

用于皮肤影像诊断的光学成像方法

席 鹏¹ 刘宇嘉² 姚志荣^{3*} 任秋实^{1,2}

¹ 北京大学工学院生物医学工程系, 北京 100871
² 上海交通大学生命科学与技术学院生物医学工程系, 上海 200240
³ 上海交通大学新华医院皮肤科, 上海 200092

摘要 皮肤影像学是利用现代成像技术手段对皮肤病进行无创、原位、动态、实时诊断的一门新兴技术学科。在过去十几年里作为医学影像学分支的皮肤影像学取得了长足的进步, 包括皮肤镜等多种光学成像技术已经被广泛应用于临床疾病诊断。主要介绍了皮肤镜、皮肤共聚焦、多光子成像、光学相干层析成像以及光声成像等技术在皮肤影像学中的发展和应用。这 5 种技术能够实现原位、在体、实时的皮肤成像, 可对可疑部位进行重复检查, 并能不同程度地实现皮下组织的无损成像, 为临床诊断提供了客观的评价依据。不断发展的皮肤影像学, 与皮肤组织病理学相互促进、相互补充, 势必将带动现代皮肤病学的飞跃发展。

关键词 医用光学; 皮肤影像学; 皮肤镜; 皮肤共聚焦成像; 多光子成像; 光学相干层析成像; 光声成像

中图分类号 O439; R751 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/CJL201138.0201001

Optical Imaging Techniques in Skin Imaging Diagnosis

Xi Peng¹ Liu Yujia² Yao Zhirong³ Ren Qiushi^{1,2}

¹ Department of Biomedical Engineering, College of Engineering, Peking University, Beijing 100871, China
² School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China
³ Department of Dermatology, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200092, China

Abstract Based on the support of new developments in optical imaging noninvasive, in situ, dynamic, real-time clinical skin diagnosis is realized. A new branch of the medical imaging and skin imaging has been developed as a new technical discipline for the past decade. This review focuses on the current optical imaging techniques that have been used in clinical diagnosis including dermoscopy, confocal imaging, multiphoton imaging, optical coherence tomography and photoacoustic imaging. These five optical clinical diagnosis methods can supply a doctor with detailed and precise information of the targeted suspicious skin area which provide objective evaluation. These new developments in skin imaging, compensate to the advances of skin histopathology research, will promote the fast development of modern dermatology.

Key words medical optics; skin imaging; dermoscopy; confocal imaging; multiphoton imaging; optical coherence tomography; photoacoustic imaging

OCIS codes 170.1870; 120.3890; 170.1790; 170.4500; 170.5120

1 引 言

皮肤组织病理学是皮肤科学不可缺少的组成部分, 它不仅是许多皮肤病的诊断标准, 也是深入探讨皮肤病的发生发展规律、指导皮肤病治疗的基础。

皮肤组织病理学经过 200 余年的发展, 已经普及并延伸出免疫病理等多个分支。然而, 组织病理学活检取材一般为创伤性的, 患者疼痛、易感染、留疤痕, 病理切片的制作费时费力, 且仅能提供活检部位的

收稿日期: 2010-07-20; 收到修改稿日期: 2010-09-30

基金项目: 国家自然科学基金(60808029)、上海市浦江人才计划(08PJ14062)和上海交通大学医工结合项目(YG2009ZD201)资助课题。

作者简介: 席 鹏(1978—), 男, 博士, 研究员, 主要从事生物医学光学成像技术方面的研究。

E-mail: xipeng@coe.pku.edu.cn(中国光学学会会员号: S040111674)

*通信联系人。E-mail: zryaosmu@sohu.com

信息,监测疾病变化、评价疗效、确定皮损的边界等常需要反复活检,这一切都降低了患者的依从性。

皮肤科临床的发展需要无创性、原位、实时、动态的检测方法,对可疑皮损进行重复检查,提供客观量化的评价指标。临床的需求促进了皮肤影像学的产生和发展。皮肤影像学是利用现代超声、光学、磁共振等手段对皮肤病进行无创、原位、动态、实时诊断的一门新型技术学科。过去十几年作为医学影像学分支的皮肤影像学取得了长足的进步,包括皮肤镜、皮肤共聚焦技术、多光子成像、光学相干层析成像和光声成像等多种光学成像技术用于临床疾病诊断已成为可能。本文将对皮肤影像学的几种主要成像技术,结合原理及具体临床应用做简要的介绍。

2 皮肤镜

2.1 皮肤镜发展简介

皮肤镜,又称为表皮透光显微镜、皮表显微镜、入射光显微镜等,是一种在体观察皮肤表面以下微细结构的、主要针对色素性皮肤病的无创性辅助诊断仪器。它通过使用油浸、光照与光学放大设备,可以观察到包括表皮下部、表真皮连接以及乳头层真皮等肉眼不可见的皮肤结构,从而确定需要做活组织检查的皮损部位,保证切除的准确性,其对于恶性黑色素瘤早期诊断的重要辅助价值已为大量研究所证实^[1~6]。作为临床上诸多疾病的筛选和诊断工具,皮肤镜具有无损伤、诊断迅速、价格低廉等优点,有着良好的发展前景。

利用显微镜来观察皮肤表面可以追溯到 1663 年, Johan Kolhaus 在显微镜下观察到指甲甲襞下的微小血管^[1]。19 世纪末,德国皮肤病学家 Unna 把油浸法应用于皮肤的显微检查,以减少皮肤表面的直接反射光,使观察更加清楚^[7]。20 世纪初, Saphier^[8] 将双筒显微镜和内置光源相结合,对皮肤解剖结构进行了形态学观察。20 世纪 50 年代,美国的 Goldman^[2] 首次提出 dermoscopy 一词,并将其应用于色素皮损的诊断。1971 年,英国的 Rona Mackie 研究表明,皮肤镜在提高色素皮损的术前诊断以及鉴别良性色素痣和恶性黑色素瘤上有很大意义^[3]。其后,关于皮肤镜的研究在奥地利、德国、美国以及世界各地得到延续。第一届皮肤镜的共识会议于 1989 年在德国汉堡召开,2001 年,第一届世界皮肤镜大会在罗马举行。现在,皮肤镜在欧洲已成为一项常规技术,并在世界其他地区获得越来越多的认可。

2.2 皮肤镜原理

由于皮肤的光密度和折射率与空气不同,照射到皮肤表面的光线很大部分被角质层直接反射,另有部分为皮肤吸收,仅有少量通过散射进入皮肤,因此很难用肉眼直接看到皮肤表面下的结构。传统皮肤镜采用的是浸润法:首先在皮肤表面滴加油脂等浸润液以增加皮肤角质层的透光性和减少反射光,然后用玻片压平并给予适当角度的光线照射,借助于特定的光学放大设备,可以观察到表真皮连接处、真皮的结构。使用的浸润液可以是水、矿物油、乙醇和凝胶等。最新的研究表明,体积分数为 70% 的乙醇具有较少的气泡,可产生清晰图像,并且具有不油腻、不染色、自然挥发无需擦拭、可有效减少细菌污染的特点。水溶性的凝胶(例如超声用耦合剂)不会流动或者产生灼烧,因而在眼睛或者粘膜区域(例如嘴唇)应用较多。

简单的手持式皮肤镜(图 1)^[9] 由卤素灯或发光二极管(LED)光源、标准放大物镜(通常为 10 倍)以及玻片组成,价格低廉且便于使用。有些可通过特定的转接环与数码相机连接,便于将成像结果及时拍照存档,为以后的诊断和治疗服务。昂贵的双目皮肤镜包括 6~40 倍的放大范围,可以提供高质量的成像,并对皮肤进行三维观察。电子皮肤镜中整合有视频摄像头,通过数据线将视频数据传输到电脑中,在显示器上观察的同时,可对图像进行处理,利于疾病的准确诊断,也可将数据存入数据库,便于归档调用。

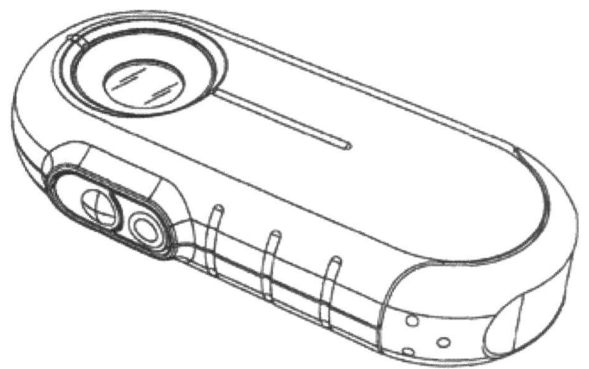


图 1 手持式皮肤镜

Fig. 1 Hand-held dermoscopy

传统的浸润型皮肤镜由于需要采用耦合剂即浸润液,可能会引发接触性皮炎和医源性交叉感染。近年来,一种新出现的偏振光皮肤镜克服了浸润型皮肤镜的缺点。偏振光皮肤镜是 21 世纪开始发展起来的皮肤镜技术,主要利用交叉偏振的原理,不需

