・特邀综述、封面文章・

生物组织纤维状结构空间取向的精准表征与应用

刘智毅1*,孟佳1,邱建榕1,韩涛1,王迪1,卓双木2,丁志华1**

1浙江大学光电科学与工程学院现代光学仪器国家重点实验室,浙江杭州 310027;

²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 纤维状结构是生物组织的一种基本结构形式。疾病的发生和演化常常伴随着纤维状结构空间取向的相应 变化。对生物组织内纤维状结构空间取向的定量表征方法和主要应用进行了简单综述,着重介绍了空间取向信息 在几种重要疾病模型中的研究进展,包括伤口愈合、骨关节炎、乳腺癌、腹膜癌扩散、脑损伤等,并在特定的人工组 织模型中探究了组织结构与功能的关系。对生物组织纤维状结构的高灵敏、高精度描述,为研究疾病的发生和演 化提供了新思路和手段,有望实现特定疾病的早期诊断和病理机制的深入理解。最后,对该方法的应用前景进行 了展望。

关键词 医用光学;纤维状结构;空间取向;三维空间结构;骨关节炎;癌症;类脑组织;多光子成像
 中图分类号 O439
 文献标志码 A
 doi: 10.3788/CJL202047.0207002

Accurate Characterization of Spatial Orientations of Fiber-Like Structures in Biological Tissues and Its Applications

Liu Zhiyi^{1*}, Meng Jia¹, Qiu Jianrong¹, Han Tao¹, Wang Di¹, Zhuo Shuangmu², Ding Zhihua^{1**}

¹State Key Laboratory of Modern Optical Instrumentation, College of Optical Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310027, China;

²Key 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 Fiber-like structure is one of the basic structures found in biological tissues. The spatial orientations of fiber-like structures change with the initiation and progression of some diseases. In this study, we present a brief overview of quantitative orientation analysis methods for fiber-like structures within biological tissues and main applications of these methods. We especially focus on the research progress of spatial orientation information in important disease models, including wound healing, osteoarthritis, breast cancer, peritoneal metastasis, and brain injury. Additionally, we explore the relations between tissue structure and function via specific engineered tissues. A highly sensitive and highly accurate description of the fiber-like structures within biological tissues serves as a novel method for studying disease initiation and progression, shows potential for early disease diagnosis, and improves our understanding of the mechanisms underlying some disorders. Finally, future potential applications of the orientation analysis methods are explored.

Key words medical optics; fiber-like structure; spatial orientation; three-dimensional organization; osteoarthritis; cancer; brain-like tissue; multi-photon imaging

OCIS codes 100.2960; 180.4315; 100.6950

收稿日期: 2019-10-08; 修回日期: 2019-11-24; 录用日期: 2019-12-11

基金项目:国家重点研发计划(2017YFA0700501);国家自然科学基金(11974310,61905214,31927801);浙江省自然科学 基金(LR20F050001);中央高校基本科研业务费专项资金(2019QNA5004)

^{*} E-mail: liuzhiyi07@zju.edu.cn; ** E-mail: zh_ding@zju.edu.cn

1 引 言

纤维状结构是生物组织的基本结构形式。胶原 纤维、神经元轴突、纤维状细胞群聚(如成纤维细胞) 等都以纤维状结构的形式存在于生物体内,并在生 命活动中发挥重要作用。疾病的发生与演化,往往 与细胞和细胞外基质(主要是胶原纤维)相互作用的 扰动密切相关^[1-3]。这种扰动将带来一系列的变化, 既包括细胞内部基因调节、骨架结构、分化、生长控 制上的变化^[4-5],也包括胶原纤维机械特性和空间取 向的定量表征就成为了研究疾病,特别是早期病 变的新思路和新手段。通过对这种结构与功能关联 特性的精准描述,人们将更深入地理解各种疾病发 生与演化的机制。

随着光学成像方法的不断进步,特别是随着共 聚焦、多光子成像(包括双光子荧光成像、二次谐波 成像等)在生物组织应用中的普及^[7-8],获取细胞和 细胞外基质中纤维状结构的精细三维图像已成为可 能^[9]。目前,国际上对纤维状结构空间取向的定量 表征大多还停留在二维分析的水平上^[10-11]。但二维 分析方法难以全面、精确地揭示三维结构空间取向 的完整信息,限制了检测的灵敏度。近年来,三维空 间取向的分析方法开始涌现,并成为了二维方法的 重要补充和推进^[12-14]。纤维状结构光学成像及其空间取向的定量描述,已被成功应用于多种疾病的检测和研究,包括伤口愈合、骨关节炎、多种癌症、神经退行性疾病等。

本文综述了近年来本课题组和其他科研团队在 生物组织内纤维状结构空间取向定量描述方面的研 究成果,特别是在三维定量分析方法上的最新进展。 同时,本文还介绍了空间取向信息在多种疾病检测中 的应用,揭示了这一方法对于深入理解生物组织结构 与功能关系的推进作用。最后,本文对纤维状结构空 间取向精准描述的发展前景进行了评述和展望。

2 纤维状结构空间取向的定量表征方法

2.1 纤维状结构二维和三维空间取向的描述

纤维的二维空间取向用方位角 θ 来描述,如图 1(a)所示。红色线代表二维图像中的任意纤维,其 与 x 方向的夹角定义为方位角 θ ,取值范围为[0°, 180°]。而对于纤维的三维空间取向的描述,除了方 位角 θ 外,还需要有极角 φ ,如图 1(b)所示。对于三 维空间中的任一纤维(红色线),其方位角 θ 定义为 其在 xy 平面的投影与 x 方向的夹角,而极角 φ 则 定义为该纤维与-z 方向的夹角。其中, θ 与 φ 的 取值范围均为[0°, 180°]。纤维状结构的二维或三 维空间取向,可由上述角度及其取值范围描述。



图 1 纤维状结构空间取向的定义。(a)纤维的二维取向用单一的方位角 θ 描述; (b)纤维的三维取向用方位角 θ 与极角 φ 共同描述

Fig. 1 Definition of spatial orientation of fiber-like structure. (a) Two-dimensional orientation of fiber is described by a single azimuthal angle θ ; (b) three-dimensional orientation is described by both azimuthal angle θ and polar angle φ

