

光声显微成像技术研究进展及其应用

陈重江, 杨思华*, 邢达

华南师范大学生物光子学研究院激光生命科学研究暨激光生命科学教育部重点实验室, 广东 广州 510631

摘要 光声显微成像技术是近年发展迅速的一种基于光学吸收差异的成像技术,它继承了光学成像对比度高、超声成像深度深的优点,表现出纯光学显微成像技术所无法比拟的优越性。光声显微成像实现了从声学分辨率至光学分辨率的多尺度成像,发展出从单纯的吸收结构到功能的多参量成像、从依靠内源吸收体到外源对比剂的多对比度成像、从依赖超声换能器到全光学激发与探测、从单一吸收成像到与光学相干层析成像、荧光成像、双光子成像、二次谐波成像等结合形成多模态的光声显微成像技术。现已在血管生物学、肿瘤学、神经学、眼科学,以及皮肤学等生物医学领域得到应用。

关键词 医用光学; 光声成像; 光声显微成像; 多尺度光声成像; 多参量光声成像; 多模态光声成像; 生物医学

中图分类号 Q631

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201845.0307008

Progress and Application of Photoacoustic Microscopy Technique

Chen Zhongjiang, Yang Sihua, Xing Da

Key Laboratory of Laser Life Science, Ministry of Education & Institute of Laser Life Science, College of Biophotonics, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong 510631, China

Abstract Photoacoustic microscopy is a fast-developing imaging technology, which depends on the optical absorption differences and inherits high contrast of optical imaging and deeper depth of ultrasound imaging. Thus, photoacoustic microscopy presents more merit than optical microscopy. Photoacoustic microscopy realizes multiscale imaging from acoustical resolution to the optical resolution, which provides multi-parameters imaging from simple absorption structure to its function, multi-contrast imaging from endogenous contrast agents to exogenous contrast agent, and imaging from ultrasound-transducer-based to all-optical excitation and detection, and multimodality imaging combined with optical coherence tomography, fluorescence imaging, two-photon imaging, second harmonic imaging, etc. Photoacoustic microscopy is widely applied in the field of biomedicine, such as vascular biology, oncology, neurology, ophthalmology, dermatology, and so on.

Key words medical optics; photoacoustic imaging; photoacoustic microscopy; multiscale photoacoustic imaging; multiparameter photoacoustic imaging; multimodality photoacoustic imaging; biomedicine

OCIS codes 170.5120; 170.3880; 110.5120

1 引 言

光声成像是近年快速发展起来的一种无损生物医学影像技术。它基于光声效应,利用短脉冲光源作为激发源照射生物组织,生物组织吸收光能以后产生光致超声信号,携带组织光学吸收信息的超声

信号被接收后,利用成像算法反演出生物组织吸收结构的可视化图像。光声成像结合了光学成像与超声成像的优点,成为介于光学成像与超声成像之间的关键成像技术,在生物医学影像诊断领域呈现出广泛的应用前景。

光声显微成像技术是光声成像技术中重要的一

收稿日期: 2017-09-15; 收到修改稿日期: 2017-11-02

基金项目: 国家自然科学基金(61705068,61627827,61331001,81630046,91539127)、广东省自然科学基金(2015B020233016,2014B020215003,2014A020215031,2017A030310363)、广东省“特支计划”科技青年拔尖人才(2015TQ01X882)、广东省高等学校优秀青年教师培养计划(YQ2015049)

作者简介: 陈重江(1987—),男,博士,讲师,主要从事光声成像技术及其应用方面的研究。E-mail: chenchj@senu.edu.cn

* 通信联系人。E-mail: yangsh@senu.edu.cn

部分,在近几年得到了快速的发展。光声显微成像技术通过类似于光学共聚焦成像的点激发模式来提高成像分辨率,并引入超声成像技术的成像算法,因而可以跨越目前光学显微镜在成像深度上的限制,成为当今生物学领域的研究热点。本文将简要说明光声显微成像技术的研究历程及其应用进展。

2 光声显微成像技术

2.1 多尺度光声显微成像

光声显微成像技术在生物学领域的发展经历了从声学分辨率到光学分辨率的演变。2005年, Maslov 等^[1]首次将光声显微成像技术用于血管成像,得到了清晰的血管结构图像。该系统采用一个 50 MHz 球形聚焦超声探测器探测信号,激光采用暗场辐射模式,实现了激发光焦点与声探测焦点的重合,取得了较高的横向及纵向分辨率,实现了基于声学分辨率的光声显微成像,开启了光声成像技术领域的快速发展^[2-3],如图 1(a)所示。2008年,该研究小组进一步发展了第一代光学分辨率光声显微镜(PAM)^[4]。该系统已经成功应用于皮下微血管形态、在体单个血细胞行为、血氧饱和度、皮肤黑色素、脑皮层微血管及功能代谢等领域。后续发展的亚微

米光声显微成像技术^[5],其横向分辨率逼近光学衍射极限。2011年提出的多焦点光声显微成像^[6]大大提高了光声显微成像的速度,为临床应用创造了可能。并进一步提出了第二代光声显微成像技术,提高了光声信号的检测灵敏度,获得了超高分辨率^[7],如图 1(b)所示。利用光学漂白原理,光声显微成像现可实现超光学分辨,空间分辨率可达到几十纳米,可以实现单个红细胞的三维成像^[8],如图 1(c)所示。Aguirre 等^[9]发展了介观光声成像技术,利用高频超声换能器提高了光声成像的纵向分辨率,实现了皮肤组织的三维精细结构成像。

本课题组建立起基于二维扫描振镜的共焦光声显微成像系统^[10],能够高分辨地成像多种癌症细胞、黑色素细胞、红细胞、神经细胞等,并建立起基于中空超声聚焦探测器的光声显微镜,实现了多尺度的光声显微成像,如图 1(d)所示,在功能成像方面也展开相应的研究工作^[11]。利用可变焦透镜可实现在深度上的显微层析成像^[12]。唐志列教授课题组建立了基于光声微腔的显微成像系统,获得了高分辨率的光声显微图像^[13]。中国科学院深圳先进研究院宋亮研究员课题组利用压缩感知技术提高了光声显微成像的成像速度^[14],并通过改进光声显

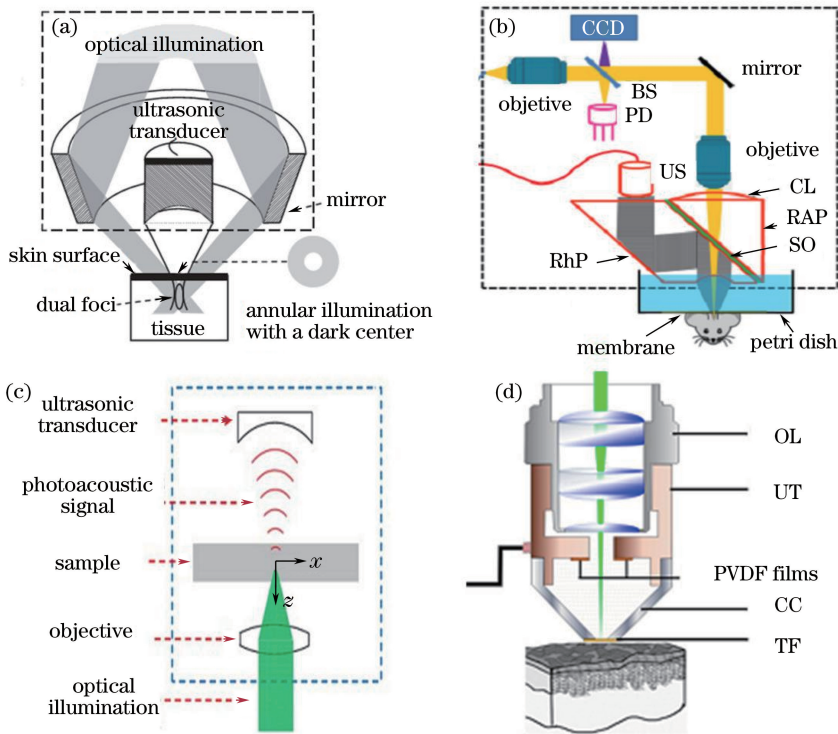


图 1 (a)声学分辨率光声显微镜^[1]; (b)光学分辨率光声显微镜^[7]; (c)超分辨率光声显微镜^[8]; (d)基于中空超声换能器的光声显微镜^[11]
 Fig. 1 (a) Acoustic-resolution photoacoustic microscopy^[1]; (b) optical-resolution photoacoustic microscopy^[7]; (c) super-resolution photoacoustic microscopy^[8]; (d) hollow-focused ultrasonic transducer based photoacoustic microscopy^[11]

微成像系统的扫描装置实现了亚波长分辨率的光声成像^[14-15]。华中科技大学骆清铭教授团队构建了基于反射式显微物镜的光声显微成像系统,改善了成像分辨率及成像深度^[16]。

2.2 多参量光声显微成像

光声显微成像不仅能实现对生物组织吸收结构的成像[图 2(a)],同时,由于组织内不同成分的吸收谱线各异,因此,可以利用这些特殊谱线进行光声成像来获取其分布情况。组织内不同物质成分的含量及分布与生物组织的代谢情况及病理特性密切相关。血氧饱和度、血液流速等都是生物组织的重要生理指标,对其进行监测具有重要的临床意义。光声成像可反映生物组织吸收信息的成像特性,通过直接测量血红蛋白含量、红细胞流动速度可实现对血氧饱和度、血液流速、力学参数等的成像。

