

# 生物医学光声显微成像:技术和应用进展

龙晓云<sup>1,2</sup>, 田超<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学技术大学工程科学学院, 安徽 合肥 230026;

<sup>2</sup>精密科学仪器安徽普通高校重点实验室, 安徽 合肥 230026

**摘要** 光声成像兼具光学成像对比度高和超声成像在深层生物组织中分辨率高等优点,是近年来迅速发展起来的一种生物医学成像模态。光声显微成像(PAM)是光声成像的一种重要实现方式,利用其可以无创提供活体生物组织结构和功能信息的优点,研究人员已开展了临床前和临床应用研究。为了使不同领域的研究人员了解这一快速发展的成像技术,本文综述了光声显微成像的发展现状、最新技术和研究进展。文章首先介绍了 PAM 的基本原理和典型的系统实现,然后概述了包括空间分辨率、成像深度、扫描方式、信号探测手段和多模态成像等方面的重要研究进展,接着阐述了 PAM 在生物医学领域的应用现状,最后总结了其未来发展面临的挑战。

**关键词** 生物医学; 光声成像; 光声显微成像; 多模态; 结构成像; 功能成像; 分子成像

中图分类号 Q631

文献标志码 A

doi: 10.3788/CJL202047.0207016

## Biomedical Photoacoustic Microscopy: Advances in Technology and Applications

Long Xiaoyun<sup>1,2</sup>, Tian Chao<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>School of Engineering Science, University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230026, China;

<sup>2</sup>Key Laboratory of Precision Scientific Instrumentation of Anhui Higher Education Institutes, Hefei, Anhui 230026, China

**Abstract** Combing the advantages of optical and ultrasound imaging, photoacoustic tomography is an emerging, fast growing biomedical imaging modality, possessing high resolution, superb contrast and deep tissue penetration. Photoacoustic microscopy (PAM) is an important embodiment of photoacoustic tomography. It has been extensively studied for preclinical and clinical applications by taking advantage of its ability to provide anatomical and functional information of live bodies noninvasively. To make people better understand the emerging technique, this review reviews the development status, latest technology, and application advances of PAM. We first introduce the working principle and typical system configurations and then discuss major advances in spatial resolution, imaging depth, scanning methods, signal detection methods, and multimodality imaging. Subsequently, we review the current status of biomedical applications of PAM. Finally, technical challenges of PAM in the translation to clinical settings are discussed.

**Key words** biotechnology; photoacoustic tomography; photoacoustic microscopy; multimodality; structural imaging; functional imaging; molecular imaging

**OCIS codes** 170.5120; 170.3880; 110.5120

## 1 引 言

光学显微镜为当代生命科学的研究和发展提供了重要的研究工具。明场显微镜简单易用,是使用最广泛的光学显微镜之一,然而明场图像的对比度

通常较低,需要对样品进行染色。以明场显微镜为基础,衍生出了许多对比度增强的显微成像技术,如暗场、相衬、微分干涉等。其中:暗场显微镜观察到的样品外部轮廓较鲜明,而内部细节较弱;相衬、微分干涉显微镜等可以解析样品的相位信息,但仅适

收稿日期: 2019-10-08; 修回日期: 2019-11-24; 录用日期: 2019-12-02

基金项目: 国家自然科学基金(61705216)、安徽省科技重大专项(18030801138)、中国科学院“百人计划”项目、之江实验室开放课题(2019MC0AB01)、中国科学技术大学青年创新重点基金、中国科学技术大学智慧城市研究院研究课题

\* E-mail: ctian@ustc.edu.cn

用于较薄的样品。生物组织是一种强散射介质,利用光学显微镜观察较厚生物组织的内部结构时会面临巨大挑战。现代光学显微成像技术,如双光子和多光子显微成像技术,可以实现较深生物组织的成像,但成像深度基本在 1 mm 量级。

由于生物组织对超声的散射效应比对光子的散射弱 2~3 个数量级,因此超声成像可以实现深层生物组织的高分辨率成像,但其成像对比度较光学成像差。相比之下,光声显微镜(PAM)通过声学检测可以反映生物组织的光学吸收特性,可在一定程度上克服纯光学显微成像和纯超声成像的局限性,实现对生物组织的高分辨率、高对比度成像。PAM 利用其独特的光学吸收对比机制<sup>[1-2]</sup>,在过去十余年间已经发展成为一种重要的显微成像工具。PAM 已被证明是一种可以利用内源或外源性造影剂进行结构、功能和分子成像的重要的生物医学工具<sup>[1,3-5]</sup>。利用血红蛋白作为内源性吸收体,PAM 已被广泛应用于多种生物医学成像领域,包括血流灌注、氧合成像、肿瘤成像和脑成像等<sup>[6]</sup>。

为了使不同领域的研究人员了解这一快速发展的成像技术,本文综述了光声显微成像技术的发展现状以及最新的应用研究进展。文章首先概述了 PAM 成像的工作原理和实现方式,然后阐述了

PAM 在系统性能提升方面的研究进展,最后从结构、功能、分子成像方面介绍了 PAM 在生物医学中的应用。

## 2 光声显微成像技术

### 2.1 光声成像的原理

光声技术的物理基础是 1880 年 Bell 发现的光声效应,该技术早在 20 世纪 70 年代就已被广泛应用于对各类固体、液体和气体材料的检测<sup>[7-8]</sup>,20 世纪 90 年代初被应用于生物医学成像<sup>[9-10]</sup>,随后引起了生物医学领域研究人员的关注<sup>[11-16]</sup>。光声成像的基本原理如图 1 所示:当生物组织受到脉冲激光辐照后,组织内的吸收体会瞬间吸收激光能量,受热膨胀,产生超声波;利用超声传感器接收超声信号,通过信号和图像处理就可以重建组织内的吸收体分布<sup>[1,11]</sup>。

光声成像技术有多种实现方式,其中两种重要的实现方式是层析成像和显微成像。层析成像利用扩散光激发生物组织,成像深度可至数厘米,空间分辨率可达数十微米<sup>[11]</sup>。显微成像利用聚焦激光激发生物组织或利用聚焦超声传感器检测特定区域内的超声信号,横向分辨率可至微米甚至亚微米<sup>[11]</sup>。

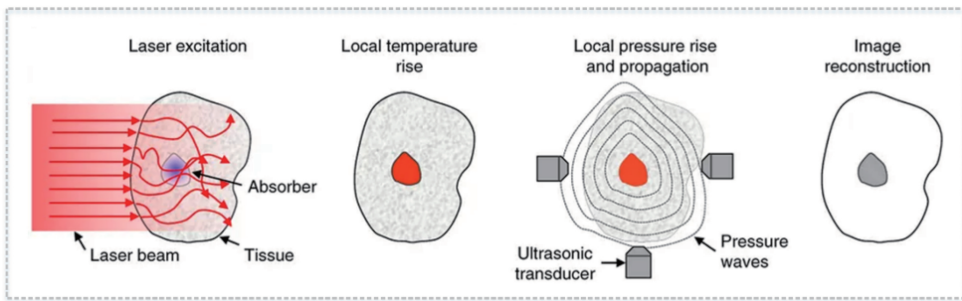


图 1 光声成像的原理示意图<sup>[1]</sup>

Fig. 1 Schematic of photoacoustic imaging<sup>[1]</sup>

### 2.2 光声显微成像的典型实现方式

根据成像系统中光束焦斑与声束焦斑的相对大小,可将光声显微成像分为光学分辨率光声显微成像技术(OR-PAM)和声学分辨率光声显微成像技术(AR-PAM)。

通常,OR-PAM 利用显微物镜将激光聚焦,可以在样品上产生较超声传感器声束焦斑更小的激光光斑,实现更高的横向分辨率。OR-PAM 可以工作在透射模式,也可以工作在反射模式,如图 2(a)、(b)所示。透射模式通常适用于对较薄的生物样品成像,反射模式在活体成像中更为方便<sup>[1]</sup>。图 2(d)

为反射式 OR-PAM 典型成像系统示意图<sup>[17]</sup>。两块通过硅油耦合的棱镜被置于显微物镜下方,保证了声光同轴。在硅油界面处,光学折射率一致,可以保证光束无障碍地通过,而声阻抗失配可以在界面处反射声波。由于超声换能器捕获的声信号包含有深度信息,因此使用二维行列扫描成像探头可以得到样品的三维图像。由于生物组织对激光有强散射作用,因此 OR-PAM 在生物组织中的成像深度约为 1 mm,超过此深度后,横向分辨率便会迅速下降<sup>[18]</sup>。OR-PAM 可以实现基于内源性吸收体的无标记成像。

