

# 在体光声流式细胞术在循环肿瘤细胞检测中的研究进展

杨萍, 魏丹, 庞恺, 王麒炎, 周泉雨, 魏勋斌

上海交通大学生物医学工程学院 Med-X 研究院, 上海 200030

**摘要** 肿瘤一直威胁着人类的健康, 大多数肿瘤患者死于转移性瘤而非原发性瘤。循环肿瘤细胞(CTC)是肿瘤转移的重要标志, CTC 的检测可以用来监控肿瘤的转移情况及预后评估。在体光声流式细胞术(PAFC)利用 CTC 与血液背景的光吸收差异可以实现 CTC 的在体检测。相比于传统的 CTC 检测方法, PAFC 可以无创、高灵敏地检测循环系统中的 CTC 数目。总结了 PAFC 无标记检测黑色素瘤 CTC 信号及纳米颗粒靶向标记乳腺癌 CTC 信号的方法, 以及这些方法在肿瘤转移、治疗效果评估中的应用。

**关键词** 医用光学; 肿瘤转移; 光声流式细胞术; 循环肿瘤细胞; 无标记; 纳米颗粒

**中图分类号** O436      **文献标识码** A

**doi:** 10.3788/LOP54.090001

## Progress in Detection of Circulating Tumor Cell by *in vivo* Photoacoustic Flow Cytometry

Yang Ping, Wei Dan, Pang Kai, Wang Qiyang, Zhou Quanyu, Wei Xunbin

Med-X Research Institute, School of Biomedical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China

**Abstract** Tumor is a great threat to human health, the majority of tumor patients die from metastatic tumor rather than primary tumor. Circulating tumor cell (CTC) is an important indication of metastatic tumor, and its detection can be used for monitoring tumor metastasis and prognosis evaluation. Based on the difference of light absorption between CTC and blood background, *in vivo* photoacoustic flow cytometry (PAFC) can realize CTC *in vivo* detection. Compared with the traditional CTC detection methods, the advantage of PAFC is that it can detect the number of CTC in the circulatory system, and the detection is noninvasive and high sensitive. This review summarizes the methods of the real-time and label-free detection of melanoma CTC and the real-time detection of breast cancer by nanoparticle targeting, and their application in evaluation of tumor metastasis and treatment effect.

**Key words** medical optics; tumor metastasis; *in vivo* photoacoustic flow cytometry; circulating tumor cell; label-free; nanoparticle

**OCIS codes** 170.1530; 110.5125

## 1 引言

目前, 癌症是威胁人类健康的主要问题之一。在美国, 癌症已经成为导致死亡的第二大因素<sup>[1]</sup>。在中国, 癌症的发病率与致死率急剧上升, 目前癌症已成为导致死亡的首要因素<sup>[2]</sup>。2015年, 中国平均每天新增12000例癌症患者, 平均每天死亡7500例癌症患者<sup>[3]</sup>。癌症的高发病率与致死率使得癌症的早期诊断成为

**收稿日期:** 2017-03-22; **收到修改稿日期:** 2017-04-25

**基金项目:** 国家自然科学基金(61425006, 61227017)

**作者简介:** 杨萍(1991—), 女, 硕士研究生, 主要从事在体光声流式细胞术方面的研究。

E-mail: yping\_bme@sjtu.edu.cn

**导师简介:** 魏勋斌(1970—), 男, 博士, 教授, 主要从事肿瘤的生物医学光学方面的研究。

E-mail: xwei01@sjtu.edu.cn(通信联系人)

提高患者生存率的重要途径。

临床中常用的癌症诊断方法与技术包括血清肿瘤标记物检测、组织病理学切片和医学影像扫描等。虽然这些方法与技术可以诊断癌症,但却存在一些弊端。如:某些癌症由于缺乏特异性标记物而无法通过对血清肿瘤标记物检测的方法进行诊断;组织病理学切片是目前临床上癌症诊断的金标准,但它的有创性使得病变组织在切除过程中可能导致癌细胞转移;超声、电子计算机断层扫描(CT)、磁共振成像(MRI)、正电子发射计算机断层扫描(PET)等医学影像扫描可进行无创检测,但对直径较小的实体肿瘤难以检出,而且CT、PET等具有放射性,不适于反复检查。

近年来,循环肿瘤细胞(CTC)作为新的肿瘤转移标记物受到广泛关注。肿瘤细胞从肿瘤原发灶部位脱落下来后浸润到原发肿瘤周围组织中,进而进入血管与淋巴循环系统,之后从循环系统渗出,进入远端组织,适应新的微环境,最终形成新的转移灶<sup>[4]</sup>。CTC就是分布在循环系统中的肿瘤细胞,它们都具有向远端组织转移的潜能<sup>[5]</sup>。1869年,CTC首次被检测出<sup>[6]</sup>。在之后的几十年中研究人员发现,CTC可以作为预测肿瘤转移过程、病情进展及患者生存质量的指标<sup>[6-8]</sup>,CTC标记与计数还可以为肿瘤患者的预后判断及疗效评估提供可靠依据与重要指导<sup>[9]</sup>。

在肿瘤发展的早期,血液中的CTC数量极少,每毫升血液中CTC的数量为1~10个<sup>[10]</sup>,因此对CTC的检测技术提出了较高要求<sup>[11]</sup>。目前能够实现CTC定量检测的技术可分为两类:体外检测和在体检测。常见的CTC体外检测方法有免疫介导法、逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)法、体外流式细胞术等。免疫介导法一般分为两个步骤:CTC富集与CTC计数。Cell Search系统是第一个也是唯一一个被美国食品及药品管理局(FDA)批准的可应用于临床的体外CTC富集与计数的检测系统。免疫介导法中常用的一种技术是微流控技术,该技术将包裹着上皮细胞黏附分子(EpCAM)抗体的微柱设计于芯片中,用于捕获表达EpCAM的CTC。由于某些CTC不表达EpCAM或其他特定的抗原,因此微流控技术存在一定的假阴性概率。CTC中包含肿瘤细胞特异性的基因,RT-PCR法可用于扩增CTC中信使核糖核酸(mRNA)的水平,从基因水平上检测出CTC的数量。体外流式细胞术利用单克隆抗体标记CTC特异性抗原,用于CTC的分离和计数。以上这些方法的局限性是采血量有限,不能测出全血中的CTC。

在体CTC检测方法实现了CTC的无创在体检测,有效避免了体外检测方法的弊端,在体检测方法包括在体荧光流式细胞术(FFC)和在体光声流式细胞术(PAFC)。FFC的原理是当带有荧光标记的CTC流经激光光斑时,被激发出的荧光被光电倍增管收集,产生不同于血液背景的信号,从而实现CTC的在体检测<sup>[12-14]</sup>。但是用于标记CTC的荧光蛋白需要通过遗传学手段标记,这个过程烦琐且不适合于临床应用。PAFC基于生物组织的光声效应来检测流经光斑的CTC产生的光声信号,从而实现CTC的计数。相对于其他检测技术,PAFC可实现CTC的在体、无创、无标记检测。本文主要介绍了PAFC的检测原理及其在癌症诊断中的应用。

## 2 在体光声流式细胞术的理论背景和基本框架

### 2.1 光声检测原理

PAFC是基于光声效应的检测技术。当激光照射组织时,组织吸收光子能量产生热膨胀,向外辐射超声波,这种现象被称为光声效应<sup>[15]</sup>,这是一个由光能转化成声能的过程<sup>[16]</sup>。光声效应于1880年由贝尔首先发现<sup>[17]</sup>,基于这种效应光声显微镜应运而生<sup>[18]</sup>。光声显微镜可用于研究气体<sup>[19]</sup>、固体<sup>[20-21]</sup>与液体<sup>[21-22]</sup>样品的光吸收能力。近年来,光声成像在生物医学领域得到了广泛应用,可以实现对动物或者人体器官(如乳腺、脑等)的成像,同时具有较高的对比度与空间分辨率<sup>[23-25]</sup>。在组织中,超声散射的能量为光子散射能量的1/2~1/3,组织吸收光子后,产生1~50 MHz的超声波,因此光声检测比单纯的光学检测具有更深的检测深度<sup>[23]</sup>。

