

多光子技术可视化血管型脑膜瘤

方娜¹, 吴赞艺², 王行富³, 林元相^{2**}, 陈建新^{4*}

¹福建医科大学医学技术与工程学院, 福建 福州 350004;

²福建医科大学附属第一医院神经外科, 福建 福州 350004;

³福建医科大学附属第一医院病理科, 福建 福州 350004;

⁴福建师范大学医学光电科学与技术教育部重点实验室, 福建 福州 350007

摘要 血管型脑膜瘤血管异常丰富。术前或者术中能明确诊断血管型脑膜瘤对手术方案的制定和预后判断至关重要。联合二次谐波技术、双光子激发荧光技术和光谱技术无标记地对血管型脑膜瘤进行研究。结果表明,多光子技术不仅可以识别血管型脑膜瘤的内源成分,还能可视化它的微结构,联合图像分析技术,还可以进一步自动定位血管的位置并计算血管的数量。随着光纤技术和多光子内窥镜技术的发展,多光子技术有望成为临床诊断血管型脑膜瘤的新技术。

关键词 生物技术; 多光子技术; 双光子激发荧光; 二次谐波; 血管型脑膜瘤

中图分类号 O436

文献标志码 A

doi: 10.3788/LOP202259.0617025

Multiphoton Technique for Visualization of Angiomatous Meningiomas

Fang Na¹, Wu Zanyi², Wang Xingfu³, Lin Yuanxiang^{2**}, Chen Jianxin^{4*}

¹*School of Medical Technology and Engineering, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350004, China;*

²*Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350004, China;*

³*Department of Pathology, the First Affiliated Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350004, China;*

⁴*Key Laboratory of Optoelectronic Science and Technology for Medicine, Ministry of Education, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350007, China*

Abstract Angiomatous meningiomas comprise numerous blood vessels. The ability to clearly diagnose angiomatous meningiomas preoperatively or intraoperatively is crucial for developing surgical plans and prognosis. In this study, we combined the second harmonic, two-photon excited fluorescence, and spectroscopic techniques to realize a label-free study of angiomatous meningiomas. Results show that this multiphoton technique can identify the endogenous components of angiomatous meningioma and visualize its microstructure. Furthermore, combined with image analysis techniques, the multiphoton technique can further automatically locate vessels and calculate number of vessels. With the rapid development in fiber optic and multiphoton endoscopic technologies, multiphoton technique poses as a new technique for the clinical diagnosis of angiomatous meningiomas.

Key words biotechnology; multiphoton technique; two-photon excited fluorescence; second harmonic generation; angiomatous meningiomas

收稿日期: 2022-01-12; 修回日期: 2022-02-08; 录用日期: 2022-02-14

基金项目: 国家自然科学基金(62105067)、福建省自然科学基金(2021J01133034)

通信作者: *chenjianxin@fjnu.edu.cn; **lyx99070@163.com

1 引言

脑膜瘤是中枢神经系统最常见的脑肿瘤之一,发病率仅次于胶质瘤,占颅内肿瘤 15%~20%^[1-2]。根据现有研究资料可以明确,脑膜瘤起源于蛛网膜细胞以及脑膜间隙的衍生物。蛛网膜细胞不仅具有间叶性特征,同时还具有上皮性特征。临床上根据不同脑膜瘤细胞的表现,将其分为 16 个亚型^[3-4]。血管型脑膜瘤是脑膜瘤的常见亚型之一。在对这类病症患者进行治疗时,最常使用的是手术疗法。血管型脑膜瘤血管异常丰富,术中容易出血,手术切除前能明确诊断血管型脑膜瘤对患者手术方案的制定及预后至关重要^[5-6]。

随着神经影像学的发展,计算机断层扫描(CT)、正电子发射断层扫描(PET)、正电子发射计算机断层扫描(SPECT)、磁共振成像(MRI)等成像技术已经为研究其生理病理变化提供了基础,并普遍用于临床脑肿瘤研究或诊断中^[7]。然而,由于空间分辨率有限,这些技术无法评估各种微观组织病理结构特征的变化。病理检查诊断血管型脑膜瘤的“金标准”。尽管在组织染色自动化方面不断取得进展,但典型的组织学处理,如福尔马林固定和石蜡包埋,需要大量的时间和劳力,而且有标记的病理诊断结果对于手术缺乏直接的指导意义。为了解决传统技术的局限性,人们提出了许多新的无标记光学成像方法。光声成像^[8]和光学相干断层扫描^[9]可以实现快速检查并可以对未处理的组织进行进一步的特征分析。但是这两种技术都不能产生具有足够分辨率和对比度的图像,无法充分展示脑膜瘤组织的显微结构特征。

