

引用格式: LIU Lixin, QI Meijie, GAO Peng, et al. Application of Fluorescence Lifetime Imaging in Cancer Diagnosis (Invited) [J]. Acta Photonica Sinica, 2021, 50(10):1017001

刘立新, 齐美捷, 郜鹏, 等. 荧光寿命成像在癌症诊断研究中的应用(特邀)[J]. 光子学报, 2021, 50(10):1017001

## 荧光寿命成像在癌症诊断研究中的应用(特邀)

刘立新<sup>1,2</sup>, 齐美捷<sup>1</sup>, 郜鹏<sup>1</sup>, 薛平<sup>3</sup>, 屈军乐<sup>4</sup>

(1 西安电子科技大学 物理与光电工程学院, 西安 710071)

(2 中国科学院光谱成像技术重点实验室, 西安 710119)

(3 清华大学 物理系 低维量子物理国家重点实验室, 北京 100084)

(4 深圳大学 物理与光电工程学院 光电子器件与系统实验室, 广东 深圳 518060)

**摘要:** 癌症是目前人类所面对的共同难题, 降低癌症死亡率的关键是实现早期诊断。荧光寿命因对微环境的敏感性, 不仅可以实现对早期癌症组织与正常组织的区分, 还可以对药物治疗癌症进行监测, 因此荧光寿命成像显微技术在癌症诊断方面具有巨大的应用潜力。本文介绍了荧光寿命成像显微技术的基本原理及检测方法, 总结了内源性和外源性荧光团的特征及其与癌症诊断的关系, 综述了近年来荧光寿命成像显微技术在神经系统、呼吸系统、消化系统、生殖系统、泌尿系统、内分泌系统以及皮肤系统等癌症诊断中的应用, 讨论了荧光寿命成像显微技术在癌症诊断中的应用优势、局限性以及未来发展趋势。

**关键词:** 荧光寿命; 荧光寿命成像; 癌症诊断; 内源性荧光团; 外源性荧光团

中图分类号: O433; R73

文献标识码: A

doi: 10.3788/gzxb20215010.1017001

## Application of Fluorescence Lifetime Imaging in Cancer Diagnosis (Invited)

LIU Lixin<sup>1,2</sup>, QI Meijie<sup>1</sup>, GAO Peng<sup>1</sup>, XUE Ping<sup>3</sup>, QU Junle<sup>4</sup>

(1 School of Physics and Optoelectronic Engineering, Xidian University, Xi'an 710071, China)

(2 CAS Key Laboratory of Spectral Imaging Technology, Xi'an 710119, China)

(3 State Key Laboratory of Low-Dimensional Quantum Physics, Department of Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

(4 Key Laboratory of Optoelectronic Devices and Systems, College of Physics and Optoelectronic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen, Guangdong 518060, China)

**Abstract:** Cancer is currently a common problem facing human beings. Early diagnosis is a key factor in reducing cancer mortality. Due to its sensitivity to the microenvironment, fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) can not only distinguish early cancer tissues from normal tissues, but also monitor the drug treatment of cancer. Therefore, FLIM has great application potential in cancer diagnosis. This article introduces the basic principles and detection methods of FLIM, summarizes the endogenous and exogenous fluorescence characteristics and their relationship with cancer. In addition, this article mainly reviews the recent applications of FLIM in the diagnosis of cancers in the nervous system, respiratory system, digestive system, reproductive system, urinary system, endocrine system and skin system, and discusses the application advantages, limitations and future development trends of FLIM in cancer diagnosis.

**基金项目:** 国家自然科学基金(No. 62075177), 陕西省自然科学基金(Nos. 2020JM-193, 2020JQ-324), 中国科学院光谱成像重点实验室开放基金(No. LSIT202005W), 高等学校学科创新引智计划(No. B17035)

**第一作者:** 刘立新(1977—), 女, 副教授, 博士, 主要研究方向为生物光子学、光谱检测与成像、深度学习。Email: lxliu@xidian.edu.cn

**通讯作者:** 屈军乐(1970—), 男, 教授, 博士, 主要研究方向为生物光子学。Email: jlqu@szu.edu.cn

**收稿日期:** 2021-07-21; **录用日期:** 2021-08-16

<http://www.photon.ac.cn>

**Key words:** Fluorescence lifetime; Fluorescence lifetime imaging; Cancer diagnosis; Endogenous fluorophores; Exogenous fluorophores

**OCIS Codes:** 170.2520; 180.2520; 170.6920

## 0 引言

癌症是目前人类所面对的共同难题。据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)统计,2020年全球新发癌症病例1 929万例,死亡病例996万例;其中中国新增癌症病例457万例,占全球新发病例数的23.7%,死亡病例300万例<sup>[1]</sup>。根据美国国立卫生研究院(National Institutes of Health, NIH)的统计分析,预计2021年美国将有1 898 160新增癌症病例,其中预计死亡人数608 570人;2011年至2017年癌症的五年相对生存率为67.7%<sup>[2]</sup>。可见,癌症已经成为严重威胁世界人群健康的公共卫生问题之一。

癌症组织的共同特征是体内细胞持续分裂,并扩散到周围组织中,从而引起细胞/组织结构的变化以及周围环境的变化。目前癌症的检查手段众多,主要有肿瘤标志物、肿瘤病理学诊断、肿瘤影像学及肿瘤内镜诊断等,但各种手段均有其相应的局限性。大多数肿瘤标志物能检测出早期无症状肿瘤,可以作为肿瘤辅助诊断工具应用于临床,但其缺点是缺乏足够高的灵敏度和特异性,很少被用于人群普查,且预后较差。肿瘤病理学诊断至今被誉为肿瘤诊断的“金标准”,但其诊断结果主要依赖于病理医生的经验,有时会出现诊断困难、暂时无法做出诊断,甚至漏诊或误诊的情况。肿瘤影像学主要有电子计算机断层扫描检查(Computed Tomography, CT)、磁共振检查、超声成像和放射性核素显像。CT易形成伪影,若患者对含碘的对比剂过敏,可能造成严重后果;核磁共振对于含少量氢质子的组织(骨骼、钙化灶)等结构显示不佳,扫描时间长、空间分辨率低、扫描范围受限;超声成像具有实时性,诊断准确率依赖于操作者;放射性核素显像对较小病灶显示能力弱、存在一定辐射危害。肿瘤内镜诊断利于直视病变、发现早期恶性肿瘤、评价肿瘤的分期以及引导微创治疗,但只能对内镜可到达的腔道进行诊断或协助诊断<sup>[3]</sup>。

自从20世纪以来,荧光显微技术得到了飞速的发展。荧光显微镜凭借其空间分辨率高、对样品损伤小、成像速度快等优点,成为生物医学领域研究的重要工具,例如共聚焦显微技术<sup>[4-5]</sup>、双光子显微技术<sup>[6-7]</sup>、超分辨显微技术<sup>[8-10]</sup>等。荧光具有多参量特性,其中荧光寿命不易受激发光强度、荧光团浓度、光漂白等因素的影响,而且对荧光团所处微环境的变化非常敏感,能够为许多物理、生物、化学参数如离子浓度、氧含量、折射率、pH值等提供信息<sup>[11-12]</sup>。荧光寿命成像显微技术(Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy, FLIM)同时具有较高的时空分辨率、灵敏度和特异性,在癌症诊断、肿瘤检测中具有巨大的应用潜力。

本文主要介绍FLIM在癌症诊断研究中的应用。介绍了FLIM的基本原理及测量方法,总结了内源性和外源性荧光团的特征及其与癌症的关系,重点综述了近年来FLIM在神经系统、呼吸系统、消化系统、生殖系统、泌尿系统、内分泌系统以及皮肤系统等癌症诊断中的应用,讨论了FLIM应用于癌症诊断的优势和目前存在的问题,并对FLIM应用的未来发展趋势进行展望。旨在为从事荧光显微技术和生物医学交叉研究的科研人员提供有益参考和新的思路,推进FLIM在生命科学研究中的深入应用。

## 1 荧光寿命成像原理及测量方法

### 1.1 荧光寿命成像基本原理

荧光寿命成像显微技术结合了荧光寿命测量与荧光显微成像两种技术。物质在吸收一定波长的激发光后由基态跃迁到激发态,后通过光化学过程返回基态时发射出比激发光波长长的光,即为荧光。荧光寿命是指分子返回基态之前在激发态的平均停留时间,通常小于100 ns,主要依赖于被测荧光团所处的微环境变化。简言之,荧光寿命就是荧光由其初始强度衰减至其1/e所消耗的时间,荧光强度衰减可以表示为<sup>[13-15]</sup>

$$I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (1)$$

式中, $t$ 为时间, $\tau$ 为荧光寿命, $I(t)$ 为 $t$ 时刻的荧光强度, $I_0$ 为 $t=0$ 时刻的荧光强度。

当样品中包含多种荧光物质时,测量的荧光寿命表现为多种荧光物质寿命的叠加,这时荧光强度衰减是多指数的,可以表示为<sup>[14]</sup>

$$I(t) = I_0 \sum_i^n \alpha_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right) \quad (2)$$

式中,  $\alpha_i$  为荧光团  $i$  的权重因子,  $\tau_i$  为荧光团  $i$  的荧光寿命。

## 1.2 荧光寿命测量方法

目前荧光寿命的测量主要有两种方法:时域法和频域法。

### 1.2.1 时域法

时域法(Time Domain, TD)是利用超短脉冲激光激发样品,由荧光衰减曲线拟合得到荧光寿命,如式(1)和(2)所示。根据探测器件的不同,时域法又可分为门控探测法、扫描相机法和时间相关单光子计数法(Time-Correlated Single-Photon Counting, TCSPC)等。

#### 1) 门控探测法

门控探测法是宽场荧光寿命成像中常用的检测方法,一般适用于呈单指数衰减的荧光,原理如图1(a)所示,利用脉冲激光激发样品产生荧光,在不同时刻选通门控光学图像增强器(Gated Optical Image Intensifier, GOI),由电耦合器件(Charge Coupled Device, CCD)记录荧光衰减,得到不同时刻样品的荧光衰减强度,最终计算出荧光寿命<sup>[15]</sup>

$$\tau = (t_2 - t_1) / \ln(I_1/I_2) \quad (3)$$

理论上讲,对于单指数荧光衰减,门控法只需探测两个时刻的荧光强度即可得到荧光寿命,所以成像速度较快;但对于多指数荧光衰减,进行寿命分析时需要多个时间门,成像过程较为复杂,测量准确率较低<sup>[16]</sup>。

#### 2) 扫描相机法

扫描相机的工作原理如图1(b)所示,被测荧光信号通过狭缝(Slit, S)和透镜(Lens, L)后轰击光电阴极

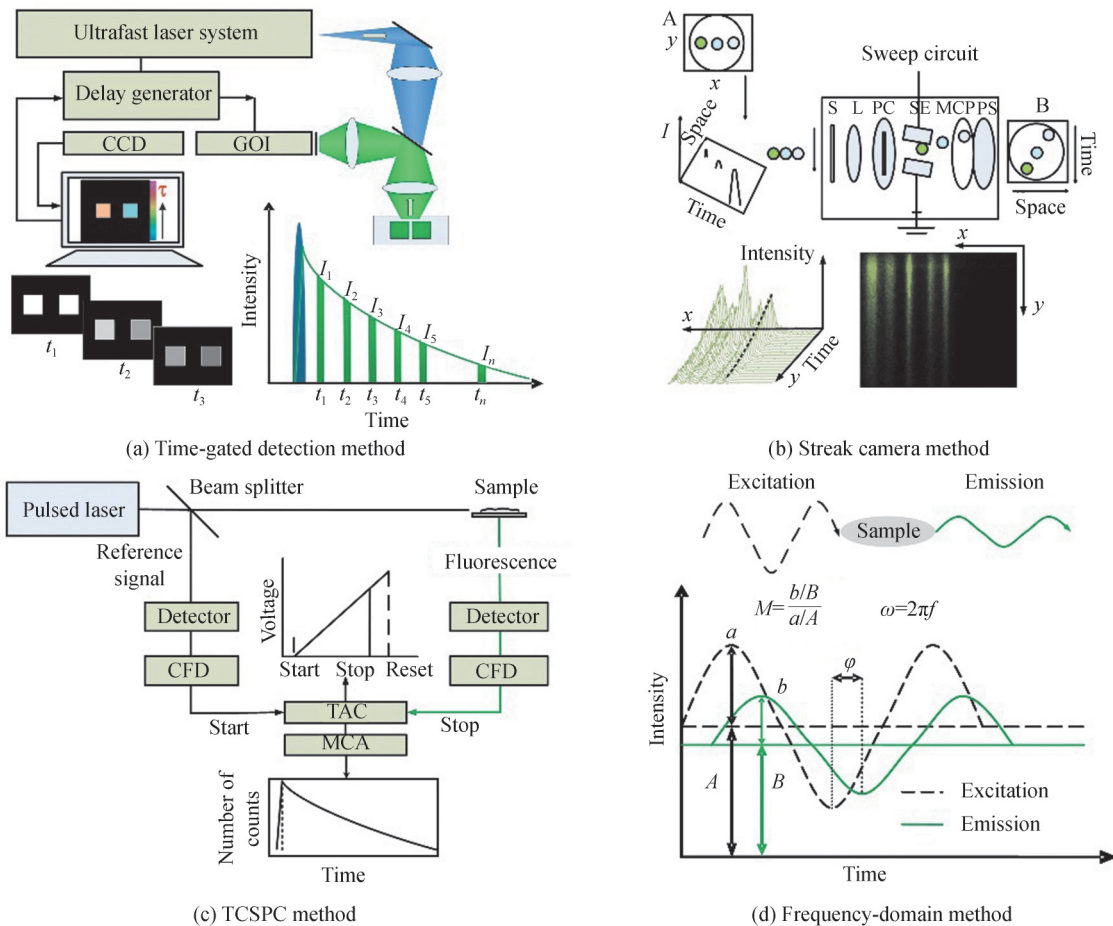


图1 荧光寿命测量方法<sup>[14,16-17]</sup>

Fig. 1 Fluorescence lifetime detection methods<sup>[14,16-17]</sup>

(Photoelectric Cathode, PC)发射出光电子,与入射光的强度成正比。扫描电极(Scanning Electrode, SE)上施加高电压,光电子到达的时间不同偏转角度也会不同,再经过微通道板(Microchannel Plate, MCP)被增强后到达荧光屏(Phosphor Screen, PS),从而将坐标为 $(x, y)$ 的二维强度图像(A)转换为坐标为 $(x, t)$ 的一维空间扫描图像(B)<sup>[17-18]</sup>。基于扫描相机的FLIM具有较高的时间分辨率和灵敏度,但成像时需要沿另一个空间维度进行扫描,因此成像速度较慢。

### 3) TCSPC方法

TCSPC法是FLIM中应用最广的测量技术,是公认的荧光寿命测量的“金标准”。TCSPC法基本原理如图1(c)所示,脉冲激光被分为两部分,一束光作为参考光,通过光电探测器和恒比鉴别器(Constant-Fraction Discriminator, CFD),作为“Start”信号,触发时幅转换器(Time-Amplitude Converter, TAC)开始工作。另一束脉冲激光用于激发样品,并通过高灵敏度探测器,例如光电倍增管(Photomultiplier Tubes, PMT)或雪崩光电二极管(Avalanche Photodiode, APD),来检测荧光,经过CFD作为“Stop”信号使TAC停止工作。TAC对“Start”和“Stop”的脉冲时差进行测量,多通道分析仪(Multichannel Analyzer, MCA)建立光子数-时间分布直方图<sup>[13-14, 19]</sup>。TCSPC-FLIM通常使用共聚焦显微镜或双光子荧光显微镜来实现,在所有FLIM技术中具有优异的时间分辨率和最佳信噪比,但由于其逐点扫描的模式,成像速度较慢。