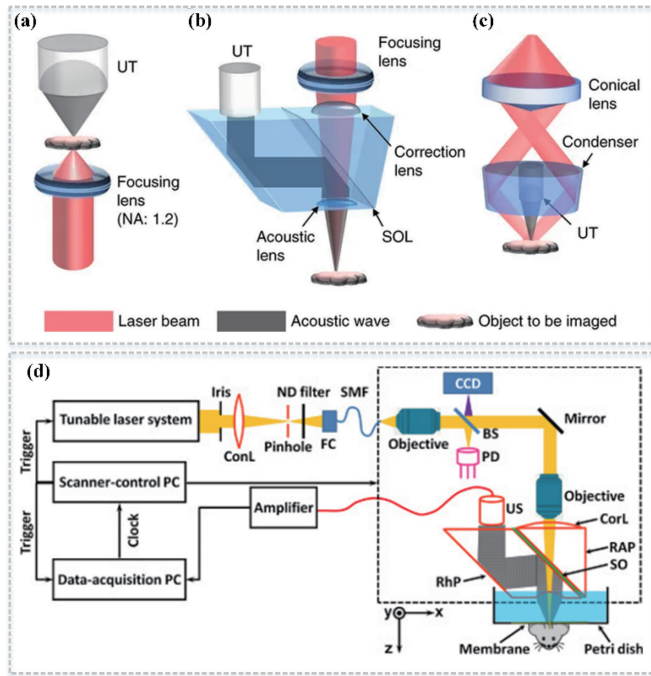


图 2 PAM 成像系统的典型实现方式<sup>[1,17]</sup>。(a)透射式 OR-PAM;(b)反射式 OR-PAM;  
(c)基于暗场照明的 AR-PAM;(d)反射式 OR-PAM 典型系统示意图

Fig. 2 Typical embodiments of PAM<sup>[1,17]</sup>. (a) Transmission-mode OR-PAM; (b) reflection-mode OR-PAM;  
(c) dark-field AR-PAM; (d) schematic of typical OR-PAM

与 OR-PAM 相比,AR-PAM 成像系统中激光照明了样品中相对较大的区域,成像分辨率由超声传感器声学焦斑的大小决定,可以实现较 OR-PAM 更大的成像深度。AR-PAM 通常使用暗场照明,如图 2(c)所示<sup>[1,19]</sup>。表 1 总结了 OR-PAM 和 AR-

PAM 的成像分辨率、成像深度等技术参数<sup>[6,20]</sup>,其中, $\lambda_0$  为入射激光的波长, $NA_O$  为光学显微镜的数值孔径, $\lambda_A$  为声波波长, $NA_A$  为聚焦型超声换能器的数值孔径, $c$  为声速, $B$  为超声换能器的检测带宽。

表 1 OR-PAM 及 AR-PAM 的性能指标<sup>[6,20]</sup>

Table 1 Performance of OR-PAM and AR-PAM<sup>[6,20]</sup>

Category	Lateral resolution	Axial resolution	Penetration depth
OR-PAM	$0.51 \frac{\lambda_0}{NA_O}$	$0.88 \frac{c}{B}$	One optical transport mean free path (~1 mm in soft tissue)
AR-PAM	$0.71 \frac{\lambda_A}{NA_A}$		A few optical transport mean free path

### 3 光声显微成像的技术进展

#### 3.1 横向分辨率

显微镜空间分辨率的提高有助于从更精细的水平上揭示基本生命过程和生命现象的物理本质。OR-PAM 的横向分辨率取决于显微物镜的数值孔径(如表 1 所示),因此可以利用高数值孔径的物镜来聚焦激光束,以提高横向分辨率。

2010 年,Zhang 等<sup>[21]</sup>在透射模式下使用数值孔径  $NA=1.23$  的物镜实现了 220 nm 的横向分辨率,实现了活体小鼠耳部脉管系统及黑色素瘤的无标记

成像,其分辨率可以解析单个红细胞的结构。然而,随着物镜数值孔径的增大,聚焦深度急剧减小,使得系统仅能对较薄的生物组织成像。2012 年出现了一种新型紧凑结构的反射式系统,该系统采用抛物面镜聚焦并反射光声波,在  $NA=0.63$  的物镜下可实现 500 nm 的横向分辨率<sup>[22]</sup>。而后,Song 等<sup>[23]</sup>于 2014 年设计了一种紧密配置的微型高频超声换能器,该换能器使用  $NA=1.0$  的水浸物镜,将反射模式下的横向分辨率提升至 320 nm。此前,Chen<sup>[24]</sup>利用盲反卷积算法,在具有相同数值孔径的物镜下,实现了比传统 OR-PAM 高一倍的横向分辨率,这

种方法不需要对系统的点扩展函数有先验知识, 普适性较高。

近年来, 研究人员相继利用强度依赖的光漂白效应<sup>[25]</sup>、非线性热膨胀及光吸收饱和<sup>[26]</sup>、双光子机制<sup>[27]</sup>、结构光照明<sup>[28]</sup>等非线性策略实现了光声显微的超分辨成像。2014年, Yao等<sup>[25]</sup>将光声技术与强度依赖性光漂白效应相结合, 通过双脉冲激发得到的两次光声信号间的非线性机制来提升PAM的横向、轴向分辨率。对金纳米颗粒成像的结果[如图3(a)所示]表明, 该成像系统的横向分辨率达到了80 nm, 突破了光学衍射极限。除此以外, 实验还证

实了红细胞和黑色素瘤的超分辨率成像, 但该方法的光漂白特性可能会对样品产生潜在的损害。同年, Danielli等<sup>[26]</sup>开发了光声纳米显微技术, 该技术利用一系列能量线性增加的激光脉冲依次激发样品, 光学饱和效应和非线性热膨胀使得每个激光脉冲产生的光声振幅会非线性增大。与线性方案相比, 非线性效应可以提高横向分辨率。该技术可以利用532 nm的激光对成纤维细胞中的线粒体[如图3(c)所示]和单个红细胞进行超分辨率成像, 横向分辨率可达88 nm, 且比传统OR-PAM图像包含了更丰富的细节信息。

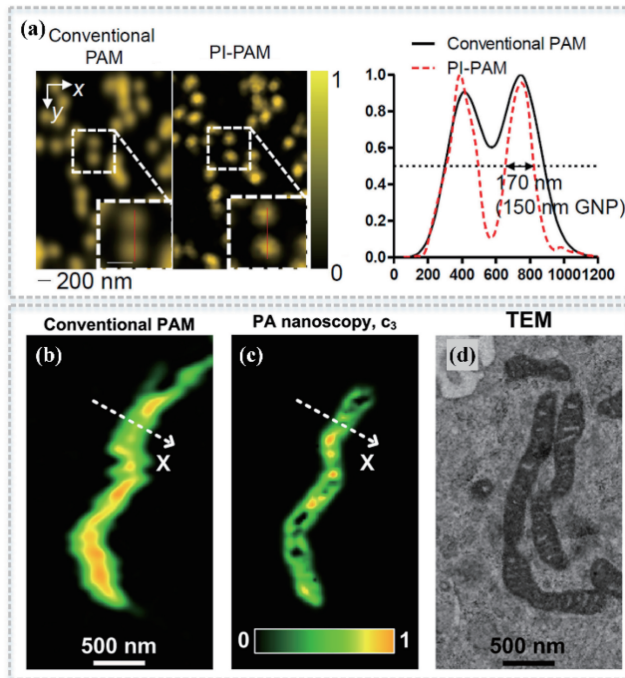


图3 超分辨率光声显微图像<sup>[25-26]</sup>。(a)直径为150 nm的金纳米颗粒的超分辨率PAM图像<sup>[25]</sup>; (b)成纤维细胞中线粒体的传统PAM图像<sup>[26]</sup>; (c)成纤维细胞中线粒体的超分辨率PAM图像<sup>[26]</sup>; (d)成纤维细胞中线粒体的扫描隧道电子显微镜图像<sup>[26]</sup>

Fig. 3 Super-resolution PAM imaging<sup>[25-26]</sup>. (a) Photoimprint-PAM imaging of gold nanoparticles with a diameter of 150 nm<sup>[25]</sup>; (b) imaging of mitochondria in fibroblasts by conventional PAM<sup>[26]</sup>; (c) imaging of mitochondria in fibroblasts by super-resolution PAM; (d) imaging of mitochondria in fibroblasts by transmission electron microscopy

### 3.2 轴向分辨率

受到声学传感器带宽的限制, PAM系统的轴向分辨率通常为数十微米, 弱于系统的横向分辨率, 这使得成像系统的点扩展函数在三维空间中呈现出不对称的形状。提升超声换能器的检测带宽可以提升轴向分辨率。Zhang等<sup>[20]</sup>使用中心频率为125 MHz的超声换能器产生了较高的绝对带宽, 最终实现了7.6 μm的轴向分辨率。此外, 新型光学传感器可以实现超宽带检测, 提升轴向分辨率<sup>[29-31]</sup>。但若若要获得1.5 μm的轴向分辨率, 则要求超声换能

器的带宽大于1 GHz。高频超声的探测面临巨大挑战: 一方面, 对换能器的设计和性能提出了更高的要求; 另一方面, 超声在生物组织中传播时会随频率升高而呈指数衰减, 随着换能器带宽增加, 超声传播距离会减小, 探测灵敏度会降低。除了增加超声换能器的带宽外, 研究人员尝试采用非线性光学效应<sup>[25, 32-34]</sup>和多视图反卷积<sup>[35-37]</sup>等方法来提高PAM成像的轴向分辨率。

当局部光通量足够高时, 在光学聚焦区域内会产生非线性光声过程。2010年, Shelton等<sup>[32]</sup>利用

瞬态吸收提供的光学非线性机制,通过在泵浦和探测光束重合处对光声信号进行频率编码,实现了高达  $6\ \mu\text{m}$  的轴向分辨率,但成像速度较慢,单点成像速率约为  $0.5\ \text{Hz}$ 。2014年,该研究组通过全方位提升成像速度实现了离体红细胞和血涂片中单个红细胞的三维成像,证实系统的轴向分辨率可以达到  $1.5\ \mu\text{m}$ <sup>[33]</sup>。同年,该研究组将泵浦光路和探测光路合并,并采用傅立叶算法进行后处理,将轴向分辨率提高了一个量级<sup>[34]</sup>。此外,Wang等<sup>[38]</sup>基于 Grueneisen 弛豫效应,使用两个激光脉冲依次激发吸收体,结果发现,在第一个脉冲激发之后的热弛豫时间内,Grueneisen 参数的幅值增大,第二个激光脉冲可以激发出更强的光声信号。通过检测两个光声信号之间的非线性幅值差异,可以提高轴向分辨率。

