

肝纤维化荧光成像及光谱分析研究进展

林雅婷, 许建树, 谢树森, 林居强*

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, 福建师范大学光电与信息工程学院,
福建 福州 350007

摘要 慢性肝脏损伤将导致肝纤维化, 不及时诊断治疗易进一步发展为肝硬化等更严重的肝脏疾病。近年来, 荧光成像及光谱分析技术以其快速、简便、无损等优势, 极大地推进了肝纤维化疾病的检测和研究, 具有良好的发展前景。重点综述了目前荧光成像及光谱分析技术在肝纤维化组织、细胞以及分子机制研究中的最新成果, 并展望了其研究难点和潜在应用前景。

关键词 图像处理; 肝纤维化; 荧光成像; 光谱分析; 检测

中图分类号 R318.5

文献标志码 A

doi: 10.3788/LOP57.010002

Research Progress on Fluorescence Imaging and Spectral Analysis for Liver Fibrosis

Lin Yating, Xu Jianshu, Xie Shusen, Lin Juqiang*

Key Laboratory of Opto-Electronic Science and Technology for Medicine (Ministry of Education),

Key Laboratory of Photonic Technology of Fujian Province,

College of Photonic and Electronic Engineering, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350007, China

Abstract Chronic liver injury induces liver fibrosis that must be diagnosed and treated within an appropriate timeframe. Otherwise, it can easily evolve into liver cirrhosis, or other more severe liver diseases. In recent years, fluorescence imaging and spectral analysis techniques have greatly promoted the detection and research of liver fibrosis diseases because they offer rapid, simple, and non-instrusive detection, and thus have great potential. This review highlights the latest achievements of fluorescence imaging and spectral analysis techniques in the investigation of tissue, cell, and molecular mechanisms of liver fibrosis. The research difficulties and potential application prospects of the technique regarding liver fibrosis are also discussed.

Key words image processing; liver fibrosis; fluorescence imaging; spectral analysis; detection

OCIS codes 100.2960; 170.4580; 300.6280; 140.3550

1 引言

肝脏是机体新陈代谢和解毒的重要器官, 而肝纤维化是肝脏对重复性刺激损伤进行不断修复的结果。当肝脏损伤持续产生时, 肝脏的再生能力将会逐渐失去, 肝实质细胞被过量的细胞外基质所取代, 导致胞外基质不断沉积、增长、桥接形成纤维状, 最终形成肝纤维化^[1]。越来越多的研究表明腺苷对于

维持肝脏的正常生理功能有着至关重要的作用^[2], 并且腺苷受体在肝纤维化的发病机制中也发挥了积极的作用^[3]。最近有报道表明 A_{2A}R 拮抗剂可以减缓甚至逆转小鼠的酒精性肝纤维化^[4], 对于防治肝纤维化具有重要意义。光学技术与生物学、医学研究手段相结合, 使细胞内的腺苷及其受体可视化, 确切观察其形态、运动、迁移和相互作用等动态行为, 提供肝纤维化形成过程中的时空动态信息, 极大

收稿日期: 2019-05-29; 修回日期: 2019-06-20; 录用日期: 2019-07-02

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(2015CB352006)、国家自然科学基金(61775037)、福建省自然科学基金(2019J01270)

* E-mail: jqclin@fjnu.edu.cn

地丰富对肝纤维化形成机制的认知。光学方法具有快速、简便、无污染、无破坏性、实时、灵敏、适用范围广等优点,已被广泛应用于肝病组织、细胞形态、结构与功能的研究。本文将重点阐述荧光成像及光谱分析在肝纤维化机制中的研究进展,以及目前所面临的机遇和挑战。

2 基于荧光成像的肝纤维化研究

荧光成像是一种落射光照明技术,光源经由滤

光片后产生的一定波长的激发光激发样品产生荧光,再经由滤光片后产生的一定波长的荧光返回物镜,并通过 CCD 成像。能够采用荧光成像技术进行检测的样品需要待测部位能被一定波长的光激发产生荧光^[5]。各种致病因素造成的慢性肝损伤常继发为肝纤维化,如图 1^[6]所示。近年来,一系列荧光成像技术在肝纤维化研究中得到快速发展与应用,如非线性光学显微成像技术、免疫荧光技术、共振能量转移技术、双分子荧光互补技术等。

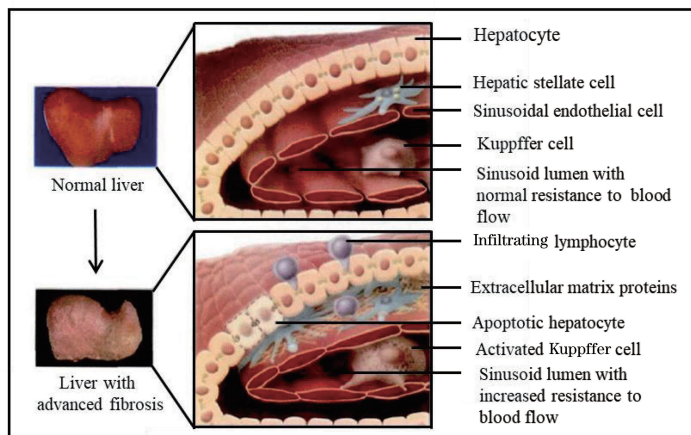


图 1 肝纤维化进程中肝脏结构的变化^[6]

Fig. 1 Liver structural changes during liver fibrosis^[6]

2.1 非线性光学显微成像技术

非线性光学显微成像技术突破了衍射极限的限制,可以获得具有超高空间分辨率、穿透深度大的图像,其中二次谐波(SHG)和双光子激发荧光(TPEF)技术应用得最广泛。SHG技术利用样品的非线性散射进行成像,其信号强度与生物组织中的胶原含量呈正相关。双光子激发荧光是生物组织在被特殊激光照射时产生的一种荧光信号,可用来显示组织及细胞的结构。非线性光学显微成像的原理如图 2 所示,激发激光器是可调谐锁模激光器(波长为 710~990 nm),具有脉冲压缩器(PC)和用于功率控制的声光调制器(AOM)。激光通过二向色镜(DM, 490 nm)和物镜后到达组织标本。二次谐波产生的二次谐波信号在激发光源的另一侧,在透射模式下,通过高数值孔径(NA)电容器、场光阑和 450 nm 带通(BP)滤波器收集,然后由光电倍增管(PMT)记录。双光子激发荧光被物镜收集后经过 700 nm 短通(SP)滤波器,过滤后由另一个 PMT 记录。

1990 年 Denk 等^[7]首次将二次谐波和双光子激发荧光这两种非线性光学显微成像技术结合起来观察生物组织的形态结构,之后越来越多的研究者将

该成像技术用于角膜^[8]、大鼠肝脏^[9]、人肝脏^[10]等部位的胶原纤维成像,还有课题组将其应用于鼻咽癌、肝癌等肿瘤学的研究中^[11]。新加坡的 Tai 等^[9]通过计算机辅助分析技术建立了肝纤维化定量分级系统“Fibro-C-Index”,将二次谐波/双光子激发荧光技术用于自动评估人肝穿刺标本的纤维化程度,发现评估的纤维化进程与传统病理相吻合,且能更特异、敏感地反映肝纤维化的等级。Xu 等^[10]基于扫描得到的组织样本中胶原蛋白的特殊参数,建立了“qFibrosis”系统,该系统可以清楚地区分组织不同纤维化程度之间的差别,因而可以检测出组织纤维化到肝硬化的转变。肝纤维化的特点是肝脏过度沉积细胞外基质,并富含 I/III 型交联胶原^[12]。肝纤维化过程的实质是胶原沉积从门脉延伸到邻近的过程,并伴随着门静脉/门静脉周围纤维化、隔纤维化和肝周纤维化的形成^[13],但肝纤维化逆转过程中胶原形态的变化尚不清楚。有学者对纤维化逆转的病理组织学模式进行研究后发现,纤维间隔变薄可能是纤维化逆转的重要标志^[14]。然而,这一观点主要是基于肝移植活检的横断面研究得到的,人们对纤维化逆转前后胶原特征和胶原形态的动态变化仍

