basement membranes in colon adenomas and adenocarcinomas [J]. Journal of Pathology, 1993, 170(3): 285-290.
- [78] Alam M. Fitzpatrick's dermatology in general medicine[J]. Archives of Dermatology, 2004, 140(3): 372.
- [79] Cicchi R, Massi D, Sestini S, *et al.* Multidimensional non-linear laser imaging of Basal Cell Carcinoma[J]. Optics Express, 2007, 15(16): 10135-10148.
- [80] Cicchi R, Sestini S, De Giorgi V, *et al.* Nonlinear laser imaging of skin lesions [J]. Journal of Biophotonics, 2008, 1(1): 62-73.
- [81] Forrester J V. The eye: basic sciences in practice [M]. New York: W. B. Saunders, 2002.
- [82] Michelacci Y M. Collagens and proteoglycans of the corneal extracellular matrix[J]. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2003, 36(8): 1037-1046.
- [83] Masters B R, Böhnke M. Three-dimensional confocal microscopy of the living human eye [J]. Annual Review of Biomedical Engineering, 2002, 4(1): 69-91.
- [84] Yeh A T, Nassif N, Zoumi A, *et al.* Selective corneal imaging using combined second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence[J]. Optics Letters, 2002, 27(23): 2082-2084.
- [85] Teng S W, Tan H Y, Peng J L, *et al.* Multiphoton autofluorescence and second-harmonic generation

- imaging of the *ex vivo* porcine eye[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2006, 47(3): 1216-1224.
- [86] Han M, Giese G, Bille J F. Second harmonic generation imaging of collagen fibrils in cornea and sclera[J]. *Optics Express*, 2005, 13(15): 5791-5797.
- [87] Tan H Y, Sun Y, Lo W, *et al.* Multiphoton fluorescence and second harmonic generation microscopy for imaging infectious keratitis [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2007, 12(2): 024013.
- [88] Tan H Y, Sun Y, Lo W, *et al.* Multiphoton fluorescence and second harmonic generation imaging of the structural alterations in keratoconus *ex vivo* [J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2006, 47(12): 5251-5259.
- [89] Morishige N, Wahlert A J, Kenney M C, *et al.* Second-harmonic imaging microscopy of normal human and keratoconus cornea [J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2007, 48(3): 1087-1094.
- [90] Brown D J, Morishige N, Neekhra A, *et al.* Application of second harmonic imaging microscopy to assess structural changes in optic nerve head structure *ex vivo* [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2007, 12(2): 024029.
- [91] Farid M, Morishige N, Lam L, *et al.* Detection of corneal fibrosis by imaging second harmonic-generated signals in rabbit corneas treated with mitomycin C after excimer laser surface ablation[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2008, 49(10): 4377-4383.
- [92] Llewellyn M E, Barretto R P J, Delp S L, *et al.* Minimally invasive high-speed imaging of sarcomere contractile dynamics in mice and humans[J]. *Nature*, 2008, 454(7205): 784-788.
- [93] LaComb R, Nadiarnykh O, Campagnola P J. Quantitative second harmonic generation imaging of the diseased state osteogenesis imperfecta: experiment and simulation[J]. *Biophysical Journal*, 2008, 94(11): 4504-4514.
- [94] LaComb R, Nadiarnykh O, Carey S, *et al.* Quantitative second harmonic generation imaging and modeling of the optical clearing mechanism in striated muscle and tendon[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2008, 13(2): 021109.
- [95] Tuchin V V. Optical clearing of tissues and blood using immersion method[J]. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2005, 38(15): 2497-2518.
- [96] Cicchi R, Pavone F S, Massi D, *et al.* Contrast and depth enhancement in two-photon microscopy of human skin *ex vivo* by use of optical clearing agents [J]. *Optics Express*, 2005, 13(7): 2337-2344.
- [97] Wright A J, Poland S P, Girkin J M, *et al.* Adaptive optics for enhanced signal in CARS microscopy[J]. *Optics Express*, 2007, 15(26): 18209-18219.
- [98] Rueckel M, Mack-Bucher J A, Denk W. Adaptive wavefront correction in two-photon microscopy using coherence-gated wavefront sensing [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(46): 17137-17142.