Zhu等<sup>[35]</sup>将多视角反卷积的概念引入到 PAM 成像中,通过旋转样品的方式获取了多个视角的图像,并采用反卷积进行重建,提高了轴向分辨率。Wang等<sup>[37]</sup>通过多角度照明同时获取多个视图,避免了样品旋转带来的数据采集速度较慢等问题,实现了活体小鼠耳部脉管系统的三维各向同性高分辨率成像。

### 3.3 成像深度

在光声显微成像中,随着成像深度增加,样品对光的散射效应逐渐增强,严重影响了成像的空间分辨率。研究人员利用变形镜和空间光调制器等调整光束的波前信息,实现了深层生物组织内的激光聚焦<sup>[39-40]</sup>。Lai等<sup>[41]</sup>结合 Grueneisen 弛豫效应,用非线性光声信号替代线性光声信号作为反馈,利用空间光调制器对入射光不断调整,使得最终透过强散射介质后的光斑聚焦至一个散斑的大小(直径为  $5\sim 7\ \mu\text{m}$ )。

由于超声换能器捕获的光声信号可以反映轴向的深度信息,因此采用二维行列扫描激光可以获得样品的三维体积图像。但高空间分辨率与大景深通常不可兼得,在焦平面外,横向分辨率会迅速降低。为了解决这个问题,Yao等<sup>[42]</sup>在样品上方和下方同时照明来增大成像区域的长度,但该方法仅适用于较薄的生物组织。Hajireza等<sup>[43]</sup>通过结合受激拉曼散射和非消色差物镜的色差产生的多焦点效应,使成像景深扩大了4倍。

2014年,Li等<sup>[44]</sup>将可变焦透镜和 PAM 系统结合开发了一套变焦式光声显微系统,该系统可以实现快速的对焦扫描。与传统的利用压电平台沿深度方向扫描相比,基于变焦物镜的成像方法的速度

较快,在一定程度上避免了运动伪影的产生。然而,可变焦透镜的对焦过程需要一定的时间(约  $15\ \text{ms}$ ),仍然无法满足高速成像的要求。Yang等<sup>[45]</sup>将声梯度折射率镜集成到光声显微成像系统中,通过快速改变超声驻波来调节声梯度折射率镜的聚焦位置,实现了  $3.3\ \mu\text{m}$  横向分辨率、 $750\ \mu\text{m}$  景深的成像,而轴向扫描时间则低至  $1\ \text{ms}$ 。该课题组<sup>[46]</sup>后续又将单个激光脉冲分为三个子脉冲,并将它们引入具有不同长度的三根多模光纤中,获得了具有一定时间间隔的脉冲序列。通过控制脉冲序列的发射时间和声梯度折射率透镜的驱动信号,最终实现了使用单个激光脉冲即可在一次采集中接收深度方向上三个焦点产生的光声信号,在相同时间分辨率的情况下景深较之前扩大了3倍。

贝塞尔光束具有无衍射性,这意味着可以在不牺牲焦点尺寸的情况下扩大景深<sup>[47]</sup>。为了扩大景深,研究人员尝试使用贝塞尔光束取代常规使用的高斯光束,但由于贝塞尔光束周围的旁瓣会产生较强的伪影信号,因而限制了其在 OR-PAM 中的直接应用。Shi等<sup>[48]</sup>基于 Grueneisen 非线性效应消除了贝塞尔光束旁瓣引入的伪影,聚焦区域的长度由此可以拓展至约  $1\ \text{mm}$ ,横向分辨率约为  $7\ \mu\text{m}$ 。但该方法需要使用两台激光器激发非线性光声信号,系统相对复杂。Jiang等<sup>[49]</sup>和 Park等<sup>[50]</sup>尝试结合盲反卷积算法来抑制贝塞尔光束旁瓣引入的伪影,可以将景深拓展至常规景深的 7.4 倍。

Yang等<sup>[51]</sup>将复杂结构光场与 PAM 相结合,提出了一种空间分辨率不变的光声显微成像技术(SIR-PAM)。该技术通过同时调控光场的振幅和相位生成了两个平面波的干涉场,即轴向大小不变的针状光场,以激发光声信号,如图4所示。仿体和活体实验验证了该成像系统可以对轴向  $1.8\ \text{mm}$  区域范围内实现清晰成像,而常规的基于高斯光束的 PAM 只能对焦平面附近区域实现清晰成像。

### 3.4 成像速度

高速光声成像有助于捕捉生物体内快速动力学特征并消除由呼吸和心跳带来的运动伪影。高重复频率激光器和快速扫描机制允许 PAM 追踪单个红细胞的运动轨迹以及血氧饱和度的实时变化<sup>[52]</sup>,描绘小鼠大脑的血流动力学特征<sup>[53]</sup>,并对清醒小鼠大脑皮层的代谢活动进行成像<sup>[54]</sup>。

无论是哪种扫描方式,对于 OR-PAM 而言,成像速度都会受到激光器脉冲重复频率的限制<sup>[55]</sup>。为了实现快速成像,高重复频率(约为  $100\ \text{kHz}$ )的

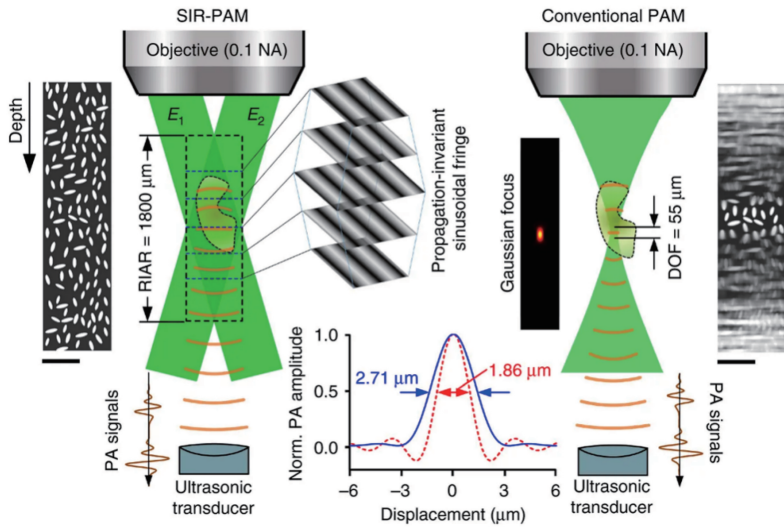


图 4 空间分辨率不变的光声显微成像技术的基本原理<sup>[51]</sup>

Fig. 4 Principle of spatially invariant resolution photoacoustic microscopy<sup>[51]</sup>

激光器被应用于 PAM 成像,但高重复频率激光器的波长调谐面临困难。

传统的 PAM 成像系统主要是基于机械扫描的方法<sup>[56]</sup>,扫描机构体积庞大,扫描速度较慢。以 1 Hz/mm 的线扫描(B scan)速率为例,对 1 mm × 1 mm 的区域进行成像约需 10 min。Qi 等<sup>[57]</sup>于 2017 年提出了可以提高扫描速度的旋转式扫描机制,但采样图案呈非均匀性,因此图像重建需要考虑每个像素点的权重因子。利用音圈电机驱动<sup>[58]</sup>是可以实现快速机械扫描的方法之一,但其扫描速度受限于驱动力的大小和扫描成像探头的重量。

2012 年,Yao 等<sup>[59]</sup>报道了一种基于声光合束器的一维水浸微机电(MEMS)扫描机制。在该机制中,激发光束和超声波被合束器同轴校准,之后经由 MEMS 扫描器转向,最终可以实现 400 Hz 的线扫描速度。然而,另外一个方向仍然需要使用机械平移台进行扫描。在此基础上,Kim 等<sup>[60]</sup>报道了一种二维 MEMS 扫描系统(扫描器件的边长仅为 15 mm,且具有 9 mm 宽的扫描范围,扫描速度较快),该系统为后续小型化及便携式 PAM 系统<sup>[61-63]</sup>的原型,具有较大的应用潜力。

MEMS 扫描器件的体积小,易于集成,但扫描器件的共振频率决定了扫描的稳定性。相比之下,扫描振镜具有较高的稳定性,加之较快的扫描速度,故而受到了研究人员的青睐。在 OR-PAM 中,振镜的扫描方法最初是通过固定超声传感器同时扫描激光束的方法实现的,但这种方法在激光光斑偏离超声传感器视场时无法接收到高信噪比的信号,所以成像视场受到一定限制,信噪比较差<sup>[64-65]</sup>。为了

改善这一现状,Jin 等<sup>[66]</sup>和 Qin 等<sup>[67]</sup>提出了将柱聚焦超声换能器应用于振镜扫描系统的方法,成像视场得到了提高,但灵敏度没有明显改善。随后,Kim 等<sup>[68]</sup>将扫描振镜置于一种非导电的液体超声耦合介质中,采用球形聚焦传感器使声光共聚焦准直,这样可以同时保证扫描速度和成像灵敏度。