#### 1.2.2 频域法

频域法(Frequency Domain, FD)又称为相位调制法,其原理如图1(d)所示,利用角频率为 $\omega = 2\pi f$ 、振幅调制度为 $a/A$ 的激发光来激发样品,产生的荧光与激发光的频率相同,但是振幅下降(调制度为 $b/B$ ),相位滞后 $\varphi$ 。频域法测量荧光寿命的公式为<sup>[13-14]</sup>

$$\tau_{\varphi} = \frac{1}{\omega} \tan\varphi \quad (4)$$

$$\tau_M = \frac{1}{\omega} \sqrt{(1/M^2 - 1)} \quad (5)$$

$$\tau = \frac{1}{2} (\tau_{\varphi} + \tau_M) \quad (6)$$

式中, $M$ 为调制系数,且 $M = (b/B)/(a/A)$ , $\omega$ 为调制频率, $\tau_{\varphi}$ 为相位寿命, $\tau_M$ 为调制寿命。当样品为单组分时有 $\tau_M = \tau_{\varphi}$ ;当样品中含有多种荧光组分时,有 $\tau_{\varphi} < \tau < \tau_M$ 。

与时域法相比,频域法测量原理简单,对设备的要求不高,成本也相对较低。但频域法在测量多组分荧光寿命时过程较为复杂,成像速度有所限制,且一般用于荧光强度足够强的样品中。

## 1.3 荧光寿命分析方法

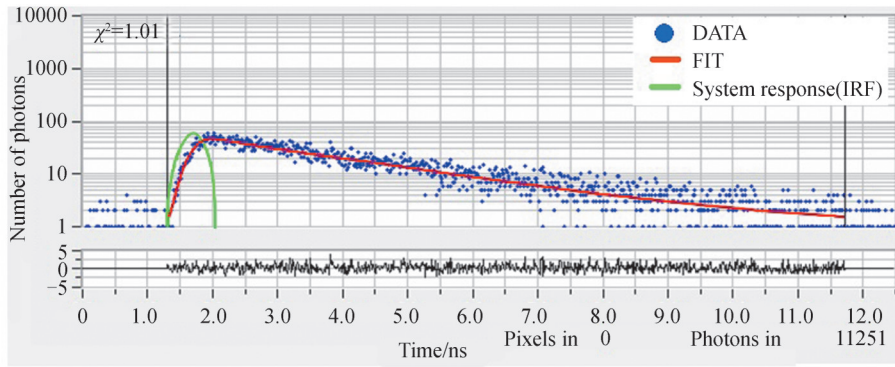
### 1.3.1 解卷积与曲线拟合

在实际的FLIM系统中,荧光是由非零宽度的激光脉冲激发,同时由具有非零宽度时间响应的测量系统探测。将激光脉冲波形和测量系统响应合并为仪器响应函数(Instrument Response Function, IRF),实际测得的荧光衰减曲线是IRF与真实衰减曲线二者卷积的结果,即<sup>[20-21]</sup>

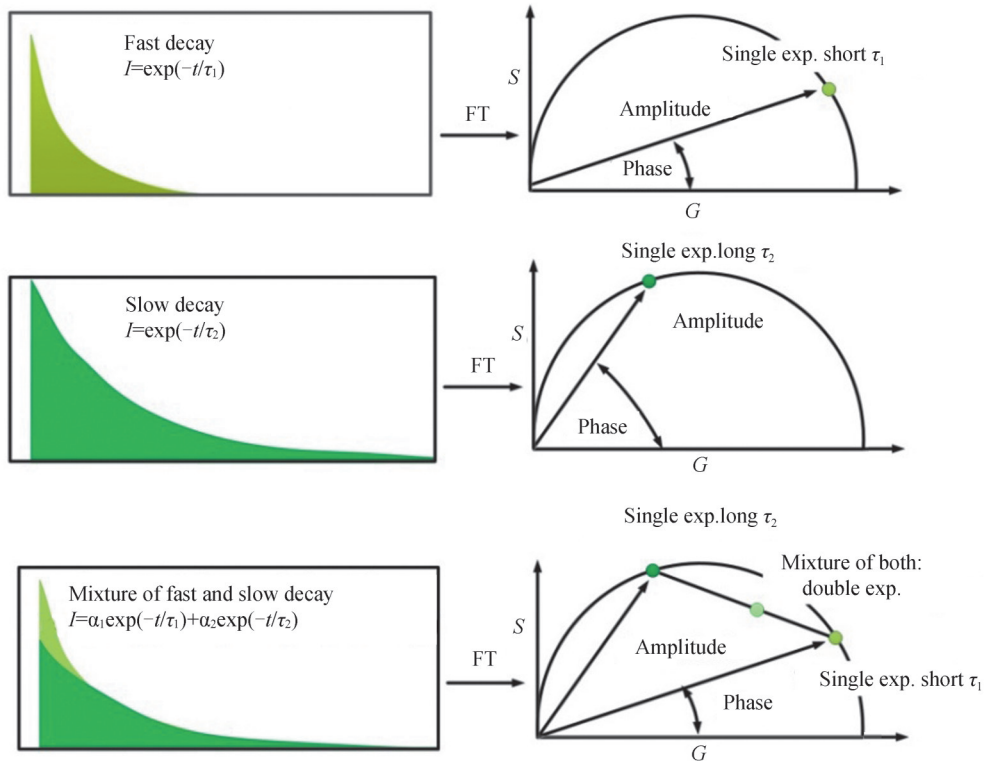
$$f_m(t) = \int_{\tau=0}^t f(\tau) \text{IRF}(t-\tau) d\tau \quad (7)$$

式中, $f_m(t)$ 为测得的荧光衰减, $f(t)$ 为真实的荧光衰减。因此只要测得荧光衰减曲线和IRF就可以通过解卷积求出真实的荧光衰减曲线,进而拟合出所测量样品的真实荧光寿命。

通常情况下真实的荧光衰减函数呈现指数形式,单个分子或在同一环境中的相同分子的荧光衰减函数为单指数形式(式(1));不同分子的混合物或同一分子在不均匀的环境中的衰减函数为多指数形式(式(2))。进行曲线拟合分析需要进行预先假设,包括IRF、寿命组分的数量和背景荧光等。如图2(a)所示,对于多组分荧光衰减拟合,通过将估计的衰减函数和IRF拟合到实验数据来确定寿命的衰减变量 $(\alpha_i, \tau_i)$ 。 $\chi^2$ 表征拟合的质量,评价拟合结果与实测数据的一致性。 $\chi^2$ 越接近1,说明模型与实验数据的拟合程度越好。



(a) Time-domain analysis determines lifetime decay variables by fitting an estimated decay function and estimated or measured IRF to experimental data



(b) The relationship between the exponential decay function in the time-domain and the phasor in the frequency-domain

图2 荧光寿命估算

Fig. 2 Fluorescence lifetime estimation

### 1.3.2 相量分析

相量分析法既可以用于时域法荧光寿命成像(Time Domain-Fluorescence Lifetime Imaging, TD-FLIM)测量,也可以应用于频域法荧光寿命成像(Frequency Domain-Fluorescence Lifetime Imaging, FD-FLIM)测量。测量的荧光寿命数据通过傅立叶变换(Fourier Transform, FT)转换到相量空间。在相量图中,基于频域中衰减数据的分析,衰减函数表现为相位和幅值;对于每一个像素都定义一个相量,并以极坐标图显示;相位作为相量的角度,调制度作为振幅, $x$ 轴( $G$ )和 $y$ 轴( $S$ )的坐标分别表示从FLIM数据中提取的相量的实部和虚部<sup>[22]</sup>。

在FD-FLIM中,相量图( $G, S$ )的变换具有以下关系

$$\begin{cases} G = M \cos \varphi \\ S = M \sin \varphi \end{cases} \quad (8)$$

在TD-FLIM中,相量图( $G, S$ )相应的坐标表示为

$$\begin{cases} G(\omega) = \int_0^T I(t) \cdot \cos(n\omega t) dt / \int_0^T I(t) dt \\ S(\omega) = \int_0^T I(t) \cdot \sin(n\omega t) dt / \int_0^T I(t) dt \end{cases} \quad (9)$$

式中,  $f=1/T$  是激光频率,  $n$  表示谐次。

对于式(2)所表示的多指数衰减过程, 相量坐标表示为

$$\begin{cases} G = \sum_j \alpha_j G_j \\ S = \sum_j \alpha_j S_j \end{cases} \quad (10)$$

图2(b)显示时域法中的单/双指数衰减函数与由相位和幅度表示的频域中的相量之间的对应关系<sup>[21-23]</sup>。可见, 荧光寿命相量图有如下特征: 具有相似衰减特征的像素在相量图上聚集成群; 满足单指数衰减规律的相量端点位于以(0.5, 0)为圆心、半径为0.5的半圆上; 满足多指数衰减过程的相量端点则位于半圆以内, 或者说, 是位于各单指数衰减组分相量端点连接组成的集合内; 几个衰减分量的组合的相量是这些分量的相量的线性组合; 半圆的两端极坐标分别为(1, 0)和(0, 0), 表示寿命为0和 $\infty$ 。这些特征使相量图在荧光寿命数据的可视化、定量分析和聚类分析方面有很大优势。

解卷积与曲线拟合和相量分析法是荧光寿命分析常用的方法。通过解卷积与曲线拟合可以得到荧光团的寿命值及其衰减组分, 但利用该方法计算真实荧光寿命值至少需要一个近似的IRF才能从检测到的荧光波形中得出荧光衰减参数。测量真实IRF较为困难, 目前常用IRF计算方法为通过测得的荧光衰减数据计算合成IRF。此外, 数据拟合前还需要对寿命组分的数量进行预先假设。相比较而言, 相量分析法是一种非拟合方法, 其主要目的不是确定荧光寿命或衰减组分, 而是对相量图的不同特征像素赋予不同颜色, 从而在FLIM图中反向注释。相量分析可以直接使用相移和调制系数来分离荧光团或荧光团组分, 并确定不同荧光团组分的浓度比。近年来, 人工智能技术, 如机器学习和深度学习, 也已经应用于提取和解释FLIM数据集, 与传统方法相比, 在成像速度和准确性方面有显著提高<sup>[24-25]</sup>。

## 2 内源性和外源性荧光团

根据是否是生物物质的固有发光, 荧光团分为内源性荧光团和外源性荧光团。

细胞和组织中最重要内源性荧光团有: 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Phosphate), NAD(P)H)、黄素腺嘌呤二核苷酸(Flavin Adenine Dinucleotide, FAD)、氨基酸和蛋白质等<sup>[21]</sup>。由内源性荧光团所发荧光通常称为自体荧光。1924年, POLICARD A最早报道了自体荧光与癌症的关系<sup>[26]</sup>; 之后的几十年, 自体荧光检测与显微成像技术相结合用于人体或动物的癌变组织的鉴别, 并取得了许多成果。利用内源性荧光团进行FLIM成像的优点是: 不需要对组织或细胞进行复杂的染色程序, 也不需要体内使用荧光试剂, 成像较为方便。由于一般生物体内存在多种荧光团, 因此衰减函数为多指数形式, 每个分量都反映单个荧光团的贡献。为了简化成像, 对激发和发射波长进行选择可以有效避免对不需要的荧光团进行寿命成像。

自体荧光寿命成像能够应用于癌症诊断, 主要是由于人体内的内源性荧光团NAD(P)H和FAD在细胞代谢中起到了重要的作用。在正常的细胞内, 葡萄糖会维持在一个相对平衡状态, 但是当细胞内缺氧的时候, 葡萄糖先会转换成丙酮酸, 最后转换为乳酸。癌细胞的特点是, 即使氧含量正常, 葡萄糖的摄取量和乳酸的累积量也会升高, 利用糖酵解来产生能量, 使葡萄糖转换成为乳酸来产生腺嘌呤核苷三磷酸(Adenosine-Triphosphate, ATP), 这种现象被称为Warburg效应<sup>[27]</sup>。即当细胞发生癌变时, 对于葡萄糖的利用方式由氧化磷酸化转换为糖酵解, 这一变化被认为是癌症的主要特征。当细胞的代谢状态发生改变时, 细胞内NAD(P)H和FAD的状态、浓度、与蛋白质结合的比率、细胞微环境的差异(含氧量, pH值等)都会改变, 从而导致NAD(P)H和FAD的荧光寿命变化, 这为利用自体荧光FLIM研究癌症机理和过程提供了基础<sup>[28-29]</sup>。

外源性荧光团通常包括小分子、纳米材料和荧光蛋白, 可选择的波长范围覆盖了从紫外光、可见光到近红外光, 通常比内源性荧光团具有更高的信噪比<sup>[30-31]</sup>。它们特异性地标记到样品中, 可以对生物体内各种重

要生物分子的位置、运动、功能活性及与其它分子的相互作用在亚细胞、细胞、组织和整体水平上进行观察和检测。目前已有种类繁多的外源性荧光团,能够提供与细胞和活生物体的生理或分子过程相关的独特荧光寿命信息<sup>[32]</sup>。其中肿瘤特异性荧光探针的FLIM可用于肿瘤代谢成像、光动力学诊断,以及药物输送或细胞内运输定位的监测等。

### 3 荧光寿命成像在癌症诊断中的应用

荧光寿命成像已经成为生物医学研究的重要工具。FLIM依赖内源性和外源性荧光团对细胞或组织进行荧光寿命成像,能够揭示正常细胞和肿瘤细胞的代谢差异,区分正常组织与癌变组织,辅助鉴定手术边界等<sup>[33-35]</sup>。检索科学网(Web of Science)数据库(检索格式:TS = (fluorescence lifetime imaging AND cancer) OR TS = (fluorescence lifetime imaging AND tumor)),从2000年以来利用FLIM进行癌症研究的论文数量呈逐年递增趋势,如图3所示。本节综述了FLIM技术在神经系统、呼吸系统、消化系统、生殖系统、泌尿系统、内分泌系统以及皮肤系统等癌症诊断中的应用。

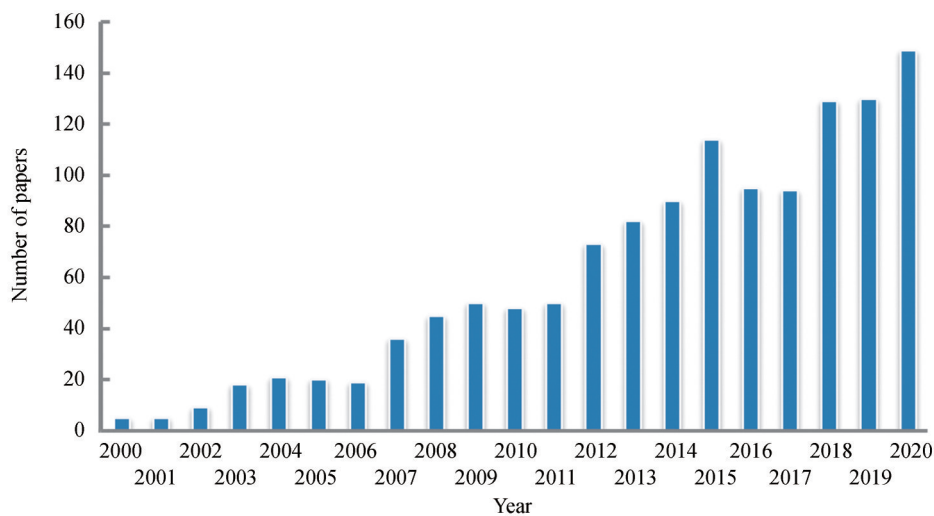


图3 利用FLIM进行癌症研究的论文数量

Fig. 3 The number of papers which focus on FLIM used in cancer research

#### 3.1 神经系统

人体的神经系统分为中枢神经系统(Central Nervous System, CNS)和外周神经系统(Peripheral Nervous System, PNS),大脑和脊髓共同构成中枢神经系统。胶质瘤在脑中形成,是最常见的中枢神经系统癌症类型,占有中枢神经系统癌症的45%,且其中60%~70%属于高度恶性类别。根据NIH统计分析,美国脑癌和其他神经系统癌症预计2021年新增病例为24 530例,预计死亡病例18 600例;2011年至2017年五年相对生存率为32.6%<sup>[36]</sup>。

