

网络出版时间: 2018-8-10 15:56 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20180808.1718.036.html>

原位实时多光子内窥镜的研发进展与展望

魏之瑶¹, 姚廷彦², 陈德鑫³ 综述 严俊³ 审校

摘要 现今临床急需一种能原位实时提供组织病理学信息的光学活检技术。多光子成像技术可实时提供活体组织的组织结构和细胞形态等诊断信息且无需外源染料,具有广阔的医学领域应用前景。如何将该项有望满足临床需求的技术小型化并以在体内窥镜的形式在临床中进行运用今已成为研究热点。现就传输光纤、扫描系统和聚焦物镜三个方面对多光子在体内窥镜的研发进展进行综述,并对多光子成像技术在临床各领域的运用现状和前景进行探讨与展望。

关键词 多光子成像; 光学活检; 内窥镜; 原位; 实时

中图分类号 R 319

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)10-1653-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.10.036

多光子效应是指一个荧光分子同时吸收多个频率相同的非线性光子,到达高能激发态后弛豫到基态,发射出波长较短的光子的现象^[1]。利用成像目标的自体荧光和二次谐波,多光子成像技术可原位实时获取细胞形态及组织结构等诊断信息。该技术穿透力强、分辨率高、光毒性小且无需对组织固定或染色^[2],是一种有巨大的临床应用价值的光学活检技术。而如何将多光子成像设备在保证稳定性和成像质量的前提下进行小型化以适应临床应用已成为研究热点。不论哪一种形式的多光子在体内窥镜均需要传输光纤、扫描器和聚焦物镜这三种结构。该文主要从这三个方面对多光子内窥镜的研发进展进行综述,并对不同类型在体设备的应用现状与展望进行阐述。

1 光纤

光纤柔软而纤细,常被用于各类通讯及图像传输系统。光纤可实现激发光的远距离传递和多光子信号的搜集,借此可将笨重的激光器与内窥镜本身

分开,使内窥镜的小型化和便携化成为可能。

光子晶体光纤(photonic crystal fiber, PCF)由纤芯和内含有序排列的气柱的包层组成,已被证实可传递 100 fs 的脉冲并给予多光子显微镜或内窥镜超出成像所需的激发功率^[3]。PCF 分为有效折射率型光子晶体光纤和带隙波导型光子晶体光纤(photonic bandgap fiber, PBF)。PBF 利用包层内气柱的周期性结构构建出光子带隙结构,而纤芯的存在破坏了结构的周期性,从而在光子晶体中引入一个窄频缺陷态。频率位于缺陷态的光子一旦离开缺陷位置就会导致光的迅速衰减,以此实现光的高效传递。不同于正色散的传统光纤,PCF 有反常色散的特性。故在传递特定波长的光时 PCF 可与正色散与之相对应的传统光纤相耦合以实现零色散传输。Wu et al^[4]运用此原理,在 PCF 末端安装了长为 300 μm、纤径和数值孔径(numerical aperture, NA)与 PCF 内包层相同的多模光纤,实现了激发光的零色散传递。

PCF 的结构远比普通光纤复杂,结构可为双包层、三包层甚至多包层。在众多多光子内窥镜设计中,双包层光子晶体光纤(double-clad photonic crystal fiber, DCPCF)最为常用。DCPCF 本质上包含了两种光纤,可在传递激发光的同时搜集多光子信号。大直径的纤芯适用于近红外激发光的单模传输,但较小的 NA 限制了纤芯的多光子信号搜集能力。当纤芯与内包层一起充当了芯径大、NA 大的多模荧光搜集光纤的纤芯时,高效的多光子信号收集得以实现。多光子信号在内包层区域的全反射传递使之可被放大两个数量级,大大增加了系统的信号探测效率。不过 DCPCF 需要配有预啁啾单元以补偿色散,一般使用的是光栅对、透镜或是二者的结合。

Rivera et al^[5]将三个轴向偏置的 DCPCF 平行放置,报道了第一个有轴向平行成像能力的空间多路复用多光子内窥镜。DCPCF 的长度为 1 m,芯-芯间距为 125 μm。双光子图像的横向和轴向分辨率分别为 0.8 μm 和 10 μm。可同时从轴向相隔 ≥ 4.8 μm 的三个不同深度的平面获得多光子图像,为多光子三维成像提供了新思路。