Li 等<sup>[55]</sup>和 Song 等<sup>[69]</sup>用超声换能器阵列替代单个传感器,然后使激发光通过微透镜阵列在样品上多焦点聚焦,之后通过换能器阵列接收,如此仅需一维扫描即可获得三维图像,有效提高了扫描速度。值得一提的还有基于多边形镜的扫描机制,Lan 等<sup>[70]</sup>采用高精度直流电机驱动六角镜扫描仪,线扫描速率可以达到 900 Hz,且保证了较高的接收灵敏度,扫描效率可通过增加多边形镜的面数得以进一步提升。

Yang 等<sup>[51]</sup>开发了一种基于高速空间光调制器——数字微镜(DMD)的波前调控技术,该技术通过同时调控光场的振幅和相位,在样品处产生传播不变的正弦条纹分布,实现了在 1.8 mm 轴向范围内横向分辨率基本不变。区别于前述光束空间扫描的方式,该技术通过 DMD 的快速切换实现了高速的光场扫描,经算法重构后可以得到样品的三维图像。在激光器脉冲重复频率为 1 kHz 的情况下,对 180 μm × 180 μm × 1.8 mm 体积成像需要 21 s;当激光器重复频率提升到 DMD 最大的切换频率(22.7 kHz)时,扫描时间可以缩短至 1 s。表 2 整理了上述扫描方法在扫描速度、扫描范围、声光同轴共聚焦性和声学聚焦形式等方面的对比。

表 2 不同扫描方法的对比

Table 2 Comparison of different scanning methods

Ref.	Scanning method	Co-axial	Transducer focusing	Scanning speed	Field of view / (mm×mm)	Laser pulse repetition rate /kHz
[56]	Mechanical	Yes	Spherical	1 Hz/mm	>10×10	-
[58]	Voice-coil	Yes	Spherical	40 Hz/mm	>5×5	4
[60]	MEMS	Yes	Spherical	50 Hz/B-scan	9×4	10
[64]	Galvanometer	No	Spherical	270 Hz/mm	0.15×0.15	100
[67]		No	Sylindrical	50 Hz/B-scan	40×40	100
[68]	Hybrid	Yes	Spherical	250 Hz/B-scan	4×8	50
[55]	Multifocal	Yes	Linear array	~20 Hz/mm	6×5	1.35
[70]	Hexagon mirror	Yes	Spherical	900 Hz/B-scan	>12×10	800
[51]	DMD	Yes	Spherical	0.05 Hz/volumetric scan	0.18×0.18	1

### 3.5 信号探测方式

目前,PAM系统通常使用压电传感器传感光声信号,虽然压电传感器具有易获取、低成本、高灵敏度和强鲁棒性等特点,但同时也存在一些问题。首先,压电传感器的带宽通常有限,无法完全响应宽带的光声信号,信号频率成分的丢失会影响系统灵敏度和轴向分辨率<sup>[11]</sup>;其次,压电传感器的尺寸通常较大且不透光,会影响与其他模态系统的集成;此外,压电传感器通常需要耦合介质,以利于超声信号的传播,这限制了其在某些场合的应用。

利用光学方法探测超声可以解决压电传感器的一些问题,目前已有多种不同的光学方法可以实现超声信号的检测。法布里-珀罗干涉仪能够以非常高的灵敏度探测超声波<sup>[71-72]</sup>,但其带宽通常较小,轴向分辨率较差。光学微环谐振腔<sup>[29-30]</sup>可以实现高达350 MHz带宽的宽带超声探测,但其工作距离较短(通常为几十微米),难以对较厚的生物样品进行成像。此外,低相干干涉仪<sup>[73-74]</sup>、光纤干涉仪<sup>[75]</sup>、 $\pi$ 相移-光纤 Bragg 光栅<sup>[76-77]</sup>等传感器也已被用于光声信号的探测。光学表面波传感属于折射型测量方法,如宽带等离子体检测<sup>[78]</sup>(BPD)、偏振相关反射超声检测<sup>[79]</sup>(PRUD)、基于石墨烯的光声探测<sup>[80]</sup>(GPAD)和表面波等离子体共振传感<sup>[81]</sup>(SPR)等,其主要原理是激发的超声波扰动引起介质折射率发生变化,通过检测光反射率的变化来检测光声信号。其中:BPD<sup>[78]</sup>和 PRUD<sup>[79]</sup>的超声检测灵敏度较差(噪声等效压 > 1.5 kPa),成像信噪比较低;GPAD<sup>[80]</sup>的检测灵敏度和带宽虽然同时得到了改善,但传感器自身容易受到石墨烯材料晶格结构缺陷、层数不均匀等因素的影响<sup>[82-83]</sup>;SPR<sup>[81]</sup>通过正交偏振反射率的差分检测,可以以 477 Pa 的探测灵

敏度实现小鼠耳部血管的高灵敏度成像。

### 3.6 集成多模态光声显微系统

角膜新生血管、黄斑变性、糖尿病视网膜病变和视网膜静脉阻塞等眼科疾病都涉及血管系统异常。基于光学吸收的造影机制,PAM可以提供三维血管的形态、功能和分子信息,在眼科疾病的诊断方面具有一定的应用潜力。自2010年起,研究人员利用光声成像技术实现了一系列与眼部相关的成像,包括血管网络的结构成像<sup>[84-89]</sup>、视网膜血氧新陈代谢速率量化<sup>[90]</sup>和睫状体组织的血氧浓度成像<sup>[91]</sup>等。

光学相干断层扫描(OCT)是目前临床上用于眼科疾病诊断的重要技术。基于低相干光干涉,OCT的成像对比度依赖于眼部组织光学散射特性的差异。OCT不仅可以获取具有高轴向、横向分辨率的眼睛解剖信息,还可以结合多普勒效应定量测量视网膜血管中的血流速度<sup>[92-93]</sup>。OCT血管造影(OCTA)技术所能提供的轴向分辨率(微米量级)优于PAM的轴向分辨率(10  $\mu$ m量级),然而难以提供眼底分子层面的信息<sup>[94-96]</sup>。因此,集成PAM和OCT的技术可以最大限度地发挥两种成像模态的优势,提供更全面的信息,有利于推动眼部病理和眼科疾病诊断方面的研究。Song等<sup>[97-98]</sup>开发了一种集成光声、谱域OCT、眼底荧光血管造影和眼底自发荧光的多模态影像系统,通过该技术可以观察白化病及色素沉积的大鼠和小鼠的视网膜光吸收、光学背向散射和荧光特性。Song等<sup>[90,99]</sup>使用光声和OCT双模态系统对视网膜氧代谢率实现了定量分析,其中PAM可以测得血氧饱和度信息,OCT可以绘制血流信息。Tian等<sup>[4-5,100]</sup>利用PAM和OCT双模态系统得到了活体新西兰白兔眼底高分辨率和高信噪比的脉络膜视网膜图像(如图5所示)以及视

网膜新生血管图像。Zhang 等<sup>[101]</sup>和 Li 等<sup>[102]</sup>利用该成像系统来评估白化病和色素沉积眼底视网膜血

管的生成,实现了对脉络膜新生血管形成过程的监视。

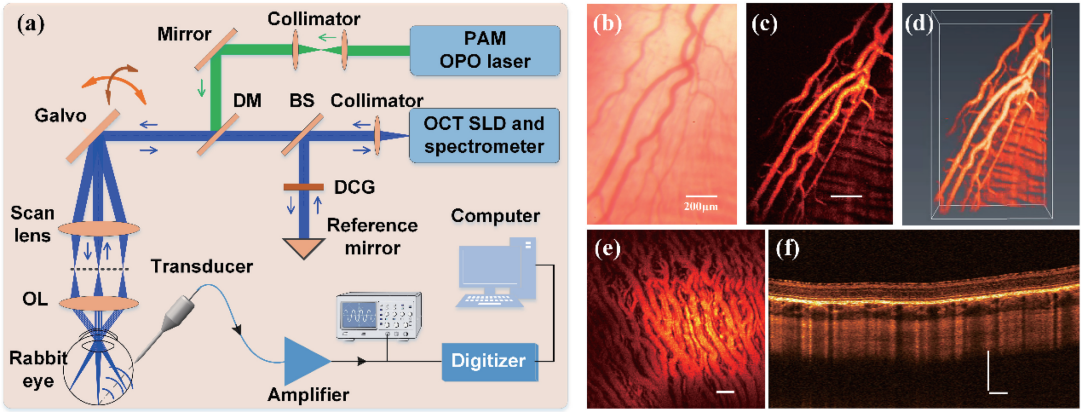


图 5 PAM/OCT 双模态眼底成像<sup>[4]</sup>。(a)系统示意图;(b)活体新西兰白兔的眼底视网膜照片;(c)视网膜光声图像;(d)三维渲染图像;(e)脉络膜光声图像;(f)眼底的 OCT 行扫描图像(B-scan)

Fig. 5 Integrated PAM/OCT for multi-modal chorioretinal imaging<sup>[4]</sup>. (a) System schematic; (b) fundus photo of retina vessels in New Zealand albino rabbit *in vivo*; (c) PAM image of retinal vessels; (d) three-dimensional rendered image of retinal vessels; (e) PAM image of choroidal vessels; (f) OCT B-scan of the fundus