FLIM用于研究中枢神经系统癌症,主要通过NAD(P)H的荧光寿命分析,实现对胶质母细胞瘤组织与正常组织的区分以及肿瘤边界的确定。一般情况下胶质母细胞瘤的荧光寿命要长于正常组织,但由于实验样本的处理方式不同对荧光寿命也有部分影响。2010年SUN Y等<sup>[37]</sup>首次将内窥镜FLIM系统用于多形性胶质母细胞瘤(Glioblastoma Multiforme, GBM)组织的术中诊断,基于GBM和正常脑皮层荧光寿命的差异( $1.59 \pm 0.24$  ns vs.  $1.28 \pm 0.04$  ns),利用FLIM在三位患者切除胶质母细胞瘤的手术过程中勾画肿瘤边界,表明了FLIM在脑肿瘤图像引导手术中的潜在应用。2016年KANTEHARDT S R等<sup>[38]</sup>应用高分辨率多光子层析成像和FLIM检查小鼠原位胶质母细胞瘤,并且首次在神经外科手术中对人胶质母细胞瘤进行成像,在小鼠模型中胶质瘤细胞的荧光寿命为1 400 ps,邻近的大脑白质荧光寿命为1 600 ps,选择平均荧光为1 500 ps的阈值可以对肿瘤与正常组织进行较好地分划。2017年LIN D等<sup>[39]</sup>利用FLIM和尺度不变特征转换(Scale-Invariant Feature Transform, SIFT)算法开发了一种胶质母细胞瘤术中边缘评估的新技术,该技术主要是对苏木精-伊红(Hematoxylin-Eosin, H&E)染色的细胞外基质切片进行FLIM成像,并对其进

行 SIFT 分析,实现胶质母细胞瘤边缘区分,以改善手术切除的脑标本切片的边缘评估。2018年 POULON F 等<sup>[40]</sup>利用双光子显微系统从光谱分析和荧光寿命成像中获得定量参数,构建了一个肿瘤边界评分系统,主要用于区分正常组织和胶质母细胞瘤或转移瘤,灵敏度为 100%,特异性为 50%。通过对脑组织的对照样本、转移样本和 GBM 样本的 FLIM 图像及平均荧光寿命分布进行分析,可知对照样本平均寿命分布的半峰全宽(Full Width at Half Maxima, FWHM)最宽,GBM 样本的平均寿命分布的 FWHM 最窄;转移样本的最大平均寿命最短(0.734 4 ns),其次为 GBM 样本(1.47 ns),对照样本的最大平均寿命最长(1.78 ns)。2019年 SHIRMANOVA M V 等<sup>[41]</sup>利用 FLIM 技术在宏观尺度研究了神经胶质细胞瘤的代谢,通过对 NAD(P)H 的荧光寿命进行分析,证明间变性星形细胞瘤和胶质母细胞瘤之间的细胞代谢不同,肿瘤组织与正常组织的细胞代谢也不相同。2020年 SCHROEDER A B 等<sup>[42]</sup>利用 FLIM 技术研究胶质母细胞瘤干细胞(Glioblastoma Stem Cells, GSCs)和 GBM 组织中的 NADH 寿命。实验表明:相比于正常的脑组织,GBM 的 NADH 平均寿命( $\tau_m$ )和结合 NADH 数量( $\alpha_2\%$ )增加( $\tau_m$ :  $1\ 021.73 \pm 40.06$  ps vs.  $1\ 117.39 \pm 106.83$  ps;  $\alpha_2\%$ :  $30.0 \pm 1.5\%$  vs.  $33.0 \pm 3.6\%$ ),这与耗氧量(Oxygen Consumption Rate, OCR)的增加一致,如图 4 所示;同时侵袭性较小的肿瘤 NADH 的平均荧光寿命比侵袭性较高的肿瘤更长( $949.83 \pm 198.48$  ps vs.  $883.81 \pm 136.99$  ps)。

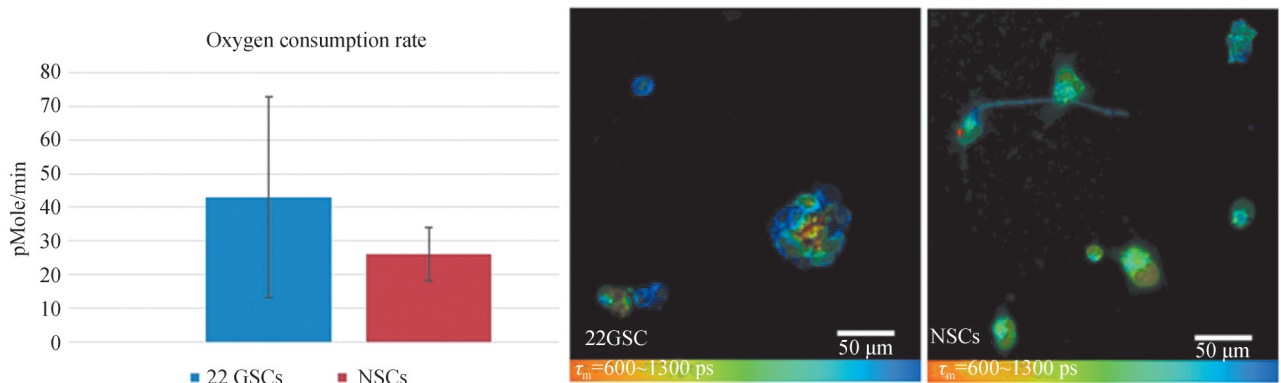


图 4 与 NSCs 相比,22 GSC 活细胞的 OCR 增加,相应的 NADH 平均寿命 ( $\tau_m$ ) 和结合 NADH 数量 ( $\alpha_2\%$ ) 增加<sup>[42]</sup>  
Fig. 4 Live 22 GSC cells have increased OCR and corresponding increased mean NADH lifetimes ( $\tau_m$ ) and increased amount of bound NADH ( $\alpha_2\%$ ) compared with NSCs<sup>[42]</sup>

### 3.2 呼吸系统

呼吸系统常见癌症有鼻咽癌、喉癌和肺癌。根据 NIH 统计分析,美国呼吸系统癌症 2021 年预计新增病例 235 760 例,占有癌症病例的 12.4%,预计死亡病例 131 880 例,占有死亡病例的 21.7%;2011 年至 2017 年五年相对生存率为 21.7%<sup>[43]</sup>。

肺癌及支气管癌为美国第二大癌症类型。2013 年 BASUKI J S 等<sup>[44]</sup>设计的氧化铁纳米颗粒 (Iron Oxide Nanoparticles, IONPS) 能够通过亚胺键实现对阿霉素 (Doxorubicin, DOX) 的附着,并首次利用 TCSPC-FLIM 测定肺癌细胞(H1299)培养液中加入游离 DOX 和 IONP@P(HBA)-b-P(OEGA)+DOX 后的荧光寿命,游离 DOX 和结合 IONPS 的 DOX 的寿命分别为  $\sim 1$  ns 和  $\sim 4.6$  ns。根据荧光寿命的不同 FLIM 可以对体外释放 DOX 进行检测。2017 年 WANG M 等<sup>[45]</sup>利用 FLIM 观察人肺癌细胞的自发荧光,从而区分癌变和正常的组织或细胞。实验结果表明,肺癌组织中 NADH 和 FAD 的寿命减少,因此肺癌组织的荧光寿命始终低于正常组织的荧光寿命,最终确定 1.92 ns 为肿瘤组织与正常组织的区分阈值,利用该阈值对肺癌进行诊断的灵敏度与特异性分别为 92.9% 和 92.3%。2020 年 AWASTHI K 等<sup>[46]</sup>利用 FLIM 对非小细胞肺癌和正常肺细胞的 NADH 和 FAD 的荧光寿命进行研究。实验样本为人肺癌细胞(H661)、人肺癌上皮细胞(A549)和正常肺细胞(MRC-5)。实验结果如图 5 所示,肺癌细胞中 NADH 和 FAD 的平均荧光寿命比正常细胞短(NADH 寿命:MRC-5:  $0.97 \pm 0.05$  ns, H661:  $0.69 \pm 0.05$  ns, A549:  $0.68 \pm 0.05$  ns; FAD 寿命:MRC-5:  $0.87 \pm 0.06$  ns, H661:  $0.58 \pm 0.04$  ns, A549:  $0.66 \pm 0.06$  ns)。因此 FLIM 可以作为检测癌变分期和肿瘤进展的一种方法。



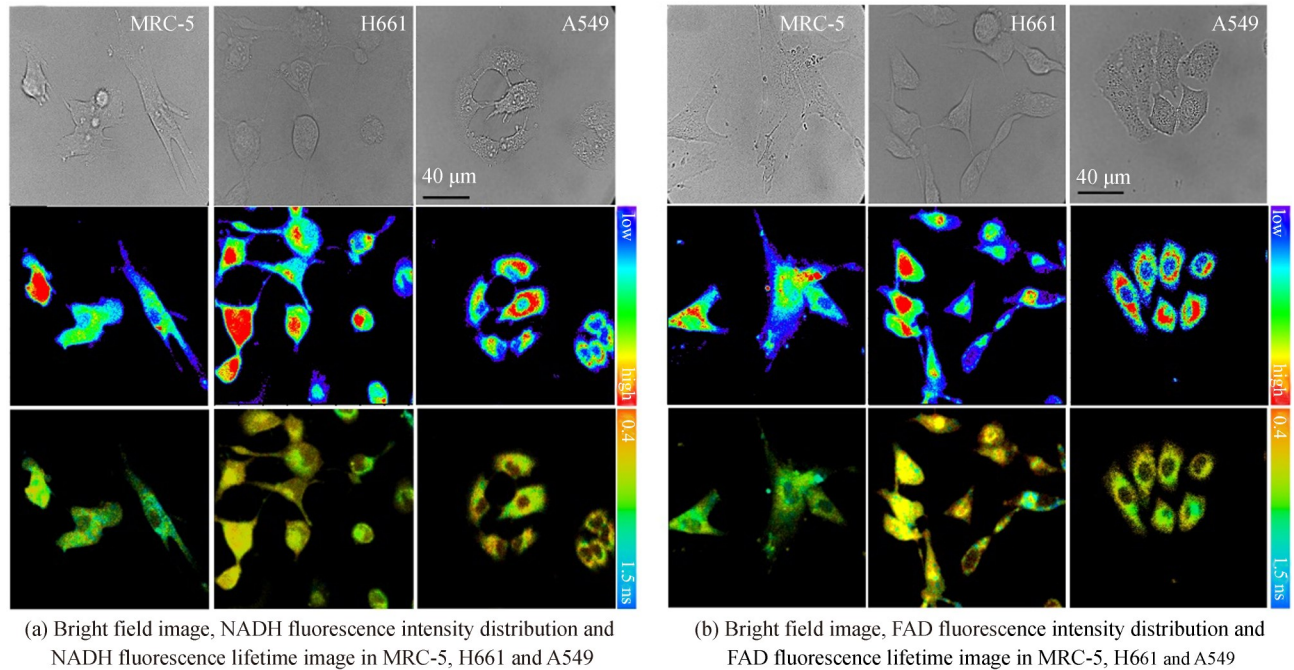
图5 MRC-5, H661, A549细胞明场图像及细胞中NADH和FAD的荧光强度和寿命图像<sup>[46]</sup>

Fig. 5 The bright field images, NADH and FAD fluorescence intensity distributions and fluorescence lifetime images in MRC5, H661 and A549<sup>[46]</sup>

鼻咽癌是呼吸系统的另一种常见癌症。2014年CHEN M等<sup>[47]</sup>研究离体人体鼻咽正常组织和癌变组织的荧光寿命,并利用线性判别式对癌变组织和正常组织进行分类,结果表明激发波长300 nm、发射波长330 nm处鼻咽癌组织的荧光寿命大于正常组织( $3.48 \pm 0.27$  ns vs.  $2.36 \pm 0.37$  ns),以3.07 ns作为分类阈值准确率为96.15%,特异性为100%,灵敏度为93.3%。2016年WANG H等<sup>[48]</sup>利用FLIM研究光学纳米探针(Au/Gd@MCM-41)对鼻咽癌细胞(CNE-2)的光学敏感性。分别使用波长400 nm和758 nm的激光激发,获得CNE-2和正常鼻咽细胞(NP69)的寿命图像。结果表明, $Ga^{3+}$ 对AuNPs的上转换发光寿命有重要的影响,CNE-2细胞在吸收Au/Gd@MCM-41后,从内源性荧光团向AuNPs的能量转移增强可能会导致CNE-2中AuNPs的荧光寿命更长。Au/Gd@MCM-41对CNE-2细胞有优异的光学敏感性和无毒性,成为早期鼻咽癌诊断的理想探针。

### 3.3 消化系统

消化系统由消化道和消化腺组成。消化道主要组成器官包括口腔、咽、食管、胃、小肠和大肠等。消化腺分为大消化腺和小消化腺,小消化腺散在消化管各部的管壁内,大消化腺有唾液腺、肝脏和胰脏。

#### 3.3.1 口腔癌

根据NIH统计分析,美国口腔癌2021年预计新增病例54 010例,占有新增癌症病例的2.8%,预计死亡病例10 850例,占有癌症死亡病例的1.8%;2011年至2017年五年相对生存率为66.9%<sup>[49]</sup>。

FLIM技术在口腔癌研究方面已经有很广泛的应用。2009年SUN Y<sup>[50]</sup>建立了一台内窥镜FLIM系统用于口腔癌的研究。实验样本为金黄地鼠,癌变区域平均荧光寿命为 $1.77 \pm 0.26$  ns,相比正常区域平均荧光寿命 $2.50 \pm 0.36$  ns低29%,表明荧光寿命可以为区分口腔癌病变区域与正常组织提供一种有效方法。2010年JO J A等<sup>[51]</sup>首次将光学相干层析成像(Optical Coherence Tomography, OCT)与FLIM整合到一个光学系统,应用于仓鼠颊囊的口腔癌模型,同时获取仓鼠颊囊内鳞状细胞癌的OCT图像和FLIM图像进行口腔癌的形态学和生化表征。由OCT图像可以看出,癌变组织的上皮层变厚和层状结构损失;由FLIM图像可以看出,癌变组织的荧光寿命主要由NADH和FAD表征而胶原蛋白含量减少;二者均可用于区分正常和癌变组织。2014年CHENG S<sup>[52]</sup>首次建立了台式多光谱FLIM系统,通过2,2-二羟甲基丁酸(2,2-Dimethylolbutanoic Acid, DMBA)诱导口腔发生癌变并对癌变部位进行成像,在不同的激发波长下测得样本的荧光强度和荧光寿命,实验结果显示,正常组织的光谱分辨荧光寿命为 $5.61 \pm 0.13$  ns @  $\lambda_{em} = 390$  nm,

$4.06 \pm 0.25$  ns @  $\lambda_{em} = 452$  nm,  $4.22 \pm 0.29$  ns @  $\lambda_{em} > 500$  nm; 癌变组织的光谱分辨荧光寿命为  $5.34 \pm 0.14$  ns @  $\lambda_{em} = 390$  nm,  $2.62 \pm 0.79$  ns @  $\lambda_{em} = 452$  nm,  $5.62 \pm 1.27$  ns @  $\lambda_{em} > 500$  nm; 这表明台式多光谱FLIM系统可以更敏感、更客观地指导口腔癌及癌前病变的活检。2016年PANDE P等<sup>[53]</sup>利用FLIM与OCT多模态系统获得口腔癌的定量的生物化学和形态学特征,并根据这些特征进行统计分类,最终基于FLIM和OCT组合特征的分类准确率为87.4%,高于仅依靠FLIM数据(83.2%)或OCT数据(81.0%)分类结果,且提供了高的灵敏度和特异性。2019年,WEYERS B W等<sup>[54]</sup>将FLIM系统与达芬奇机器人手术平台相集成,应用于外科手术中的癌变组织边缘成像,证明FLIM提供的参数可以将癌变组织与正常组织做出区分,展示了FLIM技术作为口腔癌临床诊断工具的潜力。2020年DURAN-SIERRA E等<sup>[55]</sup>首次使用宽场多光谱FLIM内窥镜对呈现癌前或癌性口腔病变的患者的口腔进行成像。利用355 nm的激光进行激发,通过选择不同的发射光谱带分别对胶原蛋白、NADH和FAD进行荧光寿命成像,结果表明:与健康口腔组织相比,癌前和癌性口腔病变组织的平均荧光寿命明显较短,归一化荧光强度明显增加。图6为某患者的舌鳞状细胞癌(Squamous-Cell Carcinoma, SCC)组织和正常组织的FLIM图像,每组成对FLIM特征图的像素分布都反映了癌前/癌变组织与正常组织的每个FLIM特征的图像中值分布的统计差异。同年,MARSDEN M等<sup>[56]</sup>对接受口腔癌或咽癌切除术的患者的样本进行FLIM成像,基于FLIM的各种参数集和分类器(支持向量机,随机森林和卷积神经网络)对健康组织和癌变组织进行区分,显示了FLIM未来用于临床上手术边缘评估的潜力。