涂抹浸润液,就可消除皮肤表面反射光的影响。入射光通过一个线偏振片照射到皮肤表面,直接反射的光保持原来的偏振方向,而被皮下组织散射的光改变了偏振方向。使用与第一个偏振片偏振方向垂直的线偏振片即可把直接反射光滤去(图 2),从而可以观察到皮肤下的组织结构,这样就提高了皮损的可视性。观察时镜片不直接接触皮肤和无需耦合剂,减少了人为对皮肤的挤压,即可观察到清晰的原始图像,特别适合头面部,尤其在口、眼和鼻等粘膜处以及敏感性皮肤的图像观察,可避免由浸润法观察时镜片直接接触皮肤的挤压变形和所需的浸润液作耦合剂而引起交叉感染等潜在危险。

2.3 皮肤镜的临床应用

较之传统的毛细血管镜,皮肤镜可以直接观察皮损部位的深在微细结构,为皮肤形态学开辟了一个新的研究领域。在减少不必要的活检、方便疾病

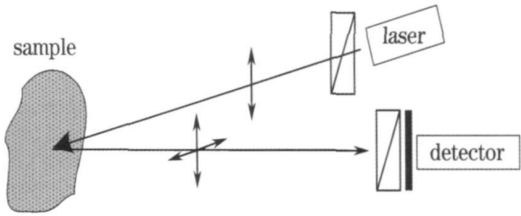


图 2 偏振型皮肤镜原理示意图

随访与大规模普查、图像资料的保存与提取方面有着明显的优点。

皮肤镜在临床上可以用于多种皮肤病的在体检查,其中基本的皮肤镜图像包括色素网、小点、小球、分支条纹、伪足、放射流、条纹、无结构区、大斑点、退化结构、蓝白幕和血管结构等(图 3)^[10]。医生可以借助皮肤镜观察到不同皮肤病的不同表现从而为临床诊治提供可靠的依据。

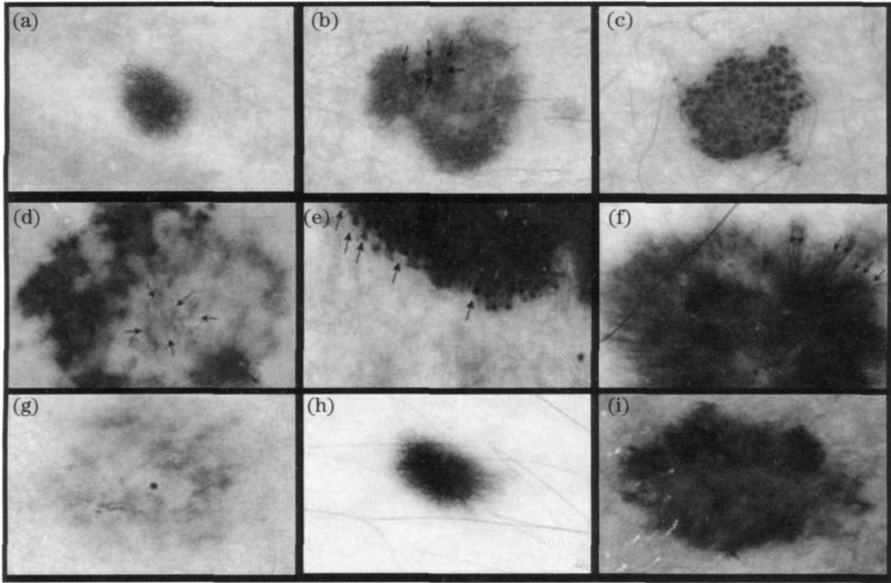


图 3 部分皮肤镜的基本图像。(a)色素网,(b)小点,(c)小球,(d)分支条纹,(e)伪足,(f)放射流,(g)无结构区,(h)大斑点,(i)蓝白幕

Fig. 3 Some basic dermoscopy images. (a) pigment network, (b) dots, (c) globules, (d) branched streaks, (e) pseudopods, (f) radio streaming (g) structureless areas (h) blotches (i) blue-white veil

皮肤镜已经成功地应用于恶性黑素瘤的临床诊断^[5]。对于以恶性黑素瘤为核心的色素病的皮肤镜鉴别诊断,目前多推荐用两步法。第一步先区分黑素性皮损与非黑素性色素性皮损:诊断为黑素性皮损,至少应具备色素网、色素纹、群集性小球、均质蓝色色沉等指征之一;如没有,则诊断为非黑素性色素病,并进一步寻找非黑素性皮损的特点。第二步为区分良性与恶性的黑素性损害:有多种方法,最经典的是 1987 年由 Pehamberger 等^[11]建立的模式分析

法。此法要求对多个皮肤镜指征逐一进行详细评估、比对,然后得出最终诊断。此法虽然具有较高的敏感性、特异性和诊断准确率^[12],但要求诊断者接受过相关的正规培训,否则会影响诊断准确率。

为提高可操作性和可重复性,许多研究小组根据各自经验创立了不同的诊断方法及标准^[13]。常用的有 Stolz 等^[14]的皮肤镜 ABCD 法则, Menzies 等^[15]的诊断侵袭性恶性黑素瘤的 11 点特征法, Aegenziano 等^[16]的 7 点核对表, Dal Pozzo 等^[17]的 7 点特征法等。

近年来的研究分析也证实,对于有经验的检测者,皮肤镜可显著地提高恶性黑素瘤的诊断准确率^[6,18]。此外,应用皮肤镜技术还可明显提高 Spitz 痣、基底细胞癌、血管瘤的诊断准确率,并可以用于脂溢性角化病、银屑病、日光性黑子、色素性光线性角化和皮肤纤维癌等多种皮肤疾病^[4,6,19,20]。

3 皮肤计算机断层扫描技术

皮肤科临床的发展需要无创性、原位、实时、动态的检测方法,对可疑皮损进行重复检查,提供客观量化的评价指标。然而,皮肤镜只能对皮损表面进行检查,对于深层皮肤结构无能为力;皮肤超声虽然能对深层皮肤结构进行检测,但其图像分辨率较低,不能达到细胞水平,无法根据其声像图来判断皮肤肿瘤的良恶性和确定皮损的浸润范围,其检查结果也易受患者体位、探头压力等多种因素影响。基于共聚焦原理的皮肤原位、在体、实时、动态三维成像技术[皮肤计算机断层扫描技术(CT)]克服了以上几种方法的局限性,是具有广阔发展前景的无创性皮肤影像学方法^[21,22]。

3.1 皮肤 CT 的发展史

1957 年,Marvin^[23]在他的专利中阐明了共聚焦激光扫描显微镜(CLSM)技术的基本原理;1985 年,Wijnaendts 等^[24]成功地用共聚焦激光显微镜演示了用荧光探针标记的生物材料的光学横断面,标志着共聚焦激光显微镜的关键技术已基本成熟。而第一台商业化的共焦扫描显微镜则是到 1987 年才问世。之后的十几年间 CLSM 发展非常迅速。CLSM 是一种先进的细胞生物学分析仪器,是一项具有划时代意义的高科技新产品,是近代生物医学图像分析仪器最重要的发展之一,有细胞“CT”之称。它是随着激光、视频、计算机等技术的飞速发展而诞生的新一代显微镜,在研究和分析活细胞结构、分子、离子的实时动态变化过程,组织和细胞的光学连续切片和三维结构重建等方面,是传统光学显微镜所望尘莫及的。

20 世纪 90 年代中期,学者们将 CLSM 进行改造,使其能够实现对活体皮肤的无创、实时成像,由此奠定了皮肤 CT 在皮肤科推广应用的基础^[25,26]。

3.2 皮肤 CT 光学共聚焦成像的基本工作原理

传统光学显微镜的基本结构主要由机械部分、照明部分和光学部分(反光镜、聚光镜、光圈、目镜和物镜等)组成。皮肤 CT 的基本结构除了光学显微镜部分之外,主要由激光光源、扫描装置、检测器、计

算机系统(包括数据采集、处理、转换及应用软件)、图像输出设备和共聚焦系统(图 4)等部分组成。由此可见,皮肤 CT 具有传统光学显微镜所不具备的复杂计算机系统、激光系统、扫描装置和共聚焦系统;另外一个最主要的区别在于光源的不同。