## 4 光声显微成像的应用进展

### 4.1 结构成像

血红蛋白和黑色素在可见光波段有较强的光学吸收,因此是光声成像的理想内源性吸收体。利用光声显微成像可以实现单个红细胞和黑色素瘤细胞的无标记成像。使用高数值孔径物镜<sup>[21, 44]</sup>或超高频的换能器<sup>[103-104]</sup>,可以实现亚微米或亚波

长的成像分辨率,满足单细胞的成像需求。Zhang 等<sup>[21]</sup>使用  $NA = 1.23$  的物镜实现了  $220\text{ nm}$  的横向分辨率,高数值孔径物镜对单细胞的成像能力在离体黑色素瘤细胞[图 6(a)]和红细胞成像中得以证实。黑色素瘤细胞中的黑色素体因含有黑色素而有较强的光吸收,在图 6(a)所示的 PAM 图像中以较亮的白点示出,然而在图 6(b)所示的明场图像中由于对比度较低而难以分辨。此外,PAM 图像中细胞

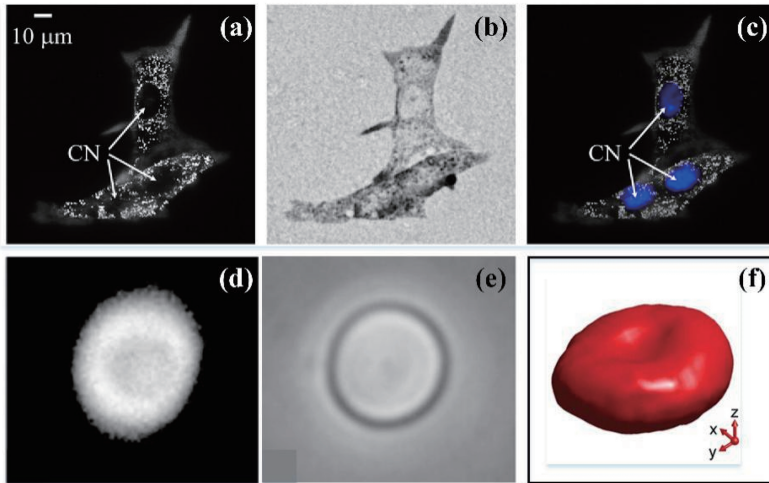


图 6 离体黑色素瘤细胞<sup>[21]</sup>和红细胞<sup>[103-104]</sup>的光声图像。(a)黑色素瘤细胞的光声图像<sup>[21]</sup>;(b)黑色素瘤细胞的明场图像<sup>[21]</sup>;(c)细胞核经染色后的荧光图像与光声图像的合成<sup>[21]</sup>;(d)红细胞的光声图像<sup>[103]</sup>;(e)红细胞的明场图像<sup>[103]</sup>;(f)重构的红细胞的三维光声图像<sup>[104]</sup>

Fig. 6 PAM images of a melanoma cell<sup>[21]</sup> and a red blood cell<sup>[103-104]</sup> *in vitro*. (a) PAM image of a melanoma cell<sup>[21]</sup>; (b) bright field microscopy image of a melanoma cell<sup>[21]</sup>; (c) fluorescence image of the cell nuclei superimposed with the PAM image<sup>[21]</sup>; (d) PAM image of a red blood cell<sup>[103]</sup>; (e) bright field microscopy image of a red blood cell<sup>[103]</sup>; (f) three-dimensional recovered PAM image<sup>[104]</sup>



内部白点所围绕的黑色椭圆形区域对应的是细胞核,其荧光染色图像[图 6(c)中蓝色区域]可以与 PAM 图像很好地融合。Strohm 等<sup>[103]</sup>使用中心频率为 1200 MHz 的超声换能器、数值孔径为 0.25 的物镜和 532 nm 的激光,得到了单个红细胞的高分辨率光声图像,如图 6(d)所示。与图 6(e)相比,光声图像不仅保留了明场光学显微镜图像的主要特征(如红细胞的中心凹陷),还具有显著的图像对比度优势。Dong 等<sup>[104]</sup>采用光学微环谐振腔探测光声信号,实现了横向分辨率为 0.7  $\mu\text{m}$ 、轴向分辨率为 2.1  $\mu\text{m}$  的高分辨率 PAM 成像。超宽的检测带宽(280 MHz)和高的探测灵敏度可以重构红细胞的三维结构[如图 6(f)所示],证实了红细胞的双凹状结构。

微血管系统负责与周围的组织交换氧气、营养物质和新陈代谢产物等<sup>[6]</sup>。利用 PAM 对微血管成像可以为尿毒症、糖尿病和关节炎等疾病提供有价值的生理和病理信息<sup>[105-106]</sup>。PAM 可以对浅表微血管和皮下微血管进行成像<sup>[107-112]</sup>。由于具有丰富的毛细血管网络和较薄的厚度(0.2~0.3 mm)<sup>[56]</sup>,鼠耳是 PAM 成像中常用的生物模型。利用 PAM 对耳部成像不会损失横向分辨率,而且在对毛细血管实现高分辨率成像的同时保持了较高的成像对比度<sup>[105]</sup>。

## 4.2 功能成像

光声成像利用丰富的内源性和外源性造影剂可以进行多样化的功能成像。光声功能成像可以在体血红蛋白总浓度、氧饱和度、氧代谢率、pH 值等生理参数的测量。由于血液中的氧合血红蛋白和脱氧血红蛋白具有不同的光学吸收性质,因此通过利用两种或多种不同波长的激光分别进行成像,可以得到不同的光声信号幅值,进而可以反演氧合血红蛋白和脱氧血红蛋白的浓度,最终得到血红蛋白浓度、氧饱和度等功能性参数。

氧代谢是一项重要的生理过程,可提供营养以维持正常的生命活动<sup>[113]</sup>。红细胞是将氧气输送到对氧有需求的细胞和组织中的基本载体。2013 年, Wang 等<sup>[114]</sup>提出了光声流氧成像,将微米尺度的空间分辨率与毫秒级的时间分辨率相结合,可以实时定量分析单个红细胞在体内的氧气释放过程,实现单个红细胞血红蛋白总浓度、血氧饱和度、血氧饱和度梯度、血流速度及氧释放速率等多个功能参数的光声在体测量,结果如图 7(a)所示。该技术可以促进与高分辨率氧和葡萄糖代谢相关的研究,还可以检测到神经元活动与单个红细胞氧释放之间的关联。光声流氧成像技术有望被用于解释某些疾病的发展过程,如氧气如何输送至正常和病变组织,疾病如何影响全身氧气的输送和消耗等。

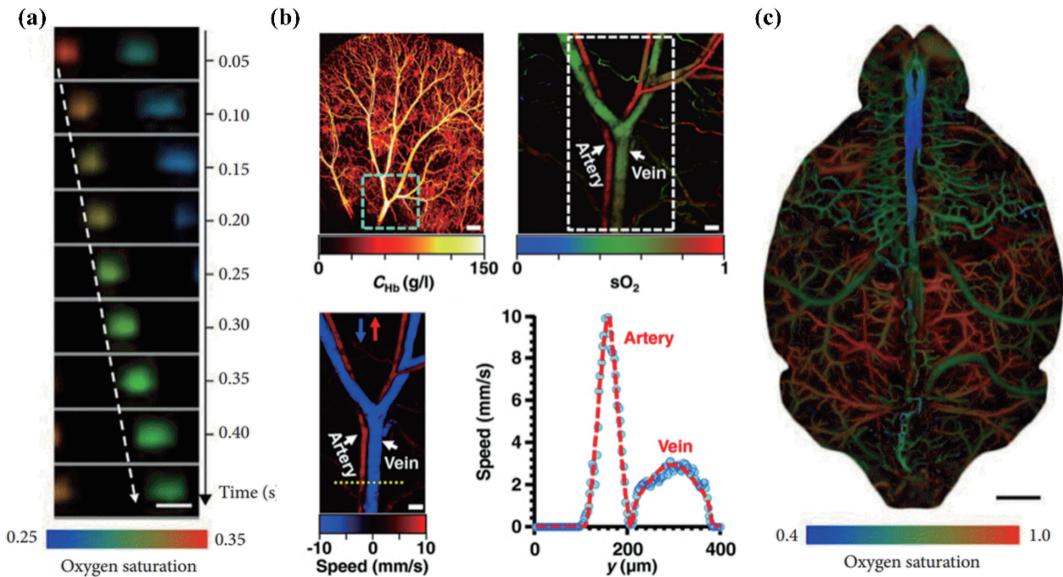


图 7 PAM 功能成像。(a)小鼠大脑中单个红细胞的氧气释放过程<sup>[114]</sup>; (b)小鼠耳部无标记多参数光声显微图像<sup>[113]</sup>, 分别包括血红蛋白总浓度、血氧饱和度、血流速度,以及虚线所示截面上的血流速度; (c)活体小鼠大脑中的血氧饱和度分布<sup>[52]</sup>  
 Fig. 7 Functional PAM imaging. (a) Sequential snapshots of single RBCs releasing oxygen in a mouse brain<sup>[114]</sup>; (b) label-free multi-parameter PAM imaging *in vivo*<sup>[113]</sup>: total concentration of hemoglobin ( $C_{Hb}$ ),  $sO_2$ , blood flow, and profile of blood flow speed across the dashed line, respectively; (c)  $sO_2$  distribution in a mouse brain<sup>[52]</sup>