由于具有高分辨率,适合实时原位检测人体组织微结构的变化,多光子(MPM)技术在肿瘤诊断和治疗中已展现出越来越大的潜力^[10-18],成为当今生物学光子学的一个重要研究课题。对于脑膜瘤来说,许多内源性荧光团,例如细胞内的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)、细胞内的黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)、血管内的弹力纤维,在强激光的作用下会产生双光子激发荧光(TPEF)信号^[19-20]。而血管壁的胶原可以产生大量的二次谐波(SHG)信号^[21]。所以双光子技术特别适合于对脑膜瘤的诊断。另一方面,图像处理办法已被广泛用于多光子图像,如神经元检测^[22]、纤维化分析^[23]和代谢评估^[24]。因此,采用适合的图像处理算法处理多光子

图像时将获得脑膜瘤组织的形态学信息和感兴趣成分的定量指标。

迄今为止,多光子技术用于脑膜瘤的研究鲜有报道。一部分工作通过描述脑膜瘤与其他肿瘤的微结构和光谱特征的不同来鉴别其他肿瘤与脑膜瘤^[25]。另一部分工作通过描述 I 级脑膜瘤和 II 级脑膜瘤的微结构特征和光谱特征的不同研究脑膜瘤的分级^[26]。而在无标记的情况下,利用多光子技术开展的血管型脑膜瘤研究仍属空白。鉴于此,本文联合光谱技术、双光子激发荧光技术、二次谐波技术、图像分析技术无标记地对血管型脑膜瘤进行研究,探讨了多光子技术在血管型脑膜瘤内在成分分析和显微结构成像上的潜力,为多光子技术未来的临床转化提供了一定的理论基础。

2 材料与方法

2.1 组织样品

本研究经过福建医科大学附属第一医院伦理审查委员会的批准,课题组人员严格遵守人体样品实验研究的相关规则。所用的 10 个血管型脑膜瘤和 3 个正常的硬膜组织样品均由福建医科大学附属第一医院提供。这些组织样品由外科医生手术切除下来之后被分为两个部分,一部分新鲜样品被放置在样品箱中送到多光子实验室进行光谱成像。另一部分样品被送到医院病理科,先用福尔马林(体积分数为 10%)固定,然后通过酒精和二甲苯脱水,包埋在石蜡中;接下来使用切片机把包埋的组织切成 10 μm 厚的连续 5 片,并利用烤片机进行烤片;最后用酒精和二甲苯将 10 μm 厚的切片脱蜡。其中,第 1、2、4、5 切片用于多光子多通道显微成像,第 3 切片进行苏木精伊红染色(H&E 染色),用于对比确认多光子多通道显微成像的结果。在多光子多通道显微成像时,为了避免样品在实验过程中出现脱水或者收缩现象,需要在样品表面滴上少许磷酸缓冲盐溶液(PBS;pH 值为 7.4),然后盖上盖玻片并用指甲油封存。

2.2 成像方法

本研究所用实验装置与以前发表的文章中介绍的装置相同^[27]。该实验基于激光共聚焦显微镜(LSM510META,卡尔蔡司股份公司,德国)和锁模钛宝石激光器(Mira900F,相干公司,美国)组成的多光子显微成像系统。该系统采用 META 探测器探测。该探测器由三个主要部分组成,第一个部分

是单独的光电倍增管(PMT);第二个部分是PMT阵列(32通道);第三个部分是反射光栅。反射光栅的分光作用将不同波段的光间隔分开,再导入不同通道的PMT。PMT阵列的间隔为10.7 m,光谱探测范围为377~716 nm。该系统选用低通的二色分光镜(KP650,卡尔蔡司股份公司,德国)将激光反射到样品中,同时样品发射回来的信号可以透过分光镜到达探测器。该系统有两个模式,多通道成像模式与光谱成像模式。多通道成像模式有8个独立的通道,每个通道都能任意地在377~716 nm发射波段进行成像。本文选择两个通道来实现血管型脑膜瘤的TPEF/SHG复合成像,其中一个通道(430~716 nm)用于TPEF成像,用红色标定,另外一个通道(389~419 nm)用于SHG成像,用绿色标定。通过调节微焦平台(HRZ200,卡尔蔡司股份公司,德国)可以获得较大面积的图像,图像的获取速度为 $2.56 \mu\text{s}/\text{pixel}$ 。光谱成像模式能记录377~716 nm范围内的光谱图像,且该模式可以获得该光谱图像中不同感兴趣区域的光谱。本实验采用的激发光波长是810 nm,脉冲宽度和脉冲频率分别为110 fs和76 MHz。