2.2 二维空间取向的计算方法

虽然获取纤维状结构的空间三维图像已成为可能,但当前国际上对它的表征仍以二维分析方法为 主。这里介绍几种比较有代表性的二维取向定量表 征手段。Bancelin等^[15]采用二次谐波成像方法获 得了人体子宫颈活检样本切片的胶原纤维图像,如 图 2(a)所示。二次谐波成像是一种非线性成像技 术,信号来源于成像对象本身,无需外源性标记,可 避免光化学毒性及染色过程中的物理损伤。当成像 对象具有非中心对称性,且成像过程满足相位匹配 条件时,可产生二次谐波信号,其频率为入射光频率 的二倍。其中,胶原纤维是生物组织中的一种内源 性的、具有显著二次谐波信号的介质。进而,该小组 采用形态学开运算获得了胶原纤维的取向信息,开 运算的算子如图 2(b)插图中的柱形所示,它可在二 维平面中连续转动,当纤维取向与算子方向相同时, 纤维图像可获得最大的强度增强。这种方式可获得 胶原纤维图像中每一个像元的空间取向,如图 2(c) 所示。算子越长,角度的计算精度越高,但此时对纤 维曲率的分辨本领越低,因此算子长度的确定需要 权衡这两项指标。傅里叶变换是一种常用的二维取 向计算方法。Sivaguru 等^[16]同样采用二次谐波成 像方法获得了马肌腱的胶原纤维图像,如图 2(d)所 示。基于图像的傅里叶变换谱的取向[图 2(e)],获 得了图像整体或某一个局域的纤维空间取向。特别 地,基于这种局域性的取向,获得了相应图像的二维 取向分布情况[图 2(f)],用以直观地展示纤维的方 向特征。例如,在本例中,二维取向分布的峰值在 140°附近[图 2(f)],与胶原纤维图像的定性特征相 符[图 2(d)]。这种方法的计算速度受限于所选局 域的窗口尺寸。窗口尺寸越小,对图像的划分越细 致,因而对取向的描述越精确,但计算耗时也会相应 增加。同时,傅里叶变换往往要求分析对象为正方 形,这在一定程度上对成像提出了更高的要求。



- 图 2 纤维状结构的二维取向算法。开算子二维取向算法^[15]:(a)子宫颈活检样本胶原纤维的二次谐波图像;(b)胶原纤维 与开算子方向相同时,纤维具有最大的强度,以此作为取向计算的依据;(c)采用开运算获得的胶原纤维的取向图谱。 基于二维傅里叶变换的二维取向算法^[16]:(d)马肌腱胶原纤维的二次谐波图像,其中每个小区域内的箭头代表该区域 的纤维取向;(e)整张图像的傅里叶变换;(f)图像的角度分布柱状图。权重矢量求和二维取向算法^[17]:(g)通过仿真 得到的纤维图像,对其中的一个像元开展取向计算时,选取其周围 7×7 个像元作为计算窗口,则中心像元与其他任 一像元都可构成矢量;(h)对每一个矢量赋予权重,权重因子与矢量长度、强度涨落有关;(i)对赋予权重后的矢量加 和,得到该像元的取向信息
- Fig. 2 Two-dimensional orientation analysis approaches for fiber-like structures. Approach based on opening operator^[15]:
 (a) second harmonic generation (SHG) image of collagen fibers from cervical biopsy section; (b) fibers demonstrate the maximum intensity if they align parallel to the direction of the opening operator; (c) acquired orientation map from the opening operator. Approach based on two-dimensional Fourier transform^[16]: (d) representative SHG image of collagen fibers from the horse tendon, which are divided into a number of regions of interest (ROIs), with the white arrow in each ROI corresponding to the fiber direction; (e) two-dimensional Fourier transform of the entire SHG image; (f) orientation distribution histogram of this representative image. Approach based on weighted vector summation^[17]: (g) simulated fiber image, the orientation of a certain pixel is calculated starting from defining a 7× 7 assessing window surrounding it, with this center pixel and any other one forming a vector; (h) all the vectors are weighted by two factors considering the vector length and the intensity fluctuations along each vector direction; (i) the orientation of the center pixel is finally acquired by the summation of all the weighted vectors

除了上述两种方法外,另一种二维取向的代表 性算法被称为"权重矢量求和法"^[17]。对于纤维强 度图像中的任一像元,权重矢量求和法拟定以该像 元为中心的计算窗口,则窗口内中心像元与其他任 何像元之间都构成一个矢量,如图 2(g)所示。对这 些矢量赋予两项权重因子:一是矢量长度的倒数,二

是沿矢量方向强度涨落的程度,如图 2(h)所示。最 终,通过对所有赋予权重后的矢量进行加和,就可得 到该中心像元的取向,如图 2(i)所示,它与纤维的方 向性吻合得很好。采用这一方法可获得图像中任一 像元的空间取向,该方法的计算效率优于傅里叶变 换方法。

2.3 三维空间取向的计算方法

纤维状结构二维取向信息的获取,在生物组织 疾病检测和表征方面取得了一定的成功。但实际 上,纤维状结构在生物体内的分布是三维的,因此采 用二维分析方法可能会造成信息的误判或缺失,影 响检测的灵敏度。

为了克服二维方法的局限性,近年来一些三维 空间取向的计算方法被陆续报道,并在生物医学领 域取得了成功应用。Lau 等^[18]在之前基于傅里叶 变换的二维取向算法上进一步推广,获得了三维空 间取向信息。简言之,该方法将采用二次谐波方法 获得的猪肌腱纤维的三维图像分成若干个小区域, 如图 3(a)、(b)所示,对每一个小区域进行三维傅里 叶变换,获得相应的傅里叶变换谱;然后,将变换谱 的空间方向与预先设定的三维空间取向数据库进行 比对,并将满足最大似然条件的方向定义为该区域 内纤维的三维空间取向,如图 3(c)所示;根据每个 局域内的三维取向(包括方位角 θ 和极角 φ),可获 得它们各自的分布图,如图 3(d)、(e)所示。参考图 1(b)中 θ 与 φ 的定义, φ 越接近 90°,表明这些胶原 纤维越平行于光学成像面,如图 3(d)所示。而峰值 在 140°附近的 θ 角的分布[图 3(e)]也与图 3(a)中 展现出的纤维的整体分布特征相符。与傅里叶变换 二维取向算法相似,该方法需要在局域的空间尺寸 (该尺寸决定了三维取向的计算精度)与计算效率之 间作出权衡。