PAFC可以实现不同细胞信号的识别与计数功能。它根据目标信号对特定波长的特异性吸收将目标信号从背景中识别出来<sup>[26]</sup>。红细胞、白细胞、黑色素瘤细胞(如B16F10细胞株)、血浆、磷酸缓冲盐溶液(PBS)及纳米颗粒对不同波长激光的吸收存在特异性差异。基于这种吸收差异,选定单一或多波长的激光进行信号激发,红细胞、白细胞、黑色素瘤细胞等产生的光声信号的幅度不同,可以以此来区分不同的细胞。光声信号的差异不仅仅来源于被检测物对不同波长激光的特异性吸收差异<sup>[26]</sup>,也与纳米颗粒的大小<sup>[27]</sup>及细胞形

状<sup>[28]</sup>等因素有关。

## 2.2 仪器设计方案

PAFC 通常有两种设计模式: 光分辨光声流式细胞术 (OR-PAFC) 和声分辨光声流式细胞术 (AR-PAFC)<sup>[29]</sup>。图 1(a) 为 OR-PAFC 的原理图, 聚焦激光准确激发流经血管的细胞信号, 信号由非聚焦型超声探头接收。此模式具有较好的检测分辨率, 但检测深度相对较浅, 而检测深度取决于光的聚焦深度, 因此此模式适用于浅表较细血管的检测。图 1(b) 为 AR-PAFC 的原理图, 非聚焦激光照射于血管, 细胞流经照射区域被激发出超声信号, 超声探头聚焦于血管, 探头焦点处的超声信号被接收。此模式具有较好的检测深度, 可以在组织深部获取更明显的信号, 但检测分辨率相对较低。与光相比, 声的传播受散射等因素的影响更小, 具有更好的穿透性, 因此 AR-PAFC 适于皮肤深部较粗血管的检测。

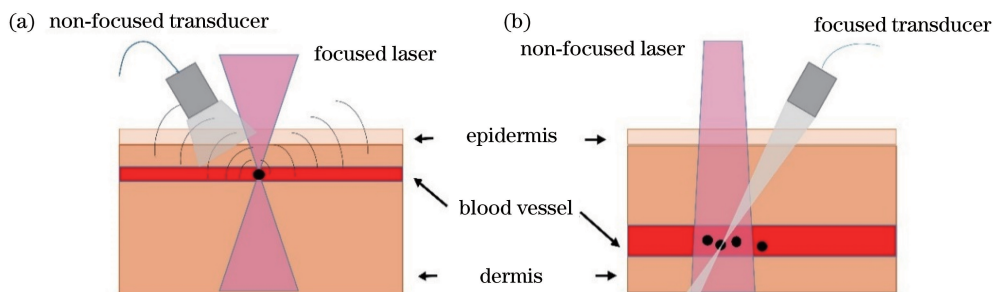


图 1 (a) OR-PAFC 和 (b) AR-PAFC 原理图

Fig. 1 Schematics of (a) optical-resolution photoacoustic flow cytometry and (b) acoustic-resolution photoacoustic flow cytometry

PAFC 的设计主要分为三部分: 图像导航部分、信号激发部分和信号检测部分<sup>[30]</sup>, 如图 2 所示。图像导航部分包括发光二极管 (LED) 灯、物镜、CCD 相机、计算机。信号激发部分包括函数发生器、激光器、二色镜、柱透镜、凸透镜与物镜。信号检测部分包括函数发生器、超声探头、放大器、数据采集 (DAQ) 卡、计算机。

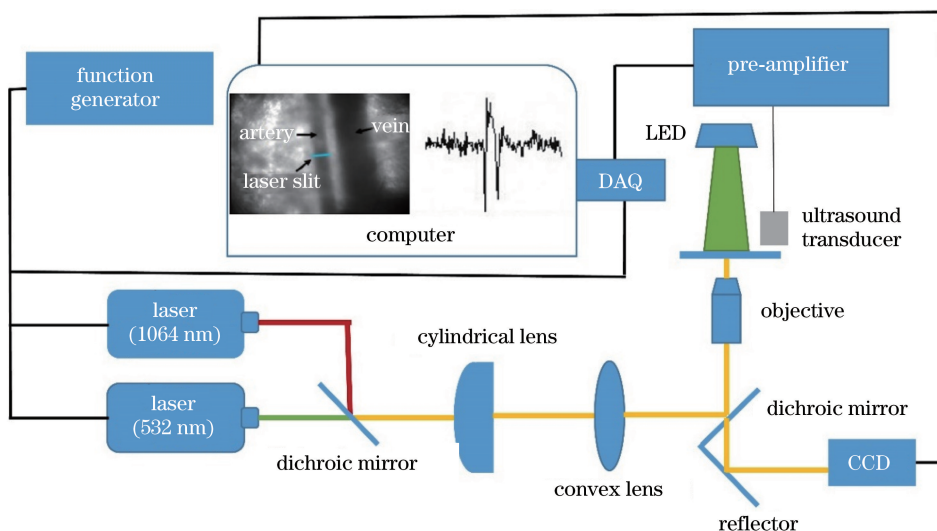


图 2 PAFC 设计图

Fig. 2 Design diagram of PAFC

图像导航部分是指通过 CCD 成像<sup>[31]</sup>或图像重建成像<sup>[26]</sup>实现血管的实时成像, 进而实现血管与激光光斑的共定位。PAFC 通过 LED 灯照射被检测物 (如图 2), 携带结构信息的透射光通过物镜进入 CCD 后成像, 图像被采集卡采集, 并实时显示于计算机屏幕上。在体光声图像流式细胞仪中的图像来源于对检测到的光声信号的重建, 可以实现实时血管导航。相比而言, CCD 采集图像的速度快于图像重建的速度, 但图像重建方法得到的图像可以观察到靶细胞的流过状态。



PAFC 选用纳秒或飞秒脉冲激光器作为激光光源,激光光斑整形成圆形或楔形以覆盖待测血管。Wei 等<sup>[31]</sup>采用 PAFC 及图 2 所示的设计方案,将 1064 nm(用于黑色素瘤细胞检测)与 532 nm(用于红细胞、白细胞检测)激光进行合束,直接使用光学元件将激光光斑整形成楔形光斑,光斑长度可以覆盖整个血管宽度。根据被检测血管的尺寸,光斑尺寸可以从  $5\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$  调整到  $25\ \mu\text{m} \times 150\ \mu\text{m}$ <sup>[10]</sup>。Zharov 等<sup>[32]</sup>与 Wang 等<sup>[23]</sup>将激光直接耦合至显微镜中进行整形与信号激发。楔形光斑长度可以覆盖整个血管宽度,光斑宽度小于单个细胞尺寸,具有较好的空间分辨率。激光脉冲的重复频率主要与血流速度有关。假设光斑宽度为  $d_1$ ,被检测细胞直径为  $d_2$ ,血流速度为  $v$ ,激光脉冲重复频率为  $f$ ,则  $f$  需要满足  $f \geq v/(d_1 + d_2)$  才能保证每个细胞都会被脉冲激光激发。激光脉冲重复频率可设为计算所得  $f$  值的 10~20 倍以上,即每个经过光斑位置的细胞可以被激光照射 10~20 次以上,以避免漏掉信号,也便于用平均去噪法处理信号。在声分辨的 PAFC 系统中,激光脉冲重复频率可适当降低。