2.3 自动计算血管的数量

为了计算血管数量,采用以下过程对MPM图像进行处理:首先,将基于RGB颜色空间的原始MPM图像转换到CIE Lab颜色空间,只获取图像的亮度分量,再对图像的亮度分量进行图像增强;接下来,利用高斯滤波去除噪声;然后,利用大津法(OTSU)分割和数学形态学处理,得到血管位置的“粗”分割图像;最后,在粗分割边界的基础上进行Graph cut分割,以得到血管位置的“细”分割图像。

同时用白线勾画血管位置并计算血管数。

3 结果与讨论

3.1 血管型脑膜瘤的多光子光谱研究

为了验证多光子光谱技术对血管型脑膜瘤微结构的内在成分分析能力,对全部10个脑膜瘤样品进行了光谱成像,对于每个样品,随机选择3个区域。所有的发射光谱都是在相同的条件下获得的,所有的数据都通过Origin软件(2021版本)进行归一化。得到的平均发射归一化光谱如图1(a)所示,误差条代表每个测量平均值的标准偏差。归一化发射光谱图显示了5个较强的峰值,分别位于405, 475, 510, 545, 630 nm处^[19-21]。从图1(a)可以看出:位于405 nm处有一个很强的SHG信号,波长刚好是激发光波长的一半,根据以往报道,胶原纤维能产生SHG信号,因此该信号应该来自血管型脑膜瘤组织中的胶原纤维;位于510 nm处的发射峰的峰值最强,对应的是血管型脑膜瘤组织中的结构蛋白;475 nm和545 nm处的发射峰分别对应于血管型脑膜瘤细胞的NADH和FAD;630 nm处的发射峰则来自卟啉衍生物。

为了进一步对光谱进行分析,使用基于Matlab语言的多峰拟合程序分析血管型脑膜瘤组织中发出荧光的不同内源分子^[28-29]。图1(b)显示拟合后的不同内源分子的曲线,可以看到组织中FAD的占比最大,接下来依次是结构蛋白、NADH、胶原和卟啉衍生物,它们的比例是0.542:0.487:0.4584:0.39010:0.0796。以上结果表明,多光子技术结合拟合技术可以无标记、定量定性地对血管型脑膜瘤组织内在成分进行分析。

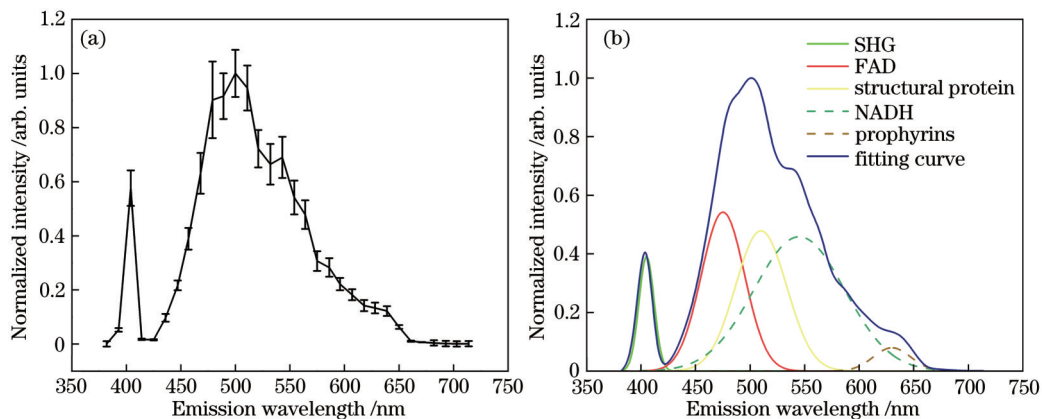


图1 血管型脑膜瘤的多光子光谱分析。(a)归一化多光子发射光谱;(b)多峰拟合

Fig. 1 Multi-photon spectral analysis of angiomatous meningiomas. (a) Normalized multi-photon emission spectrum; (b) multi-peak fitting