光声成像生物组织的血管网络,就是利用体内血红蛋白在特定波长下相较其他物质有更高的吸收系数来成像的,反映血红蛋白分布的相对值,但并不能准确测量含氧和去氧血红蛋白的具体含

量。利用朗伯比尔定律,用两个或多个波长激发血液产生光声信号,可解析出含氧血红蛋白和去氧血红蛋白的含量,从而得到血管网络的血氧饱和度分布图像。Zhang 等^[2,17-19]率先实现了活体下的光声血氧饱和度显微成像,能够实时成像单根血管的血氧饱和度分布[图 2(b)],以及单个红细胞的血氧饱和度^[20]。

血流速度是另一个重要的生理参数,与生物组织的病变关系密切。利用血红蛋白在特定波长下的强吸收特性,光声显微镜可以高分辨率地对比度地测量血流速度。此方法较光学相干层析成像(OCT)及超声成像方法在测量血流速度方面有无法比拟的优越性^[21-25]。Fang 等^[26-27]利用调制的连续激光作为光声信号的激发源,通过测量光声信号的多普勒平移实现血流速度测量。该方法可以提供较高的测量精度,但是成像深度有限。随后更多的基于自相关与互相关的光声测量流速的方法被提出^[28-31](图 2)。进而利用快速扫描及高分辨率的光声显微镜,活体测量单个红细胞的流动速度^[20,32]。

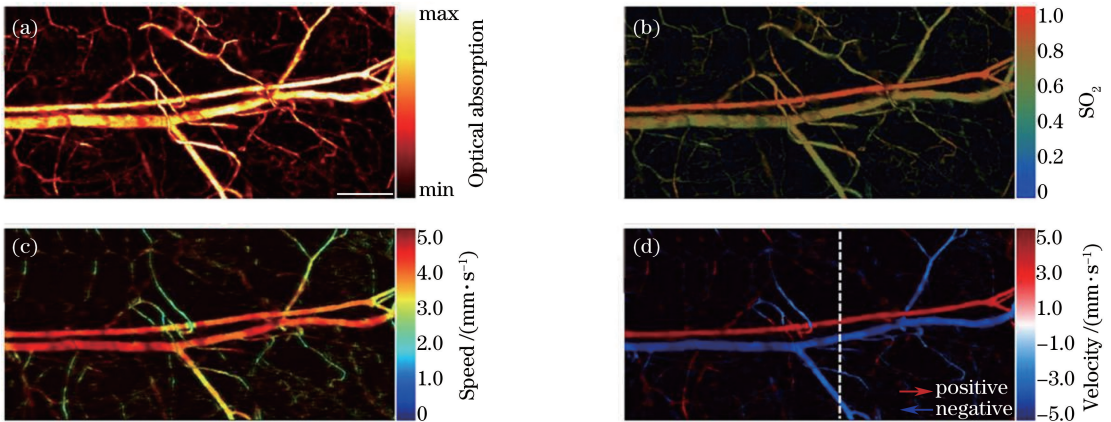


图 2 (a)血管网络光声图像;(b)血氧饱和度图像;(c)(d)血流速度成像^[31]

Fig. 2 (a) Photoacoustic image of blood vessel; (b) image of oxygen saturation; (c)(d) images of blood velocity^[31]

目前,光声成像技术主要反映组织的吸收差异,生物组织的光吸收特性可以有效地反映生物组织的结构和病理特征,但是大多数生物组织同时显示出力学特性,即粘弹性,其力学性质具有流变性,故常用粘性系数和弹性模量来描述生物组织的力学行为。生物组织的粘弹性在很大程度上取决于组织的分子构成,以及这些分子构成块在宏观、微观上的组织形式。本课题组在传统光声成像技术的基础上开发出光声粘弹成像新技术及方法,通过获取有关组织的粘弹性信息进行成像,弥补了传统的光声成像不能直接提供组织力学特性的不足^[33]。生物组织粘弹特性研究已引起医学界的广泛关注,如

正常细胞、癌细胞、药物作用的癌细胞的粘弹性系数均有明显差异。将传统光声成像与粘弹性成像技术相结合,研究正常组织与肿瘤组织,结果证明了粘弹成像技术在肿瘤诊断方面的应用可能性^[34]。进一步地,将光声粘弹成像用于易损斑块识别,为心血管疾病的检测提供了新的技术与手段(图 3)^[35-36]。光声粘弹成像以相位作为对比度,反映的是力学特性信息,展现出广阔的临床应用前景。

2.3 多对比度光声显微成像

光声成像的无损特性依赖于生物组织的内源吸收对比剂,按照吸收波段不同:DNA/RNA、血红蛋白为紫外到可见光范围内的主要吸收体;脂质、水、

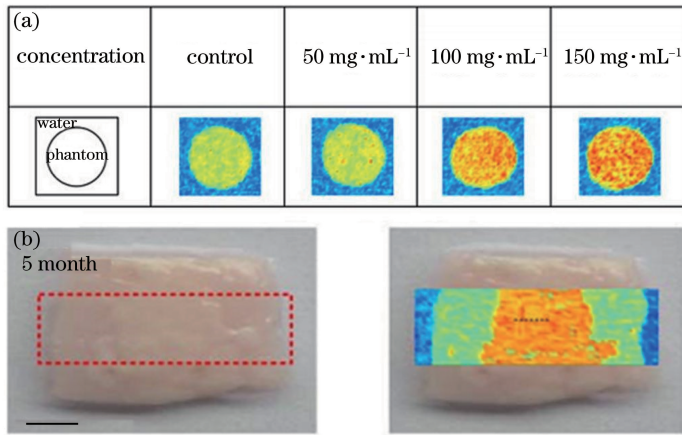


图 3 (a)不同浓度琼脂样品与(b)斑块样品^[35]的光声粘弹图像

Fig. 3 Photoacoustic viscoelasticity images of (a) phantoms containing various concentrations of lipid and (b) atherosclerotic plaque sample^[35]

葡萄糖等是近红外波段内的主要吸收体;黑色素在可见光到近红外都有较强的吸收。利用这些物质的不同吸收谱线,光声显微成像可以测量它们在组织内的分布情况(图 4)^[37]。肿瘤部位的细胞恶性增殖会导致 DNA/RNA 分布异常^[38-39]。血红蛋白是血液的主要成分,可以作为血管网络的光声显微成像对比剂^[40-41]。黑色素是皮肤及黑色素瘤的主要成分,可以作为皮肤及黑色素瘤的光声成像对比剂^[42]。光声显微成像可以利用脂质、水,以及葡萄糖近红外处的强吸收特异性地检测这些物质在组织内的分布情况,以

判断生物组织的生理及病理情况^[5,43-44]。

然而,很多疾病的特征分子的光吸收能力很弱,不能被脉冲激光激发而产生有效的光声信号。引入在近红外区域具有强吸收的外源对比剂可以大大提高光声成像的信噪比、特异性、灵敏度,对于拓展光声成像技术在生物医学中的应用有着重要意义^[45]。外源对比剂的引入可使疾病的诊断水平提前到分子异常阶段,对分子水平的病变进行检测,在体内直接观察疾病的起因、发生、发展等一系列过程,并观察疾病在基因、分子水平的异常变化和特征,这是一种

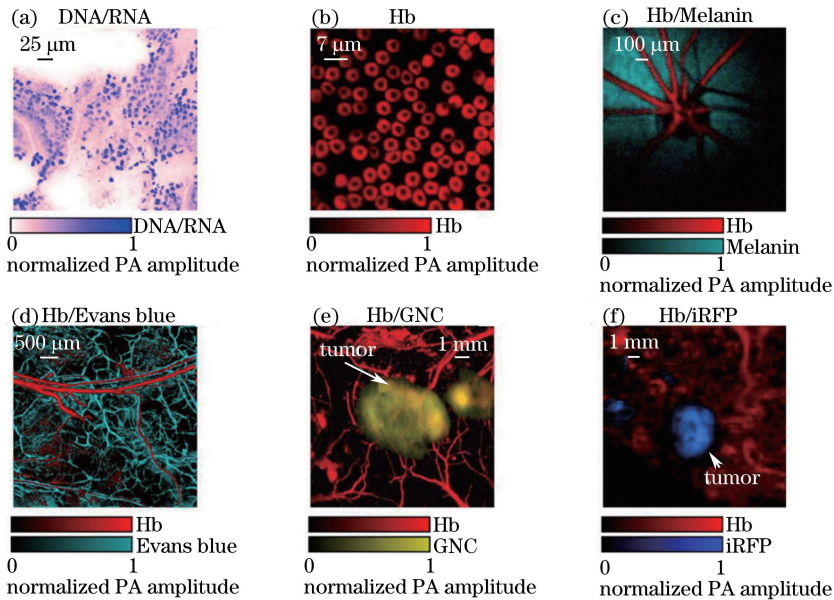


图 4 (a)细胞核、(b)红细胞、(c)视网膜血管网络及色素层、(d)伊文思蓝染料增强后的血管网络、(e)金纳米粒子靶向 B16 黑色素瘤、(f) iRFP 荧光蛋白过表达肿瘤^[37]的光声图像