激光光源的波长通常根据被检测物的吸收特性而定。在 PAFC 中,激光波长通常选取可见光波段与近红外光波段。血液中红细胞的含氧血红蛋白含量较高,含氧血红蛋白在 532 nm 波长处的吸收较强,因此 532 nm 波段常用于血管检测<sup>[23,26]</sup>。在此基础上还可以进行血流速度<sup>[27,33]</sup>、红细胞形状<sup>[28]</sup>等的研究。对于某些特定的 CTC,如具有较强黑色素分泌能力的黑色素瘤 CTC 的检测,常选用近红外波段(如 1064 nm 和 865 nm 等)激光进行信号激发<sup>[31,34-35]</sup>。PAFC 系统可以采用单波长或多波长激光进行检测。多波长激光通过延时装置使不同波长的激光产生发射时间的差异<sup>[34]</sup>,或通过快门装置对不同波长激光分别进行调制,在时间上区分不同波长激光激发产生的信号,从而实现不同细胞或颗粒的多波长检测。

信号检测部分主要由超声探头、信号放大器、数据采集卡等几部分组成。由于激光脉冲的脉宽窄,且被检测细胞或颗粒的尺寸小,激发的光声信号频率主要分布在 1 MHz 以上,因此必须选用中心频率较高的超声探头。常用探头的中心频率包括 2.25, 3.5, 5, 10, 20, 50 MHz 等。信号放大器的带宽要覆盖超声探头的检测范围,如选用中心频率为 10 MHz 的探头检测时,可以选择带宽为 40 MHz 的放大器,放大倍数一般为 50~60 dB。超声探头接收的信号为连续信号,而计算机无法识别处理连续信号,因此需要将连续信号转化为离散信号,即对信号进行采样。根据奈奎斯特采样定理,对于频谱受限信号  $f(t)$ ,若频谱范围为  $-\omega_m \sim \omega_m$ ,则  $f(t)$  可用等间隔抽样值唯一表示,且抽样间隔必须小于等于  $1/(2f_m)$ (其中  $\omega_m = 2\pi f_m$ )。只要离散系统的奈奎斯特频率高于被采样信号的最高频率或带宽,就可以避免混叠现象<sup>[36]</sup>。为了避免信号失真,数据采集卡的采样频率应设为探头检测频率的 4 倍或更高。例如,对于中心频率为 10 MHz 的超声探头,与其匹配的数据采集卡的采集频率可设置为 50 MHz。由于数据采集卡的采样频率较高,为了降低采集数据量,根据经验,只需采集单脉冲周期前 5% 的数据(以激光脉冲重复频率为 5 kHz 为例),即只需采集激光照射到样本后 10  $\mu\text{s}$  内的数据。函数发生器设置为特定频率的方波,其频率为激光脉冲重复频率,上升沿同步触发激光器与数据采集卡。控制数据采集卡仅对前 10  $\mu\text{s}$  的数据进行采集,这样既采集到了有效信号,又提高了实验效率<sup>[31]</sup>。研究发现,100 MHz 及以上频率的超声探头<sup>[37-38]</sup>接收到的信号在进行快速傅里叶变换时,会在频率范围内存在周期性特性,这些周期性特性与颗粒的大小、形态、朝向和组成密切相关,可用于区分不同尺寸、类型的细胞或颗粒<sup>[37,39]</sup>。超声探头的耦合剂可采用水、PBS、甘油或超声导声胶等。

光声信号的处理方法包括信号平均法、小波去噪法和频域分析法<sup>[40]</sup>等。根据细胞直径  $a$  与激光光斑宽度  $b$ 、血流速度  $v$  及脉冲重复频率  $f$  可以推算出流经光斑的细胞被脉冲激光激发的次数。理论上讲,细胞被脉冲激光激发的次数即为产生连续光声信号的次数,使用  $N$  次信号平均的方法可将检测到的信号的信噪比提高  $\sqrt{N}$  倍。小波去噪法使用适当的小波变换滤除一些背景信号噪声,从而达到提高信噪比的目的。小波变换通过尺度上的伸缩和时域上的平移来分析信号,其变换效果取决于小波基的选取。根据实际情况选取最佳的小波基,可以达到较优的去噪效果<sup>[41]</sup>。频域分析法是将获得的时域光声信号进行傅里叶变换以获得频域信号,之后总结提取信号在频域内的特征(包括频谱信号峰的半高峰宽、中心位置和半高切线斜率等),进行基于频域信号特征的光声信号识别。此外,还可以结合探头摆放位置对光声信号出现的位置进行初步定位,排除其他位置的噪声干扰。例如,声在水中的传播速度为  $1500\ \text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ,根据探头到被检测物的距离,便可计算出光声信号出现的位置为出光后的 2  $\mu\text{s}$  处,从而排除了其他位置的噪声干扰。

此外,PAFC 还可以结合拉曼、光热、荧光等检测方法<sup>[33,42-46]</sup>,在接收部分加入相应的检测装置,并结合

多种检测技术,提高 PAFC 检测的准确性,拓展 PAFC 的应用范围。

### 2.3 实验方法与模型

PAFC 实验方法主要包括两部分:体外信号验证与活体实验检测。活体动物实验模型主要分为 CTC 模拟模型、皮下瘤模型与原位癌模型。光声信号的检测部位主要集中于耳部血管与肠系膜血管<sup>[34,47]</sup>,有些研究也会选取前哨淋巴结淋巴管进行检测<sup>[48]</sup>。对于不同的研究目标可以选择不同的实验方法与模型。

体外信号的验证方法包括:1) 将细胞悬浮于玻璃皿中,然后将激光聚焦于细胞上进行 CTC 检测,这种检测方法可以直接验证所选波长与被检测物是否匹配;2) 利用注射泵将细胞注射于毛细玻璃管或硅胶管中模拟血液流动进行检测,这种检测方法更接近于活体检测<sup>[34]</sup>;3) 使用双相流动法<sup>[49]</sup>将两种不相融的液体或者气体与液体(如水与空气)注入到毛细管中模拟血流,并将细胞悬浮于液体中,如此可达到检测与捕获靶细胞的目的。

活体检测模型包括 CTC 模型、皮下瘤模型(耳部肿瘤细胞接种模型<sup>[34]</sup>及皮下接种模型<sup>[31,34]</sup>)、原位癌模型等。检测部位包括耳部血管(血管宽度为 50  $\mu\text{m}$ )<sup>[31,34]</sup>、肠系膜血管(血管宽度为 150  $\mu\text{m}$ )<sup>[34]</sup>、前哨淋巴结<sup>[48]</sup>。鼠的耳部薄而透明,耳部较粗的动静脉常用于检测,该部位的检测比较方便且无损伤。肠系膜血管检测需要对腹部皮肤进行微创处理,具有一定的损伤性,但由于肠系膜血管比耳部的血管粗,可以检测到更多的 CTC 信号。许多癌症的早期转移伴随着淋巴转移,因此淋巴结检测可以更早地检测到 CTC 信号。

## 3 PAFC 在肿瘤检测中的应用

PAFC 可以应用于红细胞、白细胞、CTC、植物叶脉管<sup>[50]</sup>等的研究。在癌症检测方面,PAFC 可以通过 CTC 的数目来评估癌症的转移情况,并可实时杀死检测到的 CTC<sup>[34]</sup>。有些研究表明,通过检测肿瘤细胞的外泌体可以更早地检测到 CTC<sup>[51]</sup>。以下针对 PAFC 在癌症检测中的应用进行具体介绍。