2018-05-11 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81773117); 广东省大学生科技创新培育专项资金(编号: pdjh2017a0093)

作者单位: 南方医科大学¹ 第一临床医学院、² 第二临床医学院、³ 南方医院普外科, 广州 510515

作者简介: 魏之瑶,女,本科生;

严俊,男,博士,副教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: yanjunfudan@163.com

2 扫描器

光纤可以将激发光从远处传输到设定好的焦点,然而二维乃至三维成像的实现需依靠扫描器。内窥镜的小型化要求扫描器在小尺寸的前提下尽可能实现高速扫描。

2.1 光纤扫描器 光纤扫描器一般位于光纤末端。其中一种设计是利用压电或电磁执行器直接驱动光纤末端进行机械共振,但离轴像差会限制图像分辨率。Helmchen et al^[6]设计的扫描器利用压电马达偏转光纤末端,以实现李萨如(Lissajous)模式的二维扫描。该马达被两种共振频率的电压信号所控制,且需要引入斜撑以实现李萨如扫描所需必须的空间各向异性。一些团队引入与光纤和透镜相连接的共振悬臂以进行改良,但引入新元件会增加探头体积且需要装配功率更大的马达。悬臂光纤扫描器最常用的驱动是管状压电执行器,扫描模式多为螺旋或光栅。Myaing et al^[7]设计了一个可实时成像的双光子激光扫描光纤内窥镜。扫描器包括共振悬臂和管状压电执行器。压电管的被分成了四个象限,形成了两对驱动电极($\pm x$ 和 $\pm y$)。通过转换三角或正弦波形可调制驱动电压,以此实现螺旋扫描模式。不同于李萨如模式的光纤扫描器,螺旋扫描器不需要为了打破空间对称性而在光纤上添加额外元件。该探头扫描直径约为 120 ~ 220 μm 。更佳的空间扫描模式和均匀的像素驻留时间使光栅扫描优于旋转扫描模式和李萨如扫描模式。Rivera et al^[8]在多光子成像设计中使用了小型化的谐振/非谐振悬臂光纤光栅扫描器,二维成像的视野为 110 $\mu\text{m} \times 110 \mu\text{m}$,速度为 4.1 fps(512 $\times$ 512 像素)。这个扫描器的尺寸非常小(宽度/厚度 $\leq 1 \text{ mm}$,总长度 $\approx 2.6 \text{ cm}$),可实现 $\geq 650 \mu\text{m}$ 的光纤末端挠度。

2.2 微机电系统扫描器 微机电系统(microelectromechanical systems, MEMS)扫描器尺寸小,速度快,功耗低且微光束处理能力强,是小型多光子内窥镜的首选扫描器之一。但其生产工艺复杂,造价高昂,难以量产。虽然 MEMS 扫描器的自身尺寸很小,但需要的执行器尺寸较大。压电马达或电磁马达只能提供前向旋转扫描模式或李萨如扫描模式。而对于胃肠道等临床应用目标,侧向圆周扫描模式显然更为实用。Liu et al^[9]设计了一个旋转的多光子显微镜探头,所采用的 MEMS 扫描镜可以提供侧向的双轴扫描。DCPCF 传输来的激发光通过梯度折射率(gradient index, GRIN)透镜后被直角微棱镜

反射。MEMS 马达直径为 2.2 mm,支持 360°全景旋转扫描。该旋转马达的马达控制器被外装,以实现探头的小型化。在带着微棱镜的情况下,马达的旋转速度可以达到 300 r/min,足以实现腔道内成像。

3 物镜

除了光纤和扫描器,多光子内窥镜还需要利用物镜来将激发光聚焦在目标平面上。传统显微镜物镜可提供高分辨率成像,但过大的体积使之不适用于力求小型化的多光子在体内窥镜。内窥镜需要的是可保证一定成像能力的微型物镜。GRIN 透镜易加工且耦合效率高,亚毫米级别的尺寸和低廉的造价使之成为多光子内窥镜最常用的物镜之一。