不清楚。最近, Wang 等^[15]采用全自动二次谐波/双光子激发荧光技术对 117 例接受抗病毒治疗的慢性乙型肝炎患者的成对活检标本进行了成像, 以确定门脉区、隔区和纤维区的纤维化逆转情况, 模拟纤维化回归模型, 研究表明, 隔区胶原是评估肝纤维化动态变化最有用的组织, 且间隔宽度是判断肝纤维化预后的重要指标。综上所述, 二次谐波/双光子激发荧光技术鉴别纤维和非纤维胶原蛋白的能力, 对研究纤维化具有重要的指导意义。

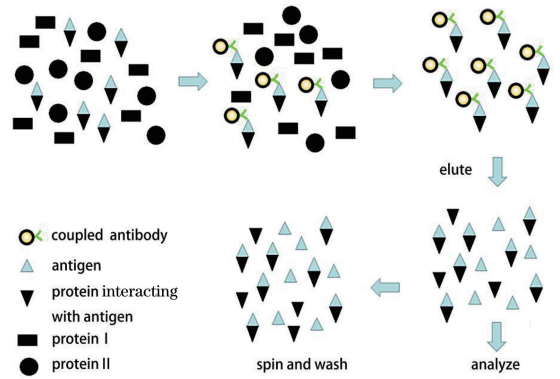


图 3 免疫荧光技术原理图

Fig. 3 Schematic of immunofluorescence

可以通过分解脂滴来提供激活 HSC 的能量, 促进了肝纤维化的发生。

近年来, 越来越多的研究团队利用免疫荧光技术研究了腺苷以及腺苷受体在各个生理机制中的作用。Ni 等^[19]利用免疫荧光法证明缺血前 $A_{2B}R$ 通过激活 PI3K/Akt 的途径来刺激脾白细胞的产生, 从而发挥限制心肌再灌注损伤的抗炎作用。Terayama 等^[20]使用双重免疫荧光标记证明了腺苷 A_3 受体激动剂可以通过抑制增强的小胶质细胞活化和脊髓背角伤害性输入的异常收缩来减轻神经病理性疼痛的程度。Zhang 等^[21]利用共聚焦免疫荧光法证明了腺苷和多巴胺分别通过 A_{2A} 和 D_2 受体起作用, 调节传入神经元的兴奋性。Chen 等^[22]通过双标免疫荧光证明了 A_{2A} 受体主要在小胶质细胞上表达, 在急性低压缺氧模型小鼠的海马中上调。但是, 目前并没有利用免疫荧光技术研究腺苷及其受体与肝纤维化之间的关系的报道。

2.3 共振能量转移技术

共振能量转移 (RET) 技术是指使能量在相距小于 10 nm 的供体与受体之间转移的技术, 包括生物发光共振能量转移 (BRET) 和荧光共振能量转移 (FRET) 技术, 均被用于肝纤维化早期检测和监控的研究中^[23]。

2.3.1 BRET 技术

BRET 技术的原理是能量在能量供体 (发光酶) 和能量受体 (荧光基团) 之间转移时供体的发射光谱必须与受体的激发光谱相重叠, 且供受体间的距离须小于 10 nm, 当两个距离足够近的目标蛋白产生相互作用时, 即可检测到 BRET 信号, 如图 4 所示^[24]。该技术是一种新的蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 的技术, 其特点是避免了传统检测方法对蛋白质的损害, 可以实现对活体细胞的实时动态检测,

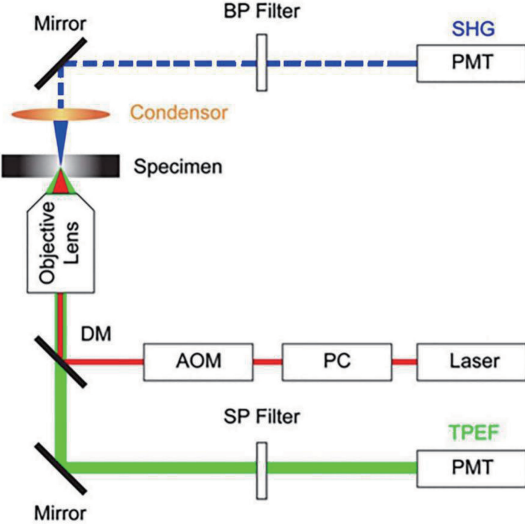


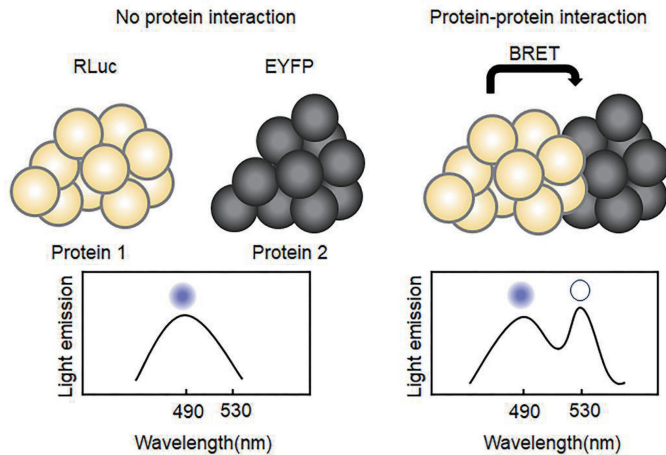
图 2 非线性光学显微成像的原理^[9]

Fig. 2 Schematic illustration of non-linear optical microimaging^[9]

2.2 免疫荧光技术

Coons 在 1941 年使用荧光素标记抗体的方法, 在小鼠组织中成功地检测到了可溶性肺炎双球菌多糖抗原, 从而开创了分子生物学的一种新技术——免疫荧光 (IF) 技术。IF 技术是利用抗原与抗体相结合的原理以及特殊的标记技术 (图 3), 对特异性抗原或抗体进行定位以及定性或定量测量的一门技术^[16], 具有成本低、灵敏度高、重复性好、特异性强、线性范围宽和运用范围广等特点, 已被广泛地应用于医学、化学、生物学等领域。

肝纤维化形成的中心环节是肝星状细胞 (HSC) 的激活^[17]。Inzaugarat 等^[18]将逆转录-聚合酶链反应、蛋白质印迹、酶联免疫吸附测定和免疫荧光等技术相结合, 证明了 NLRP3 炎性体诱导活性氧 (ROS) 的产生、肝纤维化标志物的 mRNA 和蛋白质水平上调, 将直接激活 HSC 细胞, 诱导肝纤维化, 这说明 NLR 家族 (the nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat containing gene family) 在肝纤维化发展中起到了重要作用。有研究表明自噬

图4 BRET技术原理示意图^[24]Fig. 4 Schematic of BRET technique^[24]

大大提高了信息获取的准确性和时效性^[25],在疾病发生的分子机制研究中的重要地位。

腺苷是一种局部反应性代谢物,在调节包括炎症、缺氧和心血管调节在内的生理和病理过程中发挥着主要作用,与肝纤维化疾病关系密切,对于肝纤维化的研究具有重要意义。Cooper等^[26]采用纳米荧光素酶(Nluc)生物发光能量转移(NanoBRET)方法,研究了变构配体对荧光激动剂与完整活细胞腺苷受体A₁受体结合的影响。Hinze等^[27]的BRET实验证实了A_{2A}-A_{2B}AR异聚复合物的形成,而且该复合物具有高特异性BRET信号,观察到A_{2A}R与A_{2B}R(A_{2B}R \geq A_{2A}R)在重组细胞和自然细胞中共同表达时,其药理作用发生了显著变化。用激动剂(腺苷、NECA、CGS21680以及BAY60-6583)和拮抗剂(PSB-603)孵育细胞60 min后获得的BRET信号,与配体不存在情况下的BRET信号相似,这意味着A_{2A}-A_{2B}AR异聚复合物的形成与A_{2A}或A_{2B}配体的存在无关。此外,在A_{2B}受体存在下,A_{2A}选择性配体失去与A_{2A}受体的高亲和力,为异聚复合物成为免疫肿瘤学的药物靶点提供了理论依据。