### 3.1 黑色素瘤 CTC 的实时检测与治疗

黑色素瘤是一类恶性程度较高、转移性较高的皮肤癌,黑色素瘤 CTC 具有较高的黑色素分泌量。相对于血液中的血红蛋白,黑色素在特定的激光波段具有明显的特异性吸收,PAFC 可以实现对黑色素瘤细胞的在体实时无标记检测<sup>[31,34]</sup>。对于黑色素分泌量相对较低的黑色瘤细胞可以选用纳米颗粒标记法进行信号增强<sup>[52]</sup>。此外,PAFC 还可用于手术切除治疗效果评估<sup>[53]</sup>和医学物理过程评估<sup>[46]</sup>。近期,Wang 等<sup>[35]</sup>提出 PAFC 在检测黑色素瘤细胞的同时可以触发高能激光杀死 CTC<sup>[34]</sup>。以下是 PAFC 在黑色素瘤诊断、治疗中的具体应用。

#### 3.1.1 黑色素瘤细胞的无标记检测

黑色素瘤细胞的种类较多。源于鼠源的黑色素瘤细胞株 B16F10 由于具有高的转移性而易形成 CTC,且其黑色素的分泌量较高,便于实验检测,常用于动物实验研究中。

Wei 等选用 1064 nm 脉冲激光对 B16F10 进行了检测<sup>[31]</sup>,所用脉冲激光能量为 60  $\mu\text{J}$ ,脉宽为 2 ns,选用 10 MHz 水浸式非聚焦型探头。首先采用模拟血流的方法将 B16F10 细胞注入 100  $\mu\text{m}$  的毛细玻璃管中,用水作为超声耦合介质,该实验验证了检测的可行性。其次建立原位癌模型,即皮下瘤模型,将  $10^7$  个 B16F10 细胞分别对 5 只裸鼠进行腋下皮下瘤接种,接种后每 7 d 对裸鼠耳部的动脉血管进行 10 min 的在体检测,并记录裸鼠的生存周期及检测到的 CTC 数目。实验结果显示,随着瘤块增大,裸鼠在接种 26 d 后逐渐死亡,这表明 B16F10 对裸鼠的寿命具有极大威胁。接种后第一周检测到 CTC 数目不超过 3 个,在随后的几周内检测到 CTC 数目明显增加,第二周检测到 6 个 CTC,第三周检测到 12 个 CTC,第四周检测到 22 个 CTC。研究结果表明,随着癌症的转移,CTC 数目呈现递增的趋势,这也证明了 PAFC 可以用于监测黑色素瘤细胞的转移情况。

Zharov 等<sup>[34]</sup>提出了双色 PAFC 无标记检测黑色素瘤 CTC 的方法。在奥林巴斯 BX51 显微镜系统的基础上建立 PAFC 系统,选用可调节的光学参量振荡器(OPO),其波长范围为 420~2300 nm,脉冲宽度为 8 ns,脉冲重复频率为 10~50 Hz,单脉冲通量为 0.01~100  $\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$ 。在实验中,将  $10^6$  个 B16F10 细胞分别接种于裸鼠耳部与腹部皮下,建立原位癌模型,采用 3.5 MHz 非聚焦型超声探头或 20 MHz 聚焦型超声探头进行检测,光斑尺寸为 75  $\mu\text{m}\times 11 \mu\text{m}$ 。通过对比 50  $\mu\text{m}$  血管中不同细胞的吸收谱,选取信噪比较高的

865 nm与 639 nm 双波长激光进行检测,并通过体外方法验证了该双波长激光可以区分黑色素瘤细胞与红细胞信号。高黑色素含量的黑色素瘤细胞与低黑色素含量的黑色素瘤细胞对激光的吸收具有较大差异,将加入等量黑色素纳米颗粒与未加入黑色素纳米颗粒的 B16F10 细胞进行尾静脉注射检测。对比结果表明,PAFC 的活体检测率为 82%。根据尾静脉注射后 CTC 信号数目的变化规律可知,CTC 的代谢分为两个过程,即快速下降及反弹后缓慢下降的过程,推测信号的反弹是由嵌顿在肺等部位的 CTC 重新进入血液循环中引起的。通过对比耳部黑色素瘤模型与腹部皮肤黑色素瘤模型可以发现,两种模型的 CTC 数目都呈现出逐渐增多的趋势。腹部黑色素瘤模型中的 CTC 出现得更早,数目更多。此外,将聚焦探头与非聚焦探头的检测结果进行对比后发现,聚焦型探头可以用于检测具有更高通量的大血管,因此检测到 CTC 信号的概率更高。

线性光声检测使用的激光能量较低,信号幅值较低,因此一些低含量的黑色素细胞难以被检出。因此,Zharov 等<sup>[54]</sup>提出了一种非线性光声信号检测方法。即:当激光能量高于阈值时,高强度激光使得细胞内产生纳米级气泡,对光声信号进行非线性放大,同时背景信号不会被非线性放大。这种方法可以更加有效地区分目标信号与背景信号。实验选用 1064 nm 脉冲激光,重复频率为 2 kHz 或 10 kHz。按照黑色素含量将 B16F10 细胞分为高、中、低、极低组。首先检测四组黑色素瘤细胞在 PBS、血液及活体中的光声信号幅值,结果显示从高组到极低组,光声信号强度显著降低。随着激光能量通量由 0 增加到  $800 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ ,光声信号强度呈指数增长。检测到黑色素瘤信号的比例随着激光能量通量的增加而增加,高组的黑色素瘤细胞的检测率在  $800 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$  时趋近于 100%。此项研究表明,非线性光声检测可以有效提高黑色素瘤 CTC 的检测率。

PAFC 除了可以实现血管中黑色素瘤 CTC 的信号检测,还可以实现前哨淋巴结中黑色素瘤 CTC 的无标记检测<sup>[48]</sup>。建立耳部原位癌模型,选用 639 nm 和 850 nm 激光进行检测,结果发现淋巴结中黑色素瘤细胞的信号高于背景信号。实验中通过特定比例的 639 nm 和 850 nm 激光激发的光声信号实现了黑色素瘤细胞的识别。早期淋巴管和淋巴结的实时信号检测结果表明,在肿瘤发展的初期,只有极少数的 CTC,而在接种 1~2 周后,CTC 的数目从  $(0.26 \pm 0.05) \text{ min}^{-1}$  增加到  $(2.13 \pm 0.3) \text{ min}^{-1}$ ,随着时间推移,瘤块不断增大,检测到的光声信号数目也呈增加的趋势。淋巴结中的 CTC 检测可以在癌症早期反映肿瘤的转移情况,这对皮肤癌的转移诊断与监测具有重要意义。

### 3.1.2 活检、瘤块挤压及激光损伤等对黑色素瘤循环肿瘤细胞的影响

2013 年,Zharov 等<sup>[46]</sup>针对外部干预是否会影响 CTC 进行了实验研究。实验中采用 1064 nm 的脉冲激光器(单脉冲能量为  $50 \mu\text{J}$ ,脉宽为 10 ns)激发信号,采用 2.25 MHz 非聚焦型超声探头进行光声信号的接收。在实验中,裸鼠共分为两组,第一组为实验组,共 27 只裸鼠,分别建立耳部及皮下乳腺癌模型与皮肤癌模型(乳腺癌细胞与黑色素瘤细胞均使用绿色荧光蛋白标记),待瘤块长至  $220 \sim 260 \text{ mm}^3$  时,对实体肿瘤分别进行挤压、活检、完全的肿瘤移除或激光损伤等操作。第二组为对照组,共 15 只裸鼠,未进行瘤块接种操作,同样对其进行挤压或外科手术。每组操作中至少有 5 只裸鼠,每次 CTC 检测主要包括三个连续阶段,即操作前、操作时与操作后。