3.2 血管型脑膜瘤的多光子显微成像

为了评估多光子技术对血管型脑膜瘤微结构的显微成像能力,分别对正常组织和血管型脑膜瘤组织进行多通道成像。图 2 显示的是典型的正常硬膜和蛛网膜组织的多光子显微成像图及对应的 H&E 染色图像。可以看出,正常的硬膜(浅色箭头)里面富含胶原纤维。这些胶原纤维呈波浪状,紧密平行厚实排列。从图 2(a)和图 2(b)可以看出,硬膜的胶原不仅会产生 SHG 信号,也会发

射 TPEF 信号,所以在 TPEF 和 SHG 叠加图像[如图 2(c)所示]呈现黄颜色。相比硬膜组织,蛛网膜组织(深色箭头)呈现薄膜状,虽然它也会同时产生 TPEF 和 SHG 信号,但是相比硬膜组织,它的 SHG 信号更加微弱,呈现红黄色。正常硬膜和软脑膜组织的这些纤维结构特征与相应 H&E 染色图像[如图 2(d)所示]吻合,相比传统的 H&E 染色技术,多光子技术更能刻画出胶原的形状和含量对比。

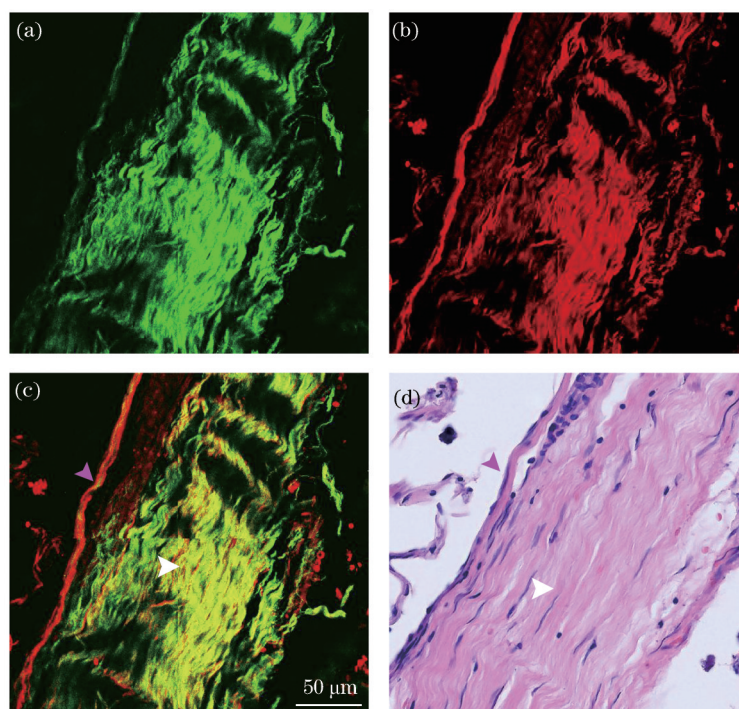


图 2 正常硬膜和蛛网膜组织的 MPM 图像与对应的 H&E 染色图片。(a) SHG 图像;(b) TPEF 图像;
(c) TPEF 和 SHG 叠加图像;(d) H&E 染色图像

Fig. 2 MPM images and the corresponding H&E stained image of normal dura mater and arachnoid mater. (a) SHG image;
(b) TPEF image; (c) TPEF/SHG overlaid image; (d) corresponding H&E stained image

图 3 显示的是典型的血管型脑膜瘤的多光子显微成像图及对应的 H&E 染色图片。从图 3(c) TPEF 和 SHG 叠加图像可以看出,跟正常的组织对比,血管型脑膜瘤组织里面富含血管。血管管腔之间间隔有大量的片状的脑膜瘤细胞。在更高的放大倍数下,更多结构的详细信息如图 4[图 3(c)实线方框的放大图]和图 5[图 3(c)虚线方框的放大图]所示。从图 4(c)可以看出,血管型脑膜瘤的血管由于其特殊管腔的结构可以被识别。这些血管在形态和结构上有很大的差异,从小血管到大的扩张血管,血管管壁从薄(深色箭头)到厚(浅色箭头)。有的血管还呈透明化改变,不仅产生大量的 TPEF 信号,还发射强烈的 SHG 信号(浅色箭头)。图 5 显示血管型脑膜瘤中