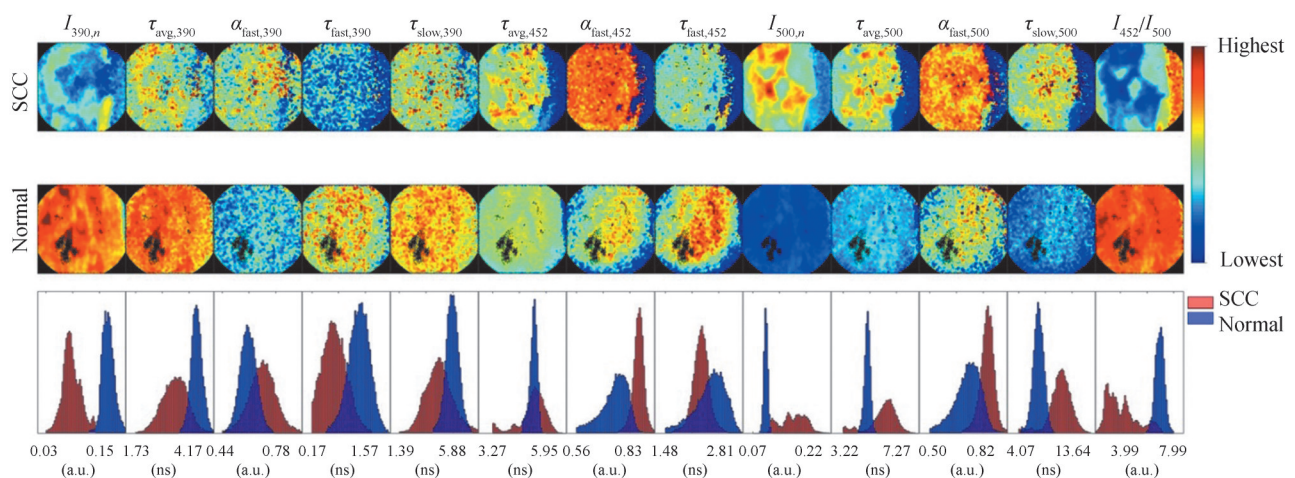


图6 同一患者的鳞状细胞癌和正常舌组织的多光谱FLIM特征图,以及正常舌组织和舌SCC组织每个特征的像素分布<sup>[55]</sup>  
Fig. 6 Multispectral FLIM feature maps of SCC and normal tongue tissue from the same patient, pixel distributions of normal and SCC maps for each feature are also compared<sup>[55]</sup>

### 3.3.2 胃癌

根据NIH统计分析,美国胃癌2021年预计新增病例26 560例,占新增癌症病例的1.4%,预计死亡病例11 180例,占癌症死亡病例1.8%;2011年至2017年五年相对生存率为32.4%<sup>[57]</sup>。

2010年MCGINTY J等<sup>[58]</sup>利用宽场FLIM系统在355 nm脉冲激光激发下,对胃肠道多个器官的癌变组织进行自体荧光寿命成像。其中胃中分化肠型腺癌组织的平均荧光寿命(2 950 ps),相比于正常胃组织的平均荧光寿命(2 510 ps)更长。2018年LI X等<sup>[59]</sup>利用多光子荧光寿命显微镜研究慢性糜烂性胃炎(Chronic Gastritis with Erosion, CG-E),慢性胃炎伴肠上皮化生(Chronic Gastritis with Intestinal Metaplasia, CG-IM)和肠胃型腺癌(Intestinal-Type Adenocarcinoma, ITA)。正常组织和患病组织的荧光寿命编码3D结构如图7所示。上皮通常呈现从黄色到绿色( $\sim 0.8 \sim 1.6$  ns)的荧光寿命,这归因于线粒体NADH和少量溶酶体FAD。粘膜表面(0  $\mu$ m)的荧光寿命正常组织比癌变组织长,表明在胃癌发生过程中上皮的代谢变化;而间质组织中的一些炎症细胞显示为橙色(图7(a)~(d)中的后两行),主要归因于相对于上皮细胞游离NADH与结合NADH的比率增加,部分归因于磷脂。总的来说,荧光寿命编码图像揭示了多个样本和不同细胞类型的亚细胞分辨代谢差异。

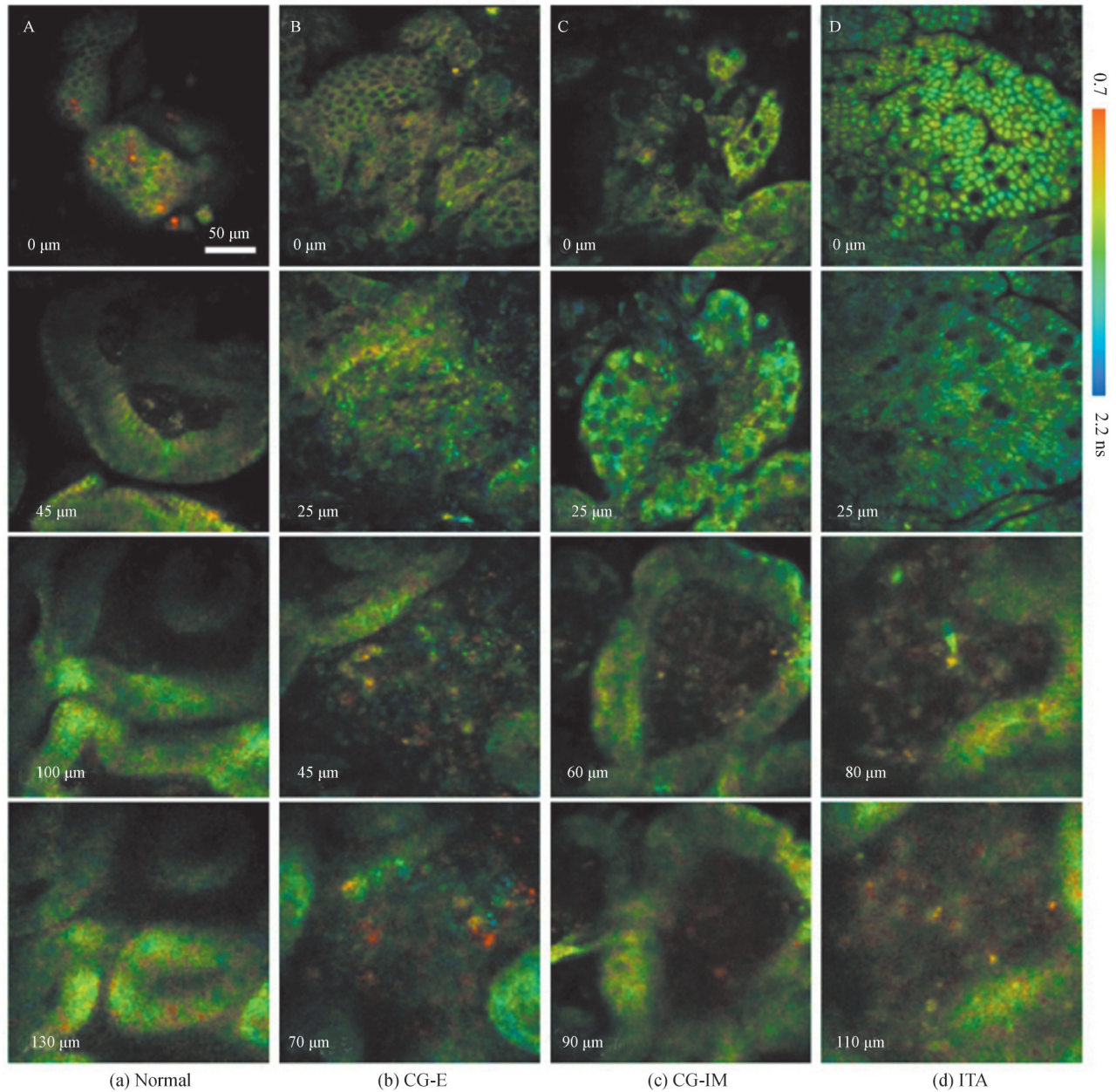


图7 不同深度处正常和胃病患者的胃窦粘膜荧光寿命编码图像<sup>[59]</sup>  
 Fig. 7 Fluorescence lifetime-coded 3D structures of the normal and diseased human gastric antrum mucosa<sup>[59]</sup>

### 3.3.3 结肠癌

根据NIH统计分析,美国2021年结肠癌预计新增病例149 500例,占新增癌症的7.9%,预计死亡病例52 980例,占癌症死亡病例8.7%;2011年至2017年五年相对生存率为64.7%<sup>[60]</sup>。

2010年MCGINTY J等<sup>[58]</sup>在355 nm的激光激发下发现结肠癌组织和健康结肠组织的荧光寿命具有统计学意义。实验结果为:结肠癌组织的平均荧光寿命(3 730 ps),相比于正常结肠组织的平均荧光寿命(3 150 ps)更长,如图8所示。2014年PATE K T等<sup>[61]</sup>利用荧光寿命相量法研究癌细胞代谢,证明了相量偏移和代谢变化之间的关系,并评估了阻断Wnt靶基因激活对游离NADH与结合NADH之比的影响。实验结果表明,经氰化钾处理后,相量分布向纯游离NADH位置靠近,表明线粒体释放NADH,NADH的游离/结合比增加;结肠癌细胞中Wnt信号的阻断导致NADH的游离/结合比率降低,表明糖酵解减少。

此外,FLIM还研究肝癌、胰腺癌等组织与正常组织的自体荧光寿命差异,用于辅助肿瘤边界鉴别<sup>[58]</sup>;研究正常人鳞状食管上皮细胞和巴特雷食管癌细胞的代谢功能,用于食道癌诊断<sup>[62]</sup>;以及对活体小鼠肝脏(正常、纤维化、脂肪性变性、肝细胞癌以及缺血再灌注损伤)进行系统且全面的实时成像,用于肝脏疾病诊断<sup>[63]</sup>。

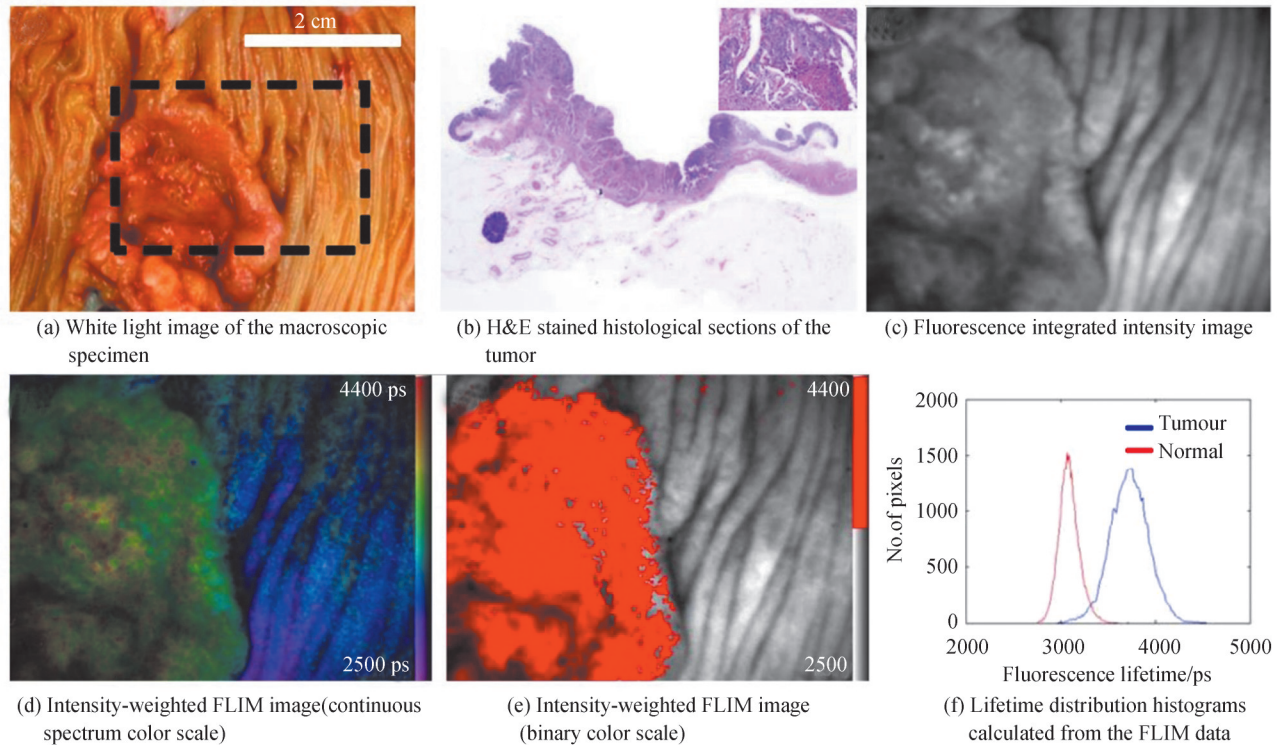


图8 中度分化结肠癌标本的明场图像、荧光强度图像、强度加权FLIM图像和寿命分布直方图<sup>[58]</sup>  
 Fig. 8 White light image, fluorescence integrated intensity image, intensity-weighted FLIM images and lifetime distribution histograms of a fresh hemicolectomy specimen containing a moderately differentiated colonic adenocarcinoma<sup>[58]</sup>

### 3.4 生殖系统

生殖系统分为男性生殖系统和女性生殖系统。女性生殖系统最常见的患癌部位是卵巢、子宫内膜和子宫颈；男性生殖系统患癌风险最高的部位为前列腺。

#### 3.4.1 宫颈癌和卵巢癌

根据NIH统计分析,美国预计2021年宫颈癌新增病例66 570例,占有新增癌症病例的3.5%,预计死亡病例12 940例,占有死亡病例的2.1%;2011年至2017年五年相对生存率为81.1%<sup>[64]</sup>。

2016年WANG Y L等<sup>[65]</sup>对无标记的宫颈组织进行FLIM研究,实验中主要对正常组织、宫颈癌前病变(Cervical Intraepithelial Neoplasia, CIN)及宫颈癌组织进行荧光寿命成像,结果显示三类样本具有不同的荧光寿命范围以及平均荧光寿命;可以在1 600 ps处绘制标准线,用以区分正常组织与癌前及癌组织(正常组织荧光寿命<1 600 ps,癌前及癌组织荧光寿命>1 600 ps);实验灵敏度和特异性分别为100%和90%。2020年WANG X等<sup>[66]</sup>通过荧光寿命成像和相量分析的方法,区分CIN的不同级别。图9显示了正常组织、轻度鳞状上皮内病变组织(CIN1)和重度不典型增生组织(CIN3)的FLIM图像及相量图。可见,正常宫颈组织的FLIM图像显示清晰的上皮细胞层结构和基底细胞边界;CIN1的FLIM图像显示约1/3的上皮有轻度不典型增生,伴有异常细胞;CIN3的FLIM图像显示,不规则形状的细胞从基底层边界逐渐侵入表皮,细胞更密、更无序。统计24位患者的样本,从FLIM相量中心坐标的密度图可以看出,正常组织、低风险CIN1和高风险CIN2、CIN3的数据分布在图中不同位置。大多数正常和轻度鳞状上皮病变的相量中心坐标主位于 $s=0.490$ 以上,而中度不典型增生(CIN2)和重度不典型增生(CIN3)的相量中心坐标主要位于 $s=0.490$ 以下,设定阈值 $s=0.490$ 的直线可用于区分宫颈组织中不典型增生的严重程度。因此FLIM相量分析可作为诊断宫颈组织高度癌前病变的有效方法。

除宫颈癌外,卵巢癌也是女性生殖系统中发病率较高的癌症类型。2014年,NAKAJIMA T等<sup>[67]</sup>建立了卵巢癌腹膜转移小鼠模型,利用荧光探针GSA-RhodG在卵巢癌组织处积聚的特点,通过活体荧光寿命成像检测腹膜卵巢癌,实验发现癌变组织(GSA-RhodG荧光)的荧光寿命长于正常组织(主要是胶原蛋白的自体