对 3 只耳部接种乳腺癌细胞的裸鼠进行手指挤压 10 min 检测,5 只背部接种黑色素瘤的裸鼠进行压力测试,即让其承受 12 N 的负载用以模拟挤压压力,接触面积为  $0.5 \text{ cm}^2$ 。5 只耳部接种黑色素瘤的裸鼠进行瘤块活检,另有 2 只在活检后进行瘤块的全部切除。7 只耳部接种黑色素瘤的裸鼠进行瘤块的全部切除。3 只耳部接种乳腺癌的裸鼠进行激光损伤操作,即使用 50 mW 功率的 488 nm 连续激光照射 30 min。同时检测了黑色素瘤 CTC 的光声与荧光信号,以及乳腺癌 CTC 的荧光信号。每个实验组对应的对照组均进行相同的处理。

实验结果表明,增加压力处理后,荷瘤裸鼠体内的 CTC 数目呈增长的趋势,停止加压后 CTC 数目仍在增加,停止加压 2 h 后 CTC 数目才接近加压前的水平。进行活检操作的裸鼠,其体内的 CTC 数目在活检过程中迅速增多,由活检前的  $0.129 \text{ min}^{-1}$  增加到  $7.51 \text{ min}^{-1}$ ,活检后的第 2 小时仍能检测到  $0.77 \text{ min}^{-1}$ 。两只连续两次进行活检操作的裸鼠,第二次活检后 CTC 数目比第一次活检后检测到的总数少。在肿瘤切除实验中,瘤块切除前 50 min,7 只裸鼠总共检测到 35 个 CTC 信号,切除瘤块 1 h 后只检测到 2 个 CTC 信号,切



除 2~3 h 后未检测到 CTC 信号。对于活检后切除瘤块的裸鼠,在切除瘤块 1 h 后未检测到 CTC 信号。激光照射损伤处理后,荷瘤裸鼠体内的 CTC 数目增加到照射前的 5~10 倍,停止照射 40 min 后 CTC 的数目才降到激光损伤之前的水平。

这项研究证明某些医学过程会诱发 CTC 或促进 CTC 释放至血液循环中。一些对肿瘤的操作,如物理检测中的触诊、活检或激光治疗方法,可能会导致肿瘤细胞从原发灶进入血液循环中。但在肿瘤全部切除后,CTC 的数目会降低,甚至检测不到。

### 3.1.3 磁性纳米颗粒标记的黑色素瘤 CTC 检测

针对人源黑色素瘤细胞中的黑色素含量较低,检测难度较大,Zharov 等<sup>[52]</sup>提出了用于检测人源黑色素瘤细胞 HTB-65、SK-3、SK-MEL-1 与 C8161 细胞的超快 PAFC 系统,并建立了原位癌模型进行活体验证。该系统选用的激光波长为 1064 nm 和 820 nm,激光脉冲重复频率高达 0.5 MHz。选用 3.5 MHz 非聚焦超声探头进行信号检测。首先将人源黑色素瘤细胞从尾静脉注射入血液循环中,通过鼠的耳部血管或肠系膜血管检测信号,从而实现人源黑色素瘤细胞的无标记检测。然后建立原位癌模型,接种后第 10 天首次检测到了 C8161 细胞信号。这表明,超快 PAFC 系统可以用于人源黑色素瘤细胞的在体无标记检测,但检测到的人源黑色素瘤细胞的数目明显低于可以检测到的高黑色素含量的黑色素瘤细胞的数目。因此在研究中采用人源多克隆抗体的 10 nm 磁性纳米颗粒靶向黑色素瘤细胞,用以增强信号。通过尾静脉注射纳米颗粒靶向黑色素瘤细胞,并在检测部位附近放置磁铁,聚集磁性纳米颗粒靶向的细胞。结果发现,由于 CTC 的聚集,检测到的信号数目明显增多,且信号强度明显增强。因此使用磁性纳米颗粒可以有效提高低黑色素含量黑色素瘤细胞的光声信号强度,并聚集黑色素瘤细胞,为 CTC 的治疗提供了有利条件。

### 3.1.4 在体光声流式图像细胞仪对黑色素瘤细胞的激光诊疗

肿瘤转移的传统临床疗法见效慢,许多药物不能到达转移部位。一些新型的基于转移特征的诊疗方法具有较好的临床治疗效果,但这些诊疗方法在早期微小转移灶存在时未能取得良好的治疗效果,同时还有一些副作用。从另一角度来说,直接针对 CTC 的治疗方法能够降低癌细胞的转移能力。

2016 年,Wang 等<sup>[35]</sup>提出了一套基于双波长的在体光声流式图像细胞仪系统,该系统成功地实现了小鼠动脉和静脉中单个循环黑色素瘤细胞的无标记成像,并结合高能量纳秒激光器对黑色素瘤进行了特异激光治疗。该系统将双波长(532 nm 和 1064 nm)快速扫描激光用于光声成像,同时结合单个细胞分辨率级别的高 CTC 选择性的 1064 nm 同轴纳秒激光束杀死 CTC。当有足够能量的纳秒激光脉冲照射黑色素瘤 CTC 时,细胞内黑素小体的温度超过了爆炸性汽化温度阈值,使得 CTC 死亡的同时亦不会损伤周围组织。基于此原理,当系统检测到的光声信号幅值高于设定阈值时,通过硬件触发高能量纳秒激光杀死检测到的 CTC,从而达到激光诊疗的目的。

为了验证该系统对 CTC 的诊疗效果,采用 1064 nm 脉冲激光体外照射 B16F10 细胞,并对单层循环肿瘤细胞逐步增加激光能量。结果显示,8.8 J·cm<sup>-2</sup> 的 1064 nm 脉冲激光足够致死 B16F10 细胞。为了验证激光对周围组织的损伤,对使用能量高达 30 J·cm<sup>-2</sup> 的激光对单层红细胞进行照射,未发现明显的损伤。最后使用活体模拟实验验证了该系统的诊疗效果。实验中将 B16F10 细胞与血液混合,并通过注射泵使细胞流经毛细管。毛细管置于诊疗系统中,实验组检测到 CTC 时自动触发治疗激光,对照组关闭治疗激光。收集两组流过系统后的样本,并皮下接种到两组裸鼠体内进行培养,每周对接部位进行一次光声显微镜成像,监测肿瘤的形成。30 d 后,实验组 6 只裸鼠中只有一只体内发现了肿瘤,且瘤块长大缓慢。而对照组所有裸鼠体内均发现了肿瘤,且瘤块长大迅速。研究结果表明,在体光声流式图像细胞仪诊疗系统具有清除 CTC 的能力,该系统在抑制肿瘤细胞转移方面具有广阔的应用前景。

## 3.2 乳腺癌 CTC 的实时检测与治疗

对于具有内源性特异性吸收物质的细胞,PAFC 可以选用特定的波长实现细胞检测,获得可以与背景信号区分开来的明显的光声信号。但是对于没有这类特征的待检测细胞,信号就难以被区分开来,此时就需要一些外源物质,如具有光特异性吸收的纳米颗粒<sup>[43,55-57]</sup>或光转换蛋白<sup>[43]</sup>,以增强待检测细胞的光声信号。随着研究的不断深入,采用带有抗体的磁性颗粒进行靶向标记 CTC 的实验被陆续开展起来。