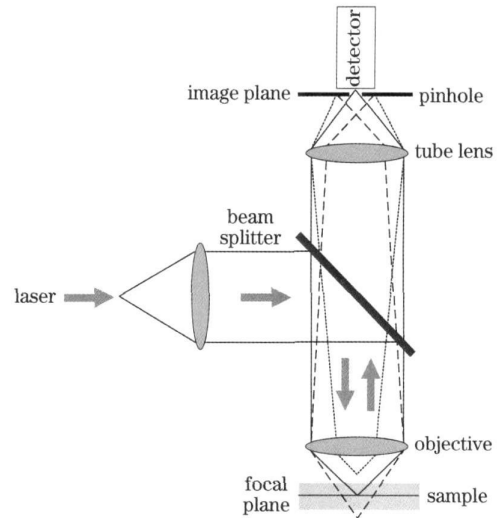


图 4 共聚焦系统的原理示意图

Fig. 4 Schematic diagram of the confocal system

光学显微镜的光源一般是自然光或者是内置光源,可见光经反光镜、聚光镜的作用,对全视野进行照明,它只能对标本局部厚度作平面成像。这样不仅要求标本为薄切片($5 \sim 10 \mu\text{m}$),而且标本上任何一点的图像都会受到邻近点衍射光和散色光的影响,降低了图像的反差和分辨率。而皮肤 CT 采用点光源代替传统光镜的场光源,光源、探测器及被测样品置于共轭位置。聚焦层面的光点通过一系列透镜最终可同时聚焦于光源针孔和检测针孔,也就是所谓的“共聚焦”。从光源出射的光经物镜准确地照明物镜焦平面的被测样品,由样品反射的光信息被聚焦到针孔处,形成点像,从而通过针孔被探测器接收。而非焦平面反射的光信息,则在探测面上仅仅形成弥散斑,此时通过针孔被探测器接收到的光信息很少。也就是说,探测到的离焦信号强度远低于焦点信号强度,对离焦信号的摒弃使共焦成像术可在三维空间上精确定位被测样品。以激光作光源并对样品进行扫描,在此过程中两次聚焦,因此称为共聚焦激光扫描显微镜。其产生的光信号由检测针孔后的光电倍增管逐点接收后,转变为电信号传输至计算机,在屏幕上呈现为清晰的整幅焦平面图像。点光源可通过对样品进行左右、上下扫描来获得厚标本(可达 $500 \mu\text{m}$)不同层面的图像,亦即可对细胞或组织厚片进行类似 CT 断层扫描的无损伤性连

续光学切片,连续光学切片经计算机三维重建处理,能够从任意角度观察标本的三维剖面或整体结构^[27,28]。因此该技术被称为皮肤 CT。皮肤 CT 图像基于细胞器和组织机构自身的折射率不同^[29]而得以实现高分辨率;皮肤组织中黑色素和角蛋白具有较高的折射率,是自然对照物。高折射率结构对比明亮,低折射率结构则显灰暗。

3.3 皮肤 CT 的临床应用

皮肤 CT 能够在细胞水平上实时、动态观察皮肤组织的形态结构,皮肤 CT 在皮肤科主要应用于:

- 1) 检测/监测药物经皮输送过程;
- 2) 检测细胞器超微结构和皮肤组织细胞因子变化;
- 3) 检测/监测伤口愈合的过程;
- 4) 皮肤科疾病的诊断、鉴别诊断、疗效评价和随访。皮肤 CT 在毛囊炎、银屑病和血管性皮肤病

等皮肤病的诊断中极具应用价值。皮肤 CT 应用于皮肤肿瘤或癌前性皮损的诊断、预后评价和确定肿瘤皮损与周围正常皮肤边界^[17]。

自 1995 年首次报道皮肤 CT 在体观察皮肤以来,目前皮肤 CT 已经用于多种皮肤疾病的临床评估,并显示良好的临床应用前景。肿瘤的诊断和癌前病灶的评价仍是大家最感兴趣的研究领域。Gerger 等^[30]从 20 例黑素瘤和 50 例色素痣的 3709 幅混合成像中筛选出两种疾病的皮肤 CT 形态学特征(图 5),随后用三步法模式来诊断色素痣和黑素瘤,结果发现两者诊断正确率分别为 92.4% 和 97.6%,显著优于目前广泛应用于临床的皮肤镜。Gerger 等^[31]先前也进行过类似的临床实验,评估报告显示,皮肤 CT 对黑素瘤、色素痣、基底细胞癌以及脂溢性角化的诊断准确率分别为 96.30%,98.89%,100% 和 100%,显示很好的临床可靠性。

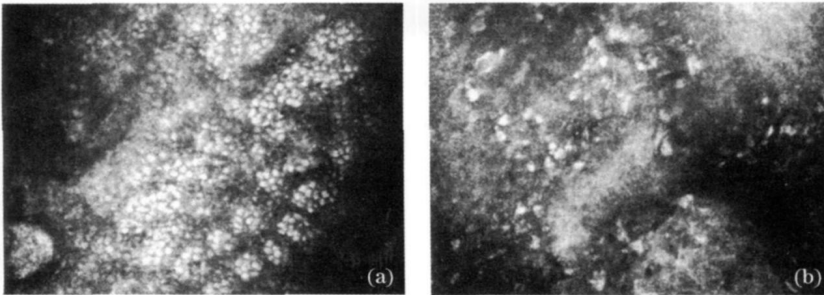


图 5 (a) 色素痣细胞形态单一、明亮、椭圆形, (b) 黑素瘤细胞多边形, 边界不规则

Fig.5 (a) Melanocytic cytomorphology: bright, round to oval and monomorphic tumour cells in benign naevi, (b) polymorphic and irregularly shaped tumour cells in malignant melanoma

目前美国 Lucid 公司生产的 Vivascope 1500 系统(图 6),其采用的光源为 830 nm 近红外光,横向分辨率为 $1 \sim 2 \mu\text{m}$,纵向分辨率为 $3 \sim 4 \mu\text{m}$,穿透深度可达 $200 \sim 500 \mu\text{m}$,能在细胞水平在体观察表皮和真皮浅层,满足大多数皮肤疾病的影像学诊断。

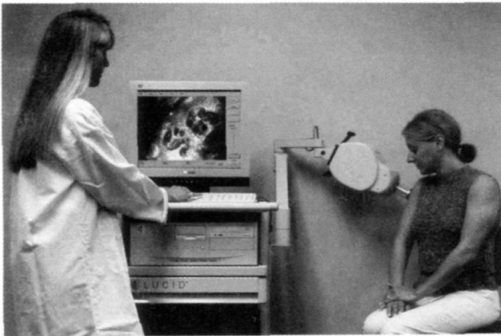


图 6 临床使用中的 Vivascope 1500 系统

Fig.6 Vivascope 1500 in a clinical case

4 用于皮肤病诊断的多光子成像

4.1 多光子成像简介

几十年来,皮肤诊断学一直建立在二维层次上,通常在白光或者使用伍德氏灯照明的条件下用肉眼或通过放大镜观察。伍德氏灯是一种紫外/蓝光光源,可以提供表面荧光的信息。为了获得数字化的皮肤影像,电荷耦合器件(CCD)镜头和图像处理软件开始投入应用。具有代表性的是作为光源而投入使用的偏振发光二极管,然后用 CCD 镜头获取散射光。当使用红光或者红外光时,相对于蓝光和紫外光,漫反射信号可以得到皮肤的深度信息。

表皮和真皮的三维成像可以用超声波或者光学相干层析(OCT)系统获得。然而,这些技术却不能对单一的内组织细胞或者胞外基质结构成像观察。要想对细胞和亚细胞层次结构进行观察,并且能够提供合适的分辨率,就需要采用共焦扫描荧光,但是

这类系统存在着一个主要的缺陷,就是它需要引入外界的异硫氰酸荧光素(FITC)荧光标记。

与上述情况形成对比的是,多光子层析成像作为一种能够达到亚细胞级精度的新式多层面成像技术,能够敏感地检测内在荧光基团发光以及胶原细胞外基质的二次谐波(SHG)信号,并且不需要对皮肤进行染色。从原理上来说,单分子检测可由单光子计数(SPC)技术实现。这是因为它的基础并不是建立在共焦检测上,所以不需要针孔,信号并不需要向后传输通过扫描系统。多光子层析成像能够实现对深层组织细胞和细胞室的成像。尤其值得一提的是,荧光线粒体中辅酶还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸[NAD(P)H] 的减少也可以被检测到。而这种辅酶的氧化物 NAD(P)并不产生可见区内的发射。这样利用 NAD(P)H 图谱就能够得到细胞内氧化还原状态和新陈代谢变化的信息。多光子层析成像能够精准地实现皮肤深层成像,甚至能对单个细胞内的线粒体成像。这样就可以通过对自发荧光的分析检测并区分细胞角质化、基底干细胞、黑色素细胞和巨噬细胞以及内网的弹性纤维和胶原束^[32]。也可以对药物和化妆品成分在皮肤下的扩散进行跟踪监测。这样无痛无创亚细胞层次分辨率的三维光学皮肤活检即得以实现。

