

# 光学投影断层成像技术及其研究进展

李颖超<sup>1,2,3</sup>, 刘昂<sup>1,2,3</sup>, 李贵叶<sup>1,2,3</sup>, 刘丽娜<sup>1,2,3</sup>, 胡学娟<sup>1,2,3</sup>, 陈玲玲<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>深圳市激光工程重点实验室, 广东 深圳 518060;

<sup>2</sup>深圳大学先进光学精密制造技术省高校重点实验室, 广东 深圳 518060;

<sup>3</sup>深圳大学光电工程学院, 广东 深圳 518060

**摘要** 光学投影断层成像技术是一种新颖的针对毫米至厘米量级的介观尺寸的三维荧光成像技术, 具有经济、快速、分辨率高和成像范围广等优异性能, 是当今生物医学光子学领域的研究热点之一。综述了光学投影断层成像的技术原理、发展研究现状以及其广泛的应用领域, 阐述了不同光学投影断层成像技术的特点。目前光学投影断层成像技术的发展主要集中在系统自身(包括焦平面扫描、角度复用、角度滤波等方法)的改进、后期图像重组算法的改进以及该技术结合多维度荧光成像技术三个方面。通过技术细节的改进和发展, 光学投影断层成像在生物医学、组织形态学和组织病理学、活体成像和荧光标记追踪等研究领域获得广泛应用。

**关键词** 生物光学; 荧光成像; 光学投影断层成像; 滤波反投影算法; 介观成像; 三维成像

中图分类号 O436

文献标识码 A

doi: 10.3788/CJL201845.0307012

## Optical Projection Tomography Technique and Its Research Progress

Li Yingchao<sup>1,2,3</sup>, Liu Ang<sup>1,2,3</sup>, Li Guiye<sup>1,2,3</sup>,  
Liu Lina<sup>1,2,3</sup>, Hu Xuejuan<sup>1,2,3</sup>, Chen Lingling<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Shenzhen Key Laboratory of Laser Engineering, Shenzhen, Guangdong 518060, China;

<sup>2</sup>Key Laboratory of Advanced Optical Precision Manufacturing Technology of Guangdong Higher Education Institutes, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China;

<sup>3</sup>College of Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China

**Abstract** Optical projection tomography (OPT) technique, is a new mesoscopic (from millimeter to centimetre level) three-dimensional fluorescence imaging technique with the advantages of low cost, high speed, high resolution and large imaging depth, and is regarded as a hot spot in biomedical photonics research. We review the principles, research progress, and wide applications of OPT, and present the performances of different OPT techniques. The development of OPT technique is introduced from the view of improvement of OPT system (e.g. focal plane scanning, angular multiplexing, angular filtering), improvement of reconstruction algorithms, and incorporation of multi-dimensional fluorescence imaging techniques. Through the developments, OPT has been widely used in various research fields such as biomedical, morphology, histopathology, *in vivo* imaging, and fluorescence tracking.

**Key words** biotechnology; fluorescence imaging; optical projection tomography; filtered back-projection algorithm; mesoscopic imaging; three-dimensional imaging

**OCIS codes** 170.3880; 110.1758; 110.3010; 110.6955

收稿日期: 2017-09-11; 收到修改稿日期: 2017-11-21

基金项目: 国家自然科学基金(61505112)、深圳市战略新兴产业发展专项资金(JCYJ20150525092941015)、深圳市高端人才启动(827-0000086)、深圳市科技计划基础研究项目(JCYJ20150625101401072)

作者简介: 李颖超(1991—), 女, 硕士研究生, 主要从事生物医疗光子学等方面的研究。E-mail: ychao\_li@163.com

导师简介: 陈玲玲(1985—), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事荧光多维度成像、三维介观光学成像等方面的研究。E-mail: l.chen10@szu.edu.cn(通信联系人)

# 1 引 言

随着近年来现代生命科学和医学等研究领域对毫米至厘米量级的介观系统(如完整的胚胎、体外器官及活体模式动物等)的高精度三维结构和功能信息快速提取需求的日益增长,可应用于生物医学成像领域中的一系列介观三维成像技术发展起来了,包括微型计算机断层扫描技术( $\mu$ CT)<sup>[1]</sup>、微型核磁共振成像技术( $\mu$ MRI)<sup>[2]</sup>、光声断层成像技术(PAT)<sup>[3]</sup>、扩散光学断层成像技术(DOT)<sup>[4]</sup>、光学相干断层成像技术(OCT)<sup>[5]</sup>、光学投影断层成像技术(OPT)<sup>[6]</sup>以及光片成像技术<sup>[7]</sup>等。常见的 $\mu$ CT和 $\mu$ MRI分别基于电离辐射和射频辐射,可对无标记样本进行非侵入式三维成像,具有较高的空间分辨率,可达微米量级。但常见的 $\mu$ CT和 $\mu$ MRI不是光学成像技术,无法利用常见的染色/荧光标记等获取样本的丰富信息。PAT是基于光声效应的一种混合模式成像方法,通常使用激光照射成像部位,利用被吸收的光能转化的热能使组织发生相应的热弹性膨胀并发射宽带超声波,从而通过超声波探测来成像。该技术通常用于观测样本(如小模式动物的脑部、肿瘤等)的三维吸收成像<sup>[8-10]</sup>,也可通过结合其他模式(如分子探针)来实现分子特异性的成像。OCT基于低相干干涉原理,可探测生物系统在不同深度方向的后向反射或散射信号,实现微米量级的三维成像,通常可应用于临床眼科、皮肤科治疗等。DOT主要利用近红外光探测高散射样本的扩散光信息来重建三维图像,但受限于扩散光测量,其空间分辨率较低、图像质量较差。