微血管的功能和代谢 PAM 成像有助于全面了解肿瘤微环境,如新血管形成、缺氧和新陈代谢过程等。Yao 等<sup>[113]</sup>开发的无标记光声显微镜可以同时组织体积、血管横截面面积、血红蛋白浓度、血氧饱和度( $s_{O_2}$ )和血流速度进行定量测量,结果如图 7(b)所示,进而通过计算可以得到氧代谢率。

大脑是人体组织器官中占比小但耗氧量大的器官,脑组织几乎完全依赖于葡萄糖的有氧代谢供能,因此对氧的缺乏极度敏感,长时间缺氧会导致脑组织发生不可逆的损伤。2015 年,Yao 等<sup>[52]</sup>使用一维 MEMS 扫描对颅骨完整状态下的小鼠的整个大脑进行了快速功能成像,实现了对皮层单根血管血流量、氧摄取分数和氧代谢率的定量测量[如图 7(c)所示],并观察了电刺激小鼠后肢引起的脑部血流动力学变化。2017 年,Cao 等<sup>[54]</sup>设计了一套可以约束小鼠头部的实验装置,实现了清醒状态小鼠脑部氧代谢率的定量测量。通过纵向成像,成功观测到了麻醉药剂量对大脑血液动力学和氧代谢的影响,对麻醉实施具有一定的指导作用。

### 4.3 分子成像

尽管 PAM 可以利用细胞内源性吸收体进行成像,然而许多病理和生理过程(如肿瘤细胞受体的表

达、蛋白酶活性等)缺乏足够的光声对比度,因此需要利用外源性造影剂提高成像的特异性和灵敏度,以揭示相关的病理和生理机制。

光声分子成像利用特异性的分子探针靶向结合到特定的病变组织,改变其光学吸收特性,揭示疾病过程中细胞和分子水平的异常,实现疾病的早期检测及解析病理过程的分子路径等。研究人员已开发出多种可以用于光声成像的外源性造影剂<sup>[115-117]</sup>。Köker 等<sup>[3]</sup>报道了一种基于分裂绿色荧光蛋白片段的可激活光子纳米探针簇,如图 8(a)所示,它可实现高灵敏度、高选择性的光声细胞成像,如图 8(b)所示。此外,该纳米探针簇的光声信号要远高于非纳米探针簇类分子探针,在活细胞光声成像中具有巨大潜力。金纳米笼也被证明是一种可以用于光声分子成像的造影剂<sup>[118]</sup>。Kim 等<sup>[119]</sup>在一项研究中量化了金纳米笼在活体黑色素瘤成像中的光声信号增强效果,结果表明,被金纳米笼主动靶向的黑色素的声信号强度是对照组的 3 倍。除此以外,其他纳米结构,如钯纳米片<sup>[115]</sup>、共轭聚合物纳米颗粒<sup>[120]</sup>、半导体聚合物纳米颗粒<sup>[121]</sup>、银纳米板<sup>[117]</sup>和碳纳米管<sup>[122]</sup>等也被用于光声分子成像。

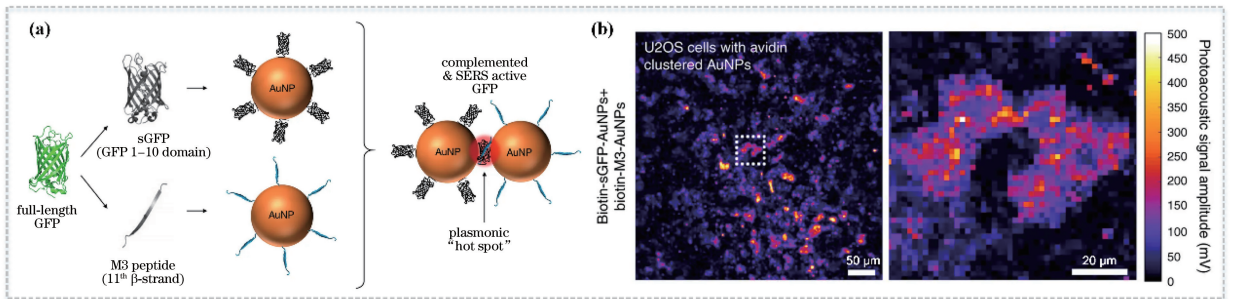


图 8 基于可激活光子纳米探针簇的高选择、高灵敏光声细胞成像<sup>[3]</sup>。(a)基于分裂绿色荧光蛋白(GFP)的团簇纳米探针制备过程;(b)基于团簇分子探针的 U2OS 细胞的高灵敏度光声细胞成像

Fig. 8 Cellular imaging using activatable photonic nanoclusters. (a) Fabrication of nanoclusters based on split green fluorescent protein (GFP) fragments; (b) highly-sensitive PAM images of U2OS cells based on nanoclusters

## 5 结束语

本文综述了近年来得到快速发展的 PAM 显微成像的基本工作原理、典型实现方式、最新技术进步,以及该技术在生物学上的应用。经过十多年的发展,PAM 成像技术在横向分辨率、轴向分辨率、成像深度、成像速度、超声传感器和多模态成像方面取得了巨大进步,在结构、功能、分子成像等生物学应用方面也找到了独特的应用。

尽管如此,PAM 成像仍然面临诸多挑战。首

先,PAM 系统通常需要行列扫描来实现成像,系统的成像速度受限于激光器的脉冲重复频率、扫描方式、信号采集和处理速度等,目前仍然难以实现实时成像。因此,高分辨率实时成像 PAM 成像技术仍然有待进一步研究。其次,大多数 PAM 系统都需要使用耦合介质,例如水或超声明胶,这会限制其在某些场景中的应用,如术中成像。全光学检测的方法具有尺寸小、宽带宽和探测灵敏度高优势,引起了研究人员的关注,基于全光学方法的非接触式超声探测是值得关注的研究方向。此外,光声分子探

针的相关研究仍有很大的发展空间,研究具有靶向性强、光声信号转换效率高、灵敏度高、特异性强、生物相容性良好的分子探针拓展 PAM 的应用范围具有重要意义。尽管 PAM 成像技术取得了巨大的研究进展,但目前多用于临床前的研究,如何将该技术进行临床和应用转化以解决实际问题,是研究人员重点探索的方向。随着技术的不断发展和进步,PAM 未来有望解决更多的实际问题,成为更具吸引力的生物医学成像手段。

## 参 考 文 献

- [1] Wang L V, Yao J J. A practical guide to photoacoustic tomography in the life sciences [J]. *Nature Methods*, 2016, 13(8): 627-638.
- [2] Tian C, Qian W, Shao X, et al. Plasmonic nanoparticles with quantitatively controlled bioconjugation for photoacoustic imaging of live cancer cells [J]. *Advanced Science*, 2016, 3(12): 1600237.
- [3] Köker T, Tang N, Tian C, et al. Cellular imaging by targeted assembly of hot-spot SERS and photoacoustic nanoprobe using split-fluorescent protein scaffolds [J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 607.
- [4] 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.
- [5] Tian C, Zhang W, Nguyen V P, et al. Novel photoacoustic microscopy and optical coherence tomography dual-modality chorioretinal imaging in living rabbit eyes [J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(132): e57135.
- [6] Yao J J, Wang L V. Photoacoustic microscopy [J]. *Laser & Photonics Reviews*, 2013, 7(5): 758-778.
- [7] Tam A C. Applications of photoacoustic sensing techniques [J]. *Reviews of Modern Physics*, 1986, 58(2): 381-431.
- [8] Manohar S, Razansky D. Photoacoustics: a historical review [J]. *Advances in Optics and Photonics*, 2016, 8(4): 586-617.
- [9] Oraevsky A A, Jacques S L, Frank K. Determination of tissue optical properties by piezoelectric detection of laser-induced stress waves [J]. *Proceedings of SPIE*, 1993, 1882: 86-101.
- [10] Kruger R A, Liu P Y. Photoacoustic ultrasound: pulse production and detection in 0.5% liposyn [J]. *Medical Physics*, 1994, 21(7): 1179-1184.
- [11] Wang L V, Hu S. Photoacoustic tomography: *in vivo* imaging from organelles to organs [J]. *Science*, 2012, 335(6075): 1458-1462.
- [12] Jo J, Tian C, Xu G, et al. Photoacoustic tomography for human musculoskeletal imaging and inflammatory arthritis detection [J]. *Photoacoustics*, 2018, 12: 82-89.
- [13] Liu S D, Wang H, Zhang C X, et al. *In vivo* photoacoustic sentinel lymph node imaging using clinically-approved carbon nanoparticles [J/OL]. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 2019 [2019-11-24]. <https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/8902046>.
- [14] Tian C, Pei M, Shen K, et al. Impact of system factors on the performance of photoacoustic tomography scanners [J]. *Physical Review Applied*, 2020, 13(1): 014001.
- [15] Wang H, Liu S D, Wang T, et al. Three-dimensional interventional photoacoustic imaging for biopsy needle guidance with a linear array transducer [J]. *Journal of Biophotonics*, 2019: e201900212.
- [16] Tian C, Xie Z X, Fabiilli M L, et al. Imaging and sensing based on dual-pulse nonlinear photoacoustic contrast: a preliminary study on fatty liver [J]. *Optics Letters*, 2015, 40(10): 2253-2256.
- [17] 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.
- [18] Liu Y, Zhang C, Wang L V. Effects of light scattering on optical-resolution photoacoustic microscopy [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2012, 17(12): 126014.
- [19] 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.
- [20] Zhang C, Maslov K, Yao J J, et al. *In vivo* photoacoustic microscopy with 7.6- $\mu\text{m}$  axial resolution using a commercial 125-MHz ultrasonic transducer [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2012, 17(11): 116016.
- [21] 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.
- [22] Zhang C, Maslov K, Hu S, et al. Reflection-mode submicron-resolution *in vivo* photoacoustic microscopy [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2012, 17(2): 020501.
- [23] Song W, Zheng W, Liu R M, et al. Reflection-