- 图 3 纤维状结构的三维取向算法。基于三维傅里叶变换的取向算法^[18]:(a)代表性的猪肌腱纤维的二次谐波图像;(b)纤 维图像的三维重构;(c)基于三维傅里叶变换获得的三维空间各局域的纤维取向;(d)三维图像内φ角的分布;(e)三 维图像内θ角的分布。基于权重矢量求和的三维取向算法^[19]:(f)三维空间纤维取向的角度定义;(g)权重矢量算法 示意图;(h)经权重矢量加和后得到的空间取向;(i)特定平面[图(f)中的绿色平面]的θ角图谱;(j)特定平面[图(f)中的 蓝色平面]的φ角图谱;(k)基于三维取向算法获得的三维方向方差指标,可定量表征纤维状结构的三维空间有序度
- Fig. 3 Three-dimensional (3D) orientation analysis approaches for fiber-like structures. Approach based on 3D Fourier transform^[18]: (a) representative SHG image of porcine tendon; (b) 3D reconstruction of SHG images; (c) acquired 3D orientation in each ROI; (d) distribution histograms of φ; (e) distribution histograms of θ. Approach based on weighted vector summation^[19]: (f) definition of angles in 3D space; (g) illustration of weighted vector summation algorithm; (h) calculated orientation based on summation of the weighted vectors; (i) θ orientation map for the planes marked in green in figure (f); (j) φ orientation map for the planes marked in blue in figure (f); (k) 3D directional variance is acquired based on 3D orientations, which quantifies the spatial organization of fiber-like structures in a 3D context

Liu \$\\$^{[19-20]}\$ 对之前的二维权重矢量求和法进行 了推广,并获取了纤维的三维空间取向信息。其中, 方位角 θ 的计算可直接沿用之前的算法,而计算的 难点在于极角 φ 。本课题组采用的解决方案是基于 角度的转化:对于计算空间中与 θ 对称的另外两个 方位角 β 与 γ ,采用角度关系式 tan² $\varphi = \frac{1}{tan²\beta}$ +

 $\frac{1}{\tan^2 \gamma}$ 来表征极角 φ ,如图 3(f)~(j)所示。这一方法 可以获得三维空间中每一个像元的三维空间取向, 且计算速度比三维傅里叶变换方法提高了近一倍。 基于三维空间取向,Liu等进一步提出了三维方向 方差这一指标[图 3(k)],用以表征纤维状结构的三 维空间有序度,是二维方向方差在三维空间中的延 伸。该指标的取值为 0~1。越接近于 0,表明纤维 状结构越接近于完美的平行分布;越接近于 1,表明 纤维的空间取向越杂乱。三维方向方差可以在不同 的窗口尺寸下展开分析。窗口尺寸可基于研究的具 体目标进行选择,一般而言,小窗口反映的是纤维个 体之间的局域性关联,而大窗口(甚至是三维图像整 体)则反映了大量纤维空间取向的一致性程度。

3 空间取向信息在生物医学中的应用

3.1 伤口愈合

在组织伤口愈合过程中,伴随着胶原纤维空间 结构的相应改变。这种改变是伤口愈合程度的重要 标志,对组织重塑进程的评估和诊疗方案的制定等 具有指导意义。但是,医学上对这种改变的研究大 多依赖于定性观察,缺乏定量的评价标准。Quinn 等^[21]通过计算胶原纤维的二维空间取向和方向方 差,定量比较了结痂组织及其邻近(正常)组织在空 间结构上的差异性。通过在大鼠皮肤上实施三级烧 伤(1 cm²),构建了伤口愈合的生物模型,并在烧伤 后的不同时间点获得了组织的生理切片,进而开展 成像研究,结果如图 4(a)所示。定量分析的结果表 明,结痂组织相比于邻近组织具有更高的胶原纤维 密度[图 4(b)]以及更低的方向方差[图 4(c)],这意 味着伤口愈合过程中新形成的胶原纤维具有很高的 空间取向性。这一研究为结痂组织的特征化识别提 供了定量依据。



- 图 4 空间取向定量表征在伤口愈合中的应用。大鼠皮肤烧伤后的伤口愈合^[21]:(a)烧伤伤口及其邻近组织的病理组织切 片图像;(b)胶原纤维的密度图谱;(c)胶原纤维的二维方向方差图谱,显示出伤口区的纤维有序度高于其邻近组织。 大鼠心肌梗死后的伤口愈合^[22]:(d)~(h)正常心肌以及发生心肌梗死1周、2周、4周、8周后的心肌多光子成像结 果,红色为胶原纤维的二次谐波图像;(i)二维方向方差,胶原纤维的二维取向有序度随着恢复时间逐步优化
- Fig. 4 Applications of orientation analysis in wound healing. Wound healing in rat skin after burns^[21]: (a) image of the histological section of the wound and adjacent tissues; (b) fiber density map; (c) 2D directional variance map, indicating a high level of fiber alignment in the wound region versus adjacent tissues. Wound healing in rats after heart infarction^[22]: multi-photon images of the rat heart (d) before or (e) 1, (f) 2, (g) 4 and (h) 8 weeks post-infarction; (i) 2D directional variance, indicating that fibers become more and more aligned as a function of time

除了研究烧伤后皮肤组织的伤口愈合外, Quinn等^[22]还采用这一方法研究了心肌梗死后伤 口愈合的情况。细胞外基质(主要是胶原纤维)的重 塑是发生心肌梗死后心脏组织恢复的重要内容。正 常的重塑能够修复受损的心肌,从而预防动脉瘤变 形的出现。研究人员通过药物引发大鼠发生心肌梗 死,分别获得了发生心肌梗死后1周、2周、4周、8 周的心脏组织。在实验中对心脏组织进行了去细胞 处理,从而最大限度地去除细胞对胶原纤维成像的 影响。研究人员通过二次谐波成像获得了组织中的 胶原纤维图像[图 4(d)~(h),红色通道],通过双光 子荧光成像获得了胶原纤维中交联(crosslinks)的 自发荧光图像[图 4(d)~(h),蓝色和绿色通道]。 二次谐波图像的二维空间取向和方向方差的定量表 征结果表明,方向方差随着伤口愈合时间序列的延 长而逐渐减小[图 4(i)],即胶原纤维的空间有序度 随愈合时间延长而逐步增强。这种定量化、高精度、 高灵敏的表征方法为心肌梗死后的伤口愈合研究提 供了新思路和手段,对诊疗方案的制定与优化具有 积极的指导作用。