荧光成像技术具有高灵敏度和分子特异性,在生物、物理、医学、药学等领域获得广泛应用,是现代生物医学研究中重要的研究手段。常见的共聚焦显微<sup>[11]</sup>、双光子<sup>[12]</sup>和多光子<sup>[13]</sup>荧光成像受到光场和扫描速率的限制,通常只能针对厚度为几十至几百微米的微观生物样本进行三维成像,不能满足对介观尺寸内的生物系统进行成像的需求。因此,基于荧光成像的高分辨率介观三维成像技术应运而生,主要包括OPT技术和光片成像技术。DOT也可对散射生物样本进行荧光成像,受散射组织和探测方式的限制,其成像精度较低,一般在毫米量级<sup>[14]</sup>。

OPT技术针对介观样本提供了一种经济、高效、快速的三维吸收/荧光成像,将其与荧光标记、多维度荧光成像、荧光寿命成像(FLIM)<sup>[15]</sup>以及荧光共振能量转移(FRET)<sup>[16]</sup>等技术结合,还可为生物

医学和药学研究提供新的研究手段。近年来,由于OPT及其扩展成像技术可提供介观生物医学样本的结构和功能信息,研究如何优化OPT成像技术及扩展其应用领域已引起了研究人员的兴趣。本文综合介绍OPT技术成像原理,技术发展历程、现状及其在生命科学、医学和药学等研究领域的广泛应用。

## 2 原 理

### 2.1 OPT基本原理和实现方式

OPT是一种光学形式的计算机投影断层成像技术,通过采集一系列在不同角度下的样本的光强度二维投影图像,运用滤波反投影(FBP)算法<sup>[17]</sup>重建样本内部的三维结构信息。OPT有2种成像模式:激发式(eOPT)和透射式(tOPT)。前者是利用可见光光源宽场激发生物样本中的荧光基团来采集荧光图像,后者则是采集可见光的吸收图像。由于OPT成像中光线被近似成平行光投射,故OPT要求成像光学的景深(DOF)至少覆盖样本的一半,同时也要求样本透明。除了自身透明的样本(如斑马鱼胚胎),多数组织样本需利用光学清洗技术(如BABB<sup>[18]</sup>, Scale<sup>[19]</sup>, SeeDB<sup>[20]</sup>, CUBIC<sup>[21]</sup>, UbasM<sup>[22]</sup>等)来进行成像的前期处理,使得样本内折射率匹配,从而减小散射。

实现OPT成像的基本配置如图1所示。在与图1同一配置情况下,当采用不同光源照射样本时,可实现eOPT和tOPT两种成像方式,也体现出OPT技术可实现吸收和荧光成像的快捷性和灵活性。eOPT的荧光成像过程为:为实现平行光均匀照射整个样本,利用散射片使激光光源扩散;将样本浸入匹配液中以减少光子的散射,当激光激发样本时,样本辐射出荧光光子,即荧光信息;控制旋转台,使样本在竖直方向以相同间隔的角度变化旋转;荧光信息在水平方向上聚焦、经过滤波片后被CCD或sCMOS采集。tOPT的成像过程类似于CT,其具体过程为:当采用白光光源从左侧照射样本时,右侧样本中不同组织成分对白光光子具有不同的吸收系数,即吸收信息;信息采集过程与eOPT相同。

OPT系统中横向分辨率 $r$ 和景深 $d_{\text{DOF}}$ 存在着相互制约的关系,光学系统的横向分辨率 $r$ 与数值孔径(NA)成正比,景深 $d_{\text{DOF}}$ 与 $(NA)^2$ 成反比,即

$$r = 0.61n\lambda / NA, \quad (1)$$

$$d_{\text{DOF}} = (1.305n_{\text{bath}}\lambda) / (NA)^2, \quad (2)$$

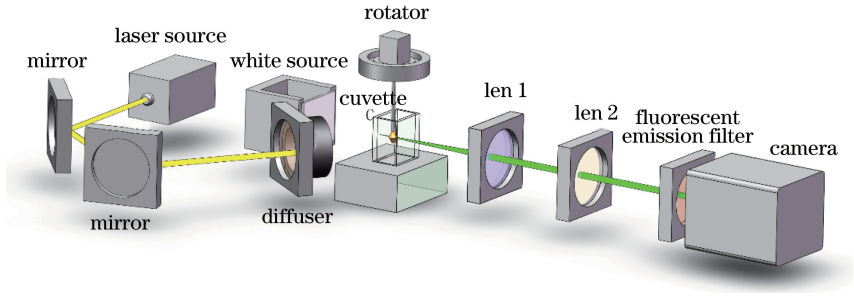


图 1 OPT 成像基本原理图

Fig. 1 Schematic of OPT

式中  $n$  为物镜浸于介质的折射率,  $\lambda$  为光的波长,  $n_{\text{bath}}$  为样本浸入匹配液的折射率。因此, 普遍的权衡方法是调整样本的位置, 使景深覆盖生物样本的前半部分, 此时光学成像系统的焦平面位于样本的前  $1/4$  处, 然后对样本进行  $360^\circ$  的全周投影, 从而可使成像得到优化。