- mode *in vivo* photoacoustic microscopy with subwavelength lateral resolution [J]. *Biomedical Optics Express*, 2014, 5(12): 4235-4241.
- [24] Chen J H, Lin R Q, Wang H N, et al. Blind-deconvolution optical-resolution photoacoustic microscopy *in vivo* [J]. *Optics Express*, 2013, 21(6): 7316-7327.
- [25] Yao J J, Wang L D, Li C Y, et al. Photoimprint photoacoustic microscopy for three-dimensional label-free subdiffraction imaging [J]. *Physical Review Letters*, 2014, 112(1): 014302.
- [26] Danielli A, Maslov K, Garcia-Uribe A, et al. Label-free photoacoustic nanoscopy [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2014, 19(8): 086006.
- [27] Lee S Y, Lai Y H, Huang K C, et al. *In vivo* sub-femtoliter resolution photoacoustic microscopy with higher frame rates[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 15421.
- [28] Murray T W, Haltmeier M, Berer T, et al. Super-resolution photoacoustic microscopy using blind structured illumination[J]. *Optica*, 2017, 4(1): 17-22.
- [29] 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.
- [30] Kim K H, Luo W, Zhang C, et al. Air-coupled ultrasound detection using capillary-based optical ring resonators [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 109.
- [31] Xie Z X, Chen S L, Ling T, et al. Pure optical photoacoustic microscopy [J]. *Optics Express*, 2011, 19(10): 9027-9034.
- [32] Shelton R L, Applegate B E. Ultrahigh resolution photoacoustic microscopy via transient absorption [J]. *Biomedical Optics Express*, 2010, 1(2): 676-686.
- [33] Shelton R L, Mattison S P, Applegate B E. Volumetric imaging of erythrocytes using label-free multiphoton photoacoustic microscopy [J]. *Journal of Biophotonics*, 2014, 7(10): 834-840.
- [34] Mattison S P, Applegate B E. Simplified method for ultra high-resolution photoacoustic microscopy via transient absorption [J]. *Optics Letters*, 2014, 39(15): 4474-4477.
- [35] Zhu L R, Li L, Gao L, et al. Multiview optical resolution photoacoustic microscopy [J]. *Optica*, 2014, 1(4): 217-222.
- [36] Vienneau E, Liu W, Yao J J. Dual-view acoustic-resolution photoacoustic microscopy with enhanced resolution isotropy [J]. *Optics Letters*, 2018, 43(18): 4413-4416.
- [37] Wang T X, Sun N D, Chen R M, et al. Isotropic-resolution photoacoustic microscopy with multi-angle illumination[J]. *Optics Letters*, 2019, 44(1): 1-4.
- [38] Wang L D, Zhang C, Wang L V. Grueneisen relaxation photoacoustic microscopy [J]. *Physical Review Letters*, 2014, 113(17): 174301.
- [39] Tay J W, Lai P X, Suzuki Y, et al. Ultrasonically encoded wavefront shaping for focusing into random media[J]. *Scientific Reports*, 2015, 4: 3918.
- [40] Kong F T, Silverman R H, Liu L P, et al. Photoacoustic-guided convergence of light through optically diffusive media[J]. *Optics Letters*, 2011, 36(11): 2053-2055.
- [41] Lai P X, Wang L D, Tay J W, et al. Photoacoustically guided wavefront shaping for enhanced optical focusing in scattering media [J]. *Nature Photonics*, 2015, 9(2): 126-132.
- [42] Yao J J, Maslov K I, Puckett E R, et al. Double-illumination photoacoustic microscopy [J]. *Optics Letters*, 2012, 37(4): 659-661.
- [43] Hajireza P, Forbrich A, Zemp R J. Multifocus optical-resolution photoacoustic microscopy using stimulated Raman scattering and chromatic aberration[J]. *Optics Letters*, 2013, 38(15): 2711-2713.
- [44] Li B B, Qin H, Yang S H, et al. *In vivo* fast variable focus photoacoustic microscopy using an electrically tunable lens [J]. *Optics Express*, 2014, 22(17): 20130-20137.
- [45] Yang X Q, Jiang B W, Song X L, et al. Fast axial-scanning photoacoustic microscopy using tunable acoustic gradient lens[J]. *Optics Express*, 2017, 25(7): 7349-7357.
- [46] Yang X Q, Song X L, Jiang B W, et al. Multifocus optical-resolution photoacoustic microscope using ultrafast axial scanning of single laser pulse [J]. *Optics Express*, 2017, 25(23): 28192-28200.
- [47] Durnin J, Miceli J J, Eberly J H. Diffraction-free beams[J]. *Physical Review Letters*, 1987, 58(15): 1499-1501.
- [48] Shi J H, Wang L D, Noordam C, et al. Bessel-beam Grueneisen relaxation photoacoustic microscopy with extended depth of field[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, 20(11): 116002.
- [49] Jiang B W, Yang X Q, Luo Q M. Reflection-mode Bessel-beam photoacoustic microscopy for *in vivo* imaging of cerebral capillaries[J]. *Optics Express*, 2016, 24(18): 20167-20176.
- [50] Park B, Lee H, Jeon S, et al. Reflection-mode

- switchable subwavelength Bessel-beam and Gaussian-beam photoacoustic microscopy *in vivo* [J]. *Journal of Biophotonics*, 2019, 12 ( 2 ): e201800215.
- [51] Yang J M, Gong L, Xu X, et al. Motionless volumetric photoacoustic microscopy with spatially invariant resolution [J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 780.
- [52] Yao J J, Wang L D, 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.
- [53] Chen J, Guo Z, Wang H B, et al. Multifunctional Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C@Ag hybrid nanoparticles as dual modal imaging probes and near-infrared light-responsive drug delivery platform [J]. *Biomaterials*, 2013, 34 (2): 571-581.
- [54] Cao R, Li J, Ning B, et al. Functional and oxygen-metabolic photoacoustic microscopy of the awake mouse brain [J]. *NeuroImage*, 2017, 150: 77-87.
- [55] Li G, Maslov K I, Wang L V. Reflection-mode multifocal optical-resolution photoacoustic microscopy [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2013, 18(3): 030501.
- [56] 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.
- [57] Qi W Z, Jin T, Rong J, et al. Inverted multiscale optical resolution photoacoustic microscopy [J]. *Journal of Biophotonics*, 2017, 10(12): 1580-1585.
- [58] Wang L D, Maslov K, Yao J J, et al. Fast voice-coil scanning optical-resolution photoacoustic microscopy [J]. *Optics Letters*, 2011, 36(2): 139-141.
- [59] Yao J J, Wang L D, Yang J M, et al. Wide-field fast-scanning photoacoustic microscopy based on a water-immersible MEMS scanning mirror [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2012, 17 ( 8 ): 080505.
- [60] Kim J Y, Lee C, Park K, et al. Fast optical-resolution photoacoustic microscopy using a 2-axis water-proofing MEMS scanner [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 7932.
- [61] Lin L, Zhang P F, Xu S, et al. Handheld optical-resolution photoacoustic microscopy [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2017, 22(4): 041002.
- [62] Park K, Kim J Y, Lee C, et al. Handheld photoacoustic microscopy probe [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 13359.
- [63] Chen Q, Guo H, Jin T, et al. Ultracompact high-resolution photoacoustic microscopy [J]. *Optics Letters*, 2018, 43(7): 1615-1618.
- [64] Rao B, Maslov K, Danielli A, et al. Real-time four-dimensional optical-resolution photoacoustic microscopy with Au nanoparticle-assisted subdiffraction-limit resolution [J]. *Optics Letters*, 2011, 36(7): 1137-1139.
- [65] Xie Z X, Jiao S L, Zhang H F, et al. Laser-scanning optical-resolution photoacoustic microscopy [J]. *Optics Letters*, 2009, 34(12): 1771-1773.
- [66] Jin T, Guo H, Jiang H B, et al. Portable optical resolution photoacoustic microscopy (pORPAM) for human oral imaging [J]. *Optics Letters*, 2017, 42 (21): 4434-4437.
- [67] Qin W, Jin T, Guo H, et al. Large-field-of-view optical resolution photoacoustic microscopy [J]. *Optics Express*, 2018, 26(4): 4271-4278.
- [68] Kim J Y, Lee C, Park K, et al. High-speed and high-SNR photoacoustic microscopy based on a galvanometer mirror in non-conducting liquid [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 34803.
- [69] Song L, Maslov K, Wang L V. Multifocal optical-resolution photoacoustic microscopy *in vivo* [J]. *Optics Letters*, 2011, 36(7): 1236-1238.
- [70] Lan B X, Liu W, Wang Y C, et al. High-speed widefield photoacoustic microscopy of small-animal hemodynamics [J]. *Biomedical Optics Express*, 2018, 9(10): 4689-4701.
- [71] Guggenheim J A, Li J, Allen T J, et al. Ultrasensitive plano-concave optical microresonators for ultrasound sensing [J]. *Nature Photonics*, 2017, 11(11): 714-719.
- [72] 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.
- [73] 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.
- [74] Chen Z J, Yang S H, 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.
- [75] Hochreiner A, Bauer-Marschallinger J, Burgholzer P, et al. Non-contact photoacoustic imaging using a fiber based interferometer with optical amplification [J]. *Biomedical Optics Express*, 2013, 4 ( 11 ): 2322-2331.