3.2 骨关节炎

骨关节炎是导致慢性残疾最重要的因素,但目前研究人员对于骨关节炎的病理认知还有不少空白,从而限制了骨关节炎治疗方案的确定^[23]。前期的研究表明,骨关节炎的发生和进展,会对端部软骨组织的空间形态产生影响。因此,对这种空间形态变化的高灵敏成像和精准描述,可能为骨关节炎的研究提供新的切入点。Mingalone等^[24]通过半月板切除(DMM)在小鼠中引入了骨关节炎的疾病模型,并对软骨组织的径向切片实施了二次谐波成像,获得了无标记情况下软骨组织的 II 型胶原纤维图像,研究了在骨关节炎手术引入后 1 周、3 周、7 周、10 周时胶原纤维的二维空间有序度特征。实验中小鼠

被分成了三个组别:代表骨关节炎模型的半月板切除组(DMM)、韧带裸露但未切除组(Sham),以及未 经任何手术操作的对照组(NS-Ctrl)。典型的软骨 组织示意图和多光子图像如图 5(a)、(b)所示。根 据细胞和胶原纤维的取向特征,软骨组织可划分成 三个 区 域:表层(superficial zone)、过 渡层 (transitional zone)和深层(radial zone)。通过计算 纤维的二维取向,得到了相应的二维方向方差图谱, 如图 5(c)所示,其中蓝色偏向于更小的方差(更高 的有序度),而红色则与之相反,如图 5(d)所示。定 量统计后发现,由于骨关节炎的引入,软骨组织表层 的胶原纤维发生了空间结构的退化,表现为更高的 方向方差,且在第 3 周和第 10 周表现出了统计学上



图 5 空间取向定量表征在小鼠骨关节炎中的应用^[19.24]。DMM:半月板切除(骨关节炎模型)组;Sham:韧带裸露但未被 切除组;NS-Ctrl:无任何手术操作对照组。(a)软骨组织的结构示意图,显示了软骨组织的分层情况;(b)软骨组织的 多光子图像,其中品红色为胶原纤维的二次谐波图像;(c)由二次谐波图像获得胶原纤维的二维取向,进而获得二维 方向方差图谱;(d)不同样本的二维方向方差图谱;(e)软骨组织各层次中,骨关节炎组织与对照组织的二维方向方差 量值比较。长度标尺:25 μm; * 代表显著性水平 P<0.05

Fig. 5 Application of orientation analysis in osteoarthritis of mice^[19,24]. DMM: destabilization of the medial meniscus (osteoarthritis model); Sham: ligament being exposed but not severed; NS-Ctrl: non-surgery control. (a) Schematic of the cartilage with layered structures; (b) a representative multi-photon image of cartilage, with the magenta signal corresponding to SHG image of collagen fibers; (c) based on the 2D orientations generated from SHG images, the 2D directional variance map is acquired accordingly; (d) the representative 2D directional variance maps for different groups; (e) a comparison of 2D directional variance values between DMM and Sham at different layers. Scale bar: 25 μm. * represents significance level P<0.05

的显著性,如图 5(e)所示。这一发现与之前基于其 他手段(如偏振光成像、核磁共振等)获得的研究结 果相符^[25]。该方法的优势在于,在引入骨关节炎之 后的早期(第 3 周),便发现了这种空间结构的显著 性差异。值得一提的是,在软骨组织的深层,骨关节 炎反而具有更高的空间有序性,表明软骨组织的不 同层次对疾病可能有不同的响应。该研究表明,二 次谐波成像辅以高度定量化的表征是骨关节炎病理 研究的一种高灵敏的新方法,为该疾病治疗方案的 确定提供了有效的参考信息。

3.3 癌 症

胶原纤维的空间结构能够影响生物组织的机械

特性,反过来,机械特性在诸多细胞信号通路中都起 到了重要作用,并最终决定细胞的功能。这种结构 与功能的相互影响在许多癌症的发生和演化中起到 了关键作用。Liu 等^[19]在小鼠的乳腺癌模型中研究 了肿瘤组织与健康组织在胶原纤维三维空间结构上 的差异性。其中,乳腺肿瘤包含人的癌细胞和小鼠 的胶原、成纤维细胞、免疫细胞等,通过离体培养和 移植的方式构建小鼠乳腺癌模型。图 6(a)、(b)展 示了正常和肿瘤组织的多光子成像结果,其中品红 色信号为胶原纤维的二次谐波图像,而绿色信号与 细胞、血管和脂滴的自发荧光相对应。通过重构胶 原纤维的三维图像,并开展三维空间取向分析



- 图 6 三维空间取向定量表征在小鼠乳腺癌中的应用^[19]。(a)正常乳腺组织的多光子图像;(b)肿瘤组织的多光子图像; (c)正常组织多光子图像的三维重构;(f)肿瘤组织多光子图像的三维重构;代表性的(d)正常组织和(g)肿瘤组织中胶 原纤维的二次谐波强度图像,其中插图为胶原空间结构示意图;(e)正常组织的三维方向方差图谱;(h)肿瘤组织的三 维方向方差图谱;(i)两种分析窗口下的三维方向方差定量表征表明肿瘤组织中胶原纤维的三维空间有序度优于正常 组织。(a)、(b)中的长度标尺:100 µm,其他图中的长度标尺:50 µm; * *表示 P<0.001, *表示 P<0.05
- Fig. 6 Application of 3D orientation analysis in the breast cancer in mice model^[19]. (a) Multi-photon image of normal tissue; (b) multi-photon image of tumor tissue; (c) 3D reconstructions of normal tissue; (f) 3D reconstruction of tumor multi-photon image; representative collagen SHG intensity images of (d) normal and (g) tumor tissues, and the insets are schematics of spatial structure of collagen; (e) 3D directional variance map of normal tissue; (h) 3D directional variance map of normal tissue; (i) 3D directional variance assessed by two different window sizes, indicating that the collagen fibers are more aligned in tumor than in normal tissues. Scale bar in (a) and (b): 100 μ m, otherwise: 50 μ m; * represents P < 0.001, * represents P < 0.05