Fig. 4 Photoacoustic images of (a) cell nuclei, (b) red blood cells, (c) retinal vessels and retinal pigment epithelium layer, (d) microvasculature enhanced by Evans blue dye, (e) B16 melanoma labeled with targeted gold nanocages, (f) tumor expressed by near-infrared fluorescent protein iRFP^[37]

非侵入性的疾病诊断方法。目前已见文献报道的光声成像探针包括各种结构的金纳米粒子、碳纳米管、硫化铜纳米粒子、吡啶青绿 (ICG)、氧化石墨烯、聚吡咯和普鲁士蓝纳米粒子等^[46-54]。基于这些探针的光声成像可以更好地研究各类疾病,包括早期肿瘤特性分子识别、癌细胞转移监测等。近年来,随着纳米材料合成技术的发展,光声外源对比剂向着诊疗一体化方向发展。

2.4 全光学光声显微成像 (AOPAM)

脉冲激光激发生物组织产生的光声信号是一个宽频信号,要完整接收光声信号通常需要宽带的超声换能器。此外,光声成像系统中轴向分辨率与超声换

能器带宽成反比,因而,提高超声换能器的带宽是提高光声成像质量的一个关键因素。然而受压电材料及制备技术的限制,超声换能器通常只有有限的带宽。尽管压电超声换能器的最大带宽可以达到中心频率的 120%^[55],但是还不能做到一个可以覆盖从低频到高频的宽带超声换能器。由于光学探测器具有宽频带特性,因此,可以利用光学检测的方法来实现宽带光声信号的检测,从而实现高质量的光声成像。

早在 20 世纪 90 年代, Jathoul 等^[45]就已经开始利用基于薄膜的法布里珀罗标准具来检测宽带超声信号,其光声成像深度及范围可达厘米级,成像分辨率为几十微米,可以实现对整个肿瘤生长情况的

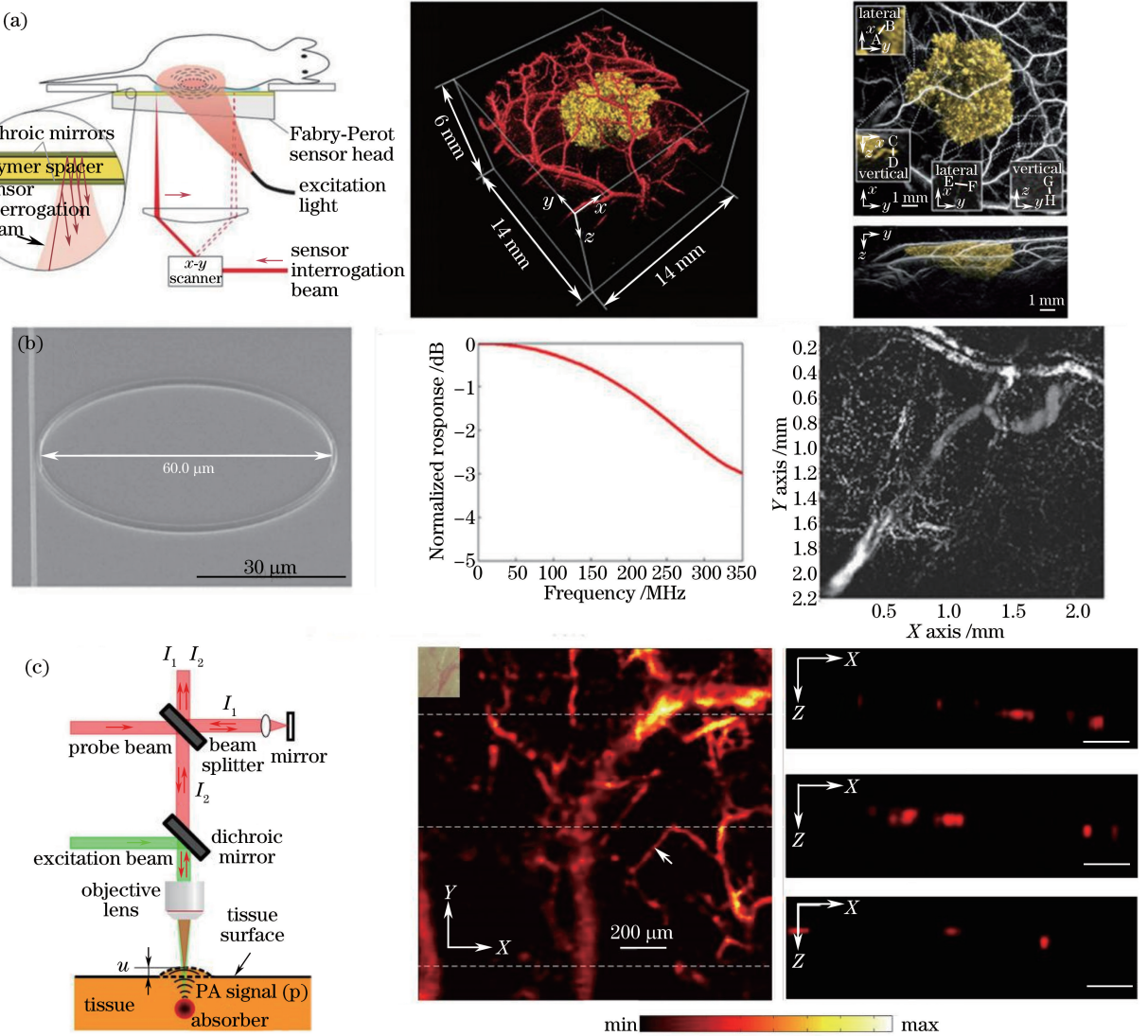


图 5 (a) 基于法布里珀罗标准具的光声成像系统^[45]; (b) 基于聚合物微环谐振器的光声成像系统^[58]; (c) 基于低相干迈克尔孙干涉仪的光声成像系统^[63]

Fig. 5 (a) Fabry-Pérot polymer film etalon ultrasound sensor based photoacoustic imaging system^[45]; (b) polymer microring resonators based photoacoustic imaging system^[58]; (c) low coherence Michelson interferometer based photoacoustic imaging system^[63]

监测成像[图 5(a)]。Huang 等^[56-58]利用聚合物微环谐振器作为光声信号的检测系统,检测带宽高达 90 MHz,可以高分辨率地成像生物组织,如图 5(b)所示。2011 年,Wang 等^[59]利用低相干迈克耳孙干涉仪实现了非接触式光声信号检测,获得了离体小鼠耳朵血管的光声图像。2012 年,Blatter 等^[60]利用相位敏感型 OCT 系统实现了光声信号的非接触式测量,同时获取了模拟样品的光声及 OCT 图像。同年,Rousseau 等^[61]以共焦法布里珀罗干涉仪作为光声信号的装置,实现了生物组织的光声及超声成像。2014 年,Park 等^[62]利用全光纤外差干涉仪检测光声信号,并将检测探头小型化,通过带动探头实现光声成像的扫描。本课题组利用低相干迈克耳孙干涉仪实现了光声信号的非接触式宽带接收,获得了高分辨率的小鼠耳朵血管图像^[63],如图 5(c)所示,推动了光声显微成像技术的发展,为光声成像技术在临床上的应用提供了便利。

2.5 多模态光声显微成像

光声显微成像已成功应用于皮下微血管成像、功能成像和早期肿瘤监测中,具有很高的灵敏度及特异性,这得益于光声成像对生物组织吸收的高度依赖。但对于弱吸收组织,光声成像能够提供的有效信息相对较少,通常需要其他的成像模式加以判别。为了全面、精准地获得生物组织的生理及病理信息,常须将光声成像与其他成像模式相结合,如 OCT、荧光成像等。

美国华盛顿大学研究组整合了光声成像与 OCT 技术,成像小鼠耳朵组织表面结构及血管分布^[64],并开展了光声荧光多模态成像研究工作,同时获取了小鼠耳朵血管的光声图像及淋巴管的荧光图像,并得到了小鼠耳朵血氧饱和度分布图像^[65]。美国的南加利福尼亚大学和西北大学研究组利用固体激光器抽运的染料激光器作为光声成像和 OCT 的同一激发源,实现了同源下吸收图像与散射图像的同时获取^[66]。伦敦大学研究组利用法布里珀罗干涉仪作为光声信号和光学相干信号的检测装置实现了光声光学相干层析多模态成像的有机结合,并开展了该多模态成像技术在肿瘤成像上的应用^[45]。慕尼黑工业大学研究组使用线阵超声换能器作为光声信号检测装置,结合荧光断层成像的线状光激发特点,研制出快速的光声荧光体显微成像技术,在在体应用中展示出广阔的前景^[67]。上海交通大学研究组开发了超高分辨率的光声光学相干层析多模态成像系统,并开展了离体视网膜色素细胞成像研究^[68]。本课题组在全光