3.1 GRIN 透镜 GRIN 透镜的介质是非均质的,可通过调整玻璃掺杂剂的浓度实现特定的折射率分布^[10]:

$$[n(r)]^2 = [n(0)]^2 [1 - (ar)^2]$$

$n(0)$ 是中心处的折射率, a 为折射率梯度分布常量, r 是到中心轴的距离。不同于利用曲面来折射光线的传统透镜,GRIN 透镜的光束传播路径是曲线的。与其他微透镜相比,GRIN 透镜可以提供更好的成像质量,且纠正像差后成像质量仍有较大的提升空间^[4],但在体应用时运动伪影仍是需待解决的问题。

Barretto et al^[11]利用了高 NA(数值孔径,前文已加上中英文名称)平-凸物镜报道了一种 GRIN 透镜的像差纠正成像设计,可使信号收集能力提至普通 GRIN 透镜的两倍。该平-凸物镜由小型商用球形透镜切割而成,平-凸物镜在光轴上引入的球面像差可被折射率分布与之相匹配的 GRIN 透镜消除。这种物镜系统的分辨率(横向 $1.0 \pm 0.2 \mu\text{m}$,轴向 $4.4 \pm 0.2 \mu\text{m}$)可以与商用水浸物镜相媲美。与上述设计相比, Murray et al^[12]设计的方案体积更小且易于组装。该方案由 GRIN 透镜、盖玻片和物镜矫正环组成。盖玻片可补偿 GRIN 透镜的像差,物镜的矫正环则用于再平衡盖玻片可能造成的过补偿。该系统的横向分辨率($1 \mu\text{m}$)和轴向分辨率($15 \mu\text{m}$)分别是普通复合 GRIN 透镜的 2 倍和 3 倍,视场($150 \mu\text{m}$)的提高超过了 3 倍。

3.2 复合透镜 复合透镜的系统设计则包括了用于平行化光线的准直镜和用于聚焦的物镜。将光束平行化可防止入射光被分散,也予以透镜间距一定的可调性,可根据扫描系统和标本位置进行优化。

Zhao et al^[13]设计的物镜系统由3个直径均为2 mm的消色差透镜组成。准直透镜焦距为6 mm,物镜由一对水平面相贴、焦距均为3 mm的GRIN透镜构成。光纤尖端和准直透镜之间的距离固定为6 mm,准直透镜与GRIN透镜对之间的距离可调。与单独使用GRIN透镜相比,该方案可以使荧光信号级提高6~20倍。在另一个原理相同的透镜设计中^[14],GRIN透镜被用作准直透镜,物镜则是一个非曲面透镜。探头的外直径为1 cm,长度为14 cm,分辨率为2 μm ,视场可达200 μm 。

Liu et al^[15]设计的探头除了准直透镜和聚焦透镜,还添加了用于扩束的中继透镜。该准直透镜的焦距为18 mm,准直后的平行光束直径约为1.8 mm。中继透镜包括一个焦距为30 mm的扫描透镜和焦距为50 mm的管状透镜。这两个透镜排列形成的扩束器放大倍数为1.67。封装后的整个透镜系统直径为16 mm。

4 现状与展望

目前已有多个团队在进行多光子临床应用的研究。有些已进行了动物在体实验,有些已利用患者离体标本构建了诊断模型。多光子的临床应用形式主要集中在硬式针状微内窥镜、软式内窥镜、硬式探头和腹腔镜式内窥镜上。其中,硬式针状微内窥镜已在皮肤学癌症诊断领域中实现了商业化,并在临床被例行应用^[16]。硬式针状微内窥镜以微创方式对近体表组织进行成像,只留下针孔大小的伤口。Dimitrow et al^[17]对83个黑色素瘤患者的皮肤病变组织分别进行了在体和离体的双光子成像,并根据黑色素瘤的组织学特点建立了用于区分良性痣和黑色素瘤的诊断模型。该模型在体诊断的敏感性为75%,特异性为80%。

软式内窥镜是多光子成像技术与传统消化道内窥镜的结合,可对消化道黏膜面进行成像。可疑病变可直接在内镜下得到原位实时的组织学确诊,有望用于原位癌的诊断和肿瘤分期。目前尚无多光子软式内窥镜实现动物或患者在体应用的报道,但已有团队利用多光子显微镜对患者的结直肠黏液腺癌离体新鲜标本的黏膜面进行了成像^[18],证明了多光子内窥镜代替传统病理活检用于诊断消化道疾病的可行性。