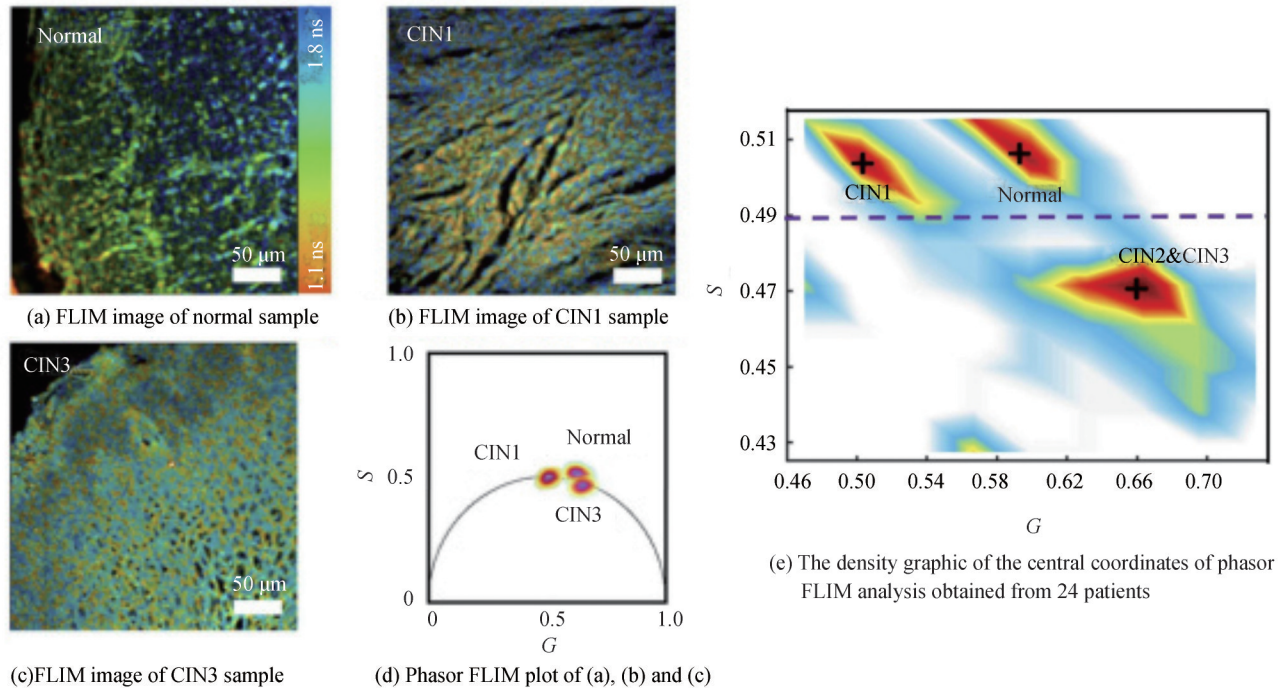


图9 正常宫颈组织样本、CIN1样本和CIN3样本的FLIM图像、相量图和相量中心坐标密度图<sup>[66]</sup>  
 Fig. 9 FLIM images, phasor FLIM plot and the density graphic of the central coordinates of phasor FLIM of a normal cervical tissue sample, a CIN1 sample, and a CIN3 sample<sup>[66]</sup>

荧光), 2.87 ns可作为区分阈值;此外, GSA-RhodG的荧光寿命不受血性腹水的影响。因此以GSA-RhodG为探针的FLIM可用于检测血性腹水中不可见的腹膜卵巢肿瘤。2018年SUARASAN S等<sup>[68]</sup>利用双光子FLIM技术评估了不同形状的明胶包覆的金纳米颗粒(AuNPs)作为造影剂对卵巢癌细胞(NIH: OVCAR-3)成像的能力,结果显示AuNPs能够在卵巢细胞内内化并聚集在细胞质区域,在近红外光照射下AuNPs具有明显而稳定的荧光发射,将其寿命作为参数,证明了AuNPs作为近红外成像分析的荧光标记物的可行性。

### 3.4.2 前列腺癌

男性生殖器癌症中前列腺发病率最高。据NIH统计分析,前列腺癌(Prostate Cancer, PCa)在美国常见癌症类型中排第3位,预计2021年新增前列腺癌病例248 530例,占有新增癌症病例的13.1%,预计新增死亡病例34 130例,占有死亡病例的5.6%;2011至2017年五年相对生存率为97.5%<sup>[69]</sup>。

FLIM技术为药物治疗前列腺癌提供一种新的观察方法。2016年O'MELIA M J等<sup>[70]</sup>将FLIM应用于表征PCa细胞对葡萄糖刺激和DOX治疗的反应。通过跟踪NAD(P)H的占比( $\alpha_2\%$ )、NADH/NAD(P)H的比率以及色氨酸(Tryptophan, Trp)的能量转移率( $E\%$ ),可以区分葡萄糖刺激和DOX在前列腺细胞中的作用。2017年ALAM S R等<sup>[71]</sup>利用FLIM研究药物DOX对PCa细胞线粒体的代谢影响,患者在服用DOX后,NADH平均荧光寿命( $\tau_{mean}$ )和酶结合率( $\alpha_1\%$ )增加,FAD酶结合率( $\alpha_1\%$ )降低,膜氧化还原比(NADH- $\alpha_2\%$ /FAD- $\alpha_1\%$ )和活性氧增加,进而诱导细胞凋亡。可见,DOX治疗后的线粒体氧化应激反应增加,对细胞的凋亡有诱导作用,表明FLIM有能力在DOX诱导PCa细胞凋亡前检测到与线粒体活性正相关的早期分子变化。

### 3.5 泌尿系统

泌尿系统主要由肾脏、输尿管、膀胱及尿道组成。根据NIH统计分析,膀胱癌在美国常见癌症中排第6位,预计2021年新增膀胱癌患者83 730例,占有新增癌症病例的4.4%,预计死亡病例17 200例,占有死亡病例的2.8%;2011至2017年五年相对生存率为77.1%<sup>[72]</sup>。

2018年PRADÈRE B等<sup>[73]</sup>将双光子荧光、二次谐波显微镜、光谱分析和FLIM结合,用于尿路上皮癌病理特征识别和肿瘤分级。由图10可以看出正常细胞、低级别肿瘤和高级别肿瘤细胞的结构及荧光寿命,高级别肿瘤细胞的平均荧光寿命长于低级别肿瘤细胞,均长于正常细胞。对每种组织的15个感兴趣区域的荧

光衰减进行双指数拟合,所得振幅寿命显示正常细胞、低级别和高级别尿路上皮癌之间存在显著差异:正常 vs. 低级别( $p=0.002$ )、正常 vs. 高级别( $p<0.001$ )、高级别 vs. 低级别( $p<0.001$ )。癌变组织与正常组织具有不同的代谢机制,从而影响 NADH 和 FAD 荧光寿命。2020 年 SUAREZ-IBARROLA R 等<sup>[74]</sup>基于 TCSPC-FLIM 技术分析了正常细胞和尿路上皮癌细胞的 NAD(P)H 和 FAD 寿命图像。表明利用 NAD(P)H 和 FAD 图像中的平均荧光寿命分布、振幅加权寿命( $\tau_{\text{mean}}$ )和快速衰减分量( $\alpha_1$ )可以对正常尿路上皮细胞、低级别和高级别尿路上皮癌细胞进行区分。

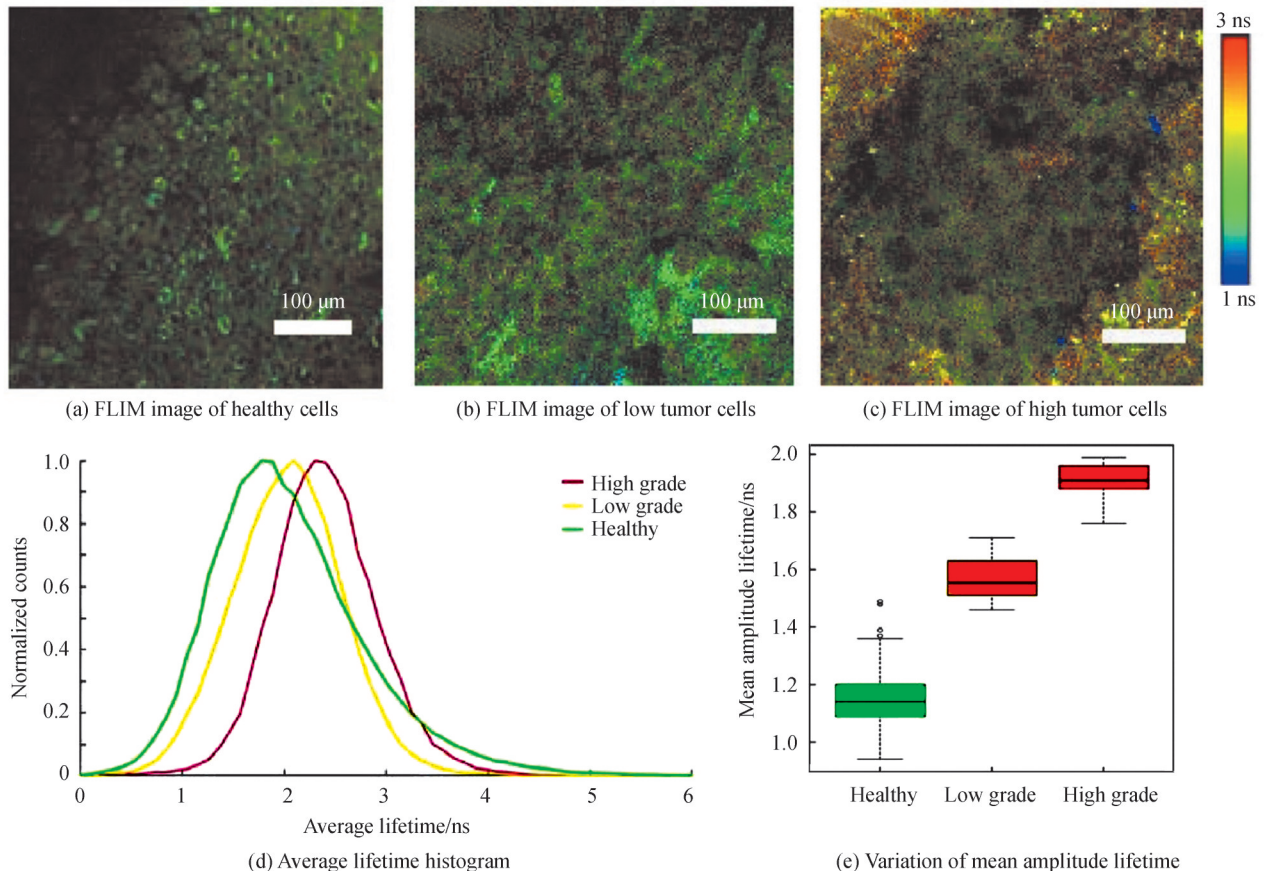


图 10 在 870 nm 激发波长下的健康组织、低级别肿瘤组织和高级别肿瘤细胞的荧光寿命图像、平均寿命直方图和平均振幅寿命<sup>[73]</sup>

Fig. 10 Fluorescence Lifetime images, respective average lifetime histogram and variation of mean amplitude lifetime of healthy, low grade and high grade tumor cells at 870 nm excitation wavelength<sup>[73]</sup>

### 3.6 内分泌系统

乳腺癌为美国第一大常见癌症类型,同时也是美国第四大癌症死亡原因。根据 NIH 统计分析,美国乳腺癌 2021 年预计新增病例 281 550 例,占所有癌症病例的 14.8%,预计死亡病例 43 600 例,占所有死亡病例的 7.2%;2011 年至 2017 年五年相对生存率为 90.3%<sup>[75]</sup>。

2013 年 DAMAYANTIN P 等<sup>[76]</sup>基于 FLIM 技术对不同阶段乳腺癌细胞的 FAD 进行荧光寿命成像,将荧光寿命与主成分分析和弹性网络分析算法相结合,根据平均寿命值对乳腺癌细胞的不同阶段进行分类,准确率为 100%。2017 年 PHIPPS J E 等<sup>[77]</sup>建立了乳腺癌 FLIM 数据库和支持向量机分类算法,可以自动检测癌变、纤维化和脂肪乳腺组织,准确率 >97%,表明该技术具有评估乳腺癌边缘的巨大潜力。2018 年 ZHOU T 等<sup>[78]</sup>合成了一种在生理 pH 下稳定,但在弱酸性条件下有效释放 DOX 的聚合物纳米粒子 PAH-Cit/DOX。实验以乳腺癌细胞(MCF-7)为研究对象,FLIM 相量分析如图 11 所示,在将 PAH-Cit/DOX 纳米粒子与 MCF-7 细胞孵育 6 h 后,部分 DOX 已经进入细胞核,其寿命比细胞质中的短。在相量图中,DOX 的荧光寿命被分成四段,分别对应 FLIM 图像中的细胞膜、细胞质、核膜和细胞核,平均寿命分别为 4.46、3.16、

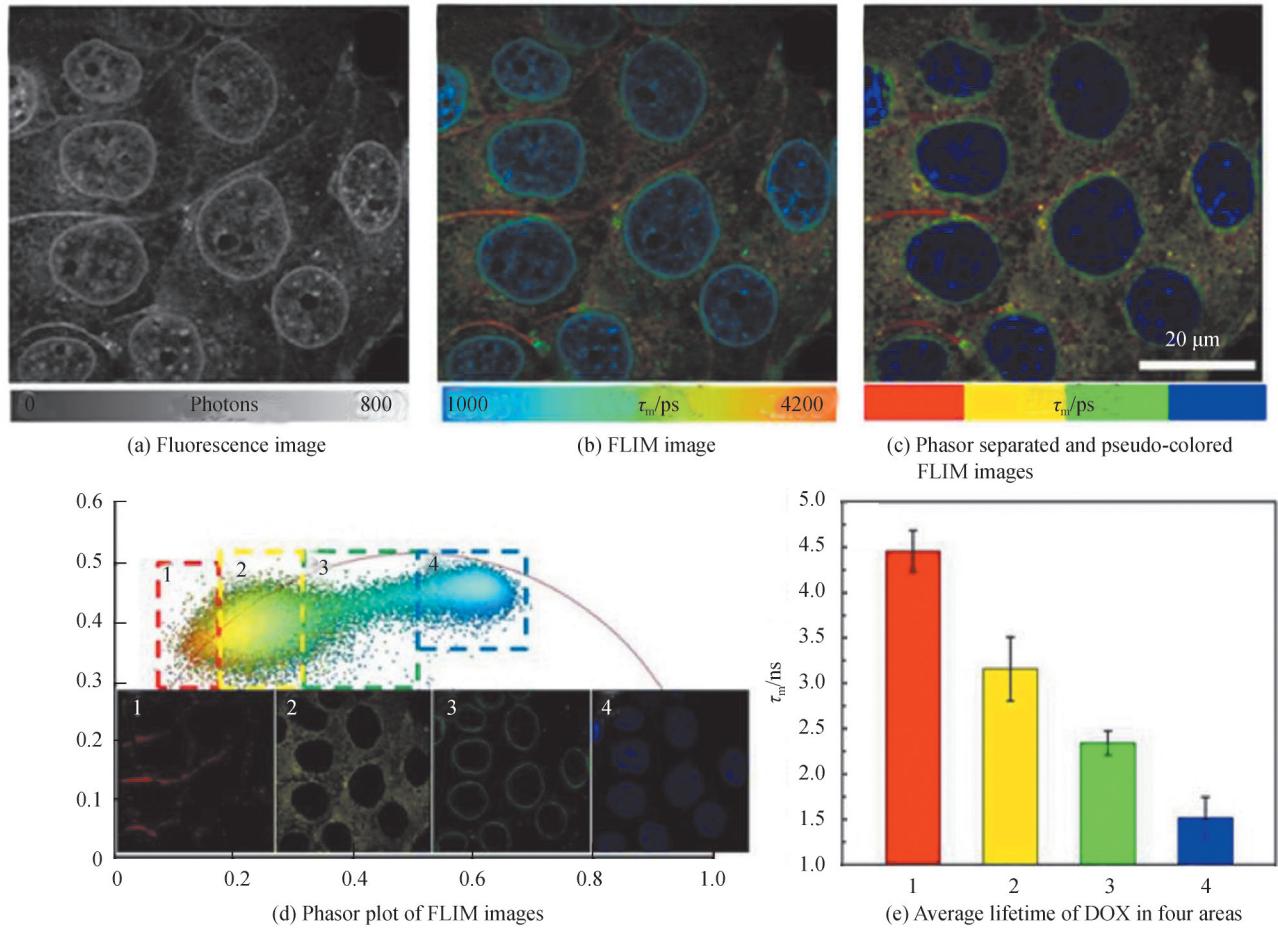
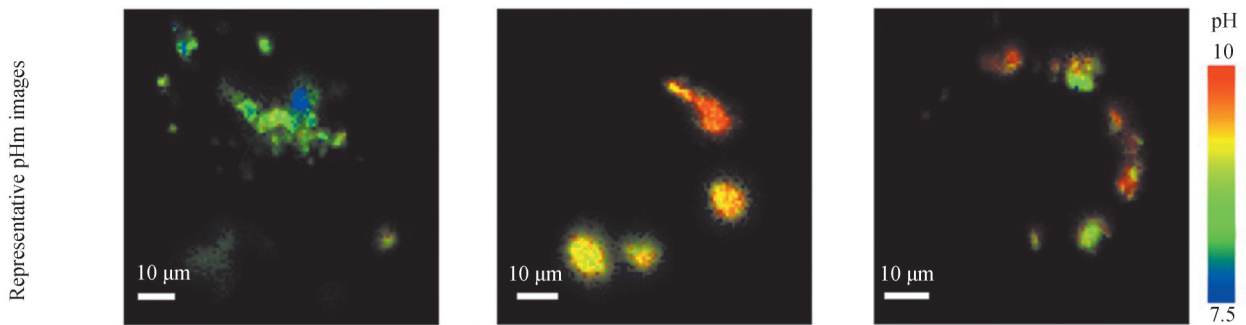