[图 6(c)、(f)]发现,正常组织中的胶原纤维呈篮状 交叉分布,如图 6(d)所示,而肿瘤组织中的胶原纤 维具有螺旋状的形貌特征,如图 6(g)所示。基于三 维取向可获得这两类组织的三维方向方差图谱,如 图 6(e)、(h)所示。其中,肿瘤组织的图谱整体上更 偏向于蓝色,具有更高的空间有序性。这种定性观 测结果进一步验证了定量表征的结果[图 6(i)]。正 如前文在介绍三维方向方差时所述,可选用不同的 窗口尺寸来适应不同的分析需求。在本例中,采用 了两种不同的窗口大小来研究三维方向方差。小窗 口反映了胶原纤维之间的局域取向关系,而大窗口 则对应于整张三维图像,着重考虑图像内所有胶原 纤维的整体取向。两种不同窗口下的分析结果都表 明,肿瘤组织的方向方差更小,胶原纤维的排列更为 有序,如图 6(i)所示。这一发现与之前其他科研团 队的研究结果相符[26]。

除了小鼠的乳腺癌模型,Liu等^[19]也在人体腹 膜癌扩散中研究了癌症发生时组织胶原纤维三维空 间取向的改变。腹腔是胃肠道肿瘤(如胰腺癌等)转 移的常见目标^[27]。受限于灵敏度水平,当前临床医 学上常用的胃肠镜难以在癌症转移的早期发现病 灶,而高分辨、高灵敏的多光子成像与精准表征可能 是实现腹膜癌扩散早期诊断的新途径。Liu等^[19]收 集了正常腹膜组织和胰腺癌组织的活检样本,采用 多光子成像获得了样本的三维胶原纤维图像[品红 色,图7(a)~(d)]。这里的胰腺癌组织样本是发生 癌扩散的腹膜样本的替代,因为临床上发现癌扩散 后不允许再做活检取样,而胰腺癌与腹膜癌扩散也 有着病理特征上的诸多相似性^[28]。图7(e)、(g)与 图7(f)、(h)分别展示了两种样本的代表性的三维



- 图 7 三维空间取向定量表征在人体腹膜癌扩散中的应用^[19]。(a)正常腹膜的多光子图像;(b)胰腺癌组织的多光子图像; (c)正常腹膜多光子图像的三维重构;(d)胰腺癌组织多光子图像的三维重构;(e)正常腹膜的三维方向方差图谱; (g)胰腺癌组织的三维方向方差图谱;(f)正常腹膜三维空间角的分布;(h)胰腺癌组织三维空间角的分布;(i)正常与 肿瘤组织的三维方向方差在不同分析窗口尺寸下的量值比较。长度标尺:100 μm; *表示 P<0.05
- Fig. 7 Application of 3D orientation analysis in human peritoneal metastases^[19]. (a) Multi-photon image of healthy parietal peritoneum; (b) multi-photon image of pancreatic neoplastic tissue; (c) 3D reconstruction of multi-photon image of healthy parietal peritoneum; (d) 3D reconstruction of multi-photon image of pancreatic neoplastic tissue; (e) 3D directional variance map of healthy parietal peritoneum; (g) 3D directional variance map of pancreatic neoplastic tissue; (f) 3D orientation distribution of healthy parietal peritoneum; (h) 3D orientation distribution of pancreatic neoplastic tissue; (i) a comparison of 3D directional variance between healthy parietal peritoneum and pancreatic neoplastic tissue using different window sizes. Scale bar: 100 μm; * represents P<0.05</p>

方向方差图谱和三维空间角分布情况。本例中,方 ddalpha = ddalpha + dda7(f)、(h)]中,并分别以不同的颜色表示。其中,在 肿瘤样本的方位角 θ 的分布中,约35°处有一个峰 值,而正常组织样本则展现出了更宽的双峰分布特 征。方位角θ的分布表明肿瘤组织中的胶原纤维具 有较强的空间取向性,而正常组织中的胶原纤维则 更为杂乱、无序。同时,在极角 φ 的分布上,肿瘤样 本的峰形更尖锐(极角更趋向于 90°),表明在肿瘤 中的胶原纤维相比于正常组织中的纤维更加平行于 光学成像面。与之前乳腺癌分析不同的是,本研究 对三维方向方差的定量分析采用的是不同的计算窗 口尺寸,以此来获得不同局域尺度下胶原纤维的三 维空间有序度,如图 7(i)所示。结果表明,在大于一 定窗口尺寸的情况下,肿瘤组织的三维方向方差更 小,纤维有序化程度更高。这一发现与乳腺癌中的 结果相似。在腹膜癌扩散早期的高灵敏诊断对于癌 症阶段的准确划分、扩散程度的界定以及治疗方案 的确定都具有重要意义。

3.4 脑损伤

上文介绍的应用场景大多是对生物组织胶原纤 维的成像与空间取向分析。除了胶原纤维,神经元 轴突是生物组织内另一种基本的纤维状结构,其空 间取向特征在多种与脑部相关的疾病中同样产生着 相应的变化,并最终影响脑部功能。Liu 等^[19]研究 了人工类脑组织中的神经元轴突在外加应力(脑损 伤)情况下空间取向的改变。该类脑组织的模型被 称为"甜甜圈"结构[29],包括了富含神经元的"类灰 质"区域和只含轴突的"类白质"区域,如图 8(a)所 示。为获得脑损伤模型,对类脑组织实施了"控制皮 质冲击"「图 8(b)],进而对其开展荧光标记和双光 子荧光成像,获得了纤维状神经元轴突的图像,如图 8(c)所示。该研究小组定量研究了损伤与非损伤样 本三维方向方差量值与采样距离(采样点与冲击造 成的损伤位点之间的距离)的关系。结果发现,在距 损伤位点约 250 μm 的范围内,损伤样本的三维方 向方差始终显著高于非损伤样本[图 8(d)]。三维 方向方差随距离变化的研究,一方面印证了冲击应 力对神经元轴突空间结构的破坏,表明受损的神经 元轴突具有空间上更高的紊乱程度;另一方面说明 这种空间结构的改变不仅仅局限于损伤位点,而是 在距损伤位点一定范围内的空间结构都会显著地受 到影响。通过对代表性样本的荧光图像「图 8(e)、 (f)]、三维方向方差图谱[图 8(g)、(h)]和空间角分 布[图 8(i)、(j)]进行定性比较发现,损伤与非损伤 类脑组织样本表现出了不同的形态与取向特征。特 别是神经元轴突空间取向中极角 φ 的分布情况,如 图 8(i)、(j)中的蓝色图谱所示,这表明对于损伤样 品,轴突在0°或180°附近有着更为尖锐的峰形,即 有大量的轴突在损伤情况下会呈现出垂直于光学成 像面分布的情形。局域窗口尺寸下的三维方向方差 定量分析进一步证实了冲击应力导致神经元轴突空 间有序度的退化[图 8(k)],而神经元轴突向光学成 像面垂直方向分布的趋向性很可能是这种空间有序 度退化的重要表现。值得一提的是,当采用整张三 维图像作为分析窗口时,这种显著性差异不复存在 「图 8(k)],这是因为个体神经元轴突之间的局域关 系对空间有序度的影响在更大的分析窗口下被削弱 了。而当该课题组对同样的样品采用二维分析时, 不论是在局域窗口下,还是在整体图像窗口情形下, 都没有获得任何的显著性差异[图 8(1)],这也有力 地论证了三维分析方法相较于二维分析具有更高的 灵敏度。当然,对神经元轴突的空间取向分析不仅 仅限于脑损伤的应用场景,在其他多种脑部疾病(包 括中风、脑部肿瘤和神经退行性疾病等[30])的研究 中都具有潜力。