硬式探头形式的多光子内窥镜可用于器官组织表面的原位实时成像且已在动物实验中得到了验证。Huland et al^[19]利用长度为8 cm的复合GRIN

透镜系统和可快速移动的机械臂制造了一个可对深处组织进行多光子在体成像的便携硬式内镜系统,并用其对活鼠的肝、肾和结肠内面(黏膜面)进行了成像。硬式探头还可在术中对手术切缘进行成像。Yan et al^[20]对新鲜的低位直肠癌手术切缘进行了全层多光子成像,并与HE染色的病理结果进行了分析对比,展现了多光子成像用于术中原位实时判断手术切缘残留与否的前景。

腹腔镜式内窥镜是多光子显微镜和传统腹腔镜的结合,可用于胃肠道浆膜面和腹膜等腹腔内组织器官的成像,可实时判断肿瘤有无侵犯浆膜面及腹膜,对肿瘤精确的术前分期、预后判断和术式选择有着重要意义。已有团队利用患者突破及未突破浆膜层的胃癌离体新鲜标本的浆膜面进行了多光子成像且构建出了诊断模型^[21]。他们利用多光子成像对肿瘤进行了T分期,识别T4期胃癌的敏感性、特异性和准确性分别可达90%、96.67%和93.33%,远远高于基于超声内镜的术前T分期。也有团队利用腹腔镜式多光子内窥镜对小鼠的癌变卵巢和纤维化肾脏进行了在体成像^[22-23]。

除上文提及的成果外,目前亦有团队对患者的膀胱癌、前列腺癌的离体新鲜标本进行了多光子成像^[24-24]。实验动物的口腔、乳腺也实现了在体成像^[26-27],但直接对患者进行的在体成像极少。目前为止,绝大多数的临床前研究集中在双光子上。Horton et al^[28]对小鼠大脑进行了三光子在体原位成像,成像深度可达1 mm,展现了三光子成像的诱人前景。上述团队的研究均已证明了多光子内窥镜是一种高效安全的原位实时光学活检技术,有望在不远的将来全面走上临床,在早癌诊断、术中切缘检验和肿瘤分期等方面发挥巨大作用。现该领域亟待临床及临床前研究的继续推进以最终实现全方面的应用。各类成熟的微型化内窥镜进一步的调试研发势必会加速这一进程。

5 总结

多光子成像技术是最具潜能的光学活检技术之一。上述元件的设计与应用使多光子内窥镜系统体积更小、成像质量更高且稳定性更好,为多光子成像的临床应用予以了重要保证。随着微型元器件设计和制造工艺的不断发展,未来更为成熟的小型多光子内窥镜必定会出现。动物实验及利用患者离体标本构建诊断模型的进程也在不断被推进。综上,多光子内窥镜有望在不远的将来全面走上临床,在早