### 2.2 基于平行光投影的滤波反投影重建算法

在样本三维重建算法中, 针对平行光照射, 最常用的算法是基于傅里叶中心切片定理的 FBP 算法, 该算法涉及滤波和反投影两部分。前者是在对每个角度的投影图像的频域做加权; 后者是将滤波后的图像在对应的每个角度进行反投影后再叠加, 从而获得样本的切片信息。如图 2 所示<sup>[17]</sup>, 某样本切片的二维函数为  $i(x, z)$ , 测量得到在平行光下的投影函数  $P_\theta(r)$ ,  $\theta$  是采集投影对应的角度,  $(r, \theta)$  是极坐标, 其中  $r = x \cdot \cos \theta + z \cdot \sin \theta$ 。计算投影函数的傅里叶变换为

$$S_\theta(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} P_\theta(r) \exp(-i2\pi\omega r) dr, \quad (3)$$

式中  $\omega$  为空间频率。将  $S_\theta(\omega)$  乘以一个滤波函数, 可弥补空间频域分量的不均衡采样, 再进行傅里叶逆变换, 将滤波后的投影反投影到相应的角度进行

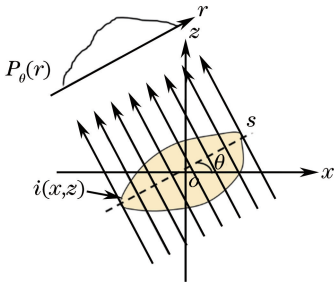


图 2 样本切片二维函数  $i(x, z)$  和在与水平方向呈  $\theta$  角度的平行光下测得的样本投影函数  $P_\theta(r)$

Fig. 2 Two-dimensional function  $i(x, z)$  of slicing sample and its parallel projection  $P_\theta(r)$  measured under a set of parallel rays at angle of  $\theta$

叠加, 最后可得到样本在该切片的 (即平面  $xoz$ ) 强度分布信息。(3) 式展示了傅里叶变换后的投影, 将  $S_\theta(\omega)$  与斜坡滤波函数  $|\omega|$  相乘, 经滤波和傅里叶逆变换后, 再将  $\theta$  的所有后投射叠加后, 得到样本切片的二维函数  $i(x, z)$  为

$$i(x, z) = \int_0^\pi \left[ \int_{-\infty}^{+\infty} S_\theta(\omega) |\omega| \exp(i2\pi r\omega) d\omega \right] d\theta. \quad (4)$$

## 3 OPT 技术发展现状

近年来, 优化 OPT 成像技术和拓展其应用领域的研究已引起研究人员的兴趣, OPT 技术也得到了了一定的发展, 主要包括成像系统本身的改进、算法改进和结合其他新型成像技术的拓展。

### 3.1 系统本身的改进方法

#### 3.1.1 焦平面扫描方法

由于 OPT 要求成像的景深覆盖至少样本的一半, 因此在使用高 NA 透镜获得高分辨率和用低 NA 透镜获得大景深之间需要有一定的权衡。Qin 等<sup>[23-24]</sup> 提出利用扫描穿透样本焦平面的方法采集伪投影, 将伪投影三维重建后得到各向同性的分辨率。使用高 NA 物镜聚焦扫描法可将分辨率提高 10 倍, 使得 OPT 适用于微小样本。Chen 等<sup>[25]</sup> 在此基础上, 提出利用电控调焦透镜实现远程焦扫描 OPT 技术, 消除了移动样本或物镜的必要性, 解决了轴向物镜扫描时速率和稳定性不能兼得的问题。通过增加 NA 可提高空间分辨率、光收集效率和系统采集速率, 并减小光通量, 该方法主要适用于大尺寸的生物样本。这种焦平面扫描的方法打破了空间分辨率和成像范围相互制约的局限性, 大幅拓展了高精度 OPT 的成像范围。

#### 3.1.2 角度复用 OPT 技术

传统的 OPT 利用单轴进行成像, Chen 等<sup>[26]</sup> 提

出角度复用 OPT 技术,利用相互正交的双轴同时在分离的焦平面成像,改善了空间分辨率与景深的不平衡关系,从而提高了空间分辨率和光收集效率,进而提高采集速率、减小光通量。同时,该技术被改进后可实现对介观活体模式动物特征细胞的三维追踪<sup>[27]</sup>,利用依次投影图像之间的时间延迟而非总采集时间,实现其延时分辨。相比较传统的三维定位方法,该技术大幅减少了对样本的光辐射。

### 3.1.3 高动态范围成像技术

传统的 OPT 技术在每个旋转角度采集单张投影图像时,会受到 CCD 相机的动态范围和曝光时间的限制,无法获得具有高异质结吸收特性的生物样本细节信息。Fei 等<sup>[28]</sup>针对此问题,提出在传统 OPT 基础上结合高动态范围成像(HDR)技术,通过采集样本在同一角度下不同曝光时间的投影图像,利用 HDR 技术将同一角度多次曝光的投影图像进行融合和图像重组,得到了未进行化学透明处理的斑马鱼胚胎的吸收成像。此外,根据融合后的投影图像,可获得更清晰的图像细节。该技术优势使得 OPT 在高效、高分辨率的三维活体成像方向有潜在的应用<sup>[29-30]</sup>。