### 3.2.1 磁性纳米颗粒标记的乳腺癌 CTC 检测

Zharov 等<sup>[58]</sup>利用双色 PAFC 实现了双色纳米颗粒标记的乳腺癌 CTC 检测。研究中使用 639 nm 与 900 nm 的双波长激光,两激光激发时存在 10 ms 的时间差,用以区分不同波长激光产生的光声信号。为了提高乳腺癌细胞的检测特异性,选用双色磁性纳米颗粒——磁性纳米颗粒(MNPs)与金碳纳米管(GNTs)进行标记。MNPs 连接到尿激酶激活物的氨基末端片段上,可以特异性靶向该激活物受体,这种受体在许多种癌细胞(包括乳腺癌细胞)中具有高表达量,而在正常细胞中的表达量很低,因此可以达到纳米颗粒特异性靶向乳腺癌细胞的目的。MNPs 在 639 nm 具有区别于背景吸收的较强的光谱吸收,因此使用 639 nm 的激光激发 MNPs 信号。叶酸受体在肿瘤细胞中的表达量较高,但在正常细胞中不表达,因此 GNTs 可以通过特异性靶向叶酸受体达到标记乳腺癌细胞的目的。与 MNPs 相比,GNTs 在 900 nm 的光谱吸收更高,因此选用 900 nm 的激光激发 GNTs 信号。

体外实验验证了 MNPs 与 GNTs 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞系具有较高的特异性靶向效率。在尾静脉注射实验中,分别注射体外标记的乳腺癌细胞与在体标记的乳腺癌细胞,并研究其代谢动力学。结果表明,检测到的乳腺癌 CTC 的信号数目与变化趋势基本一致,说明纳米颗粒的在体靶向率较高。通过在腹部皮下建立原位癌模型进行定期检测,结果发现检测到的信号数目逐渐增多,这与之前的研究是一致的。在检测血管附近放置磁铁,发现检测到的光声信号强度明显增加,而磁铁移除后,信号强度下降,说明利用磁性纳米颗粒的磁性可以有效增强光声信号。

PAFC 可以通过纳米颗粒标记实现在血管中对乳腺癌 CTC 的检测,而且利用纳米颗粒的磁性可以实现光声信号的富集,增强原本难以和背景区分的光声信号,实现更优的检测效果。使用相同的标记方法,也可以实现前哨淋巴结中乳腺癌 CTC 的检测<sup>[48]</sup>。PAFC 与光热技术的结合实现了淋巴结中纳米颗粒标记的乳腺癌 CTC 的检测,这预示着 PAFC 可以实现癌细胞更早期的转移监测。同时,光热技术可以对淋巴结中检测到的肿瘤细胞进行清除,一定程度上抑制了癌细胞的转移。

### 3.2.2 外泌体的检测

为了能够优化癌症的早期检测,Zharov 等<sup>[51]</sup>将与癌症相关的颗粒(CTP)作为早期诊断标记物,其中包括外泌体。与 CTC 相比,CTP 出现得更早,因此可以实现更早期的肿瘤转移检测。

实验采用双光斑、飞行时间光声荧光流式细胞术系统。CTC 或 CTP 依次穿过两道间隔约 20~40  $\mu\text{m}$  的光斑,每通过一道光斑便会产生一个光声信号,光声信号被超声探头接收并存储,这样细胞的信号图在时域上便会呈现偏移,根据偏移量可以推算出血液的流速。光声部分使用高重复频率 532 nm 和 820 nm 的纳秒级(0.6~8 ns)激光激发黑色素或纳米颗粒标记的 CTP,3.5 MHz 的非聚焦超声探头进行信号接收。荧光素标记的 CTP 信号使用 488 nm 连续激光激发。

研究中对鼠源黑色素瘤细胞(B16F10)、人乳腺癌细胞(MDA-MB-231)和表达绿色荧光蛋白(GFP)的鼠源腺癌(MTLn3)细胞分别进行了检测。对于乳腺癌检测部分,选用尺寸为 40~60 nm、吸收峰在 850 nm 的金纳米颗粒作为光声造影剂。通过体外分离 CTP 检测法验证了光声荧光流式细胞术可以检测到 CTP 信号,尾静脉注射 CTP 同样也可以检测到明显的信号。在采用 PAFC 检测原位癌模型的 CTP 与 CTC 信号前,会先通过尾静脉注射金纳米颗粒,通过叶酸靶向 CTC 与 CTP,最终检测到的光声信号包括 CTC、CTP 以及 CTC 团聚体的信号。由于 CTP 会因癌症种类及阶段不同而具有不同的结构和分子组成,所以对光声信号和荧光信号进行宽度和形状的分析可以将 CTP 和 CTC 区分开来。

检测结果表明,CTP 比 CTC 出现得更早,且在检测到的信号中,CTP 占据的比例大于 CTC 占据的比例。光声荧光流式细胞术系统实现了 CTP 与 CTC 的检测,并可根据信号宽度和峰值将 CTP 和 CTC 区分开来,用更加复杂的峰形参数可区分出 CTC 团块,这对 PAFC 临床意义的发掘以及癌症的早期检测具有重要意义。

### 3.2.3 光热开关纳米颗粒标记的 CTC 检测

Zharov 等<sup>[43]</sup>发现了一种新的光热开关纳米颗粒(PTSNs),随着特定光的照射,这种颗粒的吸收峰会发生可控的、可逆的偏移。Zharov 等在研究使用 MNPs 与 GNTs 靶向标记 MDA-MB-231 细胞,并使用 PAFC 结合光热技术对该细胞进行了检测。



实验中使用 532 nm 和 671 nm 的激光进行体外验证。在开启开关之前,532 nm 激光能激发出光热信号,而 671 nm 激光则可激发出明显的光热信号。在纳米颗粒标记的乳腺癌细胞周围放置磁体,使细胞聚集在磁体附近,532 nm 激光激发的光热信号下降,而 671 nm 激光却激发出很强的光热信号。打开光热开关后,GNTs 吸收谱蓝移,532 nm 激光激发的光热信号恢复,而 671 nm 激光激发的光热信号变弱。基于此原理,使用 671 nm 与 820 nm 激光激发光声信号,进行 CTC 在体检测。实验中共设置三束激光,分别为 820 nm 的光声信号激发激光、820 nm 的 GNTs 开关激光以及 671 nm 的光声信号激发激光。尾静脉注射 GNTs 标记的乳腺癌细胞用来模拟在体 CTC,CTC 流过第一束激光时被激发出较强的光声信号,这是由于 GNTs 在 820 nm 处具有强吸收;CTC 流经第二束光斑时,GNTs 被打开,吸收峰发生蓝移;CTC 流经第三束光斑时被 671 nm 激光激发出较强的激光。检测结果表明,820 nm 开关激光可以在体调控 GNTs 的吸收峰。

该研究发现,与光开关荧光蛋白相比,光开关控制的光热/光声纳米颗粒具有更快的光热选择时间、更高的光热/光声信号对比度以及更低的毒性。CTC 标记的 PTSNs 可用于区分血液中新出现的 CTC 和血液中已检测过的 CTC,克服了传统 CTC 检测和成像的缺点,这对于 CTC 转移机制的研究具有重要意义。

#### 3.2.4 循环肿瘤干细胞的检测与治疗

肿瘤干细胞与肿瘤的生长和转移密切相关,它在循环系统中的数目非常少,传统的检测方式难以检测到。Zharov 等<sup>[42]</sup>提出了结合光热技术的 PAFC 系统,该系统使用 GNTs 增强光声和光热信号,实现了肿瘤干细胞的检测与清除。