学光声显微成像的基础上构建了光声/光学相干层析双模态光声显微成像系统^[39],该双模成像系统利用同一个低相干迈克耳孙干涉仪即可实现光声成像和 OCT 于一体的双模成像,可同时获取生物组织的吸收与散射结构信息,同时实现了基于全光学检测的光声/OCT/荧光(FLM)多模态成像^[70],如图 6 所示。进一步地,将该多模态成像系统应用于黑色素瘤及基底细胞癌的鉴别中,为皮肤肿瘤的早期筛查与诊断提供了新的手段^[71]。谢炳凯等^[72]尝试将非接触式光声成像系统与频域 OCT 结合构成光声/OCT 双模态成像系统,取得了初步的研究结果。Song 等^[73]针对单一模式的影像技术受成像机制制约,通常仅能获得组织部分的生物学信息的问题,通过创新设计光、声信号的激发、探测与解析,实现了光声、双光子和二次谐波成像技术的集成。

2.6 光声显微成像算法

在光声显微成像技术的发展过程中,成像算法的改进为提高成像质量起到了不可或缺的作用。在声学分辨率光声显微镜的最初发展阶段,仅简单提取光声信号的峰值,通过点对点投影直接得到组织的光声显微图像^[1],得到的光声图像质量通常较低。为获得高分辨率的光声显微图像,Li 等^[74]提出了基于合成孔径聚焦技术(SAFT)的虚拟探测器的光声显微成像算法,以及皮肤轮廓自动检测算法^[75],改善了光声显微成像的分辨率及成像深度(图 7)。近来,Deng 等^[76]在此基础上发展了自适应合成孔径聚焦技术的光声成像算法,能够自动识别每根血管的分支,进一步提高了成像质量。Park 等^[77]发展了一种改进型的合成孔径聚焦技术(延迟求和)的光声成像算法,该方法可以看作是把每个 B-scan 的光声信号进行了相关操作,使得光声信号之间的相干信息可以被提取;因而,在离焦的情况下,系统依然具有较高的横向分辨率及信噪比。通常情况下,光学分辨率的光声显微镜的图像是使用最大值投影算法获得的^[4-5],分辨率的极限逼近衍射极限,然而在实际应用中很难达到这个极限分辨率。为了提高光学分辨率的光声显微镜的图像质量,许多成像算法相继被提出。比如:Tang 等^[78]提出了微分光声显微镜的概念;Chen 等^[79]提出了盲去卷积算法来提高光声成像的横向分辨率。目前,也有科研团队提出利用空间结构照明的方法来获得高分辨率的光声显微图像^[80-81]。总之,各种成像算法的最终目的都是为了促进光声显微成像向高分辨高速度的方向发展,以满足实际应用的需求。

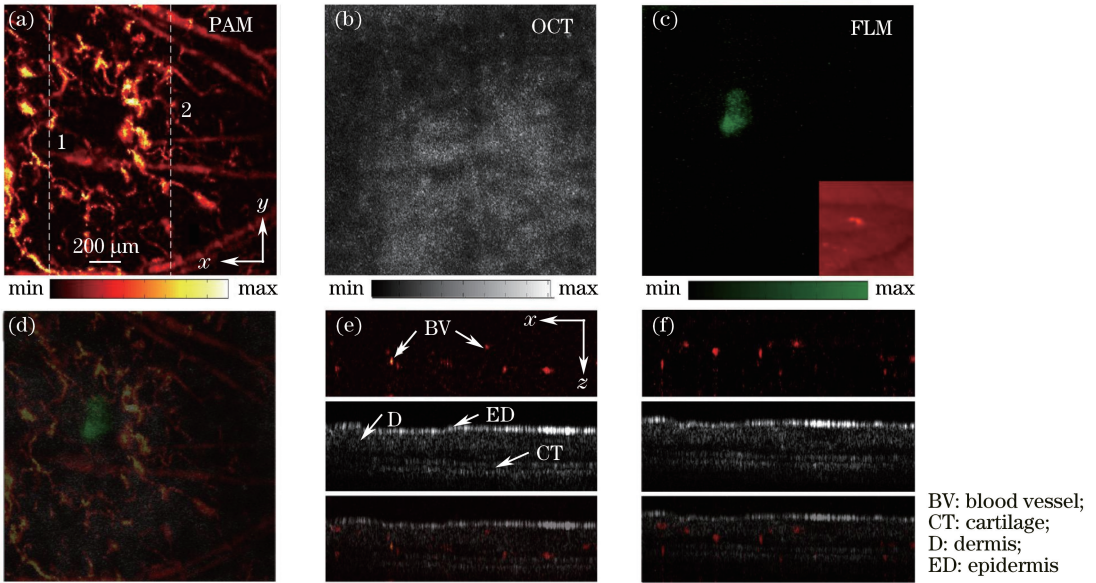


图 6 多模态系统成像活体老鼠耳朵^[70]。(a)光声最大值投影;(b) OCT 最大值投影;(c)荧光最大值投影, 插图为体视显微镜下获取的小鼠耳朵的荧光图像;(d)光声/OCT/荧光融合图像;(e)对应(a)中 1 处的光声/OCT 断层图像;(f)对应(a)中 2 处的光声/OCT 断层图像

Fig. 6 *In vivo* imaging of mouse ear using multi-modal imaging system^[70]. Images of (a) AOPAM maximum amplitude projection, (b) OCT maximum amplitude projection, and (c) FLM maximum amplitude projection; (d) image fused AOPAM, OCT and FLM; (e) AOPAM, OCT and fused AOPAM-OCT B-scan images of white dotted line 1 in (a); (f) AOPAM, OCT and fused AOPAM-OCT B-scan images of white dotted line 2 in (a); inset in (c) is fluorescence image of mouse ears obtained under a stereomicroscope

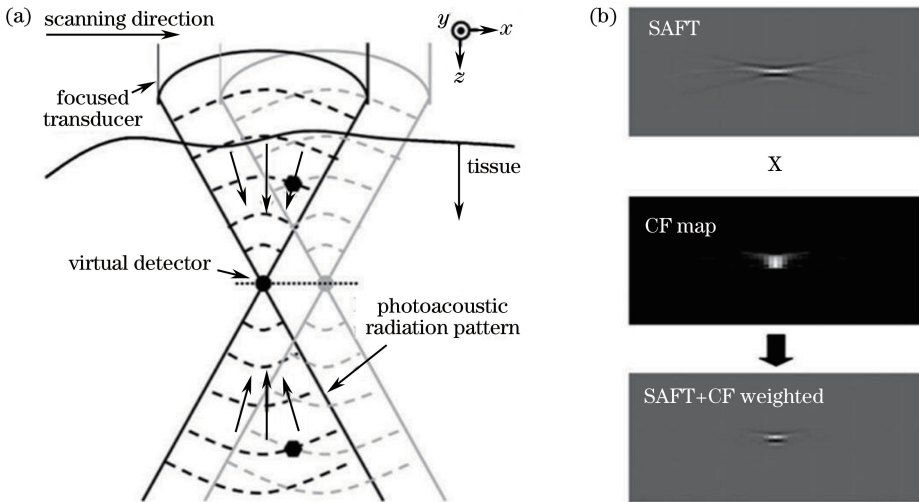


图 7 (a)合成孔径聚焦算法原理;(b)相干因子加权说明^[75]

Fig. 7 (a) Schematic of virtual-detector concept; (b) illustration of coherent factor weighting^[75]

3 光声显微成像技术应用进展

3.1 光声显微成像在血管生物学中的应用

血管是生物体的重要组成部分,遍布全身,为生物组织提供维持生命所需的养分。任何生物组织的病变都会导致血管结构及血管内物质成分的改变,

因而,通过对血管成像可以解决很多生物学上的问题。血液在可见光波段具有很高的吸收系数,因此,自光声成像技术应用于生物学领域以来,大多都是致力于生物组织血管网络的成像,包括从血管网络的形态结构到血氧饱和度、血液流速,以及组织代谢等的功能成像。

目前,光声显微成像的分辨率可以达到亚微米尺寸,在微血管网络成像领域具有非常明显的优势。Zhang 等^[82-85]将其应用于皮下微血管网络、脑皮层血管网络的成像等(图 8)。血氧饱和度是生物体至关重要的生理参数,反映了机体氧代谢的状况。通常,病变组织区域的血氧饱和度会出现异常。Chen 等^[11]将光声血氧饱和度的检测方法应用于急性一氧化碳中毒的小鼠模型中,可以准确反映出机体血

液中的氧含量,为一氧化碳中毒诊断的临床应用提供了可能。血液流速是另一项反映生物体代谢功能的重要生理参数,正常组织与病变组织对氧及营养物质消耗的差异导致血液的流速不同,通过测量血液流速可反映机体的生理状态^[20,86]。近年来,光声显微成像技术已经应用于肿瘤血管生长中不同调节因子作用过程的研究中^[87-89],为血管生物学的研究提供了有力的技术手段。