4.2 临床多光子层析成像的原理

要实现双光子吸收过程,需要高强度近红外光。在激发荧光的过程中,双近红外光子同时吸收,两个光子共同提供激发所需要的能量。该能量总和等于荧光基团在基态 S_0 和激发后达到的电子能级 S_1 之间的能量差。对于三光子吸收过程,同时吸收的是三个光子。高数值孔径聚焦光路把低平均功率的激光在一个微小的焦点体积内聚焦到所需要的高强度(图 7)。吸收和荧光/SHG 激发都只发生在这个不到飞升的体积内。这样当使用脉冲频率高达兆赫兹到吉赫兹的飞秒激光器时,平均功率只有几毫瓦。从而在使用远红外激光器时可以避免以往由较低的单光子内部组织吸收系数导致的热损伤、光漂白和失焦荧光/SHG 激发。

利用 x, y 方向上的检流计扫描器和一组压电驱动聚焦光路,可以在三维空间内以亚微米步进的精度改变双光子激发体积的位置。这就使无创深层组织光学切片能够达到亚细胞的精度。通过在反扫描模式(荧光/SHG 不通过光学扫描器)下采用无针孔检测器,就可以实现具有较高光子采集效率和单光子灵敏度的三维成像。针对这一点,图像处理必

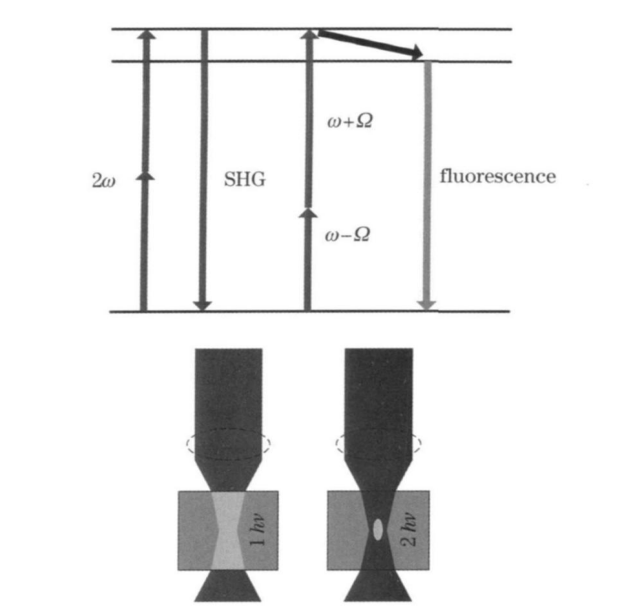


图 7 SHG 和双光子激发荧光原理

Fig. 7 Principle of SHG and two-photon excitation fluorescence

须结合像素时钟函数和 x/y -检流计, z -压电系统的帧同步信号。

在双光子层析成像中的标准激光光源应当是锁模的钛蓝宝石激光器,工作可调波长范围在 700 ~ 1000 nm 之间。这样可以检测到 350 ~ 500 nm 的 SHG 信号和 350 ~ 700 nm 的荧光信号。典型的荧光发光寿命一般在纳秒级范围内。当使用皮秒级上升时间的快速光子检测器和时间相关的单光子计数技术时,在时域内的荧光衰减动力学模型可达到较高的亚细胞空间精度。对衰减曲线进行图像处理可以得到每像素的平均荧光功率,对此进行计算则会得到荧光寿命(FILIM)图像。

表 1 列出了临床多光子层析中可检测到的主要内源皮肤荧光基团和 SHG 活跃分子。

表 1 多光子层析的荧光发射峰和荧光寿命
Table 1 Emission peaks and fluorescence life time of multiphoton tomography

Flourphores	Emission /nm	Lifetime / ns
NAD(P)H free	460	0.3
NAD(P)H-protein	440	2.0 ~ 2.3
Flavines	530	5.2
Elastin	420 ~ 460	0.3 / 2
Collegan	420 ~ 460 $\lambda/2$ (SHG)	0.3 / 2.0
Melanin	440 520, 575	0.1 / 1.9 / 8
PPIX	635 710	10 ~ 12

最吸引人的荧光基团是蓝/绿发光辅酶 NAD(P)H,这是一种通常情况下需要紫外光激发的基

团。由于紫外光的穿透深度浅, 单光子技术不能实现对深层组织区域内的该辅酶成像。然而, 近红外激光脉冲作用下的双光子激发却可以实现对基底细胞层甚至皮内细胞层细胞内线粒体中的钙该辅酶成像。有趣的是, 用近红外飞秒激光脉冲激发黑色素时, 发光最强的区域位于光谱中的黄/红区域。卟啉类化合物, 如粪卟啉和原卟啉, 它们的荧光发光寿命长, 从而可以在某些皮肤细菌(如丙酸菌座疮)中或是采用了 5-氨基乙酰丙酸(5-ALA)处理过的线粒体中成像。荧光寿命是分子和其所处环境的一个特征参数。比方说, 寿命分别为 5.2, 10~12 和 2~3 ns 的荧光分别对应着自由黄素单核苷酸、原卟啉 XI 单体和二聚体。再比方说, 自由 NAD(P)H 的荧光寿命只有 0.3 ns 左右, 而 NADH 的蛋白复合物的荧光寿命的标准值却可以达到 2 ns。

4.3 正常皮肤的双光子临床活检

内部组织荧光基团角蛋白主要存在于六角形的角化细胞中, 这类角化细胞主要存在于外层角质层(SC), 平均直径为 $(36 \pm 15) \mu\text{m}$, 而黑色素主要存在于头发和基底细胞层中。角蛋白和黑色素能产生最强烈的荧光信号。实际上, 当平均功率为 2 mW (25 pJ 脉冲能量) 或者略小的激光就足可以在快速扫描模式下对 SC 和毛发内部组织进行光学切片(快速扫描模式的标准状态为 1 frame/s, 每帧 $512 \text{ pixel} \times 512 \text{ pixel}$)。

当需要为内部组织光学切片进行基于双光子 NAD(P)H 荧光的高分辨率成像时, 扫描速度要达到 8 frame/s, 这是由平均光束驻留时间 30 ms/pixel 决定的。对于深入成像, 当成像的组织深度为 $100 \mu\text{m}$ (750 nm 波长) 时, 入射激光功率通常为 20~30 mW。高分辨率成像可从整个表皮甚至真皮结构中获得。每个表皮细胞形态和细胞内部结构都可以清楚地呈现。无荧光的细胞核的精确位置和细胞分裂都可以成像, 在系统的光学变焦下甚至可以看见单个组织内的荧光线粒体(图 8)^[33]。真皮的光学切片使对单条弹性蛋白纤维、胶原质结构和毛细血管的观测成为可能。通常情况下, 参照聚焦光路的工作距离, 监测深度一般为 $200 \mu\text{m}$ 。外层角质层的角质化死细胞一般无核, 扁平呈鳞状, 能有效阻挡外部化学物质、微生物, 并防止体内水分流失。这一层“壁垒”可以转化为 $10 \mu\text{m}$ 厚的颗粒层(SG)的颗粒, 第一批活的角质细胞死亡时, 这种转化就可被检测到了。在棘层(SS)中, 利用细胞质中的强荧光颗粒和无荧光的圆而大的核边界, 可以清楚地观察到单一的

角质化细胞和它们的细胞室。细胞直径随着在组织中位置的深入从 $(26 \pm 3) \mu\text{m}$ 减少到 $(16 \pm 4) \mu\text{m}$ 。对表皮细胞层的最底层, 也就是基底层(SB)的检测是利用对基底角质干细胞[直径为 $(9 \pm 1) \mu\text{m}$] 的强荧光的监测实现的。这些细胞通常都会在一个月的时间迁移到皮肤表面, 并在这个过程中逐渐分化。而在牛皮癣的病例中, 细胞分裂和迁移到皮肤表层的两个过程分别只用了 36 h 和 4 天的时间, 角质化细胞中的 90% 都是表皮细胞。