3.5 人工组织中细胞与细胞外基质的相互作用

细胞与细胞外基质(主要是胶原纤维)的相互作 用最终决定了生物组织的功能,因此对其进行充分、 精准的定量描述对于生物组织研究至关重要。 Sundarakrishnan 等^[31]构建了一种简单的人工组织 模型,用该模型来研究细胞与胶原纤维在空间取向 上的相互影响。他们将来自于人的肺成纤维细胞放 入丝绸与 I 型胶原混合的水凝胶中,在生物反应器 中固定水凝胶的两端,用以模拟 v 方向的外加应力 [图 9(a)],并在播种细胞之后的第1天、第5天、第 10天、第20天开展细胞和胶原纤维的光学成像。 丝绸的加入提高了该人工组织的稳定性与机械可调 性。采用共聚焦成像获得经荧光标记的肺成纤维细 胞的荧光三维图像,采用二次谐波获得胶原纤维的 三维图像。通过对细胞占据的有效像元数开展计 量,发现随着组织培养时间的推移,肺成纤维细胞数 量显著上升[图 9(b)]。而三维方向方差的定量表 征结果表明,肺成纤维细胞与胶原纤维在三维空间 有序度指标上随着时间同步优化,如图 9(c)所示。 这种空间取向上的定量变化与细胞、胶原的代表性 图像高度吻合,如图 9(d)所示。同时,对组织空间 角分布进行研究后发现,随着培养时间的延长,它们



图 8 三维空间取向定量表征在人工类脑组织损伤模型中的应用^[19]。(a)"甜甜圈模型"人工类脑组织示意图;(b)控制性皮 质冲击设备示意图;(c)神经元轴突双光子荧光图像的三维重构;(d)三维方向方差在损伤与非损伤样品中随距离的 变化特征;(e)非损伤样本和(f)损伤样本的神经元轴突双光子荧光图像;(g)非损伤和(h)损伤样本的三维方向方差图 谱;(i)非损伤和(j)损伤样本的三维空间角分布;在不同的分析窗口尺寸下,非损伤与损伤样本的(k)三维方向方差和 (l)二维方向方差。长度标尺:100 μm; *表示 P<0.05

Fig. 8 Application of 3D orientation analysis in the injury model of engineered brain-like tissues^[19]. (a) "Donut model" of engineered brain-like tissues; (b) schematic of the controlled cortical impact set-up; (c) 3D reconstruction of two-photon excited fluorescence (TPEF) image of neuronal axons; (d) 3D directional variance of the uninjured and injured tissues as a function of distance away from the injury site; representative TPEF images of (e) uninjured and (f) injured brain-like tissues; 3D directional variance maps of (g) uninjured and (h) injured brain-like tissues; 3D orientation distributions of (i) uninjured and (j) injured brain-like tissues; at assessing window with different sizes, a comparison of (k) 3D directional variance and (l) 2D directional variance between uninjured and injured brain-like tissues. Scale bar: 100 μm; * represents P<0.05

的峰值愈加集中[图 9(d)],印证了空间取向逐步趋 于一致的定量结果[图 9(c)]。在这项研究中,细胞 与胶原纤维的同步变化表明了组织中两者之间相互 依存、相互作用的关系,且这种相互关系最终影响着 组织的功能性。

除了肺成纤维细胞与细胞外基质的相互作用 外,Liu等^[32]还研究了在人工乳腺组织中,不同的激 素对三维细胞球体空间形态和胶原纤维取向特征的 作用,揭示了组织中的细胞与基质在结构上的相互 影响。他们将乳腺上皮细胞播种进鼠尾 I 型胶原 中,形成具有三维细胞球体的人工乳腺组织模型,然 后采用了三种激素处理方案:1)雌激素(E2);2)雌 激素+普美孕酮(E2+Promegestone);3)雌激素+ 催乳素(E2+Prolactin)。通过对细胞实施荧光标 记,获得了细胞的双光子荧光三维图像,用于再现三 维球体结构[图 10(a)],并采用二次谐波成像获得



图 9 三维空间取向定量表征同时应用于人工组织中的肺成纤维细胞与胶原纤维^[31]。(a)人工组织的培养和三维空间角度 定义示意图;(b)细胞数量随培养时间的变化;(c)肺成纤维细胞(绿色)和胶原纤维(红色)的三维方向方差随时间的 变化;(d)在人工组织培养的不同时间点,肺成纤维细胞和胶原纤维的代表性图像和空间角分布情况。* * * * 表示 P<0.0001; * * 表示 P<0.01; * 表示 P<0.05

Fig. 9 Applications of 3D orientation analysis in pulmonary fibroblasts and collagen fibers in engineered tissues^[31].
(a) Schematic of engineered tissue culture and 3D angle definition; (b) cell spreading as a function of culturing time;
(c) 3D directional variance of pulmonary fibroblasts (green) and collagen fibers (red) as a function of time;
(d) representative images of cells and collagen fibers, as well as distribution histograms of 3D orientations at different time points. * * * * represents P<0.0001; * * represents P<0.01; * represents P<0.05