环磷酸腺苷(cAMP)是一种重要的第二信使,可调节多种生物学过程,包括疾病、细胞分裂、学习、记忆和新陈代谢等。Huang等^[28]将基因编码的生物传感器变体、cAMP结合域与荧光酶素的突变体融合构成了BRET探针,该探针在与cAMP结合后,构象发生了改变。低水平激光照射(LLLI)能提高活细胞内cAMP的水平,即658,785,830 nm处激光的剂量依赖性和波长无关性以及腺苷受体调节LLLI诱导的cAMP水平增加,表明BRET技术可以用来测定腺苷受体在LLLI下诱导活细胞产生的

cAMP,为肝纤维化分子机制研究提供一种有效方法。

2.3.2 FRET技术

FRET技术是指两个荧光基团距离在1~10 nm之间时,供体基团在吸收特定波长的光子后被激发到更高的电子能态,由一对偶极子介导将能量向邻近的受体分子转移。供体的发射光谱与受体的吸收光谱必须具有相当的重叠,而且当它们之间的距离足够接近时,用供体的吸收波长的光激发供体发色基团,能量才会被高效率地共振转移至受体的发射基团上。因此,供体的发射荧光将减弱或消失,受体发射出很强的荧光,如图5所示。FRET技术是目前唯一可以在活细胞内检测蛋白质动态相互作用过程的实时监测技术^[29],具有高灵敏度、高特异性、高通量、检测速度快、样本基本无损、结果准确可靠、操作简单等优点,十分适用于肝纤维化信号路径中相关蛋白相互作用的分子机制研究。

在肝纤维化的发展中,星状细胞(HSC)起着主导作用。正常情况下,HSC处于静息状态,并且只产生少量的细胞外基质(ECM)用于基质膜的形成。当肝脏受损时,静止的HSC大量合成ECM,I型和III型胶原的表达被认为是HSC激活的明显特征。越来越多的研究表明,乙醇诱导后释放的大量腺苷通过HSC上的腺苷受体促进HSC胶原的合成,在肝纤维化疾病中扮演着重要的角色^[3]。有证据表明,过量的腺苷可能促进肿瘤的发生^[30],腺苷在肝纤维化发生机制中起着至关重要的作用。因此,在生理条件下直接检测腺苷将有助于进一步说明它在肝纤维化、癌症发生过程的作用机理。

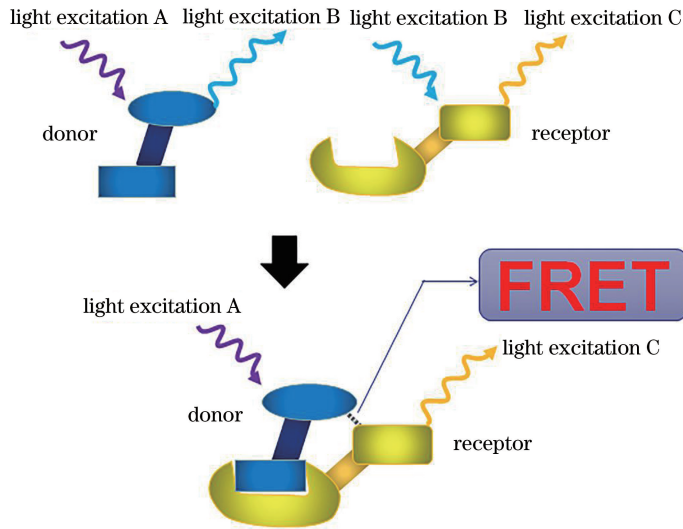


图 5 FRET 原理示意图

Fig. 5 Schematic diagram of FRET

You 等^[31]设计了双排放比率荧光适体探针,即将腺苷结合适体(ABA)分成两半(称为 ABA1 和 ABA2),ABA1 与发蓝光的碳点共价结合作为响应性荧光团(称为 ABA1-CD),ABA2 与红色发光二氧化硅涂覆的量子点相连(称为 ABA2-QDs@SiO₂)。当加入氧化石墨烯后,ABA1-CD 的荧光被淬灭;随后加入 ABA2-QDs@SiO₂ 和不同量的腺苷,颜色由红色变到深蓝。该方法通过 440 nm 和 613 nm 处的荧光强度的比值来定量计算 FRET 效率,随着腺苷浓度增加,发射强度比值(I_{440}/I_{613})逐渐增大,并且检测腺苷的极限低至 2.4 nmol/L。采用该探针检测正常人尿液和肺癌患者尿液中的腺苷含量,结果显示,该探针能准确地区分正常人和患者,有望成为肝纤维化检测的有效手段。

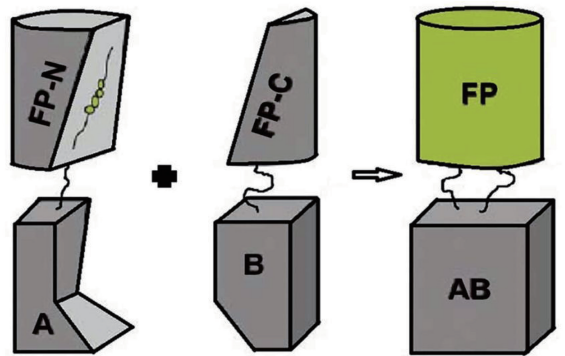
Song 等^[32]设计了基于适体的腺苷荧光测定平台,在腺苷存在的情况下,用 370 nm 波长的光进行激发,银纳米颗粒通过内部过滤效应和电子转移淬灭石墨烯量子点,以此作为腺苷的信号标记。结果表明,石墨烯量子点的荧光随着腺苷浓度的增大而下降,具有对腺苷进行高选择性和高灵敏性检测的优势,且腺苷检测浓度范围为 0.1~30 nmol/L,检测限为 60 pmol/L。此外,该平台可检测生物医学领域中的各种靶分子,具有临床诊断的巨大潜力,有助于肝纤维化诊断试剂盒的开发。

笔者课题组^[33]构建了荧光探针(A₁R-ECFP 和 A_{2A}R-EYFP),并将其瞬时转染至 HEK293T 活细胞,在荧光显微镜下能够准确地观测 A₁R 和 A_{2A}R 的定位;此外,还利用 Iem-spFRET 定量方法计算

了两种腺苷受体在 HEK293T 细胞膜上的相互作用。实验结果表明,A₁R 和 A_{2A}R 在细胞膜上有较弱的相互作用,其结果与杨凤^[34]利用免疫共沉淀技术所得结果一致。

2.4 双分子荧光互补技术

双分子荧光互补(BiFC)技术是将荧光蛋白分子在某些特定的位点切开,使其形成两个不发光的独立片段,这两个片段分别融合目标蛋白,目标蛋白相互作用使两个片段在空间上相互靠近,重新构建形成完整且具有活性的荧光蛋白,并且在该荧光蛋白的激发光激发下发射荧光^[35](图 6)。该技术是一种能够用于简单、直观、快速检测细胞内外目标蛋白在活细胞中的定位和相互作用的新技术。

图 6 双分子荧光互补技术原理示意图^[36]Fig. 6 Schematic of bimolecular fluorescence complementation technique^[36]