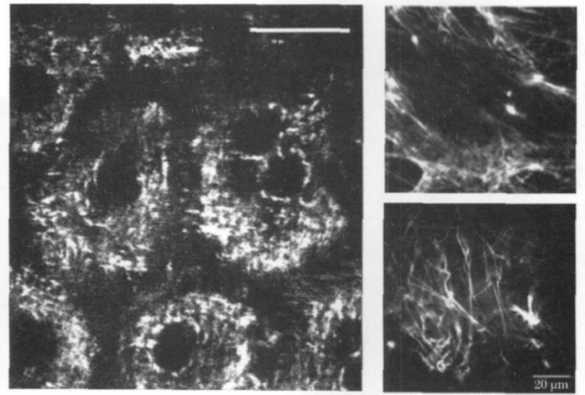


图 8 对体内不同皮肤层的自发荧光和 SHG 成像

Fig. 8 Autofluorescence and SHG images of different skin layers

真皮和表皮之间转化的深度通常是变化的, 由乳头状突起决定。女性实验对象的转化深度通常在 $55 \sim 70 \mu\text{m}$, 而男性则为 $70 \sim 100 \mu\text{m}$ 。结缔组织, 特别在厚度小于 $1 \mu\text{m}$ 的单条长荧光弹性纤维可以由自发荧光清楚地呈现。胶原蛋白结构的自发荧光通常较弱, 然而, 虽然检测方向是反向的, 但 SHG 信号更强。SHG 最初是和光束方向同向, 但是在多次散射后就不再遵循原方向。现已发现的胶原类型有 28 种。在皮肤中, 存在着第一类胶原和它的三螺旋体。

通常情况下, 从时间分辨的单光子计数测量中可以得到每个体元的双指数曲线(振幅 A_1, A_2 , 荧光寿命 τ_1, τ_2 , 平均荧光寿命 t)。短曲线的标准时间在检测器的响应时间以内, 很可能是 SHG 信号, 少量的散射光和一些快速衰退的荧光基团, 比如说黑色素。长一些的曲线源自自发荧光, 通常对于内组织细胞在 $1.8 \sim 2.4 \text{ ns}$ 的量级上。因为伪彩色编码和亮度有关, 所以在空间分辨的 FLIM 中可以获得四维信息(图 9)^[33]。FLIM 已经用于研究黑色素的不同类别和染发物质在头发中的积累过程^[34]。单光子技术也被用于获取皮肤年龄。在这种应用里, 胶原的弹性系数可由双光弹性蛋白的自发荧光和

SHG 测定。实际上,带通滤波不同的双 SPC 检测器结合到分束器的前方,分束器可将短波 SHG 信号和荧光长波信号分离,而 SPC 检测器和分束器结合后,可以在 800 nm 左右的激发光状态下同时工作。真皮二次谐波-荧光老化指数(SA AID)^[35],或者称作比率,反应了皮肤的年龄。测量体内 SA AID 可以揭示 40 岁以上妇女比同龄男性更快衰老的机理以及吸烟对人体的影响^[36]。

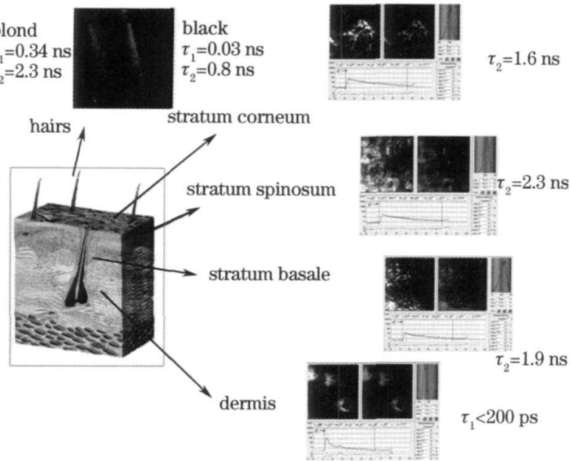


图 9 亚微米级空间分辨率和皮秒级时间分辨率的体内荧光成像

Fig. 9 *In vivo* fluorescence images with submicron spatial resolution and picosecond temporal resolution

5 OCT 成像

5.1 OCT 的起源和发展

OCT 技术是第一种以相干为特性的医学成像技术,其理论基础是早期的白光干涉测量法,起源于最初用作网络故障检测的光学相干域反射测量技术(OCDR)。OCDR 原本用于检测光缆的瑕疵,但不久人们就认识到它具有探测眼睛和其他生物组织的能力。OCT 概念的首次提出是在 1991 年,美国麻省理工大学的 Huang 等^[37]采用 OCT 技术成功地对人眼视网膜的细微结构和动脉壁成像。1993 年,演示了人类视网膜的活体光学相干层析成像^[38]。1995 年,开始眼科的临床研究。短短 10 年间, OCT 迅速发展起来,在分辨率和性能上有了很大的提高,并由此拓展出多种成像模式,如多普勒 OCT (ODT),偏振敏感型 OCT(PS-OCT),光谱 OCT,差分吸收型 OCT 和与双光子荧光或超声结合的 OCT 技术,并在同内窥镜结合的方式中实现了对内部器官的断层成像。这些不同模式的成像为从微观上更好地观察组织结构,了解其生理功能提供了

手段^[39]。

5.2 典型 OCT 系统结构

如图 10 所示, OCT 总体系统主要由低相干光源、干涉仪、光学扫描机构组成。

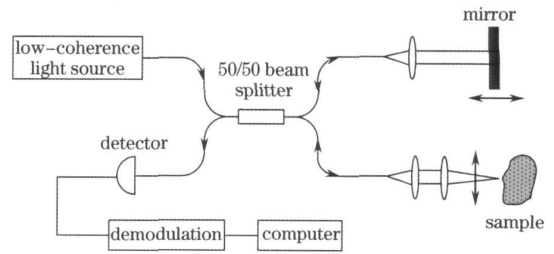


图 10 典型 OCT 系统结构图

Fig. 10 Typical configuration diagram of OCT system

5.2.1 低相干光源

在首次对人眼视网膜成像的示范中,使用了 850 nm 的超发光二极管(SLD),它对眼球的玻璃体和视网膜都有很好的穿透能力。而对于其他人体组织,由于高散射特性加强了光的衰减,因此还需要新的光源来提高穿透力。

评价适于 OCT 成像的光源有 4 个主要指标:波长、带宽、单传播模式和稳定性。其次从光源的应用角度考虑,应着重于使用方便,易于携带,兼容性好。因为短波长的光(如蓝光),它的光子在组织中的平均散射路径短,不能满足 OCT 的轴向探测深度,所以 OCT 光源一般采用近红外光。另一方面,水分子对 2 μm 左右波长的光有较强吸收,因此 OCT 的工作波段在 1.2~1.8 μm 之间为最佳。

5.2.2 干涉仪

OCT 系统的核心在它的干涉仪部分。典型的干涉结构是基于光纤的 Michelson 干涉仪,如图 11^[40]所示,在这种结构中,光源发出的光通过单模光纤传输,在耦合器处被分为两束光,其中一束由另一根单模光纤传至参考镜。而原光纤传输的那束则进入样品臂。样品臂的光纤末梢有两个作用:其一作为相干光的收发器,其二可作为类似于共焦针孔的空间滤波器。但是这种结构的一个缺点就是从参考臂返回的直流信号和强度噪声都加载到干涉信号上了。图 11(b)和(c)中的对称结构利用两个光电探测器所得的光电流相减方法来消除背景噪声,增强了干涉信号。图 11(c)的马赫-曾德尔结构可用于反射模式也可用于传输模式。

在 OCT 系统中使用光纤有很多方便的地方,但不是必需的。实际上在许多应用场合中,分离式

干涉仪有其独特的优点。各式棱镜和反射镜的应用给干涉仪的设计增加了灵活性,尤其在样品臂和参考臂的光耦合问题上。因为许多单模光纤都是由硅这种双折射材料做成的,光纤弯曲会引起光束偏振态的改变,因此在光纤式 OCT 系统中经常要加上调整光偏振态的调制器。空间分离式干涉仪结构则可避免这些问题。图 11(d)~(f)列出了几种可能

用于 OCT 系统的分离式干涉仪结构。图 11(a)的结构等价于迈克耳孙干涉仪,用分束器替代了 2×2 光纤耦合器。图 11(e)的结构可以将半导体光源和探测器结合用于手握式扫描仪使结构更紧凑。此种结构的干涉仪可容易地解决偏振态问题和参考臂与样品臂之间的散射不匹配问题。图 11(f)等效于马赫-曾德尔光纤结构。