的细胞细节,细胞核无荧光信号(箭头处),呈黑点状,通过对比细胞的轮廓,可以通过胞质中的 NADH 和 FAD 的 TPEF 信号清晰识别。从图 5(c)可以看出,血管型脑膜瘤中含有大量的脑膜瘤细胞,这些细胞的细胞核具有明显的异型性。血管和细胞的这些形态特征和相应的 H&E 染色图片的结构特征相一致。然而,血管壁的胶原纤维在 H&E 染色图片的显示不如 MPM 图片清晰。这些研究结果表明,TPEF 和 SHG 信号的结合可以在细胞分辨率上清晰显示出血管型脑膜瘤的显微图像,可视化组织的微结构,特别在成像血管方面较 H&E 染色更有优势。

图 6 显示的是血管型脑膜瘤血管的图像分析结果。图 6(a)~(e)分别显示原始图像、增强后图像、

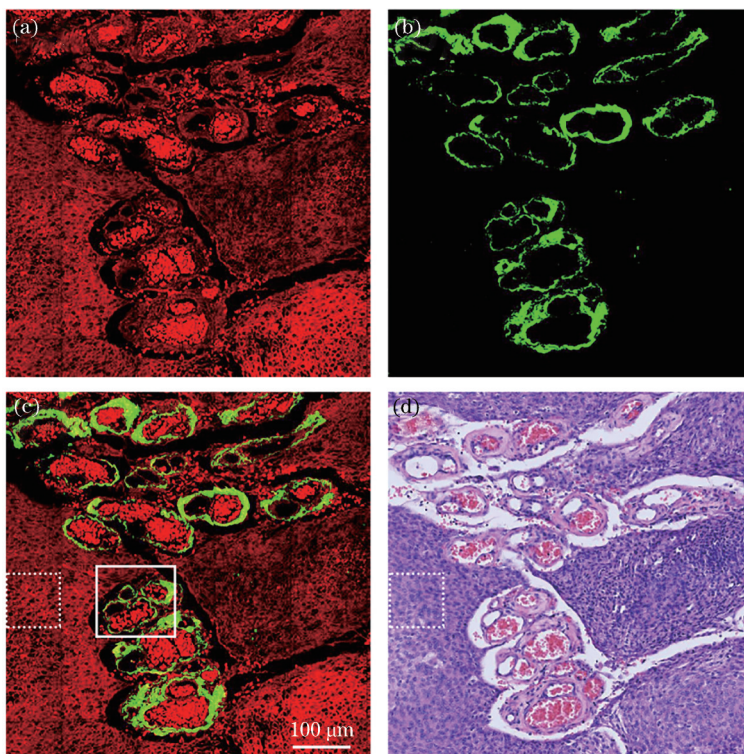


图 3 血管型脑膜瘤的 MPM 图像与对应的 H&E 染色图片。(a) TPEF 图像;(b) SHG 图像;(c) TPEF 和 SHG 叠加图像;
(d) H&E 染色图像

Fig. 3 MPM images and the corresponding H&E stained image of angiomatous meningioma. (a) TPEF image; (b) SHG image;
(c) TPEF/SHG overlaid images; (d) corresponding H&E stained image

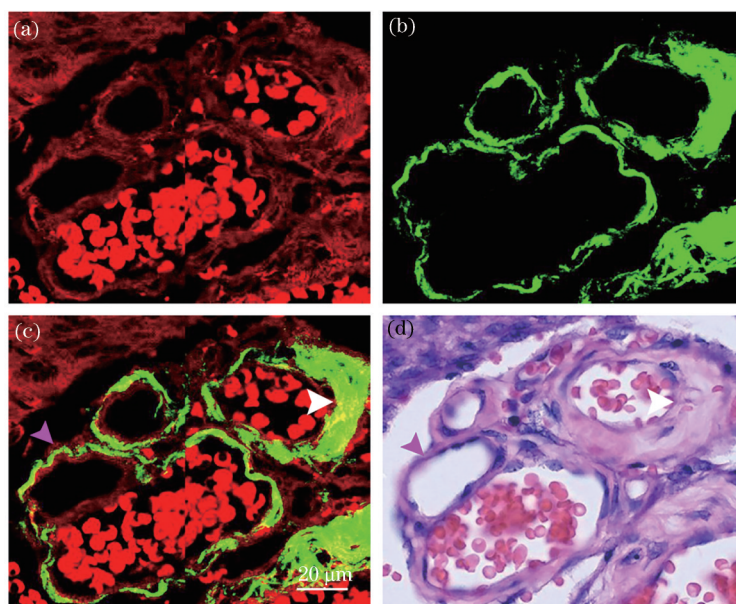


图 4 图 3(c)实线框的放大图。(a) TPEF 图像;(b) SHG 图像;(c) TPEF 和 SHG 叠加图像;(d) H&E 染色图像

Fig. 4 The enlarged images of the solid line box in Fig. 3(c). (a) TPEF image; (b) SHG image; (c) TPEF/SHG overlaid image;
(d) corresponding H&E stained image