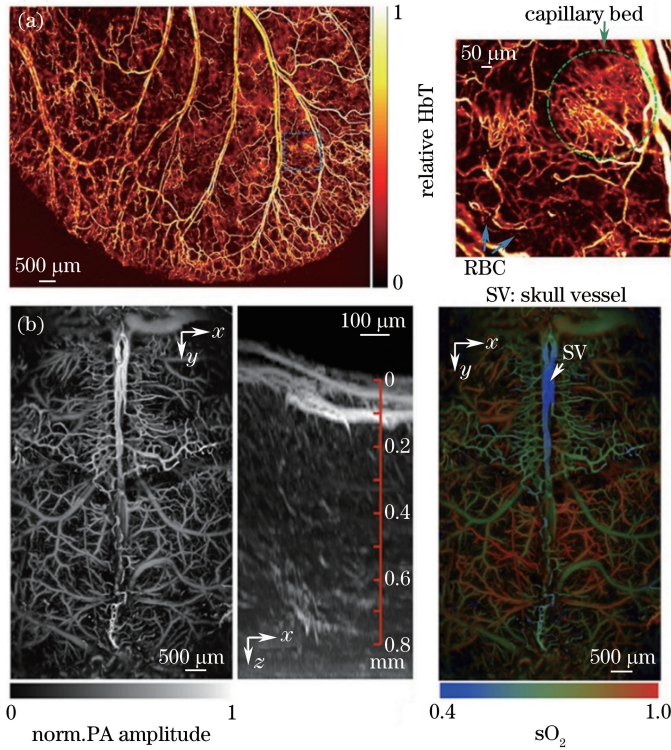


图 8 (a)小鼠耳朵血管网络^[7]与(b)脑皮层血管网络、血氧饱和度^[84]的光声图像

Fig. 8 Photoacoustic images of (a) mouse ear vasculature^[7] and (b) mouse brain vasculature and oxygen saturation^[84]

3.2 光声显微成像在肿瘤疾病诊断中的应用

肿瘤的生长通常伴随着血管的无序增生,通过成像血管的形态及血管内物质的变化可识别肿瘤。受制于成像深度的限制,光声显微成像技术一般用于体表肿瘤检测,比如黑色素瘤(BCC)等。Zhang 等^[3,90]早在 2006 年就已将光声显微成像技术应用于黑色素瘤的检测中,为黑色素瘤的早期诊断提供了可能。Wang 等使用光声及超声双模态成像系统活体检测黑色素瘤^[91],基于血管形态及瘤体厚度等多参数来判断黑色素瘤的恶性程度,并提出了利用全光学光声/OCT 双模态成像系统鉴别黑色素瘤及基底细胞癌(MM)的方法(图 9)^[71]。

在肿瘤的诊断治疗中,前哨淋巴结活检是用于判断肿瘤是否发生转移的重要手段,然而,活检穿刺会给病人带来痛苦。为了减轻病人的痛苦,各种无

损的淋巴结检查方法相继被提出,如超声、荧光等^[92-93]。光声成像具有高分辨率、高穿透深度,以及非侵入性,在淋巴结成像中别具优势。Kim 等^[94]构建了光声/荧光双模态系统,并对注入 ICG 的大鼠的淋巴结进行成像,观察 ICG 在淋巴结中的转移过程,结果验证了光声成像淋巴结及淋巴管的可行性。通过向小鼠体内注射金纳米粒子^[95],观察纳米粒子在淋巴管中的聚集及转移过程,进一步验证了光声成像淋巴结的可行性。目前,光声成像技术在淋巴结检测上已经取得了初步的临床研究进展,如 Alejandro 等^[96]通过使用光声/超声双模态成像系统对乳腺癌患者的腋下淋巴结进行活体成像,加快了光声成像技术的临床转化进程。

随着肿瘤的发展,癌细胞会通过微血管进入血液,并进而转移到其他器官。为了判断肿瘤的转移情

况,通常需要抽取病人的血样进行细胞流式检测,这种有损检测的方法并不利于长期连续观察。尽管荧光等流式细胞检测方法可以实现活体连续检测^[97],但荧光具有一定的细胞毒性,且荧光一般在可见光波段,穿透深度有限。Zharov 等^[98]于 2006 年提出活体光声流式细胞仪技术,实现了对金纳米粒子标记的癌细胞的在体检测。在随后的实验中,研究人员在接种过黑色素瘤的小鼠活体中观察到了黑色素瘤细胞的转移^[99]。Wang 等^[20]提出了可视化在体检测单个红细胞的含氧量及流动速度的方法,进一步推进了光声流式细胞术的发展。He 等^[100]通过使用高速高分辨率光声显微镜观察到了黑色素瘤细胞,该方法可以可视化地记录癌细胞在微血管中的转移过程。

皮肤是人体的重要组织器官,皮肤疾病的发生不仅影响其功能而且影响个人形象美观,给病人带来心理压力。光声显微成像非常适用于皮肤类疾病的检测。鲜红斑痣(PWS)被归类为一种良性的微

血管畸形病变,其病损部位深入真皮层血管,易发于面部、手臂和颈部,出生时即发生,90%累及头部,特别是三叉神经分布区域,随着年龄的增长,皮肤颜色会逐渐加深进而导致皮肤增厚及结节,不会自行消退。目前治疗 PWS 的方法主要有光动力(PDT)、脉冲激光治疗(PDL)、同位素、冰冻等。这些方法的治疗方案及效果主要靠医生的经验判断并辅助病理切片加以分析,但是这种经验判断通常会导致多次反复的治疗,并不能达到好的治疗效果。光声成像对血管形态结构成像具有天然的优势,Dong 等^[101-102]首次将光声显微成像技术应用于鲜红斑痣的诊断与治疗,现已取得初步进展。Aguirre 等^[103]利用超宽带光声显微镜获得了皮肤的超精细结构,并对比分析了正常皮肤与银屑病皮肤在结构上的不同(图 10)。这些预临床应用及尝试推动了光声成像技术向临床的转变,为临床疾病的诊断提供了更加有效的技术手段。

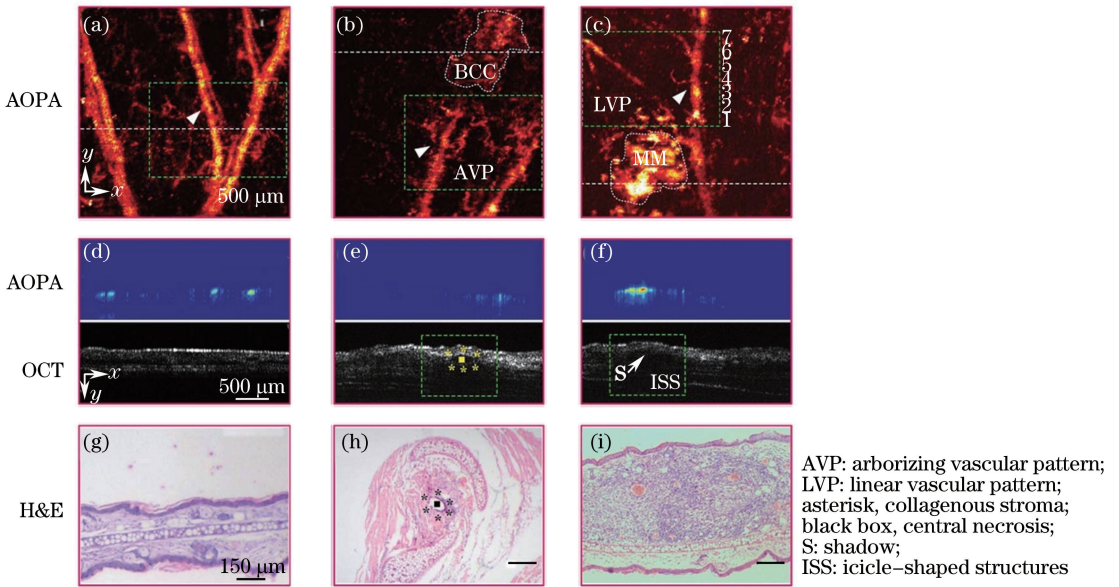


图 9 全光光声(AOPA)和 OCT 系统的活体成像结果。(a)正常、(b)黑色素瘤、(c)基底细胞癌小鼠耳朵的光声显微图像;(d)~(f)白色点线对应光声 OCT 的 B 扫光声图像;(g)~(i)对应的 H&E 染色组织切片^[71]

Fig. 9 *In vivo* imaging results by all-optical photoacoustic (AOPA) and OCT system. AOPA maximum amplitude projection images of (a) normal, (b) BCC, and (c) MM mouse ear; (d)-(f) OCT B-scan images for white dotted line in (a)-(c); (g)-(i) imaging with H&E staining histopathology^[71]

3.3 光声显微成像在其他领域中的应用

光声显微成像技术现已扩展到眼科学的应用中,包括成像眼底视网膜血管、视网膜色素上皮层的色素分布,以及脉络膜血管网络等,用以诊断包括黄斑病变、糖尿病视网膜病变等^[104-109]。另外,神经活动时常伴随着生理参数的变化,通过光声显微镜实时成像血液中血红蛋白和血氧饱和度的变化可监测