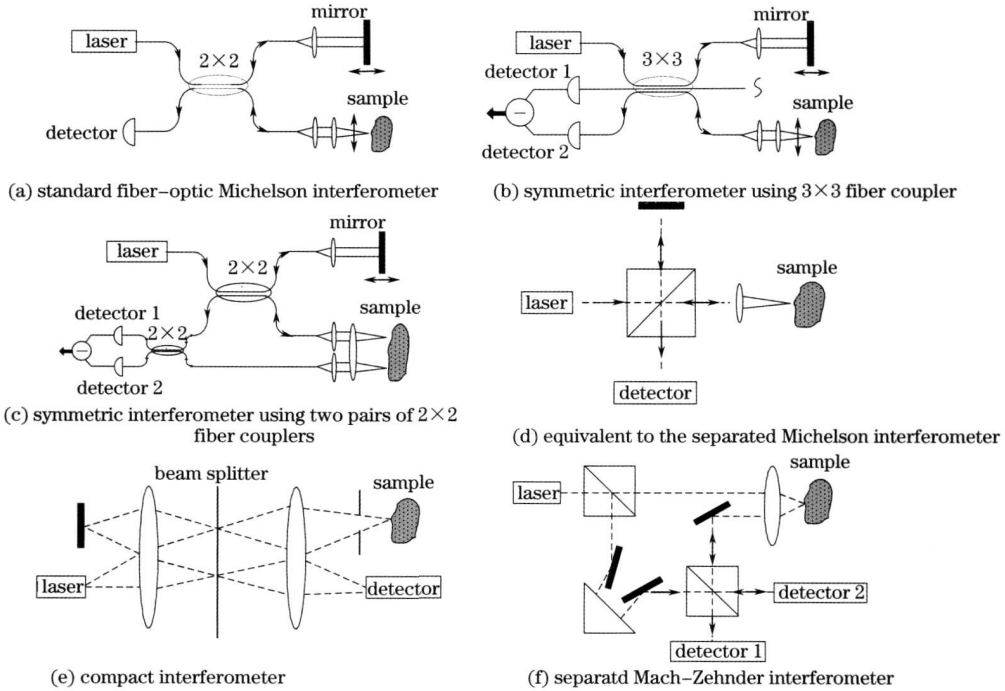


图 11 OCT 系统中常用的干涉仪结构

Fig. 11 Common interferometer structures in the OCT system

5.2.3 光学扫描机构

从 OCT 成像原理分析,为测量出样品轴向深度方向的各点信息,与它做干涉的参考臂就需要改变其长度以匹配样品臂的光程,通过得到干涉的等光程点获得样品信息。即 OCT 系统所构成的二维/三维层析图像轴向深度的测量是通过扫描参考臂得到的,因此 OCT 的图像质量与参考臂的扫描有直接关系。

扫描方式是利用各种光学延时线改变两臂的光程差。对于参考臂的扫描,首先要求路径必须是在一个有限范围内变化以覆盖成像所需的轴向长度,对于眼睛成像路径要大于 2 cm,对于皮肤和其他高散射组织则为 2 mm;其次,扫描定位精度必须小于光源的相干长度。

5.3 OCT 评价皮肤组织结构

OCT 图像显示的是皮肤结构的纵断面,与皮肤 CT 的皮肤横断面成像不同,而与皮肤组织病理相

同,符合传统的观察习惯。由于皮肤纹理的存在,皮肤表面呈现波浪形,皮肤对光的反射导致其表面呈现明亮的强信号带,在这个信号带下面,可见分层结构。角质层皮肤最为表浅,表现为低散射带,境界清楚,仅在掌跖皮肤处明显可见,较厚,如指尖皮肤角质层平均厚度约 $300\ \mu\text{m}$,而其下方表皮厚度仅为 $100\ \mu\text{m}$ 。角质层内部还可见一些螺旋形汗腺导管,表现为高度散射(图 12)^[41]。角质层和其下方表皮组织界限分明,如箭头所示为颗粒层,而真皮表皮交界常模糊不清。在掌跖以外的其他部位皮肤,角质层下方的表皮是 OCT 图像第一层(图 13)^[42],表皮信号弱于真皮层,如果真皮表皮交界平坦,易于与上层真皮区分开来。真皮常表现为信号较强,而其内的管腔如血管等的信号弱(图 13)^[42],呈现无信号圆形或长形结构。真皮内还存在一些低散射区,代表毛囊和皮脂腺(图 14)^[43]。此外,较薄的真皮下部也可见低反射的皮下结构,皮肤表面毛发可引起信号阴影。

除了表皮或真皮结构, OCT 还可用于人类指甲的成像, 较高分辨率的 OCT 证实了双层状结构的存在。

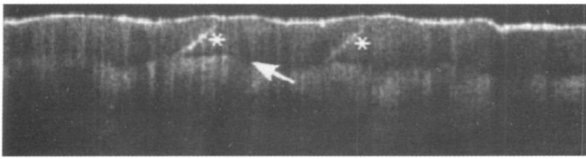


图 12 指尖正常皮肤在体 OCT 图像: 第一层角质层
星号处为螺旋形汗管, 箭头处为颗粒层
Fig. 12 *In vivo* OCT image of the healthy skin on fingertip:
cuticle, asterisks for sudoriferous ducts, arrows for
stratum granulosum

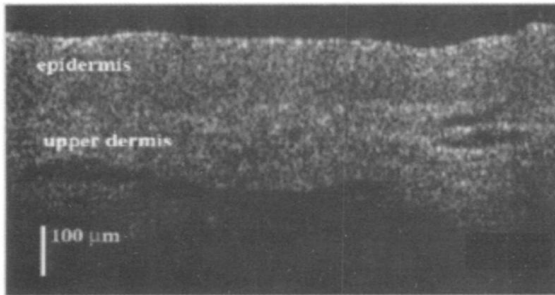


图 13 后背皮肤二维 OCT 图像: 正常情况下角质层
在非平滑皮肤不可见
Fig. 13 2D OCT image of back skin; horny layer is
invisible except at smooth skin

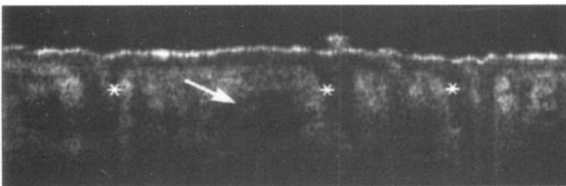


图 14 面颊正常皮肤 OCT 图像: 真皮内可见一些毛囊
(星号)和皮脂腺(箭头)
Fig. 14 OCT image of healthy cheek skin; follicles
(asterisks) and sebaceous glands (arrows) in dermis

实际应用中注意到 OCT 成像受皮肤不同生理状况的影响, 角质层厚度不影响其深层组织的光学特性, 而黑素可轻微减少真皮中的信号强度, 红斑和水肿可减少光衰减。

OCT 可对正常皮肤的厚度进行测量。简单的测量方法是通过普通 A 扫描和 B 扫描进行。在普通 A 扫描中第二个峰代表真表皮交界, 而第 2 个反射层是由于光在真皮胶原纤维中的后向散射所致, 通过测量峰与峰之间的距离可估计表皮的厚度。B 扫描也可测量表皮的厚度, 通过测量工具测量从皮肤表面反射即入射信号到第一个界清反射面的距离而获得。

为增加 OCT 成像在皮肤中的穿透深度和改善 OCT 成像的对比度, 甘油、丙二醇等高渗性物质作为透光剂已应用于 OCT 成像领域(图 15)^[41, 44], 透光剂可影响皮肤的光散射性质, 导致光衰减的降低, 使真皮变得透明, 从而增加了 OCT 光信号的检测深度^[45]。透光剂引起的皮肤组织的透明效应是由于这些物质的高渗透性引起水从细胞内向细胞外移动, 导致了胶原和基质的折射指数改变。但甘油对角质层的作用是不同的, 该物质是自然保湿因子, 增加角质层结合水的能力, 降低角质层的不透明性。

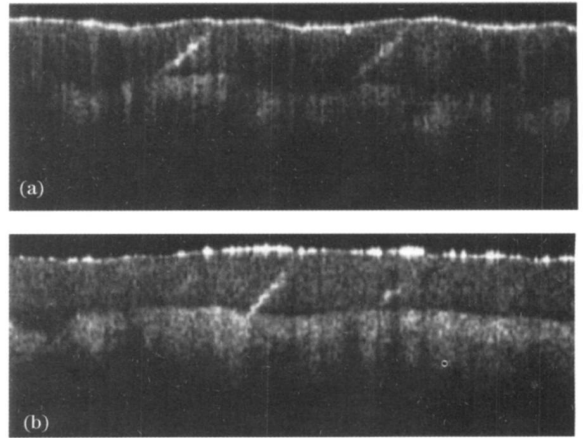


图 15 指尖正常皮肤应用甘油前(a)和后(b)的图像
Fig. 15 Image of smearing glycerin on healthy fingertip
skin before (a) and after (b)