### 3.1.4 螺旋 OPT 技术

针对较长的生物样本(如小鼠的结肠),传统拼接 OPT 技术采用对样本进行分段采集重建再拼接切片图像的方法。Arranz 等<sup>[31]</sup>引入螺旋的概念,提出螺旋 OPT 技术,解决了针对较长生物样本的三维成像。螺旋 OPT 通过将生物样本固定在可以同时实现垂直升降和旋转的平台上,根据从下到上螺旋旋转 360°过程中生物样本所需合适的曝光时间,设定合适的垂直平移速率和旋转速率,从而可采集较长的、完整的生物样本的投影图像,该过程明显减弱了光强,避免光漂白现象,提高了采集速率。

### 3.1.5 流式 OPT 技术

Bassi 等<sup>[32]</sup>引进一种流式 OPT 技术,实现对活体生物组织样本脉管系统的三维成像。该技术可探测细胞在血液中的流动,实现流体标记、动态分析等。该课题组证明了针对未使用任何荧光标记的、透明的以及轻微散射的活体生物样本的血管网,通过流式 OPT 技术可实现活体生物样本的三维光学成像。

### 3.1.6 角域滤波 OPT 技术

生物组织内不同成分的折射率不同,因此成像质量会受到散射光的影响。针对此问题,Vasefi 等<sup>[33-34]</sup>提出一种在传统 OPT 技术基础上结合角域

滤波技术来减少浑浊样本中的散射光。角域滤波 OPT 技术利用光束穿过生物系统的出射光中的弹道光和非弹道光在出射角度上存在差异,通过在样本后放置一个角滤波阵列(AFA),仅允许与光轴方向的夹角为  $0^\circ \sim 0.5^\circ$  的光经过,从而减少了由散射引入的背景噪声。

## 3.2 算法改进

### 3.2.1 频域滤波法

在 OPT 成像系统中,物镜的点扩散函数存在离焦现象,而传统的 FBP 算法并未考虑 OPT 的光学特性。Walls 等<sup>[35]</sup>提出一种基于正弦投影图像的频域与距离关系的频域空间滤波方式以改善传统 FBP 算法,通过利用点扩散函数进行反卷积,可在重组前排除正弦投影图像里高频部分的离焦数据。Chen 等<sup>[36]</sup>提出利用在 FBP 算法过程中结合测量调制传递函数的方法来限制频率只在系统实际允许分布的范围内,以进行反投影重组,从而提高 OPT 投影数据的重组图像质量。该方法更适用于需要低于采样标准的快速采集实验。

### 3.2.2 中心校正算法

Figueiras 等<sup>[37]</sup>提出一种包括照明校正和测定旋转中心的预重组算法,对于现有基于未完成重组切片最大方差值的样本旋转中心的测定方法,该课题组通过检测方差最锐利处的局部极大值来寻找样本旋转中心以改善重组图像质量。Tang 等<sup>[38]</sup>提出将吸收和荧光的正弦图融合以校正样本旋转中心,从而改善重组质量。另外,也可通过模拟多焦成像的计算模型改进 OPT 重组算法<sup>[39]</sup>。

### 3.2.3 相位恢复算法

通过相位恢复插值算法可发现隐藏在复杂层面后的生物样本,当对图像进行三维重组时,可提取穿过散射层的深度信息,深度可多达几个传输平均自由程。基于此方法,Ancora 等<sup>[40]</sup>提出将荧光标记植入生物样本散射层之间,结合相位恢复插值算法和 FBP 重建了果蝇三维图像。

### 3.2.4 迭代收缩/阈值算法

传统 FBP 算法要求用于三维重组的投影图像最少也要几百张,导致 OPT 系统需要一定的采集时间。为缩短采集时间,Rudin 等<sup>[41]</sup>在图像重组中利用全变分(TV)法对 50 张或是更少的投影图像进行三维重建<sup>[42]</sup>。TV 图像降噪技术是将图像降噪转化为能量函数的最小化问题,使图像抑制噪声的同时较好地保留图像的边缘细节。通过两步迭代收缩/阈值算法(TwIST)<sup>[43]</sup>实现最小化全变分。该方

法实现了只采集 32 张投影图像即可重建斑马鱼胚胎的三维结构,使得成像速率得到较大的提高。

### 3.3 结合新型成像技术的拓展

#### 3.3.1 FLIM-OPT 技术

传统 OPT 技术通常局限于强度测量。荧光强度容易受到激发光强度、样品淬灭和荧光分子分布浓度等诸多因素的影响,通常只提供结构信息,难以对其进行定量测量。荧光寿命是指分子受到光激发后返回到基态之前在激发态停留的平均时间,其测量过程不受上述因素的影响,可提供功能信息。2008 年 McGinty 等<sup>[44]</sup>提出将 OPT 技术扩展到 FLIM-OPT,实现介观三维荧光寿命成像,提供了一种对介观样本进行定量测量的全新手段。该技术通过在不同角度下采集不同时间延迟的宽场时间门图像,对每个时间延迟点得到的样本强度信息进行三维重建,通过将每一重建的切片信息迭代拟合成一个单指数衰减函数以决定其荧光寿命。由于其固有比例特质,荧光寿命能有效地抵抗伪影的强度,并产生可进行定量测量的荧光信号。该课题组使用 alexa-488 注入抗体,以神经丝作为靶向标记的小鼠胚胎为样本,实现了三维荧光寿命成像,根据成像结果可清晰地分辨小鼠胚胎的外部标记和自发荧光,特别是从心脏到脊主动脉的部分。2011 年该课题组提出将 FLIM-OPT 应用到活体斑马鱼胚胎<sup>[45]</sup>,实现了对活体模式动物的三维荧光寿命信息的提取,拓展了活体模式动物的多维度荧光定量测量技术。