G 蛋白偶联受体(GPCR)家族拥有大约 1000 名成员,是哺乳动物中最大的一类膜受体,可作为许多治疗药物的靶标。腺苷受体作为 GPCR 家族中

的重要成员之一,其二聚化的功能和作用具有重要的研究价值。所有的4种AR亚型均存在于大鼠HSC细胞中, $A_{2A}R$ 和 A_1R 的mRNA和蛋白质表达水平远高于 A_{2B} 和 A_3 的表达水平,所以 $A_{2A}R$ 和 A_1R 在肝纤维性疾病的发病机制中起着至关重要的作用^[37]。

Gandia等^[38]将 $A_{2A}R$ 融合至青色荧光蛋白Cerulean($A_{2A}R$ -CN和 $A_{2A}R$ -CC)和黄色荧光蛋白Venus($A_{2A}R$ -VN和 $A_{2A}R$ -VC),然后转染进Cath.a-differentiated(CAD,是Cath.a细胞的一种突变型,Cath.a是一种转基因大鼠肿瘤细胞)细胞中瞬时表达,观察到了细胞膜标记共定位的细胞表面信号。大多数细胞在囊泡结构和弥漫性胞内结构上均表现出不同程度的 $A_{2A}R/A_{2A}R$ 信号,这些结构上的细微变化可能反映了生理上的差异或细胞分化的不同状态,表明 $A_{2A}R/A_{2A}R$ 具有高效的质膜靶向性,至少由3个 $A_{2A}R$ 在神经细胞的质膜上聚集成高阶寡聚化,为G蛋白偶联受体寡聚体的分子组成提供了新见解。

Vidi等^[39]将 $A_{2A}R$ 和 D_{2L} 融合到青色荧光蛋白Cerulean($A_{2A}R$ -CN和 D_{2L} -CC)或黄色荧光蛋白Venus($A_{2A}R$ -VN和 D_{2L} -VC),同时对 A_{2A}/D_{2L} 异源二聚体和 A_{2A} 同源异构体进行可视化和对比。将 D_{2L} -VN与 A_{2A} -VC、 A_{2A} -CN和 A_{2A} -CC共转染到CAD细胞中,Venus荧光的重构表明了 A_{2A}/D_{2L} 异源二聚体的形成,而Cerulean荧光则反映了 A_{2A} 的同源化。荧光显微镜下观察到的细胞同时显示了Cerulean和Venus的荧光信号,表明 A_{2A}/D_{2L} 异种异构体和 A_{2A} 同种异构体在细胞内共存,这两种荧光信号在质膜和细胞内的间隔内基本上是共定位的,首次在活细胞中同时显示了多个GPCR的相互作用。该团队还研究了 D_2 激动剂和拮抗剂对 D_{2L} 和 A_{2A} 异构体定位的影响,用喹啉处理表达 D_{2L} -VN、 A_{2A} -VC、 A_{2A} -CN和 A_{2A} -CC的细胞18h,细胞表面与细胞内Venus(A_{2A}/D_{2L})信号的比值降低,但这种作用可被 D_2 拮抗剂阻断。在互补实验中,转染 D_{2L} -VN、 A_{2A} -VC、 A_{2A} -CN和 A_{2A} -CC的细胞表面用五氯吡咯处理后,Cerulean(A_{2A}/D_{2L})和Venus(D_{2L}/D_{2L})的BiFC信号的表面荧光减少。磺脲阻断奎尼咯会对 A_{2A}/D_{2L} 荧光产生影响,并可能通过降低 D_{2L}/D_{2L} 低聚物的活性来增加 D_{2L}/D_{2L} 的质膜定位,这些观察结果与醌吡咯诱导的 D_{2L}/D_{2L} 同分异构体和 A_{2A}/D_{2L} 异构体的内化相一致,首次利用双分子荧光互补技术监控药物调节腺苷

受体寡聚化,该技术有望成为肝纤维化疾病研究的手段之一。

上述基于荧光信号的技术在材料学、物理学、生物医学、生命科学等学科中具有举足轻重的地位。非线性光学显微成像技术具有较高的空间分辨能力和层析成像能力,与其他成像技术成像系统相比更为复杂,仪器较为昂贵。FRET技术的最大优点在于该技术可以利用信号比值进行数据分析,可以减小误差,是一把丈量分子空间距离的光学“分子尺”。BRET和FRET检测原理大致相同,但对于自发荧光较小的样本,BRET在信噪比方面具有明显优势。与BRET和FRET技术相比,BiFC技术不需要复杂的数据采集,对实验系统的要求较低,所需成本较小,还可以利用不同的荧光颜色在活细胞内同时进行多个蛋白相互作用的检测。

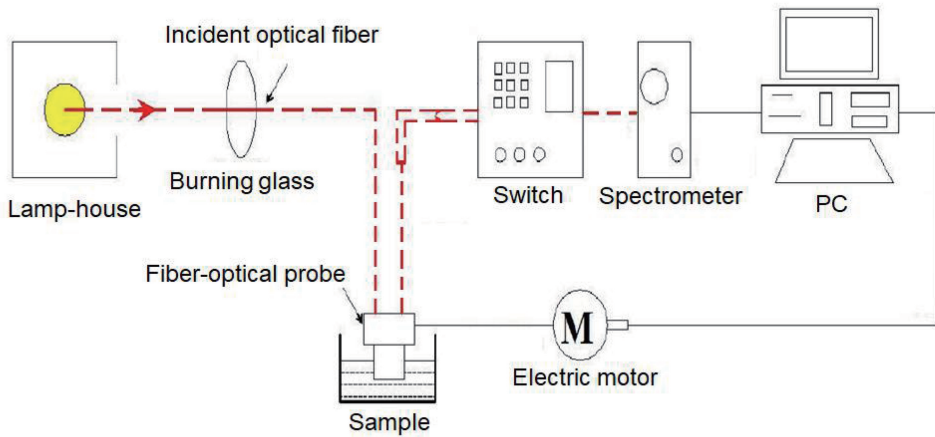
3 基于光谱分析技术的肝纤维化研究

“原子发射光谱分析”简称“光谱分析”,它是利用物质发射的光谱来判断物质组成的一门分析技术。光谱分析法具有快速、直接、无损等优点,已成为近年来疾病诊断的有效方法^[40]。

3.1 漫反射光谱技术

漫反射光谱(DRS)技术是一种通过测量待测样品在光照射下对不同波长光的漫发射,获取样品信息的光谱分析技术(图7)。当光辐射到待测样品表面时,部分光直接发生镜面反射,该部分反射光未进入样品内部发生作用,因此它未携带样品的结构和组织等相关信息,而另一部分光进入样品内部,发生反射、散射、吸收等多次相互作用后,再次返回表面并离开样品,这一部分为漫反射光。漫反射光谱技术具有操作简单、快速、对样品无破坏性、效率高和成本低等优势,在肝纤维化研究中已得到了应用^[41]。

2012年,Fabila等^[42]将足够数量的雄性大鼠差异性地暴露于 CCl_4 中,以诱导不同阶段的肝纤维化,然后通过Mason's Trichrome染色的组织学检查以及谷丙转氨酶/谷草转氨酶(ALT/AST)血清水平评估纤维化程度,利用微创腹腔镜手术从每只大鼠的肝脏表面测量漫反射光谱。测量结果显示,与对照组相比,轻度和晚期纤维化大鼠的漫反射光谱分别在365nm处明显增大了3倍和4倍,漫反射光谱强度随肝脏的纤维化程度线性增加,算法结果表明漫反射光谱检测肝纤维化具有85%的灵敏度和100%的特异性。

图7 漫反射光谱检测系统示意图^[41]Fig. 7 Diagram of diffuse reflectance spectral detection system^[41]