传统的 OCT 横向分辨率为 $10 \sim 15 \mu\text{m}$, 常能鉴别掌跖角质层、表皮和上层真皮及皮肤附属器和血管。理论上超高图像分辨率约 $1 \mu\text{m}$ 的技术才可能研究细胞水平的变化, 但超高分辨率成像在高度混浊的介质如皮肤中仍是一个技术问题, 高输出宽带光源如飞秒激光在不远的将来可能解决这个问题。除了高分辨形态学研究, 常规 OCT 应用局部物理学参数可研究组织特征, 在美容和药物工业中得到青睐, 基于光谱分析、组织双折射和多普勒血流的功能性 OCT 成像在皮肤科领域也已取得显著的进展。总之, OCT 不能完全取代活检组织学或其他诊断手段, 但从对疾病非损伤诊断及监测治疗效应角度, OCT 能发挥重要的辅助作用。

6 光声成像

6.1 光声成像简介

对生物组织进行成像, 是研究生物组织的结构特征、功能及医学临床诊断的重要手段。光声层析成像(PAT)是近年来迅速发展的一种新的无损医学成像方法, 该技术结合了组织纯光学成像和组织

纯声学成像的优点,可得到高对比度和高分辨率的重建图像,且具有无副作用的优点,为生物组织的无损检测提供了一种重要的手段,正逐步成为生物组织无损检测领域的一个新研究热点。

6.2 光声成像技术原理

在生物组织的光声成像,是一种以超声作媒介的生物光子成像方法,一束短脉冲(约 10 ns)激光经过光学元件扩束后,照射到生物样品,激光能量被组织内吸收体快速吸收,组织受热膨胀,产生压力波(光声波),这种现象叫作光声效应^[46],光声波将穿过组织向外传播,可被放置在样品周围的超声传感器探测到(图 16)。通过采用旋转扫描方式,或采用多元阵列探测器,就可以得到在激光照射下组织内不同区域的光声波压力强度分布。光声波压力的大小与组织对激光能量的吸收程度直接相关,光吸收越强,则该处的光声信号强度越高。因此,利用探测到的光声波分布数据,通过滤波反投影进行图像重建,就可以得到组织的光吸收分布图像^[47]。

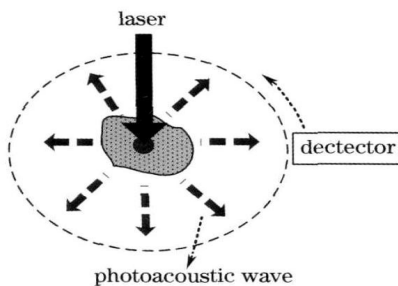


图 16 光声成像原理图

Fig. 16 Schematic diagram of photoacoustic imaging

光声成像探测的是被测点吸收激光后的光声信号,它从原理上避开了光散射的影响,光声振幅决定于吸收的光能量,由局部能流密度和作用目标的光吸收系数决定,与光散射引起的光子传播路径无关。因此,其空间分辨率不受光散射影响。同时,由于组织对超声的衰减和散射远小于对光的衰减和散射,用超声探测器检测超声波代替光学成像中的检测散射光子,可显著提高成像深度和分辨率。与传统的超声影像方法相比,PAT 可以区分声学参数相同而光学参数不同的待测样品,提供高分辨率和高对比度的影像。

6.3 光声成像技术在皮肤影像学中的应用

光声成像技术可对肿瘤及周围血管功能成像。皮下微血管的三维成像对于皮肤病、癌症研究和整形外科等领域很重要^[48]。但是皮下微血管的功能

成像仍然面临挑战。光声显微镜利用高空间分辨率和高信噪比,能够对小动物和人皮肤微血管功能成像。Zhang 等^[49]使用双波长(584 nm 和 764 nm)光源对黑素瘤小鼠模型进行功能成像,在 584 nm 波长光照下,由于黑素和血红蛋白对这一波长有强的光吸收,因此光声显微镜在 $x-y$ 轴方向能对黑素瘤和周围血管功能成像。但是在这个波长范围不能评价肿瘤的厚度,因为光子在富含黑素的肿瘤内部很快被完全吸收。为了增加光子的穿透深度,研究小组应用近红外光(764 nm)来降低黑素的光吸收。结合这两个光波成像能够完整显示黑素肿瘤的形态和周围的血管(图 17)^[49]。

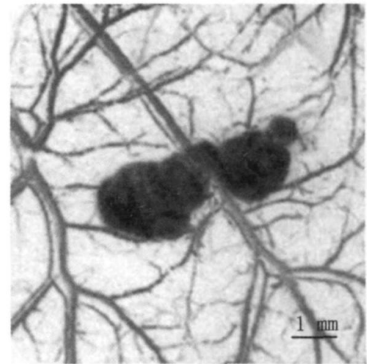


图 17 黑素肿瘤和周围血管成像

Fig. 17 Photoacoustic image of melanoma and blood vessels

对于人体的皮肤及皮下组织成像,光声技术也有着成功的应用。Zhang 等^[50]利用 670 nm 波长的激发光,实现了对人体手部皮肤及皮下深达 4 mm 的组织血管的光声成像(图 18),得到了人体皮下组织循环系统的三维影像。光声成像也在烧伤、皮下肿瘤、鲜红斑痣等方面有着成功的应用。

7 结 论

以上所介绍的皮肤影像学方法,包括皮肤镜、皮肤 CT、多光子成像、OCT 成像以及光声成像技术都具有无创性、原位、实时、动态的特性,适合对可疑皮损进行重复检查,从而提供客观量化的评价指标,为皮肤病的临床诊断提供了多种选择。当然,更多的新型成像技术也在不断涌现,这也必将使皮肤影像学不断得到丰富和发展,以满足更加多样化个性化的临床需求。