#### 3.3.2 结合 FRET 的 FLIM-OPT 技术

FRET 技术是探测在活体生物细胞内间距小于 10 nm 的荧光蛋白质分子之间的能量转移。Andrews 等<sup>[46]</sup>将 FLIM-OPT 应用于 FRET 生物传感标记的活体转基因斑马鱼幼虫,实现对其生物结构功能的测量。在此基础上,Kumar 等<sup>[47]</sup>提出将 FLIM-OPT 和角度复用技术结合,实现对成年斑马鱼的活体三维荧光成像。

#### 3.3.3 OPT-选择光片照明显微成像技术

具有高分辨率的选择光片照明显微成像技术 (SPIM)<sup>[6]</sup>是光片显微成像的一种实现手段。Mayer 等<sup>[48]</sup>利用 OPT 和 SPIM 两种技术优势提出 OPT-SPIM,通过将荧光和吸收的三维高分辨率数据集一体化,实现了介观生物样本的更广泛功能结构信息的描述。

#### 3.3.4 偏振灵敏型 OPT 技术

Fang 等<sup>[49-50]</sup>实现了一种偏振灵敏型 OPT 技术,通过使用偏振条件可改善对肌肉纤维的探测和

三维成像。提高系统的采集速率和改善处理过程,能使得肌肉纤维更清晰的显现。针对其他类似纤维状的结构(如心肌层)或其他双折射的生物组织,偏振灵敏型 OPT 技术都可以提供高精度的三维成像。

## 4 OPT 的应用

随着 OPT 技术发展日益成熟,利用 OPT 及其拓展技术(如 FLIM-OPT)的三维荧光成像广泛应用于组织生物学、医学解剖学、免疫组织学、神经学甚至药理学等研究领域,可提取生物系统的结构甚至功能信息。部分应用如图 3 所示<sup>[22,51]</sup>。

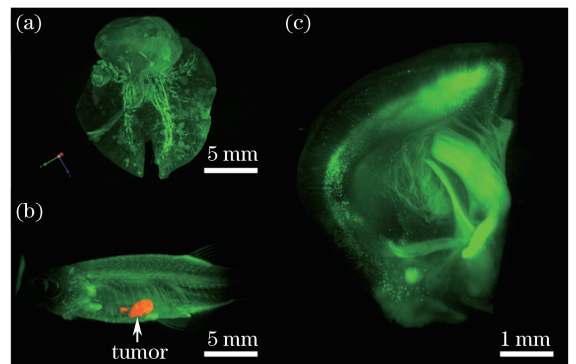


图 3 OPT 三维荧光成像。(a)野生小鼠的心脏和肺部的自发辐射荧光成像;(b)携带肿瘤组织的活体转基因受精 30 天后的成年斑马鱼;(c)转基因小鼠(thy1-YFP)的脑切片  
Fig. 3 Three-dimensional fluorescence imaging of OPT.

- (a) Autofluorescence imaging of mouse heart and lung;  
(b) post fertilization zebrafish with tumor cells living for 30 days;  
(c) brain slice of transgenic mouse (thy1-YFP)

### 4.1 生物医学组织形态和组织病理学研究

OPT 技术最初应用于解剖学研究<sup>[6,52]</sup>,其研究生物样本是固定的、经光学透明处理的生物样本,如小鼠胚胎。OPT 技术也可实现器官和其他生物组织样本的三维成像和可视化研究<sup>[53-57]</sup>。透射光和荧光辐射都可生成三维 OPT 图像。吸收对比度是由内源性发色团和外源标记或染色[如标准苏木精-伊红(H&E)染色]产生,荧光对比度是由染色、基因表达荧光蛋白的外源标记物和内源性荧光基团(如胶原蛋白、弹性蛋白等)产生的。目前已有利用 OPT 技术实现对小鼠胰腺的三维成像的相关报道,利用标准的基于强度的成像技术,可实现对胰腺里含胰岛素  $\beta$  细胞的定量和定位测量<sup>[58-59]</sup>。由于 OPT 技术对生物样本几乎无损伤,也被用作分析组织学和免疫组织化学的辅助标准,可对小鼠动脉血管病变进行三维定量观测<sup>[60]</sup>。