- [76] Wissmeyer G, Soliman D, Shnaiderman R, et al. All-optical optoacoustic microscope based on wideband pulse interferometry[J]. *Optics Letters*, 2016, 41(9): 1953-1956.
- [77] Shnaiderman R, Wissmeyer G, Seeger M, et al. Fiber interferometer for hybrid optical and optoacoustic intravital microscopy [J]. *Optica*, 2017, 4(10): 1180-1187.
- [78] Wang T X, Cao R, Ning B, et al. All-optical photoacoustic microscopy based on plasmonic detection of broadband ultrasound [J]. *Applied Physics Letters*, 2015, 107(15): 153702.
- [79] Zhu X Y, Huang Z Y, Wang G H, et al. Ultrasonic detection based on polarization-dependent optical reflection[J]. *Optics Letters*, 2017, 42(3): 439-441.
- [80] Yang F, Song W, Zhang C L, et al. Broadband graphene-based photoacoustic microscopy with high sensitivity[J]. *Nanoscale*, 2018, 10(18): 8606-8614.
- [81] Song W, Peng L L, Guo G D, et al. Isometrically resolved photoacoustic microscopy based on broadband surface plasmon resonance ultrasound sensing[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(30): 27378-27385.
- [82] Xing F, Liu Z B, Deng Z C, et al. Sensitivereal-time monitoring of refractive indexes using a novel graphene-based optical sensor [J]. *Scientific Reports*, 2012, 2: 908.
- [83] Xing F, Meng G X, Zhang Q, et al. Ultrasensitive flow sensing of a single cell using graphene-based optical sensors[J]. *Nano Letters*, 2014, 14(6): 3563-3569.
- [84] de la Zerda A, Paulus Y M, Teed R, et al. Photoacoustic ocular imaging [J]. *Optics Letters*, 2010, 35(3): 270-272.
- [85] Jiao S L, Jiang M S, Hu J M, et al. Photoacoustic ophthalmoscopy for *in vivo* retinal imaging [J]. *Optics Express*, 2010, 18(4): 3967-3972.
- [86] Hu S, Rao B, Maslov K, et al. Label-free photoacoustic ophthalmic angiography [J]. *Optics Letters*, 2010, 35(1): 1-3.
- [87] Silverman R H, Kong F T, Chen Y C, et al. High-resolution photoacoustic imaging of ocular tissues [J]. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 2010, 36(5): 733-742.
- [88] Wu N, Ye S Q, Ren Q S, et al. High-resolution dual-modality photoacoustic ocular imaging [J]. *Optics Letters*, 2014, 39(8): 2451-2454.
- [89] Liu T, Wei Q, Song W, et al. Near-infrared light photoacoustic ophthalmoscopy [J]. *Biomedical Optics Express*, 2012, 3(4): 792-799.
- [90] Song W, Wei Q, Liu W Z, et al. A combined method to quantify the retinal metabolic rate of oxygen using photoacoustic ophthalmoscopy and optical coherence tomography [J]. *Scientific Reports*, 2015, 4: 6525.
- [91] Hennen S N, Xing W X, Shui Y B, et al. Photoacoustic tomography imaging and estimation of oxygen saturation of hemoglobin in ocular tissue of rabbits[J]. *Experimental Eye Research*, 2015, 138: 153-158.
- [92] Zhao Y H, Chen Z P, 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.
- [93] Dai C X, Liu X J, Zhang H F, et al. Absolute retinal blood flow measurement with a dual-beam Doppler optical coherence tomography [J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2013, 54(13): 7998-8003.
- [94] 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.
- [95] Chen H Y, Chen X J, Qiu Z Q, et al. Quantitative analysis of retinal layers' optical intensities on 3D optical coherence tomography for central retinal artery occlusion [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 9269.
- [96] Chen B Y, Gao E T, Chen H Y, et al. Profile and determinants of retinal optical intensity in normal eyes with spectral domain optical coherence tomography [J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0148183.
- [97] Song W, Wei Q, Liu T, et al. Integrating photoacoustic ophthalmoscopy with scanning laser ophthalmoscopy, optical coherence tomography, and fluorescein angiography for a multimodal retinal imaging platform[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2012, 17(6): 061206.
- [98] Song W, Wei Q, Feng L, et al. Multimodal photoacoustic ophthalmoscopy in mouse[J]. *Journal of Biophotonics*, 2013, 6(6/7): 505-512.
- [99] Liu W, Zhang H F. Noninvasive *in vivo* imaging of oxygen metabolic rate in the retina[C]// 2014 36th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, August 26-30, 2014, Chicago, IL, USA. New York: IEEE, 2014: 3865-3868.

- [100] Nguyen V P, Li Y X, Zhang W, et al. Multi-wavelength, en-face photoacoustic microscopy and optical coherence tomography imaging for early and selective detection of laser induced retinal vein occlusion[J]. *Biomedical Optics Express*, 2018, 9(12): 5915-5938.
- [101] Zhang W, Li Y X, Nguyen V P, et al. High-resolution, *in vivo* multimodal photoacoustic microscopy, optical coherence tomography, and fluorescence microscopy imaging of rabbit retinal neovascularization [J]. *Light: Science & Applications*, 2018, 7: 103.
- [102] Li Y X, Zhang W, Nguyen V P, et al. Real-time OCT guidance and multimodal imaging monitoring of subretinal injection induced choroidal neovascularization in rabbit eyes[J]. *Experimental Eye Research*, 2019, 186: 107714.
- [103] Strohm E M, Berndl E S L, Kolios M C. High frequency label-free photoacoustic microscopy of single cells[J]. *Photoacoustics*, 2013, 1(3/4): 49-53.
- [104] Dong B Q, Li H, Zhang Z, et al. Isometric multimodal photoacoustic microscopy based on optically transparent micro-ring ultrasonic detection [J]. *Optica*, 2015, 2(2): 169-176.
- [105] Hu S, Wang L V. Photoacoustic imaging and characterization of the microvasculature[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2010, 15(1): 011101.
- [106] Zhang X, Qian X Q, Tao C, et al. *In vivo* imaging of microvasculature during anesthesia with high-resolution photoacoustic microscopy[J]. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 2018, 44(5): 1110-1118.
- [107] Zhang H F, Maslov K, Li M L, et al. *In vivo* volumetric imaging of subcutaneous microvasculature by photoacoustic microscopy[J]. *Optics Express*, 2006, 14(20): 9317-9323.
- [108] Kim J, Kim J Y, Jeon S, et al. Super-resolution localization photoacoustic microscopy using intrinsic red blood cells as contrast absorbers [J]. *Light: Science & Applications*, 2019, 8(1): 1-11.
- [109] 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.
- [110] Zhang E Z, Laufer J G, Pedley R B, et al. *In vivo* high-resolution 3D photoacoustic imaging of superficial vascular anatomy [J]. *Physics in Medicine and Biology*, 2009, 54(4): 1035-1046.
- [111] Bost W, Lemor R, Fournelle M. Photoacoustic imaging of subcutaneous microvasculature with a class one laser [J]. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 2014, 33(9): 1900-1904.
- [112] Jeon S, Song H B, Kim J, et al. *In vivo* photoacoustic imaging of anterior ocular vasculature: a random sample consensus approach [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 4318.
- [113] Yao J 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.
- [114] Wang L, Maslov K, Wang L V. Single-cell label-free photoacoustic flowoxigraphy *in vivo* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(15): 5759-5764.
- [115] Nie L M, Chen M, Sun X L, et al. Palladium nanosheets as highly stable and effective contrast agents for *in vivo* photoacoustic molecular imaging [J]. *Nanoscale*, 2014, 6(3): 1271-1276.
- [116] Weber J, Beard P C, Bohndiek S E. Contrast agents for molecular photoacoustic imaging [J]. *Nature Methods*, 2016, 13(8): 639-650.
- [117] Homan K A, Souza M, Truby R, et al. Silvernanoplate contrast agents for *in vivo* molecular photoacoustic imaging[J]. *ACS Nano*, 2012, 6(1): 641-650.
- [118] Kim C, Favazza C, Wang L V. *In vivo* photoacoustic tomography of chemicals: high-resolution functional and molecular optical imaging at new depths[J]. *Chemical Reviews*, 2010, 110(5): 2756-2782.
- [119] Kim C, Cho E C, Chen J Y, et al. *In vivo* molecular photoacoustic tomography of melanomas targeted by bioconjugated gold nanocages[J]. *ACS Nano*, 2010, 4(8): 4559-4564.
- [120] Guo B, Chen J Q, Chen N B, et al. High-resolution 3D NIR-II photoacoustic imaging of cerebral and tumor vasculatures using conjugated polymer nanoparticles as contrast agent [J]. *Advanced Materials*, 2019, 31(25): 1808355.
- [121] Cui L Y, Rao J H. Semiconducting polymer nanoparticles as photoacoustic molecular imaging probes [J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2017, 9(2): e1418.
- [122] de la Zerda A, Liu Z, Bodapati S, et al. Ultrahigh sensitivity carbon nanotube agents for photoacoustic molecular imaging in living mice[J]. *Nano Letters*, 2010, 10(6): 2168-2172.