神经的活动情况^[110-111],也可以直接利用光声成像的选择性吸收特性直接成像神经网络^[112],这为神经行为活动的研究提供了新的技术手段。

4 结束语

本文主要从光声显微成像技术及其应用研究两个方面总结了光声显微成像领域的发展现状。在成

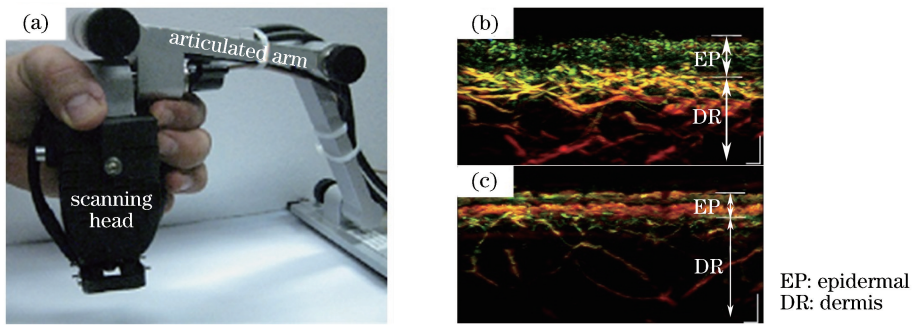


图 10 (a)手持光声扫描头;(b)银屑病皮肤病皮肤的光声图像;(c)正常皮肤的光声图像^[103]

Fig. 10 (a) Scanning head of portable photoacoustic mesoscopy; photoacoustic image of (b) psoriatic skin and (c) normal skin^[103]

像技术方面,光声显微成像已经实现了分辨率从亚微米至几十个微米的跨层次成像、成像范围从几个微米到厘米量级的多尺度成像、从结构到功能上的多参量成像,成像设备也实现了从大型化到小型化轻量化方向的发展^[113-114]。尽管各种光声显微成像技术层出不穷,满足了不同场合下的生物医学应用;然而,与其他光学成像技术一样,成像深度始终是限制光声显微成像发展的重要原因。其中,声学分辨率光声显微镜的成像深度能达到 3 mm 左右,而光学分辨率光声显微镜的成像深度被限制在传统光学成像深度的“软极限”(1 mm)附近,报道过最深的成像深度也只有 1.2 mm 左右,这个成像深度与双光子及多光子成像深度基本一致。目前,虽然可以利用波前整形技术对激发光进行调制整形使其聚焦于组织内部^[115-117],从而改善成像深度,但是活体生物组织内的细胞及其他物质在微观上是运动的,这就对调制器件及处理算法提出了苛刻的要求,现有技术尚不能满足实际应用的要求。在未来,使用调制速度更快的调制器件及更加智能的处理算法后,波前传感技术可能会使光声显微成像技术及其他光学成像技术得以实现对深层组织的成像。另外,光声成像是依赖于物质的光学吸收的成像技术,而生物体内存在着很多弱吸收物质,要检测到这些物质就需要借助于其他成像方法。光声显微成像技术正在向多模态、多功能、诊断与治疗一体化方向发展,以满足生物医学应用的要求。在应用方面,光声显微成像目前主要用于体表问题研究中,包括皮肤肿瘤、血管畸形、脑皮层肿瘤等。光声显微成像技术的临床应用定位并不清晰,需要科研工作者进一步深入探索。

参 考 文 献

[1] Maslov K, Stoica G, Wang L V. *In vivo* dark-field

reflection-mode photoacoustic microscopy [J]. *Optics Letters*, 2005, 30(6): 625-627.

[2] Zhang H F, Maslov K, Sivaramakrishnan M, *et al.* Imaging of hemoglobin oxygen saturation variations in single vessels in vivo using photoacoustic microscopy[J]. *Applied Physics Letters*, 2007, 90 (5): 053901.

[3] Zhang H F, Maslov K, Stoica G, *et al.* Functional photoacoustic microscopy for high-resolution and noninvasive *in vivo* imaging [J]. *Nature Biotechnology*, 2006, 24(7): 848-851.

[4] Maslov K, Zhang H F, Hu S, *et al.* Optical-resolution photoacoustic microscopy for in vivo imaging of single capillaries [J]. *Optics letters*, 2008, 33(9): 929-931.

[5] Zhang C, Maslov K, Wang L V. Subwavelength-resolution label-free photoacoustic microscopy of optical absorption *in vivo* [J]. *Optics Letters*, 2010, 35(19): 3195-3197.

[6] Song L, Maslov K, Wang L V. Multifocal optical-resolution photoacoustic microscopy *in vivo* [J]. *Optics Letters*, 2011, 36(7): 1236-1238.

[7] Hu S, Maslov K, Wang L V. Second-generation optical-resolution photoacoustic microscopy with improved sensitivity and speed[J]. *Optics Letters*, 2011, 36(7): 1134-1136.

[8] Yao J, Wang L, Li C, *et al.* Photoimprint photoacoustic microscopy for three-dimensional label-free subdiffraction imaging [J]. *Physical Review Letters*, 2014, 112(1): 014302.

[9] Aguirre J, Schwarz M, Soliman D, *et al.* Broadband mesoscopic optoacoustic tomography reveals skin layers [J]. *Optics Letters*, 2014, 39 (21): 6297-6300.

[10] Yuan Y, Yang S, Xing D. Optical-resolution photoacoustic microscopy based on two-dimensional scanning galvanometer[J]. *Applied Physics Letters*, 2012, 100(2): 023702.

- [11] Chen Z, Yang S, Xing D. *In vivo* detection of hemoglobin oxygen saturation and carboxyhemoglobin saturation with multiwavelength photoacoustic microscopy[J]. Optics Letters, 2012, 37(16): 3414-3416.
- [12] Li B, Qin H, Yang S, *et al.* *In vivo* fast variable focus photoacoustic microscopy using an electrically tunable lens [J]. Optics Express, 2014, 22(17): 20130-20137.
- [13] Tan Z, Tang Z, Wu Y, *et al.* Multimodal subcellular imaging with microcavity photoacoustic transducer[J]. Optics Express, 2011, 19(3): 2426-2431.
- [14] Meng J, Liu C, Zheng J, *et al.* Compressed sensing based virtual-detector photoacoustic microscopy *in vivo* [J]. Journal of Biomedical Optics, 2014, 19(3): 036003.
- [15] Song W, Zheng W, Liu R, *et al.* Reflection-mode *in vivo* photoacoustic microscopy with subwavelength lateral resolution [J]. Biomedical Optics Express, 2014, 5(12): 4235-4241.
- [16] Wang H, Yang X, Liu Y, *et al.* Reflection-mode optical-resolution photoacoustic microscopy based on a reflective objective[J]. Optics Express, 2013, 21(20): 24210-24218.
- [17] Maslov K, Zhang H F, Wang L V. Effects of wavelength-dependent fluence attenuation on the noninvasive photoacoustic imaging of hemoglobin oxygen saturation in subcutaneous vasculature *in vivo* [J]. Inverse Problems, 2007, 23(6): S113-S122.
- [18] Hu S, Maslov K, Wang L V. Noninvasive label-free imaging of microhemodynamics by optical-resolution photoacoustic microscopy [J]. Optics Express, 2009, 17(9): 7688-7693.
- [19] Hu S, Rao B, Maslov K, *et al.* Label-free photoacoustic ophthalmic angiography [J]. Optics Letters, 2010, 35(1): 1-3.
- [20] Wang L, Maslov K, Wang L V. Single-cell label-free photoacoustic flowoxigraphy *in vivo* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013, 110(15): 5759-5764.
- [21] Ren H, Brecke K M, Ding Z, *et al.* Imaging and quantifying transverse flow velocity with the Doppler bandwidth in a phase-resolved functional optical coherence tomography [J]. Optics Letters, 2002, 27(6): 409-411.
- [22] Zhao Y, Chen Z, Saxer C, *et al.* Phase-resolved optical coherence tomography and optical Doppler tomography for imaging blood flow in human skin with fast scanning speed and high velocity sensitivity [J]. Optics Letters, 2000, 25(2): 114-116.
- [23] Wang R K, An L. Doppler optical micro-angiography for volumetric imaging of vascular perfusion *in vivo* [J]. Optics Express, 2009, 17(11): 8926-8940.
- [24] Wang R K, Hurst S. Mapping of cerebro-vascular blood perfusion in mice with skin and skull intact by Optical Micro-angiography at 1.3 μm wavelength [J]. Optics Express, 2007, 15(18): 11402-11412.
- [25] Cobbold R S C. Foundations of biomedical ultrasound [M]. New York: Oxford University Press, 2007.
- [26] Fang H, Maslov K, Wang L V. Photoacoustic Doppler effect from flowing small light-absorbing particles [J]. Physical Review Letters, 2007, 99(18): 184501.
- [27] Fang H, Maslov K, Wang L V. Photoacoustic Doppler flow measurement in optically scattering media [J]. Applied Physics Letters, 2007, 91(26): 264103.
- [28] Fang H, Wang L V. M-mode photoacoustic particle flow imaging [J]. Optics Letters, 2009, 34(5): 671-673.
- [29] Chen S L, Ling T, Huang S W, *et al.* Photoacoustic correlation spectroscopy and its application to low-speed flow measurement [J]. Optics letters, 2010, 35(8): 1200-1202.
- [30] Yao J, Wang L V. Transverse flow imaging based on photoacoustic Doppler bandwidth broadening [J]. Journal of Biomedical Optics, 2010, 15(2): 021304.
- [31] Yao J, Maslov K I, Shi Y, *et al.* *In vivo* photoacoustic imaging of transverse blood flow by using Doppler broadening of bandwidth [J]. Optics Letters, 2010, 35(9): 1419-1421.
- [32] Wang L, Maslov K, Yao J, *et al.* Fast voice-coil scanning optical-resolution photoacoustic microscopy [J]. Optics Letters, 2011, 36(2): 139-141.
- [33] Gao G, Yang S, Xing D. Viscoelasticity imaging of biological tissues with phase-resolved photoacoustic measurement [J]. Optics Letters, 2011, 36(17): 3341-3343.
- [34] Zhao Y, Yang S, Chen C, *et al.* Simultaneous optical absorption and viscoelasticity imaging based on photoacoustic lock-in measurement [J]. Optics Letters, 2014, 39(9): 2565-2568.
- [35] Chen C, Zhao Y, Yang S, *et al.* Integrated mechanical and structural features for photoacoustic characterization of atherosclerosis using a quasi-continuous laser [J]. Optics Express, 2015, 23(13): 17309-17315.