形态学处理后图像、最后分割结果、可视化面板图像。通过图像处理后,组织中的血管可以被自动定位,同时血管的数量可以被自动计算并可视化显示

出来。

临床实践中,对血管比较丰富的血管型脑膜瘤患者进行手术治疗时,很有可能出现术中切除出现

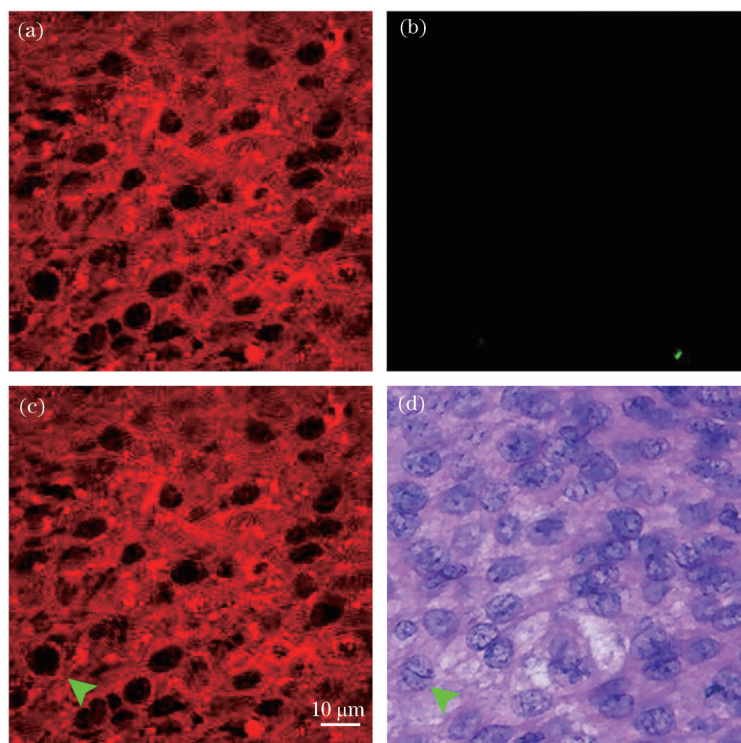


图 5 图 3(c)虚线框的放大图。(a) TPEF 图像;(b) SHG 图像;(c) TPEF 和 SHG 叠加图像;(d) H&E 染色图像
 Fig. 5 The enlarged images of the dashed line box in Fig. 3(c). (a) TPEF image; (b) SHG image; (c) TPEF/SHG overlaid image; (d) corresponding H&E stained image