图 11 PAH-Cit / DOX 作用 6 h 后 MCF-7 细胞的 FLIM 相量分析<sup>[78]</sup>  
 Fig. 11 Phasor-FLIM analysis of MCF-7 cells after incubation with PAH-Cit/DOX for 6 h<sup>[78]</sup>

2.34 和 1.52 ns。表明 FLIM 的相量分析可以将 MCF-7 细胞分为细胞膜、细胞质、细胞核膜和细胞核,并对细胞环境中 DOX 荧光寿命的动态变化进行检测。2020 年 RIPOLL C 等<sup>[79]</sup>使用 FLIM 准确测量乳腺癌细胞中线粒体的 pH 值(pH<sub>m</sub>),通过 QD-SS20-MPA 纳米传感器获得 FLIM 图像,该传感器被整合到不同乳腺癌细胞系(MCF7、MDA-MB-231 和 MDA-MB-46)的线粒体中,然后将荧光寿命值转换成 pH 值,图 12 显示实验测得的线粒体 pH。



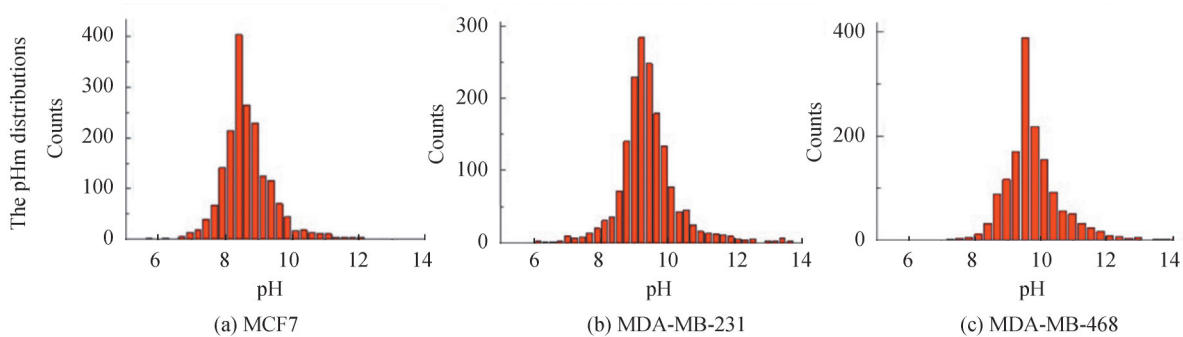


图 12 MCF7, MDA-MB-231 和 MDA-MB-468 乳腺癌细胞系线粒体内 QD-SS20-MPA 纳米传感器的 pH 图像和相应的 pH 分布<sup>[79]</sup>

Fig. 12 Representative pHm images and the corresponding pHm distributions obtained from the PL lifetime of QD-SS20-MPA nanosensors incorporated into the mitochondria of MCF7, MDA-MB-231 and MDA-MB-468<sup>[79]</sup>

### 3.7 皮肤系统

皮肤癌包括鳞状细胞癌(Squamous-Cell Carcinoma, SCC)、基底细胞癌(Basal Cell Carcinoma, BCC)、恶性黑色素瘤(Malignant Melanoma, MM)、恶性淋巴瘤、汗腺癌、隆突性皮肤纤维肉瘤、血管瘤等。

#### 3.7.1 恶性黑色素瘤

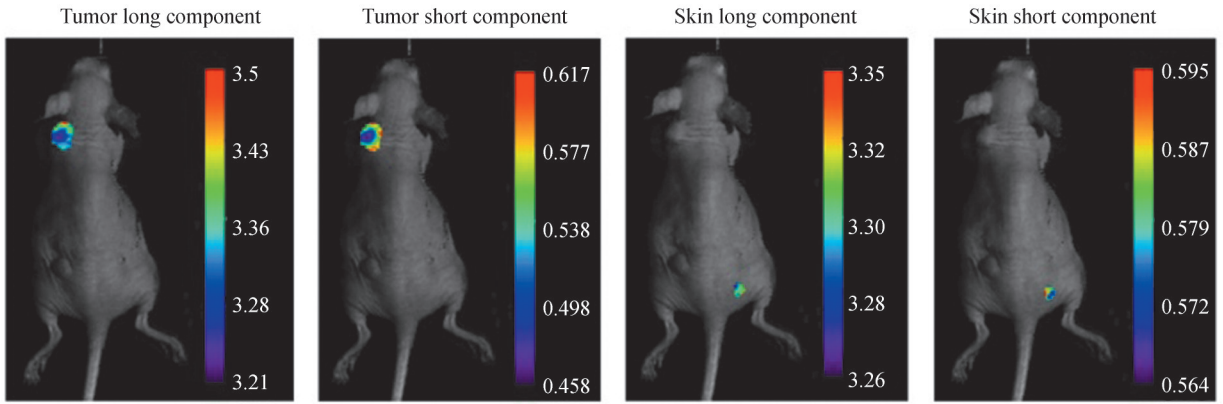
黑色素瘤位于美国常见癌症第五位。根据 NIH 统计分析,美国黑色素瘤 2021 年预计新增病例 106 110 例,预计死亡病例 7 180 人;2011 年至 2017 年五年相对生存率为 93.3%<sup>[80]</sup>。

2013 年 SEIDENARI S 等<sup>[81]</sup>利用多光子层析成像(Multiphoton Laser Tomography, MPT)与 FLIM 相结合对 MM 进行研究,比较了健康皮肤、黑色素细胞病变和基底细胞癌的荧光寿命差异,研究了 MM 不同深度处的荧光寿命成像及非典型大短寿命细胞的变化等。结果表明,MM 的特征是存在非典型的短寿命细胞和结构紊乱,而痣则表现为典型的细胞和规则的组织结构;利用 MPT/FLIM 对 MM 诊断的灵敏度和特异性分别达到 100% 和 98%。2014 年 PIRES L 等<sup>[82]</sup>通过评估 NADH 和 FAD 分子的时间分辨荧光寿命来探测 MM,对使用细胞系 B16F10 诱导建立的 42 个 balb/c 裸鼠 MM 模型进行了研究。根据荧光寿命的差异对正常组织和 MM 进行区分,实验灵敏度、特异性和准确率分别为 99.4%、97.4% 和 98.4%。2017 年 PASTORE M N 等<sup>[83]</sup>将多光子显微与 FLIM 相结合,对细胞内 NADH 的游离/结合比率进行成像,研究同基因 MM 小鼠模型,检测单个表皮细胞代谢状态的变化,作为监测肿瘤生长进程的代谢标志物。实验表明随着 MM 的生长,NADH 的游离/结合比率显著增加,同时 NADH 的短寿命和长寿命成分保持不变。

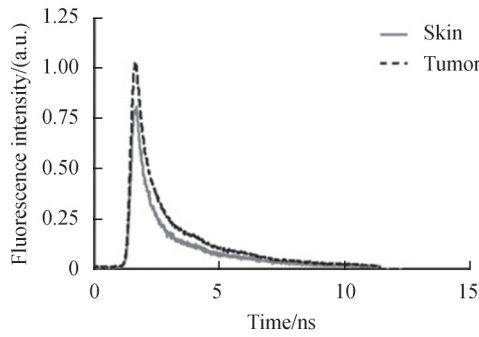
#### 3.7.2 鳞状细胞癌

SCC 又称为鳞癌或表皮癌,是发生于表皮或附属器细胞的一种恶性肿瘤。2010 年 MARTÍN-VILLAR E 等<sup>[84]</sup>利用 FLIM 技术研究了 SCC 细胞内跨膜糖蛋白 Podoplanin (供体, eGFP 标记)和 CD44 蛋白(受体, mRFP 标记)之间的荧光共振能量转移,证明了 Podoplanin-CD44s 的相互作用与具有迁移表型的细胞质膜相关,且对驱动恶性肿瘤细胞迁移产生影响。2015 年 MILLER C R 等<sup>[85]</sup>使用双通道 FLIM 来量化高表达和低表达 HER-2 的 SCC 细胞系(SCC-74B 和 SCC-74A)内部和之间的代谢变化,代谢状态的改变引起荧光寿命分布和荧光强度发生变化,可用于对 SCC-74B 和 SCC-74A 进行区分。2017 年 MILLER J P 等<sup>[86]</sup>利用 FLIM 技术研究小鼠的 SCC 组织与正常皮肤组织的自体荧光寿命,实验结果如图 13 所示,对 FLIM 图像中每个区域的荧光强度衰减的分析表明肿瘤组织与正常组织的平均荧光寿命的长寿命组分没有差异,短寿命组分表现出差异(肿瘤组织:  $0.57 \pm 0.026$  ns; 正常组织:  $0.61 \pm 0.021$  ns),且越靠近肿瘤中心寿命越短;根据长/短寿命组分的像素直方图,可见肿瘤和正常皮肤具有相同的长寿命组分分布,而短寿命组分分布有明显差异;受试者工作特征(Receiver Operating Characteristic, ROC)曲线显示使用不同的短寿命阈值鉴别肿瘤时,灵敏度总是高于特异性。

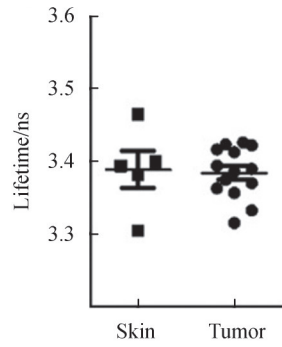




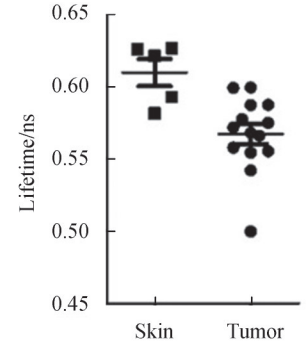
(a) Lifetime components of tumor and skin



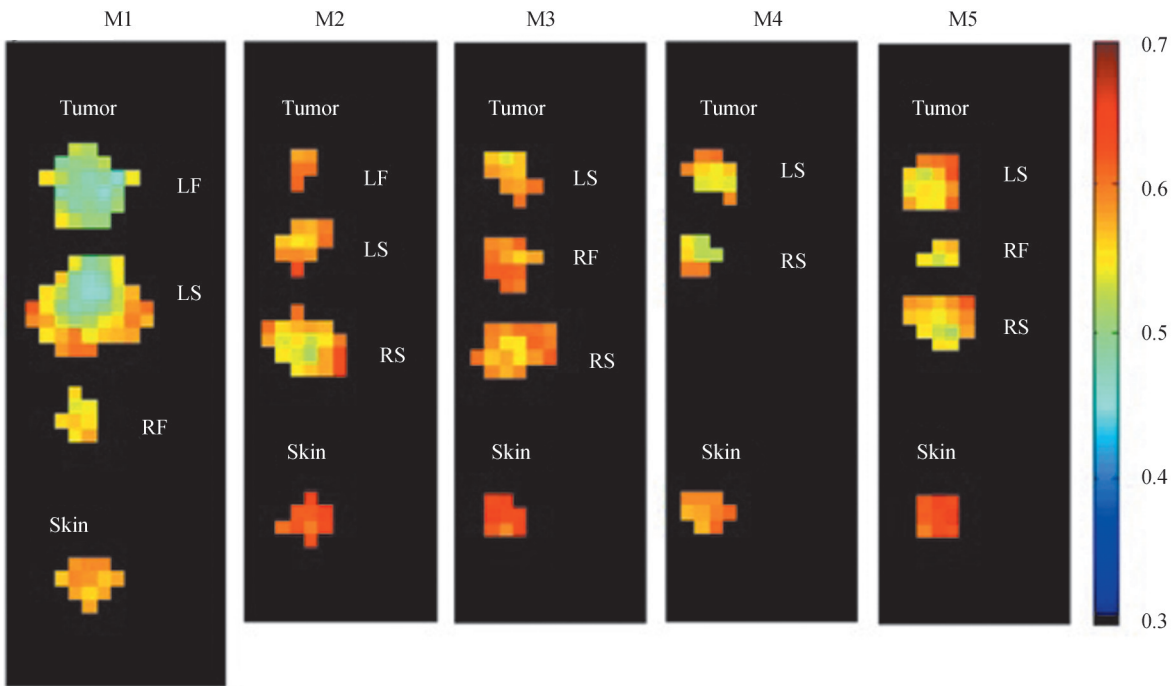
(b) Fluorescence lifetime decay curves



(c) Fluorescence lifetime long component



(d) Fluorescence lifetime short component



(e) Lifetime short component (ns)

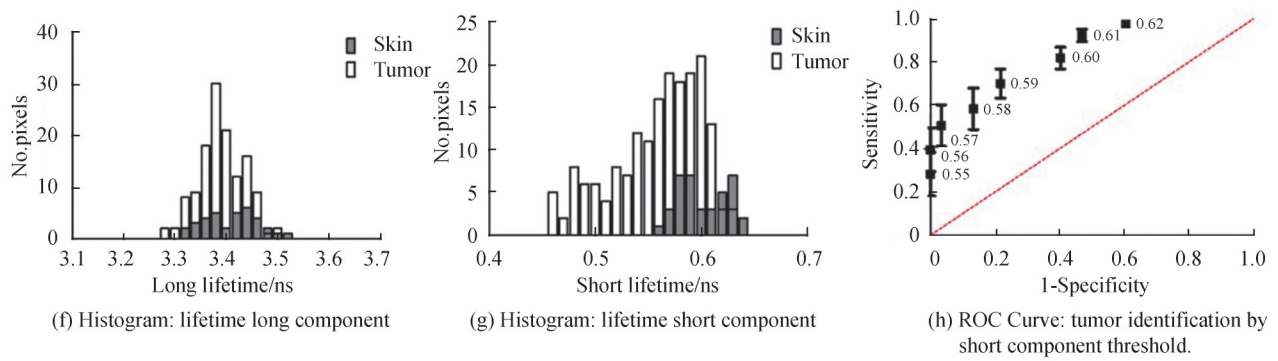
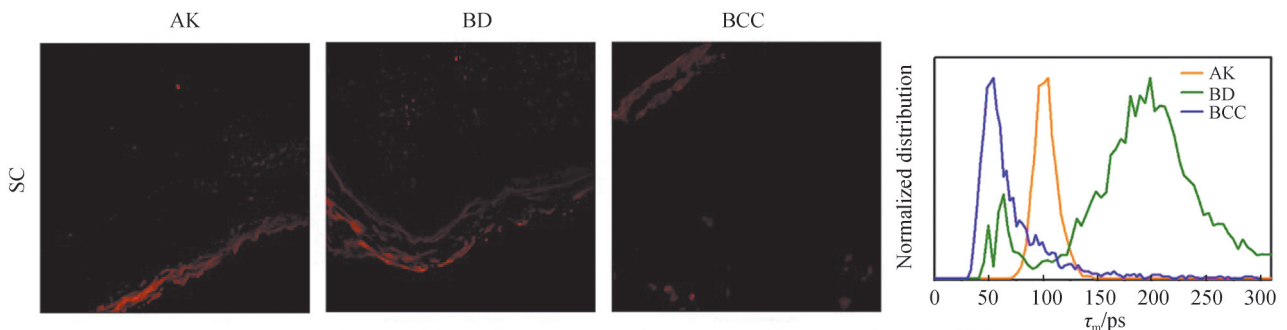