细胞周围胶原纤维的图像[品红色,图 10(b)、(c)]。 结果发现:在单一雌激素作用下,细胞球体大多呈球 形,或有小幅拉长;在雌激素+普美孕酮的作用下, 细胞球体出现侧向树枝状突出;在雌激素+催乳素 的作用下,细胞球体出现了新的细胞团萌芽。对胶 原纤维开展三维空间取向计算,结果发现,在三种不 同的激素方案下,纤维空间角的分布各具特点,如图 10(d)所示。尤为明显的是,在雌激素的单一作用 下,胶原纤维极角 φ 的分布具有相比于另外两种方 案更为尖锐的峰形[图 10(d)],表明此时的胶原纤 维更加平行于光学切面,在空间中自由延伸的程度 更低。相应地,细胞球体周围区域的胶原纤维的三 维方向方差图谱与角度分布特征很好地吻合,即雌 激素单一作用下最为偏蓝色,对应于最小的方向方 差和最高的空间有序度。与此相反,雌激素+普美 孕酮作用导致了最高程度的胶原纤维杂乱化,而雌 激素+催乳素作用导致的纤维有序度介于前两者之间。尽管如此,正如图 10(e)中的箭头所指,在树枝状突出的端部,出现了局部高度取向化的纤维,与之前的观测结果相符^[33]。



- 图 10 三维空间取向定量表征应用于人工乳腺组织中激素作用的研究^[32]。(a)在三种不同激素的作用下,细胞球体荧光图像的三维重构;(b)包含细胞球体与胶原纤维的人工乳腺组织多光子图像的三维重构;(c)三维重构中的一张具有代表性的图像;(d)胶原纤维的三维空间角分布;(e)在细胞球体外一定范围内,胶原纤维的三维方向方差图谱。长度标尺:50 μm
- Fig. 10 Application of 3D orientation analysis in the study of hormone effects in engineered breast tissues^[32]. (a) 3D reconstructions of TPEF images of cell spheroids in response to different hormone treatments; (b) 3D reconstructions of engineered breast tissues including both cells and collagen fibers; (c) one representative frame from 3D constructions; (d) distribution histograms of 3D orientations under different hormone treatments; (e) 3D directional variance maps of collagen fibers surrounding cell spheroids. Scale bar: 50 μm

这项研究表明,细胞周围胶原纤维的空间取向 与细胞球体的空间形态密切相关。例如,在雌激 素+普美孕酮作用下,纤维取向的整体杂乱很可能 是由细胞体的树枝状突出导致的胶原交错分布造成 的。对胶原纤维三维空间结构的解析,推动了不同 激素作用下细胞-胶原相互作用机制的研究,并将最 终优化乳腺疾病的诊疗。

4 结束语

本文主要介绍了生物组织内纤维状结构空间取 向的定量表征方法,并综述了现有的空间取向信息 的精准描述手段在生物医学中的应用。纤维状结构 空间取向的定量化经历了从二维分析向三维分析的 过渡,由于三维分析相比于二维分析能够更加全面、 准确地再现生物组织的空间形貌,因此在生物医学 领域展现出了巨大的潜力。在应用层面,目前这种 空间取向定量计算方法已经在伤口愈合、骨关节炎、 癌症、脑损伤等疾病模型中获得了可行性验证和初 步应用,并且在多种人工组织中,揭示了细胞与细胞 外基质在结构上的相互影响,这种结构上的特征最 终决定了生物组织的功能性。对取向信息的描述能 够与各种不同的光学成像手段相匹配,包括共聚焦、 二次谐波、双光子荧光成像等。在检测目标上,这种 计算方法涵盖了包括胶原纤维、神经元轴突、纤维状 细胞群聚等生物组织中的任何纤维状结构,展示了 该方法广泛的适用性。需要特别指出的是,虽然目 前已有多种疾病模型展现了正常组织与病态组织在 纤维状结构空间取向和有序度上的显著性差异,但 是,将这一指标直接作为定量病理诊断依据还需要 大量的重复性实验,包括不同组织类别、不同病期的 多方面验证。例如,本文中介绍的癌症应用,包括小 鼠乳腺癌和人的腹膜癌扩散,都给出了肿瘤组织中 胶原纤维空间有序度高于正常组织的结论,但它们 都是在特定的癌症阶段获得的成像与表征结果。事 实上,癌症的发生和演化是一个阶段性的复杂过程, 在不同的阶段可能展现出不同的特征,甚至可能会 出现相反的结果。之前的研究也表明,某些癌症(如 结肠癌)中的胶原纤维将趋向于更加杂乱的空间结 构^[34]。因此,定量诊断指标的最终形成(以癌症为 例),需要获得特定癌症种类在不同病理阶段的纤维 取向和有序度的特征量值,从而获得可作为诊断依 据的不同病理阶段的病理指标阈值。在当前条件 下,空间结构的精准描述与传统医学手段(如作为临 床诊断"金标准"的组织切片方法等)的互补式融合 或许是最为有效的手段。尽管如此,这些前期的疾 病模型纤维状结构空间取向分析,为进一步实现精 细化病理诊断打下了坚实的基础,对于精准医疗具 有重要的参考意义。

与此同时,在生物组织中,还有一些更加微观的 纤维状结构,如细胞微管、应力纤维等,它们的尺寸 大约在亚百纳米范围,在诸多基本生命过程中通过 形态的改变最终决定细胞的功能。过去,受制于光 学成像的分辨率水平,这些微观纤维状结构的空间 取向没有得到充分研究。随着光学超分辨成像手段 的不断发展与完善,对这些微观结构的三维动态高 分辨成像已成为可能。如果将光学超分辨成像手段 进一步与这些空间取向的精准描述方法相结合,将 有可能揭示基本生命过程的一般发展规律,这对于 生命科学的进步将起到积极的作用。事实上,该方 法在材料检测领域同样具有广阔的空间。例如,对 纤维状纳米线的定量表征和反馈,有助于推进制备 手段的评估与改进。可以预见,对空间取向的精准 描述,有望在不同的学科领域,特别是在生物组织一 般规律的揭示方面方面,发挥更大的作用。

参考文献

- [1] Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, et al. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001, 2(11): 793-805.
- [2] Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression [J]. Nature Reviews Cancer, 2002, 2(3): 161-174.
- [3] Abbott N J, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyteendothelial interactions at the blood-brain barrier[J].

Nature Reviews Neuroscience, 2006, 7(1): 41-53.