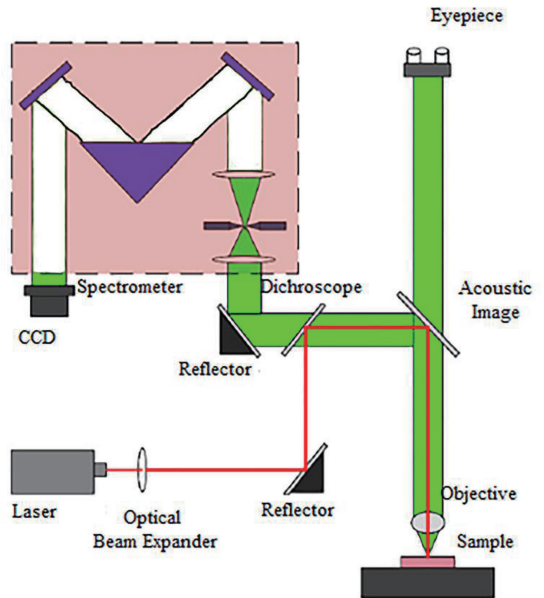
Fabila-Bustos 等^[43]首次报道了在石蜡中保存的人肝脏标本中每个纤维化阶段的独特漫反射谱。他们通过在光学探针和保存的组织之间建立表面接触,于 450~750 nm 处采集得到了光谱信号。根据组织学评价,在 F_0 (无纤维化) 肝脏样品中,漫反射强度在 450~750 nm 波长范围内逐渐增大。相反,与 F_0 肝脏样本相比, F_1 - F_2 (纤维化初期)、 F_3 (纤维化程度严重) 和 F_4 (肝硬化) 样本分别显示出 F_0 样本漫反射强度的 1.5 倍、2 倍和 5.5 倍。在 650 nm 处,肝纤维化的所有阶段都以高灵敏度和特异性 (92%~100%) 明显区分。

Arista Romeu 等^[44]在离体肝脏样本上直接测量漫反射光谱,波长范围为 400~800 nm,实验结果表明漫反射技术能够区分正常肝组织和肝纤维化组织。此外,他们还采用该技术对肝纤维化进行分级判断,结果显示高敏感性和特异性,说明该技术可准确评估肝纤维化的程度。

3.2 拉曼光谱技术

拉曼散射是 1928 年印度物理学家拉曼发现的一种物理现象,也被称作拉曼效应。拉曼散射是指散射分子的转动能级和振动能级发生了变化,导致入射光子频率发生改变。所以,不同物质的拉曼光谱只与其分子结构有关,不会受入射光频率的干扰(图 8)。生物体内的蛋白质、脂质、糖类和核酸等分子结构,会产生不同的拉曼图谱,故被称为“分子指纹”^[45]。拉曼光谱技术具有易制样、样品需求量小、样品无损伤、检测时间短、快速分析、操作方便、干扰小以及实时检测等特点,常被用于研究生物大分子的结构^[46]。拉曼光谱技术通过物质的分子振动光谱来区分不同的物质结构,可以灵敏地反映组织中

信息的微小改变,因此很有希望被应用于肝纤维化的辅助检测和筛查。

图8 拉曼散射原理示意图^[47]Fig. 8 Schematic diagram of Raman scattering^[47]

Ramírez-Elias 等^[48]使用四氯化碳诱导肝纤维化,评估拉曼光谱检测大鼠肝纤维化的早期病理征兆,结果表明,健康和纤维化肝脏的拉曼光谱之间存在显著差异,通过主成分分析(PCA)和线性判别分析法(LDA)进行分类,PCA-LDA 方法的灵敏度为 100%,特异性为 85%,诊断准确率为 93.5%。可见,拉曼光谱技术可用于检测离体肝脏样品是否纤维化。

1995 年修订的《病毒性肝炎防治方案(试用)》中对慢性病毒性肝炎的诊断加入了肝纤维化分期,根据肝纤维化的范围和损伤程度,将肝纤维化分为

4期(S_1 - S_4),从 S_1 到 S_4 逐渐加重,其中 S_4 期已发生早期肝硬化。李师思等^[49]利用四氯化碳橄榄油溶液制作了不同时期的肝纤维化大鼠模型,将大鼠的肝脏组织进行拉曼光谱检测,观察正常组织与 S_1 - S_4 期病变组织的拉曼光谱特征,并比较各个时期不同谱带处的拉曼特征峰值。实验结果表明,不同时期肝纤维化大鼠的近红外激光拉曼光谱检查结果存在差异。

星状细胞激活是肝纤维化形成的重要环节,因此快速有效地鉴别星状细胞对肝纤维化的诊断和治疗具有重要意义。Yildirim等^[50]基于氨基官能化的甲基丙烯酸甲酯与视黄酸和荧光染料共价耦合,通过拉曼成像检测得到了肝星状细胞中含有聚合纳米颗粒视黄酸的结论,这表明视黄酸功能化的纳米粒子可以在所有测试的肝星状细胞和肝脏组织中检测到,且无需额外的标记。权日浩等^[51]使用拉曼光谱技术联合其他手段研究了肝星状细胞和四氯化碳诱导的肝组织损伤动物模型,揭示了肝星状细胞在体外活化过程中,胞内分子组成和结构的变化,以及急性肝损伤条件下肝星状细胞体内活化的高峰时刻及其活化的大致周期,使用代表肝组织内胶原蛋白相对含量的拉曼峰强比值 I_{1640}/I_{1660} 作为肝星状细胞体内活化的拉曼光谱判断依据。采用显微拉曼光谱技术偶联光纤探针对肝星状细胞体内活化进行表征的方法有望成为肝纤维化早期诊断的潜在临床手段。

近年来,众多的研究表明,腺苷及其受体与肝纤维化息息相关,因此腺苷的研究及检测显得十分重要。腺嘌呤碱基和腺苷作为贮存和携带遗传信息的载体参与了遗传信息在生物体细胞内的传递和表达,所以研究腺嘌呤碱基和腺苷的性质对于研究肝纤维化具有重要意义。吴雷等^[52]对腺嘌呤碱基和腺苷的拉曼光谱进行了研究,结果显示,与腺嘌呤相比,腺苷的拉曼光谱在 $412,762,1386,1572\text{ cm}^{-1}$ 等位置出现了新的谱峰。谱峰位置的移动是由于糖苷键的形成,腺苷分子和腺嘌呤分子的拉曼光谱相比振动的位置都发生了改变,它的存在对于腺苷分子的精确检测分析具有重要意义。Villa等^[53]设计了表面增强拉曼光谱/多变量曲线分辨率-交替最小二乘法(SERS/MCR-ALS)方法,在没有干扰的情况下,利用表面增强拉曼光谱(SERS)检测尿液中的腺苷,以及采用多变量曲线分辨率-交替最小二乘法(MCR-ALS)的方法量化腺苷,并通过正常人与癌症患者的尿液评估了SERS/MCR-ALS方法的选择

性、准确性和灵敏性,首次提出了表面增强拉曼化学计量学方法,并将其用于腺苷的检测。Wang等^[54]设计了银纳米颗粒/N-异丙基丙烯酰胺(AgNP/PNIPAAm)表面增强拉曼基底,即银纳米颗粒沿PNIPAAm纳米纤维排列,其可在激光诱导等离子体加热时产生更多的热点,大大改善SERS信号。该基底从亲水状态到疏水状态的温度响应变化可被用于有效捕获疏水性分析物,以进行选择性的SERS检测,并可用于尿液中腺苷的直接检测,且具有良好的再现性和稳定性。因此,拉曼光谱检测技术有助于肝纤维化的早期发现及分期评估,并有望成为肝纤维化早期诊断的潜在临床手段。

3.3 荧光光谱技术

荧光光谱是光谱学的重要组成部分。物质在吸收光后发出荧光,在吸收光的这段时间内许多分子会影响到荧光物质的光谱特征,所以荧光光谱技术在物理学、化学、生物学和医学等领域具有十分重要的应用。利用适当波长的激发光激发被检测物使其产生荧光,根据荧光光谱特征可对癌症进行诊断。根据被检测物的荧光物质不同,可将荧光光谱技术分为“敏化荧光法”和“自体荧光法”。血液成分很复杂,饮食、药物等可以改变血清的荧光光谱,这一点对于肝纤维化的研究极为重要。