## 4.2 荧光标记追踪

Colas 和 Sharpe 的研究实现了实时对小鼠胚胎的 OPT 成像<sup>[61]</sup>,将 OPT 与成熟的小鼠胚胎技术结合,提出一种荧光标记追踪的方法。通过表面外胚层的组织级别的运动,该课题组建立小鼠四肢的动态生长图像。该样本从 200 个角度成像,每改变 1.8°成像一次,以 15 min 为间隔,可在透射式成像与激发式成像两种模式间相互切换,前者测量器官的整体形状,后者追踪人工标记。该方法可实时记录小鼠胚胎头部的荧光图像,并且重建得到了小鼠头部的虚拟断层图像,在体动态 OPT 成像方面取得了较大的进展。

角度复用拓展的 OPT 技术还被应用在一只具有绿色荧光蛋白标记、尾巴有炎症的斑马鱼胚胎中,通过超过 25.5 min 的观察,可以实现对发炎尾巴里中性粒细胞三维追踪<sup>[27]</sup>。该项追踪技术不但可用于研究在发炎刺激过程里中性粒细胞迁移的表现,还可应用于任何可分辨的、具有荧光特征三维移动的、半透明的介观生物样本。

## 4.3 植物应用

为更深入地了解构成植物生长和发育基础的机制,不仅要求在三维形态学上量化数据,也要求基因活动在多种平台和尺度上。利用 OPT 技术可获得植物样本的三维结构数据<sup>[62]</sup>,该技术可方便地应用在一系列如植物种子、幼苗、叶、花、根茎、植物胚胎、分生组织等多种多样的植物样本。OPT 技术的最大精度是可观测到植物结构里较大的个体细胞。对于如根茎等天然的半透明植物结构,利用 OPT 技术可实现对植物的三维成像。利用外源基因标记技术或整体原位杂交技术,可实现基因表达的三维成像。

此外,有文献已实现将 OPT 技术应用于药物传输系统<sup>[63]</sup>、检测小鼠心肌梗塞<sup>[64]</sup>、量化细胞增殖过程<sup>[65]</sup>等药学和医学领域。

## 5 结束语

OPT 作为一种介观光学成像技术,可利用常见的染色和荧光标记等手段,快速实现对完整生物系统样本的吸收/荧光的高精度三维成像。OPT 可与多维度荧光成像技术结合进行多参数测量,进行对离体/活体模式动物的定性定量研究,具有传统针对微观样本(尺度小于毫米量级)的共聚焦显微、双光子荧光成像等不具备的独特技术优势。OPT 自提出以来,由于其能实现厘米至毫米范围内的快速、经

济、稳定的高分辨三维荧光成像,一直向更高分辨、定性定量的高维度信息(如结合 FRET 的 OPT-FLIM 技术)和更快速图像处理(如频域滤波法)的方向发展,为完整的生物系统样本的结构和功能信息提取提供了新的研究手段。OPT 在基础生命科学领域中有广阔的应用前景,可通过对特定器官的靶向标记进行 OPT 或 OPT 拓展成像,达到对药物疗效评估的目的,因此在医学和药物开发领域也有很好的应用前景。

## 参 考 文 献

- [1] Peters O A, Peters C I, Schönerberger K, *et al.* ProTaper rotary root canal preparation: effects of canal anatomy on final shape analyzed by micro CT [J]. *International Endodontic Journal*, 2003, 36(2): 86-92.
- [2] Yang X, Farquhar T, Burton-Wurster N, *et al.* Diffusion and relaxation mapping of cartilage-bone plugs and excised disks using microscopic magnetic resonance imaging[J]. *Magnetic Resonance in Medicine Official Journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine*, 1994, 31(3): 273-282.
- [3] Wang L V, Hu S. Photoacoustic tomography: in vivo imaging from organelles to organs[J]. *Science*, 2012, 335(6075): 1458-1462.
- [4] Ntziachristos V, Yodh A G, Schnall M, *et al.* Concurrent MRI and diffuse optical tomography of breast after indocyanine green enhancement[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000, 97(6): 2767-2772.
- [5] Huang D, Swanson E A, Lin C P, *et al.* Optical coherence tomography[J]. *Science*, 1991, 254(5035): 1178-1181.
- [6] Sharpe J, Ahlgren U, Perry P, *et al.* Optical projection tomography as a tool for 3D microscopy and gene expression studies[J]. *Science*, 2002, 296(5567): 541-545.
- [7] Huisken J, Swoger J, Bene F D, *et al.* Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy[J]. *Science*, 2004, 305(5686): 1007-1009.
- [8] Yeh C, Li L, Zhu L, *et al.* Dry coupling for whole-body small-animal photoacoustic computed tomography[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2017, 22(4): 041017.
- [9] Liab L, Xiaa J, Lia G, *et al.* Label-free structural photoacoustic tomography of intact mouse brain[C]. *SPIE*, 2015, 9323: 93230M.
- [10] Li L, Zhu L, Shen Y, *et al.* Multiview Hilbert