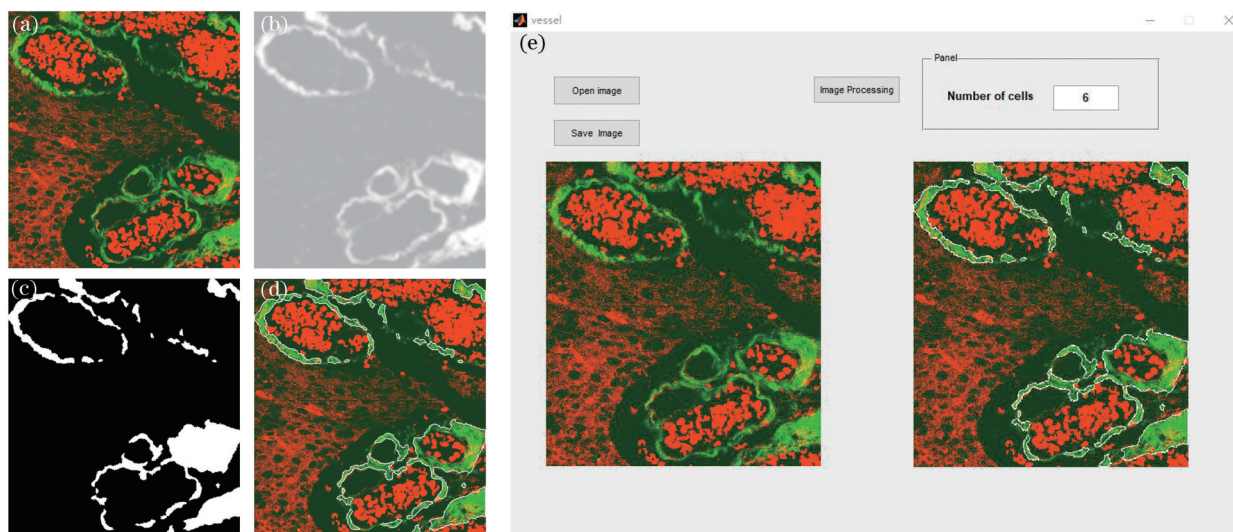


图 6 血管型脑膜瘤血管的图像分析结果。(a)原始图像;(b)增强处理后的图像;(c)形态学处理后的图像;(d)最后的图像分析结果;(e)可视化面板图像

Fig. 6 Image analysis of blood vessels in angiomatous meningioma. (a) Original image; (b) image after enhancement processing; (c) image after morphological processing; (d) final image analysis result; (e) visualized panel image

大出血情况,此时很难在短时间内为患者止血。因此如果对脑肿瘤进行诊断,发现其为高血供的血管型脑膜瘤,则在切除之前,需要进行供血动脉栓塞。所以手术切除前明确诊断血管型脑膜瘤至关重要。目前,H&E快速冰冻切片技术是术中诊断血管型脑

膜瘤的“金标准”。然而,这种有效的检查是需要很多的时间去切除、冷冻和染色组织切片的。此外,由于冰冻切片的标本制作过程可能会损伤组织,改变细胞结构,引入人工伪影,因此也可能影响诊断的准确性。MPM技术基于非线性光学和飞秒激光

的相互作用,与快速冰冻切片技术相比,可以为神经外科医生提供更多感兴趣区域的实时病理学数据,从而提高诊断率。

在本研究中,首先分析了血管型脑膜瘤的多光子信号来源,通过峰值拟合,还进一步确定了内源性荧光团的成分和比例。在此基础上,对血管型脑膜瘤进行MPM显微成像并与H&E染色结果进行比较,实验结果表明,MPM技术有潜力通过来自细胞和血管壁的TPEF信号和来自胶原的SHG信号对血管型脑膜瘤的组织形态进行成像。通过MPM技术,可以获得血管型脑膜瘤组织的高对比度、高分辨率图像,这些图像可以提供细胞、血管和胶原的详细形态特征信息。结合图像分析技术,MPM技术还可以自动定位血管的位置并定量快速计算血管的数量。在此背景下,MPM技术与图像处理相结合可以帮助神经病理学家和神经外科医师快速有效地评估病人血供的情况,并制定最合适的手术方法和治疗方案。

4 结 论

利用基于二次谐波和双光子激发荧光的多光子技术无标记地对血管型脑膜瘤进行研究。结果表明多光子技术可以可视化血管型脑膜瘤组织微结构。结合图像分析技术,还可进一步自动统计血管的数量,提供定量血供数据。随着光纤技术和内窥镜技术的发展,多光子技术有望成为临床诊断血管型脑膜瘤的新技术。