秦少平^[55]使用激光器发出的 488 nm 激发光来激发肝纤维化白鼠血清的自体荧光,在 $495\sim 640\text{ nm}$ 范围内采集到了荧光光谱,共检测了37例肝纤维化白鼠血清,14例肝硬化患者血清以及40例健康人血清,并对得到的荧光光谱进行分析。分析后发现肝纤维化白鼠血清的荧光光谱峰位和健康血清相比蓝移了 $2\sim 3\text{ nm}$,肝硬化患者血清较健康血清蓝移了 1 nm ,且带宽变小。

李建东^[56]以氩离子激光器为激发光源,利用 $514.5,488,476.5\text{ nm}$ 波长的激发光激发8例健康白鼠血清、51例肝纤维化白鼠血清,得到了荧光光谱。通过荧光光谱可以发现:用 514.5 nm 光激发血清产生的荧光光谱主要呈单峰结构,峰位在 562 nm 附近, I_{520}/I_{620} 的相对比值有增大的趋势,但差异不大;直接用 488 nm 光激发健康白鼠血清产生的荧光光谱的谱峰在 552.26 nm 附近,肝纤维化小鼠血清的荧光光谱谱峰在 547 nm 附近,相比前者出现了 5 nm 左右的蓝移。 I_{500}/I_{620} 的平均值随肝纤维化程度的增加略有增大,但增大的程度不明显。用 476.5 nm 光激发照射 5 min 后,相对强度 I_{490}/I_{600} 增大,且随肝纤维化程度的增加有增大的趋势。在

某些波长激发光的激发下,肝纤维化程度不同时期的白鼠血清的荧光光谱存在差异,但差异很小。所以该小组在荧光导数分析方法的基础上发展了白鼠血清荧光光谱的二阶导数光谱,对血清荧光光谱作二阶导数处理后,能够在很大程度上区分肝纤维化血清和健康血清。目前,诊断肝纤维化多用肝穿刺的方法,这种办法会给病人带来痛苦。因此,通过分析肝纤维化的荧光光谱可对肝病变的诊断提供有价值的参考意见。

基于两种或者两种以上的光学技术进行检测是未来的检测趋势。以上所述的检测技术的对象各不相同,两种或者两种以上的光学检测能够提高准确

率,例如:Lin 等^[57-58]完成了 FRET 荧光成像和荧光光谱同时检测的任务,搭建了具有三种模式探测通道的检测系统,该系统可实现对单个细胞进行实时动态显微成像和光谱探测;周延玲等^[59]将复合粒子辅助荧光和 SERS 信号提取用于细胞的成像研究,将增强拉曼光谱技术与荧光成像技术结合,充分发挥两种技术各自的优点,提高诊断特异性与灵敏度。目前已有文献利用各种光学技术描述了肝纤维化,本文综述了它们在肝纤维化领域的研究(图 9),但在肝纤维化的高度动态、长时程、多细胞参与互动的形成过程中,研究者们对肝纤维化的认识还只是冰山一角。

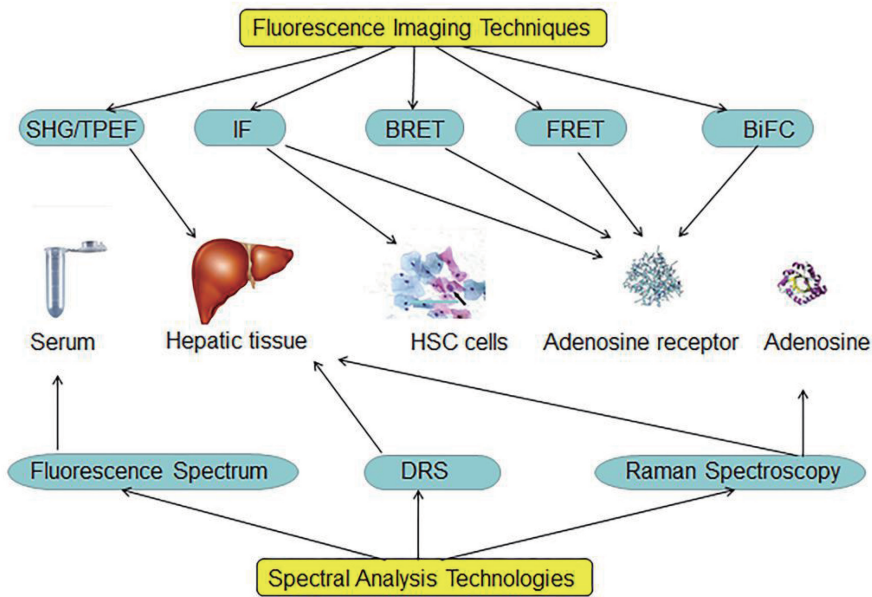


图 9 肝纤维化与光学技术的联系

Fig. 9 Relationship between liver fibrosis and optical technologies

4 结束语

肝癌是一种死亡率很高的癌症,每年的新发病例在 20 万左右。肝脏疾病是一种常见的、危害性极大的疾病,早期症状一般不明显,大多数患者就诊时已经到了中晚期,因此,肝纤维化的诊断是肝脏疾病治疗的关键。无论是非线性光学显微成像技术、免疫荧光技术、共振能量转移技术、双分子荧光互补技术等荧光成像技术,还是漫反射光谱技术、拉曼光谱技术等光谱分析技术,均有待人们去完善和改进。

光学技术在未来的实际临床应用中已经显示出了良好的发展前景,具有快速、无损、检测灵敏度高、特异性好等优点,而且还可以从分子水平上给出诊断信息,对标记物进行实时定量观测等。然而,光学技术在肝纤维化中的研究还处于起步阶段,仍然存

在以下不足:1)荧光探针或荧光染料容易污染或失效,导致实验结果有误;2)仅有特殊结构的肿瘤标志物才能与荧光团融合,限制了肿瘤蛋白的研究范围;3)尚未建立系统的癌症光谱诊断标准,无法对测量的光谱进行区分。随着各种光学技术的完善,以及基础研究的不断积累,两种或多种光学技术相结合的检测方法将不断出现,它们具有互补、精准、快速、简便、可靠等优点,可以解决目前诊断肝纤维化中遇到的活检缺乏时间连续性、难以进行肝纤维化形成过程的检测以及无法评价抗纤维化药物的治疗效果等难题,为肝纤维化的非侵入性、准确性研究发展提供方向。但是,就结合技术而言,系统搭建比较困难且成本较大,例如在 FRET 荧光成像及光谱分析系统搭建过程中,需要解决成像和光谱同时检测、光谱数据分析复杂以及构建荧光探针等难题,在对肝纤

维化程度的判断中(尤其是轻/中度)存在无法定量评估、缺乏客观的量化指标等问题。可以预见,荧光成像和光谱分析技术将成为强有力的肝纤维化诊断方式,例如:与单一的 BiCF 技术模式相比,将其与 FRET 结合可以利用信号比值而非信号强度进行数据分析,可以消除取样误差造成的信号差异;与单一的成像模式相比,结合光谱技术能够在可见光区域获得图像,同时获得样品的空间信息和光谱信息。每种光谱技术所检测出来的特征反射峰不同,多种光谱技术的结合可以避免检测出现的假阳性。因此,两种技术的结合有望获得更加准确的评估结果,将其应用于临床,可以在早期发现肝纤维化,改善大众健康,造福人类。