图 13 小鼠 SCC 肿瘤组织和正常组织 FLIM 分析<sup>[86]</sup>  
Fig. 13 FLIM analysis of mouse SCC tumor tissue and normal tissue<sup>[86]</sup>

### 3.7.3 基底细胞癌

BCC 是皮肤恶性肿瘤的常见类型之一,约占皮肤恶性肿瘤常见组织类型的 60%。2011 年 PATALAY R 等<sup>[87]</sup>利用多光子层析成像和荧光寿命成像对良性增生痣(Dysplastic Nevi, DN)和恶性结节性基底细胞癌(nodular Basal Cell Carcinomas, nBCC)进行研究。使用 760 nm 激发并在两个光谱通道探测,nBCC 和 DN 的平均荧光寿命分别为 2.79 ns 和 2.52 ns(300~500 nm 通道)以及 2.08 ns 和 1.33 ns(500~640 nm 通道),显示出多光子 FLIM 技术在诊断常见皮肤肿瘤方面具有巨大的潜力。2012 年 SEIDENARI S 等<sup>[88]</sup>评估多光子层析成像和 FLIM 描述符对 BCC 的灵敏度和特异性,以提高 BCC 的诊断和肿瘤边缘的识别。通过对不同组织的荧光寿命进行统计分析,最终表明利用形态学和数字特征可以将 BCC 与其他皮肤病及健康皮肤进行区分。2017 年 LUO T 等<sup>[89]</sup>使用双光子 FLIM 及相量分析来区分 BCC、光化性角化病(Actinic Keratosis, AK)和鲍温病(Bowen's Disease, BD)。实验首次测量了 AK、BD、BCC 的三层皮肤组织(角质层(Stratum Corneum, SC)、上皮细胞(Epithelial Cells, ECs)、结缔组织(Connective Tissue, CT))的平均荧光寿命,并利用 FLIM 相量法将这三层区分开,表明 FLIM 相量分析可以为组织病理学研究提供一种简便直接的方法,显著提高明场 H&E 诊断的准确性。在该工作<sup>[89]</sup>的基础上,2019 年 CHEN B 等<sup>[90]</sup>将 FLIM 与支持向量机算法结合,建立以荧光寿命特征和信息熵为输入参数的线性支持向量机模型(Linear Support Vector Machines, LSVM)来区分 BCC、AK 和 BD。图 14 所示为 H&E 染色的 AK、BD 和 BCC 皮肤组织切片在 SC、EC 和 CT 层的 FLIM 图像和平均寿命分布直方图。结果显示,每种病变类型中各层的荧光寿命分布不同,同一层中不同病变类型根据荧光寿命分布可进行区分;BD 组织在所有层都具有较长的平均寿命( $\tau_m$ )值,AK 组织次之,BCC 组织最短,因此  $\tau_m$  可以作为鉴定皮肤病变的理想特征。此外,进行荧光寿命分析时采用三指数函数进行寿命拟合,得到三个组分寿命值( $\tau_1 < \tau_2 < \tau_3$ )。将平均荧光寿命( $\tau_m$ )、中间寿命( $\tau_2$ )作为 SVM 特征参数,并结合信息熵用于皮肤肿瘤疾病探测,取得了较高的灵敏度和特异性。2020 年 ROMANO R A 等<sup>[91]</sup>应用多光谱 FLIM 皮肤镜系统对 nBCC 进行分析,在三个发射通道( $390 \pm 20$  nm,  $452 \pm 22$  nm,  $>496$  nm)同时测量了三种内源性荧光团(胶原蛋白、NADH 和 FAD)的荧光寿命,然后在线性判别分类器中使用自体荧光光谱和荧光寿命特征的组合,可以识别出 nBCC 病变区域,灵敏度和特异性分别为 88% 和 67%;初步结果显示,自体荧光 FLIM 内窥技术在 nBCC 图像引导手术中具有应用潜力。



(a) FLIM images of the SC from AK, BD and BCC and the histogram of average lifetime

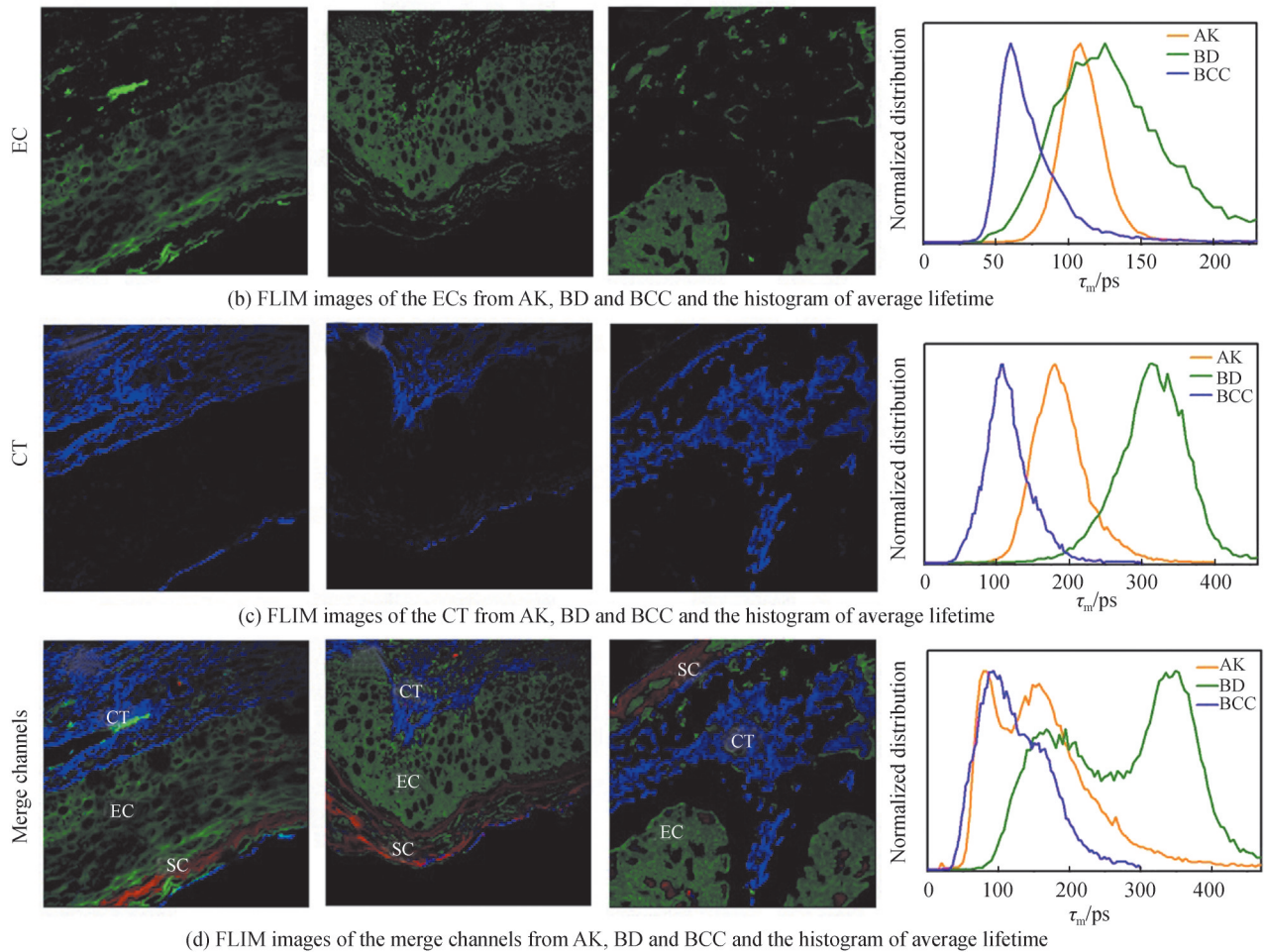


图14 基于H&E染色切片的FLIM相量分析使用图像分割对比AK、BD和BCC不同特征<sup>[90]</sup>

Fig. 14 Distinction among AK, BD, and BCC using image segmentation based on a phasor plot of the fluorescence lifetime imaging of H&E-stained sections<sup>[90]</sup>

## 4 总结与展望

FLIM是一种新型的荧光成像技术,具有定量监测荧光团所处微环境变化的能力。根据不同微环境下荧光团荧光寿命的差异,利用时域法或频域法进行荧光寿命测量与成像,FLIM技术可以实现对正常细胞/组织与癌变细胞/组织的识别,从而实现早期癌症诊断并对癌症发展阶段进行表征,目前已经被应用于多种癌症的检测,并取得了良好的效果。本文详细综述了FLIM在神经系统、呼吸系统、消化系统、生殖系统、泌尿系统、内分泌系统和皮肤系统等癌症诊断中的应用。FLIM用于癌症诊断研究的方向主要包括:1)手术中对癌症区域切除边界进行判断和划分;2)辅助鉴别癌症的分型、分级及分期;3)结合人工智能技术对癌症进行预测和诊断;4)检测癌症治疗药物的作用机理与观察癌细胞的药物反应。因此,FLIM技术在癌症诊断方面有巨大的应用前景。

然而,目前FLIM技术在癌症诊断中还存在一些局限性,尚未大量应用到临床上,主要有以下几个方面的原因。1)硬件系统的限制。首先,FLIM技术对光源及探测器要求很高,使得系统整体成本较高;其次,FLIM虽然可以提供微环境变化信息,但对于肿瘤生长的复杂环境而言参数单一,因此通常需要与多种成像模式,如拉曼散射、二次谐波等相结合进行多模态成像,尽管增加了系统的复杂性,但可以提供更多互补的功能信息,有助于提高诊断的精度;最后,若对体内腔道进行检测,还需将FLIM与内镜(例如胃镜、十二指肠镜和腹腔镜等)结合,将FLIM系统接收模块改进为与光纤相连接的小型化探头。2)成像速度的限制。在进行活体成像时,成像速度对诊断非常重要,但是受时间分辨率、光子产额、探测效率和数据分析等因素的影响,目前FLIM的成像速度很难满足活体成像诊断的需要。比如,若实现理想的FLIM成像,需要达到给定

的信噪比,而光子产额和探测效率与图像采集时间成反比。此外,目前处理一张FLIM图像需要几秒钟到几分钟,进行大量数据计算则更加耗时,通过结合深度学习和人工智能有望解决成像和诊断速度的问题。3) 成像深度的限制。由于生物组织对光,尤其是可见光具有强的散射特性,导致成像深度降低。上皮组织相比于其他组织细胞周期短、组织更新较快,发生基因突变的可能性更高,因此大多数癌症来源于上皮层,例如BCC,其I期肿瘤厚度不超过1 mm,III期肿瘤厚度不超过4 mm。目前单光子成像深度只有几十 $\mu\text{m}$ ,双光子成像深度为300~500  $\mu\text{m}$ ,三光子成像深度达到800~900  $\mu\text{m}$ ,因此未来发展多光子,尤其是三光子FLIM活体成像技术,是解决FLIM成像深度问题的有效方法之一。除此之外,利用近红外二区(1 000~1 700 nm)成像,可以获得更大的组织穿透深度。4) 目前医生进行癌症诊断时所执行的“金标准”仍为病理活检。医生应用FLIM进行诊断的经验匮乏,且FLIM技术缺乏大量实验数据积累,对医生说服力不足,这在一定程度上限制了FLIM的临床应用。

展望未来,随着人们对FLIM技术的深入研究、高灵敏度荧光探针的开发、多模态成像方法的发展,以及人工智能技术尤其是深度学习的快速进步,FLIM所面临的问题会逐步得到解决,FLIM将对传统癌症诊断产生巨大影响,并将获得广泛的临床应用。

### 参考文献

- [1] International Agency for Research on Cancer. Cancer today [DB/OL]. (2021-07-10) [2021-07-15]. <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-populations>.
- [2] National cancer institute. SEER cancer stat facts: cancer of any site [DB/OL]. (2021-04-15) [2021-06-1]. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/all.html>.
- [3] HAO Jie. An introduction to oncology[M]. 2nd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2018.  
郝捷. 肿瘤学概论[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2018.
- [4] PETRÁŇ M, HADRAVSKÝ M, EGGER M D, et al. Tandem-scanning reflected-light microscope[J]. Journal of the Optical Society of America, 1968, 58(5): 661-664.
- [5] DINNES J, DEEKS J J, CHUCHU N, et al. Reflectance confocal microscopy for diagnosing keratinocyte skin cancers in adults[J]. The Cochrane Database of Systematic Reviews, 2018, 12(12): CD013191.
- [6] DENK W, STRICKLER J H, WEBB W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy[J]. Science, 1990, 248(4951): 73-76.
- [7] CHEN Y, GUO H, GONG W, et al. Recent advances in two-photon imaging: technology developments and biomedical applications[J]. Chinese Optics Letters, 2013, 11(1): 011703.
- [8] HELL S W, WICHMANN J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy[J]. Optics Letters, 1994, 19(11): 780-782.
- [9] BETZIG E, PATTERSON G H, SOUGRAT R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. Science, 2006, 313(5793): 1642-1645.
- [10] BERGSTRAND J, XU L, MIAO X, et al. Super-resolution microscopy can identify specific protein distribution patterns in platelets incubated with cancer cells[J]. Nanoscale, 2019, 11(20): 10023-10033.
- [11] SAGOLLA K, LÖHMANNSRÖBEN H G, HILLE C. Time-resolved fluorescence microscopy for quantitative  $\text{Ca}^{2+}$  imaging in living cells[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013, 405(26): 8525-8537.
- [12] PLISS A, PENG X, LIU L, et al. Single cell assay for molecular diagnostics and medicine: monitoring intracellular concentrations of macromolecules by two-photon fluorescence lifetime imaging[J]. Theranostics, 2015, 5(9): 919-930.
- [13] VO-DINH T. Biomedical photonics handbook[M]. CRC Press, 2003.
- [14] LAKOWICZ J R. Principles of fluorescence spectroscopy[M]. 3rd ed., Springer, 2006.
- [15] LIU Lixin, QU Junle, LIN Ziyang, et al. Fluorescence lifetime imaging and its applications in biomedicine[J]. Journal of Shenzhen University, 2005, 22(2): 133-141.  
刘立新, 屈军乐, 林子扬, 等. 荧光寿命成像及其在生物医学中的应用[J]. 深圳大学学报, 2005, 22(2): 133-141.
- [16] ELSON D, WEBB S, SIEGEL J, et al. Biomedical applications of fluorescence lifetime imaging [J]. Optics and Photonics News, 2002, 13(11): 26-56.
- [17] KRISHNAN R V, SAIYOH H, TERADA H. Development of a multiphoton fluorescence lifetime imaging microscopy system using a streak camera[J]. Review of Scientific Instruments, 2003, 74(5): 2714-2721.
- [18] QU J, LIU L, CHEN D, et al. Temporally and spectrally resolved sampling imaging with a specially designed streak camera[J]. Optics letters, 2006, 31(3): 368-370.
- [19] LIU Xiongbo, LIN Danying, WU Qianqian, et al. The latest research progress of fluorescence lifetime microscopy and its application[J]. Acta Physica Sinica, 2018, 67(17): 27-40.  
刘雄波, 林丹樱, 吴茜茜, 等. 荧光寿命显微成像技术及应用的最新研究进展[J]. 物理学报, 2018, 67(17): 27-40.