- [36] Zhao Y, Chen C, Yang S, *et al.* Mechanical evaluation of lipid accumulation in atherosclerotic tissues by photoacoustic viscoelasticity imaging[J]. *Optics Letters*, 2016, 41(19): 4522-4525.
- [37] Yao J, Wang L V. Photoacoustic microscopy[J]. *Laser & Photonics Reviews*, 2013, 7(5): 758-778.
- [38] Yao D K, Maslov K, Shung K K, *et al.* *In vivo* label-free photoacoustic microscopy of cell nuclei by excitation of DNA and RNA[J]. *Optics Letters*, 2010, 35(24): 4139-4141.
- [39] Zhang C, Cheng Y J, Chen J, *et al.* Label-free photoacoustic microscopy of myocardial sheet architecture [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2012, 17(6): 060506.
- [40] Zhang C, Zhang Y S, Yao D K, *et al.* Label-free photoacoustic microscopy of cytochromes [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2013, 18 (2): 020504.
- [41] Yao J, Maslov K I, Zhang Y, *et al.* Label-free oxygen-metabolic photoacoustic microscopy *in vivo* [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2011, 16 (7): 076003.
- [42] Staley J, Grogan P, Samadi A K, *et al.* Growth of melanoma brain tumors monitored by photoacoustic microscopy[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2010, 15(4): 040510.
- [43] Wang H W, Chai N, Wang P, *et al.* Label-free bond-selective imaging by listening to vibrationally excited molecules [J]. *Physical Review Letters*, 2011, 106(23): 238106.
- [44] Yakovlev V V, Zhang H F, Noojin G D, *et al.* Stimulated Raman photoacoustic imaging [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(47): 20335-20339.
- [45] Jathoul A P, Laufer J, Ogunlade O, *et al.* Deep *in vivo* photoacoustic imaging of mammalian tissues using a tyrosinase-based genetic reporter[J]. *Nature Photonics*, 2015, 9(4): 239-246.
- [46] Brannon-Peppas L, Blanchette J O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004, 56(11): 1649-1659.
- [47] Kim C, Cho E C, Chen J, *et al.* *In vivo* molecular photoacoustic tomography of melanomas targeted by bioconjugated gold nanocages[J]. *ACS Nano*, 2010, 4(8): 4559-4564.
- [48] Cho E C, Kim C, Zhou F, *et al.* Measuring the optical absorption cross sections of Au-Ag nanocages and Au nanorods by photoacoustic imaging[J]. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2009, 113(21): 9023-9028.
- [49] Kim J W, Galanzha E I, Shashkov E V, *et al.* Golden carbon nanotubes as multimodal photoacoustic and photothermal high-contrast molecular agents [J]. *Nature Nanotechnology*, 2009, 4(10): 688-694.
- [50] Yang X, Skrabalak S E, Li Z Y, *et al.* Photoacoustic tomography of a rat cerebral cortex *in vivo* with Au nanocages as an optical contrast agent [J]. *Nano Letters*, 2007, 7(12): 3798-3802.
- [51] Razansky D, Distel M, Vinegoni C, *et al.* Multispectral opto-acoustic tomography of deep-seated fluorescent proteins *in vivo* [J]. *Nature Photonics*, 2009, 3(7): 412-417.
- [52] Zhong J, Yang S, Wen L, *et al.* Imaging-guided photoacoustic drug release and synergistic chemophotacoustic therapy with paclitaxel-containing nanoparticles [J]. *Journal of Controlled Release*, 2016, 226: 77-87.
- [53] Li L, Zemp R J, Lungu G, *et al.* Photoacoustic imaging of lacZ gene expression *in vivo* [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2007, 12(2): 020504.
- [54] Yang S, Ye F, Xing D. Intracellular label-free gold nanorods imaging with photoacoustic microscopy [J]. *Optics Express*, 2012, 20(9): 10370-10375.
- [55] Snook K A, Zhao J Z, Alves C H F, *et al.* Design, fabrication, and evaluation of high frequency, single-element transducers incorporating different materials[J]. *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, 2002, 49 (2): 169-176.
- [56] Huang S W, Chen S L, Ling T, *et al.* Low-noise wideband ultrasound detection using polymer microring resonators[J]. *Applied Physics Letters*, 2008, 92(19): 193509.
- [57] Zhang C, Ling T, Chen S L, *et al.* Ultrabroad bandwidth and highly sensitive optical ultrasonic detector for photoacoustic imaging [J]. *ACS Photonics*, 2014, 1(11): 1093-1098.
- [58] Dong B, Chen S, Zhang Z, *et al.* Photoacoustic probe using a microring resonator ultrasonic sensor for endoscopic applications [J]. *Optics Letters*, 2014, 39(15): 4372-4375.
- [59] Wang Y, Li C, Wang R K. Noncontact photoacoustic imaging achieved by using a low-coherence interferometer as the acoustic detector [J]. *Optics Letters*, 2011, 36(20): 3975-3977.
- [60] Blatter C, Grajciar B, Zou P, *et al.* Intrasweep phase-sensitive optical coherence tomography for noncontact optical photoacoustic imaging[J]. *Optics Letters*, 2012, 37(21): 4368-4370.
- [61] Rousseau G, Blouin A, Monchalain J P. Non-contact

- photoacoustic tomography and ultrasonography for tissue imaging [J]. *Biomedical Optics Express*, 2012, 3(1): 16-25.
- [62] Park S J, Eom J, Kim Y H, *et al.* Noncontact photoacoustic imaging based on all-fiber heterodyne interferometer[J]. *Optics Letters*, 2014, 39(16): 4903-4906.
- [63] Chen Z, Yang S, Wang Y, *et al.* Noncontact broadband all-optical photoacoustic microscopy based on a low-coherence interferometer [J]. *Applied Physics Letters*, 2015, 106(4): 043701.
- [64] Li L, Maslov K, Ku G, *et al.* Three-dimensional combined photoacoustic and optical coherence microscopy for *in vivo* microcirculation studies[J]. *Optics Express*, 2009, 17(19): 16450-16455.
- [65] Wang Y, Maslov K, Kim C, *et al.* Integrated photoacoustic and fluorescence confocal microscopy [J]. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 2010, 57(10): 2576-2578.
- [66] Zhang X, Zhang H F, Jiao S. Optical coherence photoacoustic microscopy: accomplishing optical coherence tomography and photoacoustic microscopy with a single light source[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2012, 17(3): 030502.
- [67] Lin H C A, Chekkoury A, Omar M, *et al.* Selective plane illumination optical and optoacoustic microscopy for postembryonic imaging[J]. *Laser & Photonics Reviews*, 2015, 9(5): L29-L34.
- [68] Li L, Dai C, Li Q, *et al.* Fast subcellular optical coherence photoacoustic microscopy for pigment cell imaging[J]. *Optics Letters*, 2015, 40(19): 4448-4451.
- [69] Chen Z, Yang S, Wang Y, *et al.* All-optically integrated photo-acoustic microscopy and optical coherence tomography based on a single Michelson detector[J]. *Optics Letters*, 2015, 40(12): 2838-2841.
- [70] Chen Z, Yang S, Xing D. Optically integrated trimodality imaging system: combined all-optical photoacoustic microscopy, optical coherence tomography, and fluorescence imaging [J]. *Optics Letters*, 2016, 41(7): 1636-1639.
- [71] Zhou W, Chen Z, Yang S, *et al.* Optical biopsy approach to basal cell carcinoma and melanoma based on all-optically integrated photoacoustic and optical coherence tomography [J]. *Optics Letters*, 2017, 42(11): 2145-2148.
- [72] Xie B K, Liu S J, Wu Y B, *et al.* Dual mode imaging of all-optical non-contact photoacoustic tomography and optical coherence tomography [J]. *Acta Optica Sinica*, 2016, 36(1): 0111001.
- 谢炳凯, 刘少杰, 吴泳波, 等. 全光非接触光声层析及光学相干层析双模成像[J]. *光学学报*, 2016, 36(1): 0111001.
- [73] Song W, Xu Q, Zhang Y, *et al.* Fully integrated reflection-mode photoacoustic, two-photon, and second harmonic generation microscopy *in vivo* [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 32240.
- [74] Li M L, Zhang H F, Maslov K, *et al.* Improved *in vivo* photoacoustic microscopy based on a virtual-detector concept [J]. *Optics Letters*, 2006, 31(4): 474-476.
- [75] Zhang H F, Maslov K, Wang L V. Automatic algorithm for skin profile detection in photoacoustic microscopy [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2009, 14(2): 024050.
- [76] Deng Z, Yang X, Gong H, *et al.* Adaptive synthetic-aperture focusing technique for microvasculature imaging using photoacoustic microscopy [J]. *Optics Express*, 2012, 20(7): 7555-7563.
- [77] Park J, Jeon S, Meng J, *et al.* Delay-multiply-and-sum-based synthetic aperture focusing in photoacoustic microscopy [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2016, 21(3): 036010.
- [78] Tang H, Tang Z, Wu Y, *et al.* Differential photoacoustic microscopy technique [J]. *Optics Letters*, 2013, 38(9): 1503-1505.
- [79] Chen J, Lin R, Wang H, *et al.* Blind-deconvolution optical-resolution photoacoustic microscopy *in vivo* [J]. *Optics Express*, 2013, 21(6): 7316-7327.
- [80] Liang J, Gao L, Li C, *et al.* Spatially Fourier-encoded photoacoustic microscopy using a digital micromirror device [J]. *Optics Letters*, 2014, 39(3): 430-433.
- [81] Murray T W, Haltmeier M, Berer T, *et al.* Super-resolution photoacoustic microscopy using blind structured illumination [J]. *Optica*, 2017, 4(1): 17-22.
- [82] Zhang H F, Maslov K, Wang L V. *In vivo* imaging of subcutaneous structures using functional photoacoustic microscopy [J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(4): 797-804.
- [83] Hu S, Maslov K I, Wang L V. *In vivo* noninvasive monitoring of microhemodynamics using optical-resolution photoacoustic microscopy [J]. *Proceedings of SPIE*, 2009, 7177: 71770H.
- [84] Yao J, Wang L, Yang J M, *et al.* High-speed label-free functional photoacoustic microscopy of mouse brain in action [J]. *Nature Methods*, 2015, 12(5): 407-410.
- [85] Stein E W, Maslov K, Wang L V. Noninvasive, *in*