参 考 文 献

- [1] Marosi C, Hassler M, Roessler K, et al. Meningioma [J]. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2008, 67(2): 153-171.
- [2] Fathi A R, Roelcke U. Meningioma[J]. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 2013, 13(4): 337.
- [3] Louis D N, Perry A, Wesseling P, et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary[J]. *Neuro-Oncology*, 2021, 23(8): 1231-1251.
- [4] Komori T. The 2016 WHO classification of tumours of the central nervous system: the major points of revision[J]. *Neurologia Medico-Chirurgica*, 2017, 57(7): 301-311.
- [5] Liu Z G, Wang C W, Wang H W, et al. Clinical characteristics and treatment of angiomatous meningiomas: a report of 27 cases[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2013, 6(4): 695-702.
- [6] Kanazawa T, Minami Y, Jinzaki M, et al. Preoperative prediction of solitary fibrous tumor/hemangiopericytoma and angiomatous meningioma using magnetic resonance imaging texture analysis[J]. *World Neurosurgery*, 2018, 120: e1208-e1216.
- [7] Hoffman J M. New advances in brain tumor imaging [J]. *Current Opinion in Oncology*, 2001, 13(3): 148-153.
- [8] Monaco E A III, Friedlander R M. Novel triple-modality molecular imaging approach holds promise for improving brain tumor resection[J]. *Neurosurgery*, 2012, 71(2): N14-N15.
- [9] Yu X J, Hu C, Zhang W F, et al. Feasibility evaluation of micro-optical coherence tomography (μ OCT) for rapid brain tumor type and grade discriminations: μ OCT images versus pathology[J]. *BMC Medical Imaging*, 2019, 19(1): 102.
- [10] Cicchi R, Crisci A, Cosci A, et al. Time- and spectral-resolved two-photon imaging of healthy bladder mucosa and carcinoma *in situ*[J]. *Optics Express*, 2010, 18(4): 3840-3849.
- [11] Chen J X, Zhuo S M, Chen G, et al. Establishing diagnostic features for identifying the mucosa and submucosa of normal and cancerous gastric tissues by multiphoton microscopy[J]. *Gastrointestinal Endoscopy*, 2011, 73(4): 802-807.
- [12] Paoli J, Smedh M, Ericson M B. Multiphoton laser scanning microscopy: a novel diagnostic method for superficial skin cancers[J]. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 2009, 28(3): 190-195.
- [13] Kirkpatrick N D, Brewer M A, Utzinger U. Endogenous optical biomarkers of ovarian cancer evaluated with multiphoton microscopy[J]. *The Science of the Total Environment*, 2007, 16(10): 2048-2057.
- [14] Tewari A K, Shevchuk M M, Sterling J, et al. Multiphoton microscopy for structure identification in human prostate and periprostatic tissue: implications in prostate cancer surgery[J]. *BJU International*, 2011, 108(9): 1421-1429.
- [15] Wang C C, Li F C, Wu R J, et al. Differentiation of normal and cancerous lung tissues by multiphoton imaging[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2009, 14(4): 044034.
- [16] Chen J X, Li H S, Chen Z F, et al. Label-free monitoring of colorectal adenoma-carcinoma sequence

- based on multiphoton microscopy[J]. *Laser Physics Letters*, 2014, 11(6): 065604.
- [17] Zhuo S M, Chen J X, Wu G Z, et al. Label-free multiphoton imaging and photoablation of preinvasive cancer cells[J]. *Applied Physics Letters*, 2012, 100(2): 023703.
- [18] König K. Clinical multiphoton tomography[J]. *Journal of Biophotonics*, 2008, 1(1): 13-23.
- [19] Kasischke K A, Vishwasrao H D, Fisher P J, et al. Neural activity triggers neuronal oxidative metabolism followed by astrocytic glycolysis[J]. *Science*, 2004, 305(5680): 99-103.
- [20] Chia T H, Williamson A, Spencer D D, et al. Multiphoton fluorescence lifetime imaging of intrinsic fluorescence in human and rat brain tissue reveals spatially distinct NADH binding[J]. *Optics Express*, 2008, 16(6): 4237-4249.
- [21] Zipfel W R, Williams R M, Christie R, et al. Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(12): 7075-7080.
- [22] Wang S, Lin B B, Lin G M, et al. Automated label-free detection of injured neuron with deep learning by two-photon microscopy[J]. *Journal of Biophotonics*, 2020, 13(1): e201960062.
- [23] Kistenev Y V, Vrazhnov D A, Nikolaev V V, et al. Analysis of collagen spatial structure using multiphoton microscopy and machine learning methods[J]. *Biochemistry. Biokhimiia*, 2019, 84(1): S108-S123.
- [24] Liu Z Y, Pouli D, Alonzo C A, et al. Mapping metabolic changes by noninvasive, multiparametric, high-resolution imaging using endogenous contrast[J]. *Science Advances*, 2018, 4(3): eaap9302.
- [25] Zanello M, Poulon F, Pallud J, et al. Multimodal optical analysis discriminates freshly extracted human sample of gliomas, metastases and meningiomas from their appropriate controls[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 41724.
- [26] Zanello M, Poulon F, Varlet P, et al. Multimodal optical analysis of meningioma and comparison with histopathology[J]. *Journal of Biophotonics*, 2017, 10(2): 253-263.
- [27] Zhuo S M, Chen J X, Luo T S, et al. Multimode nonlinear optical imaging of the dermis in *ex vivo* human skin based on the combination of multichannel mode and Lambda mode[J]. *Optics Express*, 2006, 14(17): 7810-7820.
- [28] Ibrahim A, Poulon F, Melouki F, et al. Spectral and fluorescence lifetime endoscopic system using a double-clad photonic crystal fiber[J]. *Optics Letters*, 2016, 41(22): 5214-5217.
- [29] Haidar D A, Leh B, Zanello M, et al. Spectral and lifetime domain measurements of rat brain tumors[J]. *Biomedical Optics Express*, 2015, 6(4): 1219-1233.