- [20] STOKKUM I H MVAN, LARSEN D S, GRONDELLE RVAN. Global and target analysis of time-resolved spectra [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1657(2-3): 82-104.
- [21] DATTA R, HEASTER T M, SHARICK J T, et al. Fluorescence lifetime imaging microscopy: fundamentals and advances in instrumentation, analysis, and applications[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2020, 25(7): 071203.
- [22] LIN Danying, NIU Jingjing, LIU Xiongbo, et al. Phasor analysis of fluorescence lifetime data and its application[J]. *Acta Physica Sinica*, 2020, 69(16): 319-331.  
林丹樱, 牛敬敬, 刘雄波, 等. 荧光寿命数据的相量分析及其应用[J]. *物理学报*, 2020, 69(16): 319-331.
- [23] DIGMAN M A, CAIOLFA V R, ZAMAI M, et al. The phasor approach to fluorescence lifetime imaging analysis[J]. *Biophysical Journal*, 2008, 94(2): 14-16.
- [24] MANNAM V, ZHANG Y, YUAN X, et al. Machine learning for faster and smarter fluorescence lifetime imaging microscopy[J]. *Journal of Physics: Photonics*, 2020, 2(4): 042005.
- [25] SMITH J T, YAO R, SINSUEBPHON N, et al. Fast fit-free analysis of fluorescence lifetime imaging via deep learning [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2019, 116(48): 24019-24030.
- [26] POLICARD A. Étude sur les aspects offerts par des tumeurs expérimentales examinées à la lumière de Wood[J]. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de Ses Filiales*, 1924, 91: 1423-1424.
- [27] KOPPENOL W H, BOUNDS P L, DANG C V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2011, 11(5): 325-337.
- [28] LI Buhong, XIE Shusen. Application of fluorescence spectroscopy and its imaging technology in optical biopsy [J]. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2005, 25(7): 1083-1087.  
李步洪, 谢树森. 荧光光谱及其成像技术在光活检中的应用[J]. *光谱学与光谱分析*, 2005, 25(7): 1083-1087.
- [29] NI M, ZHOU S. Nonlinear optical microscopy: Endogenous signals and exogenous probes [J]. *Annalen der Physik*, 2015, 527(7-8): 471-489.
- [30] RAYMOND S B, SKOCH J, HILLS I D, et al. Smart optical probes for near-infrared fluorescence imaging of Alzheimer's disease pathology[J]. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2008, 35(1): S93-S98.
- [31] THIBON A, PIERRE V C. Principles of responsive lanthanide-based luminescent probes for cellular imaging [J]. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 2009, 394(1): 107-120
- [32] NAKABAYASHI T, OHTA N. Sensing of intracellular environments by fluorescence lifetime imaging of exogenous fluorophores[J]. *Analytical Sciences*, 2015, 31(4): 275-285.
- [33] MARCU L. Fluorescence lifetime techniques in medical applications [J]. *Annals of Biomedical Engineering*, 2012, 40 (2): 304-331.
- [34] LIU L, YANG Q, ZHANG M, et al. Fluorescence lifetime imaging microscopy and its applications in skin cancer diagnosis[J]. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 2019, 12(5): 1930004.
- [35] LI Hui, XIA Xianyuan, CEHN Tingai, et al. Applications of two-photon excitation fluorescence lifetime imaging in tumor diagnosis[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2018, 45(2): 139-152.  
李慧, 夏先园, 陈廷爱, 等. 双光子荧光寿命成像在肿瘤诊断研究中的应用[J]. *中国激光*, 2018, 45(2): 139-152.
- [36] National Cancer Institute. SEER Cancer Stat Facts: Brain and Other Nervous System Cancer [DB/OL]. (2021-04-15) [2021-06-1]. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/brain.html>.
- [37] SUN Y, HATAMI N, YEE M, et al. Fluorescence lifetime imaging microscopy for brain tumor image-guided surgery [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2010, 15(5): 056022.
- [38] KANTELHARDT S R, KALASAUSKAS D, KÖNIG K, et al. In vivo multiphoton tomography and fluorescence lifetime imaging of human brain tumor tissue[J]. *Journal of Neuro-Oncology*, 2016, 127(3): 473-482.
- [39] LIN D, LUO T, LIU L, et al. Implementation of FLIM and SIFT for improved intraoperative delineation of glioblastoma margin[J]. *Chinese Optics of Letters*, 2017, 15(9): 20-24.
- [40] POULON F, PALLUD J, VARLET P, et al. Real-time brain tumor imaging with endogenous fluorophores: a diagnosis proof-of-concept study on fresh human samples[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 14888.
- [41] SHIRMANOVA M V, LUKINA M, KISILEVA E B, et al. Interrogation of glioma metabolism on macroscale by FLIM [C]. *SPIE*, 2019, 10882: 1088209.
- [42] SCHROEDER A B, POINTER K B, CLARK P A, et al. Metabolic mapping of glioblastoma stem cells reveals NADH fluxes associated with glioblastoma phenotype and survival[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2020, 25(3): 036502.
- [43] National Cancer Institute. SEER cancer stat facts: lung and bronchus cancer [DB/OL]. (2021-04-15) [2021-06-1]. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/lungb.html>.
- [44] BASUKI J S, DUONG H T T, MACMILLAN A, et al. Using fluorescence lifetime imaging microscopy to monitor theranostic nanoparticle uptake and intracellular doxorubicin release[J]. *ACS Nano*, 2013, 7(11): 10175-10189.
- [45] WANG M, TANG F, PAN X, et al. Rapid diagnosis and intraoperative margin assessment of human lung cancer with fluorescence lifetime imaging microscopy[J]. *BBA Clinical*, 2017, 8(C): 7-13.

- [46] AWASTHI K, CHANG F, HSIEH P, et al. Characterization of endogenous fluorescence in nonsmall lung cancerous cells: a comparison with nonmalignant lung normal cells[J]. *Journal of Biophotonics*, 2020, 13(5): e201960210.
- [47] CHEN Minghui, LI Hao, CHEN Rong, et al. A study on the factors influencing auto-fluorescence lifetime of nasopharyngeal tissues in vitro[J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2014, 23(3): 207-210.  
陈明惠, 李昊, 陈荣, 等. 鼻咽组织荧光寿命影响因素研究[J]. *激光生物学报*, 2014, 23(3): 207-210.
- [48] WANG H, ZHANG S, TIAN X, et al. High sensitivity of gold nanoparticles co-doped with Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mesoporous silica nanocomposite to nasopharyngeal carcinoma cells[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 34367.
- [49] National Cancer Institute. SEER cancer stat facts: oral cavity and pharynx cancer [DB/OL]. (2021-04-15) [2021-06-1]. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/oralcav.html>.
- [50] SUN Y, PHIPPS J, ELSON D S, et al. Fluorescence lifetime imaging microscopy: in vivo application to diagnosis of oral carcinoma[J]. *Optics Letters*, 2009, 34(13): 2081-2083.
- [51] JO J A, APPLGATE B E, PARK J, et al. In vivo simultaneous morphological and biochemical optical imaging of oral epithelial cancer[J]. *IEEE Transactions on Bio-medical Engineering*, 2010, 57(10): 2596-2599.
- [52] CHENG S. Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) system for imaging of oral cancer and precancer[D]. Texas A & M University, 2014.
- [53] PANDE P, SHRESTHA S, PARK J, et al. Automated analysis of multimodal fluorescence lifetime imaging and optical coherence tomography data for the diagnosis of oral cancer in the hamster cheek pouch model[J]. *Biomedical Optics Express*, 2016, 7(5): 2000-2015.
- [54] WEYERS B W, MARSDEN M, SUN T, et al. Fluorescence lifetime imaging for intraoperative cancer delineation in transoral robotic surgery[J]. *Translational Biophotonics*, 2019, 1(1-2): 1-16.
- [55] DURAN-SIERRA E, CHENG S, CUENCA-MARTINEZ R, et al. Clinical label-free biochemical and metabolic fluorescence lifetime endoscopic imaging of precancerous and cancerous oral lesions[J]. *Oral Oncology*, 2020, 105: 104635.
- [56] MARSDEN M, WEYERS B W, BEC J, et al. Intraoperative margin assessment in oral and oropharyngeal cancer using label-free fluorescence lifetime imaging and machine learning[J]. *IEEE transactions on Bio-medical Engineering*, 2020, 68(3): 857-868.
- [57] National Cancer Institute. SEER cancer stat facts: stomach cancer [DB/OL]. (2021-04-15) [2021-06-1]. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/stomach.html>.
- [58] MCGINTY J, GALLETLY N P, DUNSBY C. Wide-field fluorescence lifetime imaging of cancer[J]. *Biomedical Optics Express*, 2010, 1(2): 14.
- [59] LI X, LI H, HE X, et al. Spectrum- and time-resolved endogenous multiphoton signals reveal quantitative differentiation of premalignant and malignant gastric mucosa[J]. *Biomed Optics Express*, 2018, 9(2): 453-471.
- [60] National Cancer Institute. SEER cancer stat facts: colorectal cancer [DB/OL]. (2021-04-15) [2021-06-1]. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html>.
- [61] PATE K T, STRINGARI C, SPROWL-TANIO S, et al. Wnt signaling directs a metabolic program of glycolysis and angiogenesis in colon cancer[J]. *The EMBO journal*, 2014, 33(13): 1-20.
- [62] SUD D, ZHONG W, BEER D G, et al. Time-resolved optical imaging provides a molecular snapshot of altered metabolic function in living human cancer cell models[J]. *Optics Express*, 2006, 14(10): 4412-4426.
- [63] WANG H, LIANG X, MOHAMMED Y H, et al. Real-time histology in liver disease using multiphoton microscopy with fluorescence lifetime imaging[J]. *Biomedical Optics Express*, 2015, 6(3): 780-792.
- [64] National Cancer Institute. SEER cancer stat facts: uterine cancer [DB/OL]. (2021-04-15) [2021-06-1]. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/corp.html>.
- [65] WANG Y L, SONG C, WANG M Y, et al. Rapid, label-free, and highly sensitive detection of cervical cancer with fluorescence lifetime imaging microscopy[J]. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 2016, 22(3): 228-234.
- [66] WANG X, WANG Y, ZHANG Z, et al. Discriminating different grades of cervical intraepithelial neoplasia based on label-free phasor fluorescence lifetime imaging microscopy[J]. *Biomedical Optics Express*, 2020, 11(4): 1977-1990.
- [67] NAKAJIMA T, SANO K, SATO K, et al. Fluorescence-lifetime molecular imaging can detect invisible peritoneal ovarian tumors in bloody ascites[J]. *Cancer Science*, 2014, 105(3): 308-314.
- [68] SUARASAN S, LICARETE E, ASTILEAN S, et al. Probing cellular uptake and tracking of differently shaped gelatin-coated gold nanoparticles inside of ovarian cancer cells by two-photon excited photoluminescence analyzed by fluorescence lifetime imaging (FLIM)[J]. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2018, 166: 135-143.
- [69] National Cancer Institute. SEER cancer stat facts: prostate cancer [DB/OL]. (2021-04-15) [2021-06-1]. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/prost.html>.
- [70] O'MELIA M J, WALLRABE H, SVINDRYCH Z, et al. FLIM data analysis of NADH and Tryptophan

- autofluorescence in prostate cancer cells[C]. SPIE, 2016, 9712: 97122E.
- [71] ALAM S R, WALLRABE H, SVINDRYCH Z. Investigation of mitochondrial metabolic response to doxorubicin in prostate cancer cells: an NADH, FAD and tryptophan FLIM assay[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 10451.
- [72] National Cancer Institute. SEER cancer stat facts: bladder cancer [DB/OL]. (2021-04-15) [2021-06-1]. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/urinb.html>.
- [73] PRADÈRE B, POULON F, COMPRAT E, et al. Two-photon optical imaging, spectral and fluorescence lifetime analysis to discriminate urothelial carcinoma grades[J]. Journal of Biophotonics, 2018, 11(11): e201800065.
- [74] SUAREZ-IBARROLA R, BRAUN L, POHLMANNA P F, et al. Metabolic imaging of urothelial carcinoma by simultaneous autofluorescence lifetime imaging (FLIM) of NAD(P)H and FAD[J]. Clinical Genitourinary Cancer, 2020, 19(1): e31-e36.
- [75] National Cancer Institute. SEER cancer stat facts: female breast cancer [DB/OL]. (2021-04-15) [2021-06-1]. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>.
- [76] DAMAYANTI N P, CRAIG A P, IRUDAYARAJ J. A hybrid FLIM-elastic net platform for label free profiling of breast cancer[J]. Analyst, 2013, 138(23): 7127-7134.
- [77] PHIPPS J E, GORPAS D, UNGER J, et al. Automated detection of breast cancer in resected specimens with fluorescence lifetime imaging[J]. Physics in Medicine and Biology, 2017, 63(1): 1-31.
- [78] ZHOU T, LUO T, SONG J, et al. Phasor-fluorescence lifetime imaging microscopy analysis to monitor intercellular drug release from a pH-sensitive polymeric nanocarrier[J]. Analytical Chemistry, 2018, 90(3): 2170-2177.
- [79] RIPOLL C, ROLDAN M, CONTRERAS-MONTOYA R, et al. Mitochondrial pH nanosensors for metabolic profiling of breast cancer cell lines[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(10): 3731.
- [80] National Cancer Institute. SEER cancer stat facts: melanoma of the skin [DB/OL]. (2021-04-15) [2021-06-1]. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html>.
- [81] SEIDENARI S, ARGINELLI F, DUNSBY C, et al. Multiphoton laser tomography and fluorescence lifetime imaging of melanoma: morphologic features and quantitative data for sensitive and specific non-invasive diagnostics[J]. PloS One, 2013, 8(7): e70682.
- [82] PIRES L, NOGUEIRA M S, PRATAVIEIRA S, et al. Time-resolved fluorescence lifetime for cutaneous melanoma detection[J]. Biomedical Optics Express, 2014, 5(9): 3080-3089.
- [83] PASTORE M N, STUDIER H, BONDER C S, et al. Non-invasive metabolic imaging of melanoma progression[J]. Experimental Dermatology, 2017, 26(7): 607-614.
- [84] MARTÍN-VILLAR E, MUOZ B F, PARSONS M, et al. Podoplanin associates with CD44 to promote directional cell migration[J]. Molecular Biology of the Cell, 2010, 21(24): 4387-4399.
- [85] MILLER C R, NICHOLS M G. Metabolic profiling of the skin to monitor the onset and progression of squamous cell carcinoma through time- and wavelength-resolved fluorescence lifetime imaging[J]. Biophysical Journal, 2015, 108(2): 478A.
- [86] MILLER J P, HABIMANA-GRIFFIN L M, EDWARDS T S, et al. Multimodal fluorescence molecular imaging for in vivo characterization of skin cancer using endogenous and exogenous fluorophores[J]. Journal of Biomedical Optics, 2017, 22(6): 66007.
- [87] PATALAY R, TALBOT C, ALEXANDROV Y, et al. Quantification of cellular autofluorescence of human skin using multiphoton tomography and fluorescence lifetime imaging in two spectral detection channels [J]. Biomedical Optics Express, 2011, 2(12): 3295-3308.
- [88] SEIDENARI S, ARGINELLI F, DUNSBY C, et al. Multiphoton laser tomography and fluorescence lifetime imaging of basal cell carcinoma: morphologic features for non-invasive diagnostics[J]. Experimental Dermatology, 2012, 21(11): 831-836.
- [89] LUO T, LU Y, LIU S, et al. Phasor-FLIM as a screening tool for the differential diagnosis of actinic keratosis, Bowen's disease, and basal cell carcinoma[J]. Analytical Chemistry, 2017, 89(15): 8104-8111.
- [90] CHEN B, LU Y, PAN W, et al. Support vector machine classification of nonmelanoma skin lesions based on fluorescence lifetime imaging microscopy[J]. Analytical Chemistry, 2019, 91(16): 10640-10647.
- [91] ROMANO R A, GABRIEL R, ROSA T, et al. Multispectral autofluorescence lifetime dermoscope for skin lesion assessment[J]. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2020, 30: 101704.