- transformation in full-ring transducer array-based photoacoustic computed tomography [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2017, 22(7): 076017.
- [11] Pawley J B, Masters B R. Handbook of biological confocal microscopy [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2008, 13(2): 029902.
- [12] Denk W, Strickler J H, Webb W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy [J]. *Science*, 1990, 248(4951): 73-76.
- [13] Larson D R, Zipfel W R, Williams R M, *et al.* Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging *in vivo* [J]. *Science*, 2003, 300(5624): 1434-1436.
- [14] Xu C T, Svenmarker P, Liu H, *et al.* High-resolution fluorescence diffuse optical tomography developed with nonlinear upconverting nanoparticles [J]. *ACS Nano*, 2012, 6(6): 4788-4795.
- [15] Wang X F, Periasamy A, Herman B, *et al.* Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM): instrumentation and applications [J]. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 1992, 23(5): 369-395.
- [16] Clegg R M. Clegg RM fluorescence resonance energy transfer [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1995, 6(1): 103-110.
- [17] Kak A C, Slaney M, Wang G. Principles of computerized tomographic imaging [J]. *Medical Physics*, 2002, 29(1): 107-107.
- [18] Dent J A, Polson A G, Klymkowsky M W. A whole-mount immunocytochemical analysis of the expression of the intermediate filament protein vimentin in *Xenopus* [J]. *Development*, 1989, 105(1): 61-74.
- [19] Hama H, Kurokawa H, Kawano H, *et al.* Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain [J]. *Nature Neuroscience*, 2011, 14(11): 1481-1488.
- [20] Ke M T, Fujimoto S, Imai T. SeeDB: A simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction [J]. *Nature Neuroscience*, 2013, 16(8): 1154-1161.
- [21] Susaki E A, Tainaka K, Perrin D, *et al.* Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis [J]. *Cell*, 2014, 157(3): 726-739.
- [22] Chen L, Li G, Li Y, *et al.* UbasM: An effective balanced optical clearing method for intact biomedical imaging [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 12218.
- [23] Qin M, Hawthorne B, Meyer M, *et al.* Dual modal three-dimensional imaging of single cell using optical projection tomography microscope [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2009, 14(6): 064035.
- [24] Qin M, Jon H, Michael G M, *et al.* Resolution improvement in optical projection tomography by the focal scanning method [J]. *Optics Letters*, 2010, 35(20): 3363-3365.
- [25] Chen L, Kumar S, Kelly D, *et al.* Remote focal scanning optical projection tomography with an electrically tunable lens [J]. *Biomedical Optics Express*, 2014, 5(10): 3367-3375.
- [26] Chen L, Andrews N, Kumar S, *et al.* Simultaneous angular multiplexing optical projection tomography at shifted focal planes [J]. *Optics Letters*, 2013, 38(6): 851-853.
- [27] Chen L, Alexandrov Y, Kumar S, *et al.* Mesoscopic *in vivo* 3-D tracking of sparse cell populations using angular multiplexed optical projection tomography [J]. *Biomedical Optics Express*, 2015, 6(4): 1253-1261.
- [28] Fei P, Yu Z, Wang X, *et al.* High dynamic range optical projection tomography (HDR-OPT) [J]. *Optics Express*, 2012, 20(8): 8824-8836.
- [29] 王晓蕊. 基于相机阵列的光学投影断层成像装置及方法: CN104224127A [P]. 2014-12-24.
- [30] Wang J L, Liao R W, Zeng Y G, *et al.* Three-dimensional imaging of optical projection tomography based on normalized dynamic range-transform [J]. *Acta Optica Sinica*, 2017, 37(5): 0511003.  
王洁琳, 廖日威, 曾亚光, 等. 基于线性化动态范围变换的光学投影层析三维成像 [J]. *光学学报*, 2017, 37(5): 0511003.
- [31] Arranz A, Dong D, Zhu S, *et al.* Helical optical projection tomography [J]. *Optics Express*, 2013, 21(22): 25912-25925.
- [32] Bassi A, Fieramonti L, D'Andrea C, *et al.* *In vivo* label-free three-dimensional imaging of zebrafish vasculature with optical projection tomography [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2011, 16(10): 100502.
- [33] Vasefi F, Ng E, Kaminska B, *et al.* Transmission and fluorescence angular domain optical projection tomography of turbid media [J]. *Applied Optics*, 2009, 48(33): 6448-6457.
- [34] Vasefi F, Kaminska B, Jordan K, *et al.* Angular domain optical projection tomography in turbid media [C]. *SPIE*, 2009, 7174: 71740D.
- [35] Walls J R, Sled J G, Sharpe J, *et al.* Resolution improvement in emission optical projection tomography [J]. *Physics in Medicine and Biology*, 2007, 52(10): 2775-2790.
- [36] Chen L, McGinty J, Taylor H B, *et al.* Improved OPT reconstructions based on the MTF and extension to FLIM-OPT [C]. *Biomedical Optics. Optical Society of America*, 2012: BTu3A. 23.