Zharov 等采用 639 nm 和 850 nm 的激光激发 MNPs 与 GNTs 标记的 MDA-MB-231 乳腺癌细胞,其中 MNPs 连接 CD44 抗体,用于靶向乳腺癌细胞中高表达的 CD44 受体,GNTs 连接叶酸或 CD44 抗体。体外验证了 MNPs 与 GNTs 在含有乳腺癌细胞血液中的靶向效率,利用磁铁聚集磁性纳米颗粒标记的细胞可以有效提高信号的强度。基于光热效应,当激光能量密度达到  $0.5 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$  时,由于纳米颗粒的强吸收,乳腺癌细胞内因产生微泡而导致损伤,从而达到了治疗目的。原位癌模型检测中,在第四周尾静脉注射连接叶酸的 GNTs 与连接 CD44 的 GNTs,用于靶向乳腺癌 CTC。PAFC 对 CTC 的检测结果显示,通过 CD44 靶向的 CTC 占有检测到的 CTC 的 8.8%,推测 CD44 靶向的 CTC 可能是肿瘤干细胞。

这套系统集成了解细胞的检测与清除功能,同时保证了较好的灵敏度和深度,可以用于所有易转移癌细胞的检测与清除,同时对于肿瘤干细胞分子水平的生物机制有更好的理解。

## 4 结束语

PAFC 基于光声效应原理,利用被检测物对特定波长激光的特异性吸收产生较强光声信号的原理进行在体检测。该技术通过黑色素瘤 CTC 的无标记检测可以进行皮肤癌转移检测,评估医学物理过程和治疗效果,通过磁性纳米颗粒标记达到了聚集捕获黑色素瘤 CTC 的目的。同时,该技术也可实现红细胞、镰刀型红细胞、白细胞及疟原虫<sup>[29]</sup>的无标记在体检测。针对乳腺癌细胞等对激光光子没有特异性吸收的细胞,可通过纳米颗粒标记技术实现这些细胞的检测与捕获。此外,PAFC 不仅可用于动物血管的检测,也可以应用于植物鞘管的检测<sup>[50]</sup>。光声技术可与其他检测方法相结合进行在体检测,如拉曼检测<sup>[45]</sup>、荧光检测<sup>[46]</sup>、光热检测<sup>[44]</sup>等,进一步提高了 PAFC 的应用范围与检测准确度。

PAFC 由动物实验推向临床面临着巨大挑战。首先,人体皮肤较厚,皮肤组织对激光的吸收、散射会导致激光能量衰减,降低信号的检测效率,对于较深的血管就更加难以检测。不能为了提高检测效率而提高激光能量,因为这会涉及到激光的安全性问题。其次,对于本身不含有特异性吸收物质的细胞,需采用纳米颗粒标记,而纳米颗粒探针具有一定的毒性,这些颗粒会残留在肾脏中,不容易被代谢掉。虽然 PAFC 可以实现无标记检测 CTC 的对象较为单一,目前仅限于黑色素瘤细胞,但可以通过基因调控过表达黑色素或寻找其他内源强吸收物质的方法,拓宽 PAFC 的应用范围。目前的实验研究正在努力将检测参数逐渐靠近人体检测参数,通过设计手环<sup>[29]</sup>等方式实现 PAFC 在人体的 CTC 无标记检测。寻找低毒性的纳米探针靶向 CTC 解决无标记检测 CTC 中的假阴性信号问题,结合 PT 等技术实现血管中 CTC 的在体高效检测与实时诱导凋亡,是 PAFC 未来的发展方向。

## 参 考 文 献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2016[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2016, 66(1): 7-30.
- [2] National Bureau of Statistics of China. China statistical yearbook 2010[J]. Beijing: China Statics Press, 2010.
- [3] Chen W Q, Zheng R S, Baade P D, *et al.* Cancer statistics in China, 2015[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2016, 66(2): 115-132.
- [4] Plaks V, Koopman C D, Werb Z. Circulating tumor cells[J]. Science, 2013, 341(6151): 1186-1188.
- [5] Chaffer C L, Weinberg R A. A perspective on cancer cell metastasis[J]. Science, 2011, 331(6024): 1559-1564.
- [6] Cristofanilli M, Budd G T, Ellis M J, *et al.* Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer[J]. New England Journal of Medicine, 2004, 351: 781-791.
- [7] Cohen S J, Punt C J, Iannotti N, *et al.* Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer[J]. Journal of Clinical Oncology, 2008, 26(19): 3213-3221.
- [8] de Bono J S, Scher H I, Montgomery R B, *et al.* Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer[J]. Clinical Cancer Research, 2008, 14(19): 6302-6309.
- [9] Alix-Panabières C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer[J]. Clinical Chemistry, 2013, 59(1): 110-118.
- [10] Galanzha E I, Zharov V P. Circulating tumor cell detection and capture by photoacoustic flow cytometry *in vivo* and *ex vivo* [J]. Cancers, 2013, 5(4): 1691-1738.
- [11] Alix-Panabières C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research[J]. Nature Reviews Cancer, 2014, 14(9): 623-631.
- [12] Novak J, Georgakoudi I, Wei X, *et al.* *In vivo* flow cytometer for real-time detection and quantification of circulating cells[J]. Optics Letters, 2004, 29(1): 77-79.
- [13] Ding Y, Wang J, Fan Z, *et al.* Signal and depth enhancement for *in vivo* flow cytometer measurement of ear skin by optical clearing agents[J]. Biomedical Optics Express, 2013, 4(11): 2518-2526.
- [14] He W, Wang H, Hartmann L C, *et al.* *In vivo* quantitation of rare circulating tumor cells by multiphoton intravital flow cytometry[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007, 104(28): 11760-11765.
- [15] Sigrist M W. Laser generation of acoustic waves in liquids and gases[J]. Journal of Applied Physics, 1986, 60(7): R83-R122.
- [16] Viator J A, Goldschmidt B S, Bhattacharyya K, *et al.* Photoacoustic flow cytometry for detection and capture of circulating melanoma cells[M]//Circulating Tumor Cells: Isolation and Analysis. New Jersey: John Wiley & Sons, Incorporation, 2016: 249-266.
- [17] Bell A G. On the production and reproduction of sound by light[J]. American Journal of Science, 1917, 20: 305-324.
- [18] Zeng Guang, Shi Yan, Song Liang, *et al.* Novel illumination design of acoustic resolution photoacoustic microscopy system[J]. Chinese J Lasers, 2016, 43(2): 0204002.  
曾光, 石岩, 宋亮, 等. 新型声学分辨率光声显微镜系统照明设计[J]. 中国激光, 2016, 43(2): 0204002.
- [19] Hill D W, Powell T. Non-dispersive infra-red gas analysis in science, medicine, and industry[M]. [S.l.]: Plenum Press, 1968.
- [20] Rosenzweig A. Photoacoustic spectroscopy of solids[J]. Optics Communications, 1973, 7(4): 305-308.
- [21] Mc Donald F A, Wetsel G C, Jr. Generalized theory of the photoacoustic effect[J]. Journal of Applied Physics, 1978, 49(4): 2313-2322.
- [22] Ode H. Photoacoustic microscope for detecting reflected detection light resulting from modulation by specimen: US9335253[P]. 2016-05-10.
- [23] Xu M, Wang L V. Photoacoustic imaging in biomedicine[J]. Review of Scientific Instruments, 2006, 77(4): 041101.
- [24] Xu Dong, Xiang Liangzhong, Ji Xuanrong. Photoacoustic imaging system based on multi-channel parallel acquisition [J]. Chinese J Lasers, 2011, 38(2): 0204002.  
许栋, 向良忠, 纪轩荣. 基于多通道并行采集的光声成像系统[J]. 中国激光, 2011, 38(2): 0204002.