癌诊断、术中切缘检验和肿瘤分期等方面发挥巨大作用。

参考文献

- [1] Perry S W, Burke R M, Brown E B. Two-photon and second harmonic microscopy in clinical and translational cancer research[J]. *Ann Biomed Eng* 2012 40(2): 277–91.
- [2] Flusberg B A, Cocker E D, Piyawattanametha W, et al. Fiber-optic fluorescence imaging[J]. *Nat Methods*, 2005 2(12): 941–50.
- [3] Fu L, Jain A, Xie H, et al. Nonlinear optical endoscopy based on a double-clad photonic crystal fiber and a MEMS mirror[J]. *Opt Express*, 2006 14(3): 1027–32.
- [4] Wu Y, Xi J, Cobb M J, et al. Scanning fiber-optic nonlinear endomicroscopy with miniature aspherical compound lens and multi-mode fiber collector[J]. *Opt Lett*, 2009 34(7): 953–5.
- [5] Rivera D R, Brown C M, Ouzounov D G, et al. Multifocal multiphoton endoscopy[J]. *Opt Lett*, 2012 37(8): 1349–51.
- [6] Helmchen F, Fee M S, Tank D W, et al. A miniature head-mounted two-photon microscope. high-resolution brain imaging in freely moving animals[J]. *Neuron*, 2001 31(6): 903–12.
- [7] Myaing M T, MacDonald D J, Li X. Fiber-optic scanning two-photon fluorescence endoscope[J]. *Opt Lett*, 2006 31(8): 1076–8.
- [8] Rivera D R, Brown C M, Ouzounov D G, et al. Compact and flexible raster scanning multiphoton endoscope capable of imaging unstained tissue[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011 108(43): 17598–603.
- [9] Liu G, Xie T, Tomov I V, et al. Rotational multiphoton endoscopy with a 1 microm fiber laser system[J]. *Opt Lett*, 2009 34(15): 2249–51.
- [10] 郭俊, 马永利, 张璐, 等. 基于梯度折射率透镜的管道内窥镜设计[J]. *光子学报* 2010 39(10): 1780–5.
- [11] Barretto R P, Messerschmidt B, Schnitzer M J. *In vivo* fluorescence imaging with high-resolution microlenses[J]. *Nat Methods*, 2009 6(7): 511–2.
- [12] Murray T A, Levene M J. Singlet gradient index lens for deep *in vivo* multiphoton microscopy[J]. *J Biomed Opt*, 2012 17(2): 021106.
- [13] Zhao Y, Nakamura H, Gordon R J. Development of a versatile two-photon endoscope for biological imaging[J]. *Biomed Opt Express* 2010 1(4): 1159–72.
- [14] Tang S, Jung W, McCormick D, et al. Design and implementation of fiber-based multiphoton endoscopy with microelectromechanical systems scanning[J]. *J Biomed Opt*, 2009 14(3): 034005.
- [15] Liu G, Kieu K, Wise F W, et al. Multiphoton microscopy system with a compact fiber-based femtosecond-pulse laser and handheld probe[J]. *J Biophotonics*, 2011 4(1–2): 34–9.
- [16] Paoli J, Smedh M, Ericson M B. Multiphoton laser scanning microscopy—a novel diagnostic method for superficial skin cancers[J]. *Semin Cutan Med Surg*, 2009 28(3): 190–5.
- [17] Dimitrow E, Ziemer M, Koehler M J, et al. Sensitivity and specificity of multiphoton laser tomography for *in vivo* and *ex vivo* diagnosis of malignant melanoma[J]. *J Invest Dermatol*, 2009 129(7): 1752–8.
- [18] Liu N, Chen J, Xu R, et al. Label-free imaging characteristics of colonic mucinous adenocarcinoma using multiphoton microscopy[J]. *Scanning*, 2013 35(4): 277–82.
- [19] Huland D M, Brown C M, Howard S S, et al. *In vivo* imaging of unstained tissues using long gradient index lens multiphoton endoscopic systems[J]. *Biomed Opt Express*, 2012 3(5): 1077–85.
- [20] Yan J, Zhuo S, Chen G, et al. Real-time optical diagnosis for surgical margin in low rectal cancer using multiphoton microscopy[J]. *Surg Endosc*, 2014 28(1): 36–41.
- [21] Yan J, Zheng Y, Zheng X, et al. Real-time optical diagnosis of gastric cancer with serosal invasion using multiphoton imaging[J]. *Sci Rep*, 2016 6: 31004.
- [22] Williams R M, Flesken-Nikitin A, Ellenson L H, et al. Strategies for high-resolution imaging of epithelial ovarian cancer by laparoscopic nonlinear microscopy[J]. *Transl Oncol*, 2010 3(3): 181–94.
- [23] Ducourthial G, Leclerc P, Mansuryan T, et al. Development of a real-time flexible multiphoton microendoscope for label-free imaging in a live animal[J]. *Sci Rep*, 2015 5: 18303.
- [24] Jain M, Robinson B D, Scherr D S, et al. Multiphoton microscopy in the evaluation of human bladder biopsies[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2012 136(5): 517–26.
- [25] 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 Int*, 2011 108(9): 1421–9.
- [26] Walsh A J, Cook R S, Manning H C, et al. Optical metabolic imaging identifies glycolytic levels, subtypes, and early-treatment response in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2013 73(20): 6164–74.
- [27] Skala M C, Riching K M, Gendron-Fitzpatrick A, et al. *In vivo* multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007 104(49): 19494–9.
- [28] Horton N G, Wang K, Kobat D, et al. *In vivo* three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain[J]. *Nat Photonics*, 2013 7(3): 205–9.