- [37] Figueiras E, Soto A M, Jesus D, *et al.* Optical projection tomography as a tool for 3D imaging of hydrogels[J]. *Biomedical Optics Express*, 2014, 5(10): 3443-3449.
- [38] Tang X, Van M, Hoogenboom J, *et al.* Fluorescence and bright-field 3D image fusion based on sinogram unification for optical projection tomography[C]. *IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine*, 2017: 16604097.
- [39] Koskela O H, Belay B A, Pursiainen S T, *et al.* Computational model for simulating multifocal imaging in optical projection tomography[C]. *Mathematics in Imaging*, 2017: MTu1C.3.
- [40] Ancora D, Di Battista D, Giasafaki G, *et al.* Phase-retrieved optical projection tomography for 3D imaging through scattering layers[C]. *SPIE*, 2016, 9718: 97181B.
- [41] Rudin L I, Osher S, Fatemi E. Nonlinear total variation based noise removal algorithms[J]. *Physica D: Nonlinear Phenomena*, 1992, 60(1/2/34): 259-268.
- [42] Correia T, Lockwood N, Kumar S, *et al.* Accelerated optical projection tomography applied to *in vivo* imaging of zebrafish[J]. *Plos One*, 2015, 10(8): e0136213.
- [43] Bioucas-Dias J M, Figueiredo M A T. A new TwIST: Two-step iterative shrinkage/thresholding algorithms for image restoration[J]. *IEEE Transactions on Image Processing*, 2007, 16(12): 2992-3004.
- [44] McGinty J, Tahir K B, Laine R, *et al.* Fluorescence lifetime optical projection tomography[J]. *Journal of Biophotonics*, 2008, 1(5): 390-394.
- [45] McGinty J, Taylor H B, Chen L, *et al.* *In vivo* fluorescence lifetime optical projection tomography [J]. *Biomedical Optics Express*, 2011, 2(5): 1340-1350.
- [46] Andrews N, Ramel M C, Kumar S, *et al.* Visualising apoptosis in live zebrafish using fluorescence lifetime imaging with optical projection tomography to map FRET biosensor activity in space and time[J]. *Journal of Biophotonics*, 2016, 9(4): 414-424.
- [47] Kumar S, Lockwood N, Ramel M C, *et al.* *In vivo* multiplexed OPT and FLIM OPT of an adult zebrafish cancer disease model[C]. *Cancer Imaging and Therapy*. Optical Society of America, 2016: CTu4A. 2.
- [48] Mayer J, Robert-Moreno A, Danuser R, *et al.* OPTiSPIM: integrating optical projection tomography in light sheet microscopy extends specimen characterization to nonfluorescent contrasts [J]. *Optics Letters*, 2014, 39(4): 1053-1056.
- [49] Fang M, Dong D, Zeng C, *et al.* Polarization-sensitive optical projection tomography for muscle fiber imaging [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 19241.
- [50] 田捷. 光学投影断层成像的检测方法: CN104865195A[P]. 2015-08-26.
- [51] Chen L. Development of optical projection tomography for mesoscopic 3-D biomedical imaging [D]. London: Imperial College London, 2013: 123-140.
- [52] Sharpe J. Optical projection tomography as a new tool for studying embryo anatomy [J]. *Journal of Anatomy*, 2010, 202(2): 175-181.
- [53] Oldham M, Sakhalkar H, Wang Y, *et al.* Three-dimensional imaging of whole rodent organs using optical computed and emission tomography[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2007, 12(1): 014009.
- [54] Sakhalkar H S, Dewhirst M, Oliver T, *et al.* Functional imaging in bulk tissue specimens using optical emission tomography: fluorescence preservation during optical clearing [J]. *Physics in medicine and biology*, 2007, 52(8): 2035-2054.
- [55] Fisher M E, Clelland A K, Bain A, *et al.* Integrating technologies for comparing 3D gene expression domains in the developing chick limb[J]. *Developmental Biology*, 2008, 317(1): 13-23.
- [56] Kerwin J, Scott M, Sharpe J, *et al.* 3 dimensional modelling of early human brain development using optical projection tomography[J]. *BMC Neuroscience*, 2004, 5(1): 27.
- [57] Freem L J, Escot S, Tannahill D, *et al.* The intrinsic innervation of the lung is derived from neural crest cells as shown by optical projection tomography in Wnt1-Cre; YFP reporter mice [J]. *Journal of Anatomy*, 2010, 217(6): 651-664.
- [58] da Silva Xavier G, Mondragon A, Sun G, *et al.* Abnormal glucose tolerance and insulin secretion in pancreas-specific Tcf7l2-null mice [J]. *Diabetologia*, 2012, 55(10): 2667-2676.
- [59] Hörnblad A, Cheddad A, Ahlgren U. An improved protocol for optical projection tomography imaging reveals lobular heterogeneities in pancreatic islet and  $\beta$ -cell mass distribution[J]. *Islets*, 2011, 3(4): 204-208.
- [60] Kirkby N S, Low L, Wu J, *et al.* Generation and 3-dimensional quantitation of arterial lesions in mice using optical projection tomography [J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2015(99): 50627.
- [61] Colas J F, Sharpe J. Live optical projection



- tomography[J]. *Organogenesis*, 2009, 5(4): 211-216.
- [62] Lee K, Avondo J, Morrison H, *et al.* Visualizing plant development and gene expression in three dimensions using optical projection tomography[J]. *Plant Cell*, 2006, 18(9): 2145-2156.
- [63] Soto A M, Koivisto J T, Parraga J E, *et al.* Optical projection tomography technique for image texture and mass transport studies in hydrogels based on gellan gum [J]. *Langmuir*, 2016, 32(20): 5173-5182.
- [64] Zhao X, Wu J, Gray C D, *et al.* Optical projection tomography permits efficient assessment of infarct volume in the murine heart postmyocardial infarction[J]. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2015, 309(4): H702-H710.
- [65] Lindsey B W, Kaslin J. Optical projection tomography as a novel method to visualize and quantitate whole-brain patterns of cell proliferation in the adult zebrafish brain [J]. *Zebrafish*, 2017, 14(6): 574-577.