- in vivo* imaging of blood-oxygenation dynamics within the mouse brain using photoacoustic microscopy[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2009, 14 (2): 020502.
- [86] Yao J, Maslov K I, Wang L V. *In vivo* photoacoustic tomography of total blood flow and potential imaging of cancer angiogenesis and hypermetabolism [J]. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 2012, 11(4): 301-307.
- [87] Oladipupo S S, Hu S, Santeford A C, *et al.* Conditional HIF-1 induction produces multistage neovascularization with stage-specific sensitivity to VEGFR inhibitors and myeloid cell independence [J]. *Blood*, 2011, 117(15): 4142-4153.
- [88] Gutknecht M F, Seaman M E, Ning B, *et al.* Identification of the S100 fused-type protein hornerin as a regulator of tumor vascularity [J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 552.
- [89] Oladipupo S, Hu S, Kovalski J, *et al.* VEGF is essential for hypoxia-inducible factor-mediated neovascularization but dispensable for endothelial sprouting[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(32): 13264-13269.
- [90] Oh J T, Li M L, Zhang H F, *et al.* Three-dimensional imaging of skin melanoma *in vivo* by dual-wavelength photoacoustic microscopy [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2006, 11 (3): 034032.
- [91] Wang Y, Xu D, Yang S, *et al.* Toward *in vivo* biopsy of melanoma based on photoacoustic and ultrasound dual imaging with an integrated detector [J]. *Biomedical Optics Express*, 2016, 7(2): 279-286.
- [92] Krishnamurthy S, Sneige N, Bedi D G, *et al.* Role of ultrasound-guided fine-needle aspiration of indeterminate and suspicious axillary lymph nodes in the initial staging of breast carcinoma[J]. *Cancer*, 2002, 95(5): 982-988.
- [93] Troyan S L, Kianzad V, Gibbs-Strauss S L, *et al.* The FLARE™ intraoperative near-infrared fluorescence imaging system: a first-in-human clinical trial in breast cancer sentinel lymph node mapping[J]. *Annals of Surgical Oncology*, 2009, 16(10):2943-2952.
- [94] Kim C, Song K H, Gao F, *et al.* Sentinel lymph nodes and lymphatic vessels: noninvasive dual-modality *in vivo* mapping by using indocyanine green in rats--volumetric spectroscopic photoacoustic imaging and planar fluorescence imaging [J]. *Radiology*, 2010, 255(2): 442-450.
- [95] Pan D, Pramanik M, Senpan A, *et al.* Near infrared photoacoustic detection of sentinel lymph nodes with gold nanobeacons [J]. *Biomaterials*, 2010, 31(14):4088-4093.
- [96] Alejandro G U, Erpelding T N, Arie K, *et al.* Dual-modality photoacoustic and ultrasound imaging system for noninvasive sentinel lymph node detection in patients with breast cancer [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 15748.
- [97] Novak J, Georgakoudi I, Wei X, *et al.* *In vivo* flow cytometer for real-time detection and quantification of circulating cells [J]. *Optics Letters*, 2004, 29 (1): 77-79.
- [98] Zharov V P, Galanzha E I, Shashkov E V, *et al.* *In vivo* photoacoustic flow cytometry for monitoring of circulating single cancer cells and contrast agents [J]. *Optics Letters*, 2006, 31(24):3623-3625.
- [99] Galanzha E I, Shashkov E V, Spring P M, *et al.* *In vivo*, noninvasive, label-free detection and eradication of circulating metastatic melanoma cells using two-color photoacoustic flow cytometry with a diode laser [J]. *Cancer Research*, 2009, 69 (20): 7926-7934.
- [100] He G, Xu D, Qin H, *et al.* *In vivo* cell characteristic extraction and identification by photoacoustic flow cytography [J]. *Biomedical Optics Express*, 2015, 6(10): 3748-3756.
- [101] Dong X, Yang S, Ying W, *et al.* Noninvasive and high-resolving photoacoustic dermoscopy of human skin[J]. *Biomedical Optics Express*, 2016, 7(6): 2095-2102.
- [102] Ma H, Yang S, Cheng Z, *et al.* Photoacoustic confocal dermoscope with a waterless coupling and impedance matching opto-sono probe [J]. *Optics Letters*, 2017, 42(12): 2342-2345.
- [103] Aguirre J, Schwarz M, Garzorz N, *et al.* Precision assessment of label-free psoriasis biomarkers with ultra-broadband optoacoustic mesoscopy[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2017, 1: 0068.
- [104] Wei Q, Liu T, Jiao S, *et al.* Image chorioretinal vasculature in albino rats using photoacoustic ophthalmoscopy [J]. *Journal of Modern Optics*, 2011, 58(21): 1997-2001.
- [105] Jiao S, Jiang M, Hu J, *et al.* Photoacoustic ophthalmoscopy for *in vivo* retinal imaging [J]. *Optics Express*, 2010, 18(4): 3967-3972.
- [106] Silverman R H, Kong F, Chen Y C, *et al.* High-resolution photoacoustic imaging of ocular tissues [J]. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 2010, 36 (5): 733-742.
- [107] Tian C, Zhang W, Mordovanakis A, *et al.* Noninvasive chorioretinal imaging in living rabbits

- using integrated photoacoustic microscopy and optical coherence tomography[J]. *Optics Express*, 2017, 25(14): 15947-15955.
- [108] Liu X, Liu T, Wen R, *et al.* Optical coherence photoacoustic microscopy for in vivo multimodal retinal imaging[J]. *Optics Letters*, 2015, 40(7): 1370-1373.
- [109] Wu N, Ye S, Ren Q, *et al.* High-resolution dual-modality photoacoustic ocular imaging [J]. *Optics Letters*, 2014, 39(8): 2451-2454.
- [110] Liao L D, Li M L, Lai H Y, *et al.* Imaging brain hemodynamic changes during rat forepaw electrical stimulation using functional photoacoustic microscopy[J]. *Neuroimage*, 2010, 52(2): 562-570.
- [111] Tsytsarev V, Hu S, Yao J, *et al.* Photoacoustic microscopy of microvascular responses to cortical electrical stimulation [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2011, 16(7): 076002.
- [112] Matthews T P, Zhang C, Yao D K, *et al.* Label-free photoacoustic microscopy of peripheral nerves [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2014, 19(1): 016004.
- [113] Zeng L M, Liu G D, Yang D W, *et al.* Compact optical-resolution photoacoustic microscopy system based on a pulsed laser diode[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2014, 41(10): 1004001.
曾吕明, 刘国栋, 杨迪武, 等. 基于脉冲激光二极管的小型化光学分辨式光声显微成像系统 [J]. *中国激光*, 2014, 41(10): 1004001.
- [114] Park K, Kim J Y, Lee C, *et al.* Handheld photoacoustic microscopy probe [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 13359.
- [115] Lai P, Wang L, Tay J W, *et al.* Photoacoustically guided wavefront shaping for enhanced optical focusing in scattering media[J]. *Nature Photonics*, 2015, 9(2): 126-132.
- [116] Conkey D B, Caravaca-Aguirre A M, Dove J D, *et al.* Super-resolution photoacoustic imaging through a scattering wall [J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 7902.
- [117] Deán-Ben X L, Estrada H, Ozbek A, *et al.* Influence of the absorber dimensions on wavefront shaping based on volumetric photoacoustic feedback [J]. *Optics Letters*, 2015, 40(22): 5395-5398.