- [4] Discher D E, Mooney D J, Zandstra P W. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells [J]. Science, 2009, 324 (5935): 1673-1677.
- [5] Zamir E, Katz M, Posen Y, et al. Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts [J]. Nature Cell Biology, 2000, 2(4): 191-196.
- [6] Butcher D T, Alliston T, Weaver V M. A tense situation: forcing tumour progression [J]. Nature Reviews Cancer, 2009, 9(2): 108-122.
- [7] Lin H X, Zuo N, Zhuo S M, et al. Application of multiphoton microscopy in disease diagnosis [J]. Chinese Journal of Lasers, 2018, 45(2): 0207014.
 林宏心,左宁,卓双木,等.多光子显微技术在医学 诊断中的应用[J]. 中国激光, 2018, 45(2): 0207014.
- [8] Li H, Xia X Y, Chen T, et al. Applications of twophoton excitation fluorescence lifetime imaging in tumor diagnosis [J]. Chinese Journal of Lasers, 2018, 45(2): 0207010.
 李慧,夏先园,陈廷爱,等.双光子荧光寿命成像在 肿瘤诊断研究中的应用[J].中国激光, 2018, 45 (2): 0207010.
- [9] Zipfel W R, Williams R M, Webb W W. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences [J]. Nature Biotechnology, 2003, 21 (11): 1369-1377.
- [10] Zemel A, Rehfeldt F, Brown A E X, et al. Optimal matrix rigidity for stress-fibre polarization in stem cells[J]. Nature Physics, 2010, 6(6): 468-473.
- [11] Barnes C, Speroni L, Quinn K P, et al. From single cells to tissues: interactions between the matrix and human breast cells in real time[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e93325.
- [12] Schriefl A J, Zeindlinger G, Pierce D M, et al. Determination of the layer-specific distributed collagen fibre orientations in human thoracic and abdominal aortas and common iliac arteries [J]. Journal of the Royal Society Interface, 2012, 9(71): 1275-1286.
- [13] Altendorf H, Decencière E, Jeulin D, et al. Imaging and 3D morphological analysis of collagen fibrils[J]. Journal of Microscopy, 2012, 247(2): 161-175.
- [14] Napadow V J, Chen Q, Mai V, et al. Quantitative analysis of three-dimensional-resolved fiber architecture in heterogeneous skeletal muscle tissue using NMR and optical imaging methods [J]. Biophysical Journal, 2001, 80(6): 2968-2975.
- [15] Bancelin S, Nazac A, Ibrahim B H, et al.

Determination of collagen fiber orientation in histological slides using Mueller microscopy and validation by second harmonic generation imaging[J]. Optics Express, 2014, 22(19): 22561.

- [16] Sivaguru M, Durgam S, Ambekar R, et al. Quantitative analysis of collagen fiber organization in injured tendons using Fourier transform-second harmonic generation imaging [J]. Optics Express, 2010, 18(24): 24983.
- [17] Quinn K P, Georgakoudi I. Rapid quantification of pixel-wise fiber orientation data in micrographs [J].
 Journal of Biomedical Optics, 2013, 18(4): 046003.
- [18] Lau T Y, Ambekar R, Toussaint K C. Quantification of collagen fiber organization using three-dimensional Fourier transform-second-harmonic generation imaging [J]. Optics Express, 2012, 20 (19): 21821-21832.
- [19] Liu Z Y, Pouli D, Sood D, et al. Automated quantification of three-dimensional organization of fiber-like structures in biological tissues [J]. Biomaterials, 2017, 116: 34-47.
- [20] Liu Z Y, Quinn K P, Speroni L, et al. Rapid threedimensional quantification of voxel-wise collagen fiber orientation[J]. Biomedical Optics Express, 2015, 6 (7): 2294-2310.
- [21] Quinn K P, Golberg A, Broelsch G F, et al. An automated image processing method to quantify collagen fibre organization within cutaneous scar tissue[J]. Experimental Dermatology, 2015, 24(1): 78-80.
- [22] Quinn K P, Sullivan K E, Liu Z Y, et al. Optical metrics of the extracellular matrix predict compositional and mechanical changes after myocardial infarction [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 35823.
- [23] Loeser R F, Goldring S R, Scanzello C R, et al. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ[J]. Arthritis & Rheumatism, 2012, 64(6): 1697-1707.
- Mingalone C K, Liu Z Y, Hollander J M, et al. Bioluminescence and second harmonic generation imaging reveal dynamic changes in the inflammatory and collagen landscape in early osteoarthritis [J]. Laboratory Investigation, 2018, 98(5): 656-669.
- [25] Nieminen M T, Rieppo J, Töyräs J, et al. T2

relaxation reveals spatial collagen architecture in articular cartilage: a comparative quantitative MRI and polarized light microscopic study [J]. Magnetic Resonance in Medicine, 2001, 46(3): 487-493.

- [26] Ambekar R, Lau T Y, Walsh M, et al. Quantifying collagen structure in breast biopsies using secondharmonic generation imaging [J]. Biomedical Optics Express, 2012, 3(9): 2021-2035.
- [27] Schnelldorfer T, Ware A L, Sarr M G, et al. Longterm survival after pancreatoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma [J]. Annals of Surgery, 2008, 247(3): 456-462.
- [28] Whatcott C J, Diep C H, Jiang P, et al. Desmoplasia in primary tumors and metastatic lesions of pancreatic cancer[J]. Clinical Cancer Research, 2015, 21(15): 3561-3568.
- [29] Tang-Schomer M D, White J D, Tien L W, et al. Bioengineered functional brain-like cortical tissue[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111 (38): 13811-13816.
- [30] Hirokawa N, Niwa S, Tanaka Y. Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease [J]. Neuron, 2010, 68(4): 610-638.
- [31] Sundarakrishnan A, Zukas H, Coburn J, et al. Bioengineered *in vitro* tissue model of fibroblast activation for modeling pulmonary fibrosis [J]. ACS Biomaterials Science & Engineering, 2019, 5(5): 2417-2429.
- [32] Liu Z Y, Speroni L, Quinn K P, et al. 3D organizational mapping of collagen fibers elucidates matrix remodeling in a hormone-sensitive 3D breast tissue model[J]. Biomaterials, 2018, 179: 96-108.
- [33] Dhimolea E, Maffini M V, Soto A M, et al. The role of collagen reorganization on mammary epithelial morphogenesis in a 3D culture model [J]. Biomaterials, 2010, 31(13): 3622-3630.
- [34] Birk J W, Tadros M, Moezardalan K, et al. Second harmonic generation imaging distinguishes both highgrade dysplasia and cancer from normal colonic mucosa[J]. Digestive Diseases and Sciences, 2014, 59(7): 1529-1534.