- [25] Yin Bangzheng, Xing Da, Wang Yi, *et al.* Fast photoacoustic tomography based on multivariate linear array detector [J]. *Acta Optica Sinica*, 2005, 25(3): 331-334.  
尹邦政, 邢达, 王毅, 等. 基于多元线性阵列探测器的快速光声层析成像[J]. *光学学报*, 2005, 25(3): 331-334.
- [26] He G, Xu D, Qin H, *et al.* *In vivo* cell characteristic extraction and identification by photoacoustic flow cytography [J]. *Biomedical Optics Express*, 2015, 6(10): 3748-3756.
- [27] Sarimollaoglu M, Nedosekin D A, Simanovsky Y, *et al.* *In vivo* photoacoustic time-of-flight velocity measurement of single cells and nanoparticles[J]. *Optics Letters*, 2011, 36(20): 4086-4088.
- [28] Cai C, Nedosekin D A, Menyayev Y A, *et al.* Photoacoustic flow cytometry for single sickle cell detection *in vitro* and *in vivo* [J]. *Analytical Cellular Pathology*, 2016, 2016: 2642361.
- [29] Menyayev Y A, Carey K A, Nedosekin D A, *et al.* Preclinical photoacoustic models: application for ultrasensitive single cell malaria diagnosis in large vein and artery[J]. *Biomedical Optics Express*, 2016, 7(9): 3643-3658.
- [30] Liu R, Wang C, Hu C, *et al.* *In vivo*, label-free, and noninvasive detection of melanoma metastasis by photoacoustic flow cytometry[C]. *SPIE*, 2014: 89440Q.
- [31] Yang P, Liu R, Niu Z, *et al.* Noninvasive and label-free detection of circulating melanoma cells by *in vivo* photoacoustic flow cytometry[C]. *SPIE*, 2015: 93240G.
- [32] Zharov V P, Galanzha E I, Shashkov E V, *et al.* *In vivo* photoacoustic flow cytometry for monitoring of circulating single cancer cells and contrast agents[J]. *Optics Letters*, 2006, 31(24): 3623-3625.
- [33] Galanzha E I, Zharov V P. *In vivo* photoacoustic and photothermal cytometry for monitoring multiple blood rheology parameters[J]. *Cytometry Part A*, 2011, 79(10): 746-757.
- [34] Galanzha E I, Shashkov E V, Spring P M, *et al.* *In vivo*, noninvasive, label-free detection and eradication of circulating metastatic melanoma cells using two-color photoacoustic flow cytometry with a diode laser [J]. *Cancer Research*, 2009, 69(20): 7926-7934.
- [35] He Y, Wang L, Shi J, *et al.* *In vivo* label-free photoacoustic flow cytography and on-the-spot laser killing of single circulating melanoma cells[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 39616.
- [36] Oppenheim A V, Willsky A S, Nawab S H. *Signals and systems*[M]. New Jersey: Prentice-Hall Englewood Cliffs, 1983.
- [37] Strohm E M, Berndl E S, Kolios M C. Probing red blood cell morphology using high-frequency photoacoustics [J]. *Biophysical Journal*, 2013, 105(1): 59-67.
- [38] Strohm E M, Berndl E S, Kolios M C. High frequency label-free photoacoustic microscopy of single cells [J]. *Photoacoustics*, 2013, 1(3): 49-53.
- [39] Strohm E M, Berndl E S, Kolios M C. Circulating tumor cell detection using photoacoustic spectral methods [C]. *SPIE*, 2014: 89430D.
- [40] Niu Z, Yang P, Wei D, *et al.* Improving the signal analysis for *in vivo* photoacoustic flow cytometry[C]. *SPIE*, 2015: 932413.
- [41] 刘素美, 李书光. 超声检测信号处理的小波基选取[J]. *无损探伤*, 2004, 28(6): 12-15.
- [42] Galanzha E I, Kim J W, Zharov V P. Nanotechnology-based molecular photoacoustic and photothermal flow cytometry platform for *in-vivo* detection and killing of circulating cancer stem cells [J]. *Journal of Biophotonics*, 2009, 2(12): 725-735.
- [43] Galanzha E I, Nedosekin D A, Sarimollaoglu M, *et al.* Photoacoustic and photothermal cytometry using photoswitchable proteins and nanoparticles with ultrasharp resonances [J]. *Journal of Biophotonics*, 2015, 8(1/2): 81-93.
- [44] Nedosekin D A, Juratli M A, Sarimollaoglu M, *et al.* Photoacoustic and photothermal detection of circulating tumor cells, bacteria and nanoparticles in cerebrospinal fluid *in vivo* and *ex vivo* [J]. *Journal of Biophotonics*, 2013, 6(6/7): 523-533.
- [45] Shashkov E V, Galanzha E I, Zharov V P. Photothermal and photoacoustic Raman cytometry *in vitro* and *in vivo* [J]. *Optics Express*, 2010, 18(7): 6929-6944.
- [46] Juratli M A, Sarimollaoglu M, Siegel E R, *et al.* Real-time monitoring of circulating tumor cell release during tumor manipulation using *in vivo* photoacoustic and fluorescent flow cytometry [J]. *Head & Neck*, 2014, 36(8): 1207-1215.



- [47] Galanzha E I, Shashkov E, Sarimollaoglu M, *et al.* *In vivo* magnetic enrichment, photoacoustic diagnosis, and photothermal purging of infected blood using multifunctional gold and magnetic nanoparticles[J]. Plos One, 2012, 7(9): e45557.
- [48] Galanzha E I, Kokoska M S, Shashkov E V, *et al.* *In vivo* fiber-based multicolor photoacoustic detection and photothermal purging of metastasis in sentinel lymph nodes targeted by nanoparticles[J]. Journal of Biophotonics, 2009, 2(8/9): 528-539.
- [49] O'Brien C M, Rood K D, Bhattacharyya K, *et al.* Capture of circulating tumor cells using photoacoustic flowmetry and two phase flow[J]. Journal of Biomedical Optics, 2012, 17(6): 061221.
- [50] Nedosekin D A, Khodakovskaya M V, Biris A S, *et al.* *In vivo* plant flow cytometry: a first proof-of-concept[J]. Cytometry Part A, 2011, 79(10): 855-865.
- [51] Nolan J, Sarimollaoglu M, Nedosekin D A, *et al.* *In vivo* flow cytometry of circulating tumor-associated exosomes[J]. Analytical Cellular Pathology, 2016, 2016: 1628057.
- [52] Nedosekin D A, Sarimollaoglu M, Ye J H, *et al.* *In vivo* ultra-fast photoacoustic flow cytometry of circulating human melanoma cells using near-infrared high-pulse rate lasers[J]. Cytometry Part A, 2011, 79(10): 825-833.
- [53] Juratli M A, Galanzha E I, Sarimollaoglu M, *et al.* *In vivo* detection of circulating tumor cells during tumor manipulation[C]. SPIE, 2013: 85652H.
- [54] Sarimollaoglu M, Nedosekin D A, Menyaev Y A, *et al.* Nonlinear photoacoustic signal amplification from single targets in absorption background[J]. Photoacoustics, 2014, 2(1): 1-11.
- [55] Kim J W, Galanzha E I, Shashkov E V, *et al.* Golden carbon nanotubes as multimodal photoacoustic and photothermal high-contrast molecular agents[J]. Nature Nanotechnology, 2009, 4(10): 688-694.
- [56] Zharov V P, Galanzha E I, Shashkov E V, *et al.* Photoacoustic flow cytometry: principle and application for real-time detection of circulating single nanoparticles, pathogens, and contrast dyes *in vivo* [J]. Journal of Biomedical Optics, 2007, 12(5): 51503.
- [57] Nedosekin D A, Sarimollaoglu M, Shashkov E V, *et al.* Ultra-fast photoacoustic flow cytometry with a 0.5 MHz pulse repetition rate nanosecond laser[J]. Optics Express, 2010, 18(8): 8605-8620.
- [58] Galanzha E I, Shashkov E V, Kelly T, *et al.* *In vivo* magnetic enrichment and multiplex photoacoustic detection of circulating tumour cells[J]. Nature Nanotechnology, 2009, 4(12): 855-860.