参 考 文 献

- [1] Yang P. Study on the role of adenosine A₁ receptor in the pathogenesis of liver disease [D]. Nanjing: Nanjing University of Science and Technology, 2013. 杨萍. 腺苷受体 A₁ 在肝脏疾病发病机制中的作用研究[D]. 南京: 南京理工大学, 2013.
- [2] Peng Z S, Fernandez P, Wilder T, et al. Ecto-5'-nucleotidase (Cd₇₃)-mediated extracellular adenosine production plays a critical role in hepatic fibrosis[J]. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 2008, 27(6/7): 821-824.
- [3] Chan E S L, Montesinos M C, Fernandez P, et al. Adenosine A_{2A} receptors play a role in the pathogenesis of hepatic cirrhosis[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2006, 148(8): 1144-1155.
- [4] Chiang D J, Roychowdhury S, Bush K, et al. Adenosine 2A receptor antagonist prevented and reversed liver fibrosis in a mouse model of ethanol-exacerbated liver fibrosis [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69114.
- [5] Di L. Research progress and application of modern microimaging technology[J]. *China Medical Devices*, 2018, 33(2): 107-110. 狄伶. 近代显微成像技术的研究进展与应用[J]. *中国医疗设备*, 2018, 33(2): 107-110.
- [6] Yuan Y. Underlying roles of Wnt2b in the progression of liver fibrosis and related mechanisms [D]. Jinan: Shandong University, 2017. 袁奕. Wnt2b 对肝纤维化进程影响及机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2017.
- [7] Denk W, Strickler J, Webb W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy[J]. *Science*, 1990, 248(4951): 73-76.
- [8] Han M, Zickler L, Giese G, et al. Second-harmonic imaging of cornea after intrastromal femtosecond laser ablation [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2004, 9(4): 760-766.
- [9] Tai D C S, Tan N, Xu S Y, et al. Fibro-C-Index: comprehensive, morphology-based quantification of liver fibrosis using second harmonic generation and two-photon microscopy [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2009, 14(4): 044013.
- [10] Xu S Y, Wang Y, Tai D C S, et al. qFibrosis: a fully-quantitative innovative method incorporating histological features to facilitate accurate fibrosis scoring in animal model and chronic hepatitis B patients[J]. *Journal of Hepatology*, 2014, 61(2): 260-269.
- [11] Raja A M, Xu S Y, Sun W X, et al. Pulse-modulated second harmonic imaging microscope quantitatively demonstrates marked increase of collagen in tumor after chemotherapy[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2010, 15(5): 056016.
- [12] Bedossa P. Reversibility of hepatitis B virus cirrhosis after therapy: who and why? [J]. *Liver International*, 2015, 35(s1): 78-81.
- [13] Ishak K, Baptista A, Bianchi L, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis[J]. *Journal of Hepatology*, 1995, 22(6): 696-699.
- [14] Wanless I R, Nakashima E, Sherman M. Regression of human cirrhosis: morphologic features and the genesis of incomplete septal cirrhosis[J]. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2000, 124(11): 1599-1607.
- [15] Wang B Q, Sun Y M, Zhou J L, et al. Advanced septa size quantitation determines the evaluation of histological fibrosis outcome in chronic hepatitis B patients [J]. *Modern Pathology*, 2018, 31(10): 1567-1577.
- [16] Shen F X, Cheng A C, Wang M S. Application of immunofluorescence technique in the study and diagnosis of poultry infectious diseases [J]. *China Poultry*, 2009, 31(1): 30-34. 沈福晓, 程安春, 汪铭书. 免疫荧光技术在家禽传染病研究和诊断中的应用[J]. *中国家禽*, 2009, 31(1): 30-34.
- [17] Zhu Z X, Zhu L L, Cheng Z, et al. Cellular mechanism of Tβ4 intervention in liver fibrosis by regulating NF-κB signaling pathway [J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2019, 23(3): 1279-1290.

- [18] Inzaugarat M E, Johnson C D, Holtmann T M, et al. NLR family pyrin domain-containing 3 inflammasome activation in hepatic stellate cells induces liver fibrosis in mice[J]. *Hepatology*, 2019, 69(2): 845-859.
- [19] Ni Y Y, Liang D G, Tian Y K, et al. Infarct-sparing effect of adenosine A_{2B} receptor agonist is primarily due to its action on splenic leukocytes via a PI3K/Akt/IL-10 pathway [J]. *Journal of Surgical Research*, 2018, 232: 442-449.
- [20] Terayama R, Tabata M, Maruhama K, et al. A₃ adenosine receptor agonist attenuates neuropathic pain by suppressing activation of microglia and convergence of nociceptive inputs in the spinal dorsal horn[J]. *Experimental Brain Research*, 2018, 236(12): 3203-3213.
- [21] Zhang M, Vollmer C, Nurse C A. Adenosine and dopamine oppositely modulate a hyperpolarization-activated current I_h in chemosensory neurons of the rat carotid body in co-culture [J]. *The Journal of Physiology*, 2018, 596(15): 3101-3117.
- [22] Chen P Z, He W J, Zhu Z R, et al. Adenosine A_{2A} receptor involves in neuroinflammation-mediated cognitive decline through activating microglia under acute hypobaric hypoxia [J]. *Behavioural Brain Research*, 2018, 347: 99-107.
- [23] Nie D H, Tang G H. Resonance energy transfer molecular imaging application in biomedicine [J]. *Journal of Isotopes*, 2016, 29(4): 248-256.
聂大红, 唐刚华. 共振能量转移分子显像在生物医学中的应用[J]. *同位素*, 2016, 29(4): 248-256.
- [24] Pang X J. The study on the interaction between BST-2 and Vpu by BRET assay and the screening of small molecular compound inhibitors [D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2013.
庞晓静. BRET 方法研究 BST-2 和 HIV-1 Vpu 相互作用及小分子化合物抑制剂的筛选 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2013.
- [25] Du H, Bai B, Chen J. Application of BRET technology in interaction of G protein-coupled receptor with β -arrestins: recent progress [J]. *Academic Journal of Second Military Medical University*, 2011, 32(10): 1140-1143.
杜辉, 白波, 陈京. BRET 技术在 G 蛋白偶联受体与 β -arrestins 相互作用研究中的应用进展 [J]. *第二军医大学学报*, 2011, 32(10): 1140-1143.
- [26] Cooper S L, Soave M, Jörg M, et al. Probe dependence of allosteric enhancers on the binding affinity of adenosine A₁-receptor agonists at rat and human A₁-receptors measured using Nano BRET [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2019, 176(7): 864-878.
- [27] Hinz S, Navarro G, Borroto-Escuela D, et al. Adenosine A_{2A} receptor ligand recognition and signaling is blocked by A_{2B} receptors[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(17): 13593-13611.
- [28] Huang Y M, Zheng L Q, Yang H Q, et al. Measuring the dynamics of cyclic adenosine monophosphate level in living cells induced by low-level laser irradiation using bioluminescence resonance energy transfer [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2015, 20(5): 051029.
- [29] Sun H, Chen T S. Automatic background recognition and data selection for online quantitative E-FRET imaging [J]. *Acta Optica Sinica*, 2019, 39(2): 0217001.
孙晗, 陈同生. 用于在线 E-FRET 定量成像的自动背景识别与数据筛选 [J]. *光学学报*, 2019, 39(2): 0217001.
- [30] Xu S C, Man B Y, Jiang S Z, et al. Graphene/Cu nanoparticle hybrids fabricated by chemical vapor deposition as surface-enhanced Raman scattering substrate for label-free detection of adenosine [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2015, 7(20): 10977-10987.
- [31] You J H, You Z Y, Xu X, et al. A split aptamer-labeled ratiometric fluorescent biosensor for specific detection of adenosine in human urine [J]. *Microchimica Acta*, 2019, 186(1): 43.
- [32] Song Y Y, Xu G H, Wei F D, et al. Aptamer-based fluorescent platform for ultrasensitive adenosine detection utilizing Fe₃O₄ magnetic nanoparticles and silver nanoparticles [J]. *Microchimica Acta*, 2018, 185(2): 139.
- [33] Lin Y T, Huang Y M, Wu Z W, et al. Quantitative FRET measurement of the interaction of A₁ adenosine receptors and A_{2A} adenosine receptors in living cell [J]. *Proceedings of SPIE*, 2018, 10820: 108201V.
- [34] Yang F. The effects of adenosine receptor A₁ and A_{2A} on activation of hepatic stellate cells in alcoholic liver fibrosis and the interaction between adenosine receptor A₁ and A_{2A} [D]. Hefei: Anhui Medical University, 2016.
杨凤. 腺苷 A₁ 和 A_{2A} 受体在酒精性肝纤维化大鼠 HSC 模型中的作用及两者间的相互作用研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2016.
- [35] Cai L J. The self-interaction of rice gall dwarf virus

- P3 protein and the interaction between RGDV P2 and PC1/PC3 of oryzasativa [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2010.
- 蔡丽君. 水稻瘤矮病毒 P3 蛋白自身及 P2 蛋白与水稻 PC1 和 PC3 蛋白间的互作[D]. 福州: 福建农林大学, 2010.
- [36] Wang M. Novel analytical methods for proteases and protein kinase detection based on fluorescence proteins[D]. Changsha: Hunan University, 2013.
- 王茗. 基于荧光蛋白的蛋白酶和蛋白激酶检测方法[D]. 长沙: 湖南大学, 2013.
- [37] Yang Y R, Wang H, Lü X, et al. Involvement of cAMP-PKA pathway in adenosine A₁ and A_{2A} receptor-mediated regulation of acetaldehyde-induced activation of HSCs [J]. Biochimie, 2015, 115: 59-70.
- [38] Gandia J, Galino J, Amaral O B, et al. Detection of higher-order G protein-coupled receptor oligomers by a combined BRET-BiFC technique[J]. FEBS Letters, 2008, 582(20): 2979-2984.
- [39] Vidi P A, Chemel B R, Hu C D, et al. Ligand-dependent oligomerization of dopamine D₂ and adenosine A_{2A} receptors in living neuronal cells [J]. Molecular Pharmacology, 2008, 74(3): 544-551.
- [40] Yang F, Zhong Y, Zhou H K, et al. Detection of years of dried tangerine peels based on surface-enhanced Raman spectroscopy [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2017, 54(3): 033001.
- 杨方, 钟莹, 周鸿昆, 等. 基于表面增强拉曼光谱技术的陈皮年份检测[J]. 激光与光电子学进展, 2017, 54(3): 033001.
- [41] Sun D. Measuring *in vivo* tissue spectra for long-term non-invasive glucose monitoring and preliminarily analyzing the spectral characteristics of the multiple measurement interference[D]. Tianjin: Tianjin University, 2018.
- 孙迪. 长时间无创血糖监测中活体组织光谱的测量方法及干扰因素初步分析[D]. 天津: 天津大学, 2018.
- [42] Fabila D, de la Rosa J M, Stolik S, et al. *In vivo* assessment of liver fibrosis using diffuse reflectance and fluorescence spectroscopy: a proof of concept[J]. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2012, 9(4): 376-382.
- [43] Fabila-Bustos D A, Arroyo-Camarena U D, López-Vancell M D, et al. Diffuse reflectance spectroscopy as a possible tool to complement liver biopsy for grading hepatic fibrosis in paraffin-preserved human liver specimens[J]. Applied Spectroscopy, 2014, 68(12): 1357-1364.
- [44] Arista Romeu E J, Escobedo G, Campos-Espinosa A, et al. Diffuse reflectance spectroscopy accurately discriminates early and advanced grades of fatty liver in mice[J]. Journal of Biomedical Optics, 2018, 23(11): 115005.
- [45] Lakshmi R J, Alexander M, Kurien J, et al. Osteoradionecrosis (ORN) of the mandible: a laser Raman spectroscopic study [J]. Applied Spectroscopy, 2003, 57(9): 1100-1116.
- [46] Zheng J W, Yang T W. Classification method of biological tissues based on Raman spectrum features [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2017, 54(5): 053001.
- 郑家文, 杨唐文. 基于拉曼光谱特征的生物组织识别方法[J]. 激光与光电子学进展, 2017, 54(5): 053001.
- [47] Wang X B. Research on the detection and identification of flour additives based on Raman hyperspectral imaging technique [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2018.
- 王晓彬. 基于拉曼高光谱成像技术的面粉添加剂检测与识别方法研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2018.
- [48] Ramírez-Eliás M G, Kolosovas-Machuca E S, Kershenobich D, et al. Evaluation of liver fibrosis using Raman spectroscopy and infrared thermography: a pilot study[J]. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2017, 19: 278-283.
- [49] Li S S, Shi D, Li X M, et al. Raman spectroscopic observation of liver fibrosis in S₀-S₄ stage of rats[J]. Shandong Medical Journal, 2017, 57(15): 34-36.
- 李师思, 史达, 李欣明, 等. 大鼠 S₀~S₄ 期肝纤维化的拉曼光谱观察[J]. 山东医药, 2017, 57(15): 34-36.
- [50] Yildirim T, Matthäus C, Press A T, et al. Uptake of retinoic acid-modified PMMA nanoparticles in LX-2 and liver tissue by Raman imaging and intravital microscopy[J]. Macromolecular Bioscience, 2017, 17(10): 1700064.
- [51] Quan R H, Shen A G, Liao C X. *In vitro* and *in vivo* activation of mouse liver astral cell by confocal Raman microspectroscopy [J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2007, 28(9): 1645-1650.
- 权日浩, 沈爱国, 廖长秀. 鼠肝星状细胞体内与体外激活的显微拉曼光谱[J]. 高等学校化学学报, 2007, 28(9): 1645-1650.
- [52] Wu L, Jin Z Y, Li Y T, et al. A study on the Raman

- spectra of the adenine, adenosine and adenylic acid [J]. Heilongjiang Science and Technology Information, 2016, 36: 119-120.
- 吴雷, 金周雨, 李雨婷, 等. 腺嘌呤、腺苷和腺苷酸的拉曼光谱研究[J]. 黑龙江科技信息, 2016, 36: 119-120.
- [53] Villa J E L, Pasquini C, Poppi R J. Surface-enhanced Raman spectroscopy and MCR-ALS for the selective sensing of urinary adenosine on filter paper [J]. Talanta, 2018, 187: 99-105.
- [54] Wang L, Zhang Y, Zhang W Q, et al. Laser-induced plasmonic heating on silver nanoparticles/poly (N-isopropylacrylamide) mats for optimizing SERS detection[J]. Journal of Raman Spectroscopy, 2017, 48(2): 243-250.
- [55] Qin S P. The diagnoses investigation of liverish and pulmonary disease based on laser spectrum [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2006.
- 秦少平. 激光光谱技术用于肝病、肺病的诊断研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2006.
- [56] Li J D. Preliminary study on the application of laser spectroscopy in the diagnosis of liver diseases [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2004.
- 李建东. 激光光谱技术用于肝病诊断的初步研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2004.
- [57] Lin F R, Du M Y, Yang F F, et al. Improved spectrometer-microscope for quantitative fluorescence resonance energy transfer measurement based on simultaneous spectral unmixing of excitation and emission spectra[J]. Journal of Biomedical Optics, 2018, 23(1): 016006.
- [58] Zhang J, Lin F R, Chai L Y, et al. Iem-spFRET: improved Iem-spFRET method for robust FRET measurement [J]. Journal of Biomedical Optics, 2016, 21(10): 105003.
- [59] Zhou Y L, Chen S, Zhou Y L, et al. Preparation of polydopamine/silver composite nanoparticles for cell fluorescence/SERS dual-mode imaging[J]. Journal of Shanghai Normal University (Natural Sciences), 2016, 45(6): 686-692.
- 周延玲, 陈偲, 周亚蕾, 等. 聚多巴胺/银复合纳米粒子的制备及其在细胞荧光/表面增强拉曼双成像中的应用[J]. 上海师范大学学报(自然科学版), 2016, 45(6): 686-692.