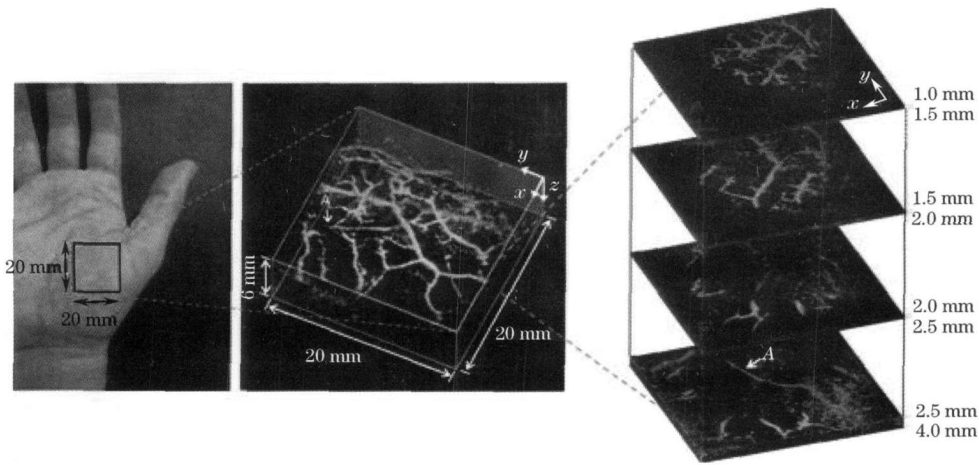


图 18 在体手部皮下组织的光声成像

Fig. 18 *In vivo* photoacoustic image of the vasculature in the palm

参 考 文 献

- 1 O. Gilje P. A. O'Leary, E. J. Baldes. Capillary microscopic examination in skin diseases[J]. *AMA Arch. Derm. Syphilol.*, 1953, **68**(2): 136~147
- 2 L. Goldman. Some investigative studies of pigmented nevi with cutaneous microscopy[J]. *J. Invest. Dermatol.*, 1951, **16**(6): 407
- 3 F. M. Paschoal. Early diagnosis of melanoma by surface microscopy (dermatoscopy)[J]. *Sao Paulo Medical Journal*, 1996, **114**(4): 1220~1221
- 4 C. A. Charles, A. A. Marghoob, K. J. Busam *et al.*. Melanoma or pigmented basal cell carcinoma: a clinical-pathologic correlation with dermoscopy, *in vivo* confocal scanning laser microscopy, and routine histology[J]. *Skin research and Technology: Official Journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS)[and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS)[and] International Society for Skin Imaging (ISSI)*, 2002, **8**(4): 282~287
- 5 G. Argenziano, H. P. Soyer. Dermoscopy of pigmented skin lesions: a valuable tool for early diagnosis of melanoma[J]. *Lancet Oncol*, 2001, **2**(7): 443~449
- 6 M. L. Bafounta, A. Beauchet, P. Aegerter *et al.*. Is dermoscopy (epiluminescence microscopy) useful for the diagnosis of melanoma? results of a meta-analysis using techniques adapted to the evaluation of diagnostic tests[J]. *Arch. Dermatol.*, 2001, **137**(10): 1343~1350
- 7 E. S. Spencer, V. P. Petersen. The urinary sediment after renal transplantation[J]. *Acta Medica Scandinavica*, 1967, **182**(1): 73~82
- 8 J. Saphier. Die dermatoskopie[J]. *Archives of Dermatological Research*, 1921, **128**(1): 1~19
- 9 Nizar A. Mullani, S. Land, TX. Dermoscopy epiluminescence device employing cross and parallel polarization[J]. USA Patent, 2006. 7006223B2
- 10 A. Marghoob, A. Kopf. Atlas of Dermoscopy[M]. Oxon: Taylor & Francis. 2004. 28~42
- 11 H. Pehamberger, A. Steiner, K. Wolff. *In vivo* epiluminescence microscopy of pigmented skin lesions. I. Pattern analysis of pigmented skin lesions[J]. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 1987, **17**(4): 571~583
- 12 P. Carli, E. Quercioli, S. Sestini *et al.*. Pattern analysis, not simplified algorithms, is the most reliable method for teaching dermoscopy for melanoma diagnosis to residents in dermatology[J]. *Br. J. Dermatol.*, 2003, **148**(5): 981~984
- 13 C. M. Gryn, K. P. Friedman, J. M. Grant-Kels. Dermoscopy: a review[J]. *Dermatol. Clin.*, 2002, **20**(4): 641~646
- 14 W. Stolz, A. Riemann, A. Cognetta *et al.*. A BCD rule of dermoscopy: a new practical method for early recognition of malignant melanoma[J]. *European J. Dermatology*, 1994, **4**(7): 521~527
- 15 S. Menzies, C. Ingvar, K. Crotty *et al.*. Frequency and morphologic characteristics of invasive melanomas lacking specific surface microscopic features[J]. *Archives of Dermatology*, 1996, **132**(10): 1178~1182
- 16 G. Argenziano, G. Fabbrocini, P. Carli *et al.*. Epiluminescence microscopy for the diagnosis of doubtful melanocytic skin lesions. comparison of the ABCD rule of dermoscopy and a new 7-point checklist based on pattern analysis[J]. *Archives of Dermatology*, 1998, **134**(12): 1563~1570
- 17 V. Dal Pozzo, C. Benelli, E. Roscetti. The seven features for melanoma: a new dermoscopic algorithm for the diagnosis of malignant melanoma[J]. *European J. Dermatology*, 1999, **9**(4): 303~308
- 18 H. Kittler, H. Pehamberger, K. Wolff *et al.*. Diagnostic accuracy of dermoscopy[J]. *Lancet Oncol*, 2002, **3**(3): 159~169
- 19 Wu Jianbo, Zheng Jiarun. Fundation and clinical application of dermoscopy technology[J]. *Foreign Medical Sciences (Section of Dermatology and Venereology)*, 2005, **31**(5): 282~284
- 吴剑波, 郑家润. 皮肤镜技术的基础与临床应用[J]. 国外医学: 皮肤性病学分册, 2005, **31**(5): 282~284
- 20 K. Tsukahara, Y. Takema, S. Moriwaki *et al.*. Dermal fluid translocation is an important determinant of the diurnal variation in human skin thickness[J]. *Br. J. Dermatol.*, 2001, **145**(4): 590~596
- 21 Li Zhiming, Ren Qiushi, Zhang Xuejun *et al.*. New development in skin imaging[J]. *Chinese J. Dermatology*, 2009, **42**(3): 215~217
- 李智铭, 任秋实, 张学军 等. 皮肤影像学新进展[J]. 中华皮肤科杂志, 2009, **42**(3): 215~217
- 22 Liu Huaxu, Li Ying, Zheng Zhizhong *et al.*. New skin imaging technology — skin CT and its application[C]. Progress in Chinese Biomedical Engineering, 2007. 460
- 刘华绪, 李颖, 郑志忠 等. 新型皮肤影像学技术——皮肤 CT 及其应用[C]. 中国生物医学工程进展, 2007. 460

- 23 M. Marvin. Microscopy apparatus[P]. USA Patent, 1961, 3013467
- 24 R. Wijnaendts van Resandt, H. Marsman, R. Kaplan *et al.*. Optical fluorescence microscopy in three dimensions: microtomoscopy[J]. *J. Microsc.*, 1985, **138**: 29~34
- 25 M. Rajadhyaksha, M. Grossman, D. Esterowitz *et al.*. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin: melanin provides strong contrast [J]. *J. Invest. Dermatol.*, 1995, **104**(6): 946~952
- 26 M. Rajadhyaksha, S. Gonzalez, J. M. Zavislan *et al.*. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin II: advances in instrumentation and comparison with histology[J]. *J. Invest. Dermatol.*, 1999, **113**(3): 293~303
- 27 S. W. Paddock. Confocal laser scanning microscopy[J]. *Bio Techniques*, 1999, **27**(5): 992~1004
- 28 J. M. Girkin, G. McConnell. Advances in laser sources for confocal and multiphoton microscopy[J]. *Microsc. Res. Tech.*, 2005, **67**(1): 8~14
- 29 M. J. Gruber, A. Wackernagel, E. Richtig *et al.*. Digital image enhancement for in vivo laser scanning microscopy[J]. *Skin Research and Technology: Official Journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS)*[and] *International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS)*[and] *International Society for Skin Imaging (ISSI)*, 2005, **11**(4): 248~253
- 30 A. Gerger, R. Hofmann-Wellenhof, U. Langsenlehner *et al.*. In vivo confocal laser scanning microscopy of melanocytic skin tumours: diagnostic applicability using unselected tumour images [J]. *Br. J. Dermatol.*, 2008, **158**(2): 329~333
- 31 A. Gerger, S. Kollek, W. Weger *et al.*. Sensitivity and specificity of confocal laser-scanning microscopy for in vivo diagnosis of malignant skin tumors[J]. *Cancer*, 2006, **107**(1): 193~200
- 32 K. König, K. Schenke-Layland, I. Riemann *et al.*. Multiphoton autofluorescence imaging of intratissue elastic fibers [J]. *Biomaterials*, 2005, **26**(5): 495~500
- 33 K. König. Clinical multiphoton tomography [J]. *J. Biophotonics*, 2008, **1**(1): 13~23
- 34 A. Ehlers, I. Riemann, M. Stark *et al.*. Multiphoton fluorescence lifetime imaging of human hair[J]. *Microscopy Research and Technique*, 2007, **70**(2): 154~161
- 35 M. Koehler, K. König, P. Elsner *et al.*. In vivo assessment of human skin aging by multiphoton laser scanning tomography[J]. *Opt. Lett.*, 2006, **31**(19): 2879~2881
- 36 K. König. Clinical multiphoton tomography [J]. *J. Biophotonics*, 2008, **1**(1): 13~23
- 37 D. Huang, E. A. Swanson, C. P. Lin *et al.*. Optical coherence tomography[J]. *Science*, 1991, **254**(5035): 1178~1181
- 38 M. R. Hee, J. A. Izatt, E. A. Swanson *et al.*. Optical coherence tomography of the human retina [J]. *Arch Ophthalmol.*, 1995, **113**(3): 325~332
- 39 Li Peng, Huang Run, Gao Wanrong. Experiment research on optical coherence tomography of human skin[J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(10): 2498~2502
- 李 鹏, 黄 润, 高万荣. 光学相干层析术在人体皮肤成像方面的实验研究[J]. *中国激光*, 2009, **36**(10): 2498~2502
- 40 J. L. Leveque. Noninvasive measurements on photodamaged skin[C]. Photodamage Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1995, 192~200
- 41 J. Welzel, C. Reinhardt, E. Lankenau *et al.*. Changes in function and morphology of normal human skin: evaluation using optical coherence tomography [J]. *British Journal of Dermatology*, 2004, **150**(2): 220~225
- 42 T. Gambichler, G. Moussa, M. Sand *et al.*. Applications of optical coherence tomography in dermatology [J]. *J. Dermatological Science*, 2005, **40**(2): 85~94
- 43 J. Welzel. Optical coherence tomography in dermatology: a review[J]. *Skin Research and Technology*, 2001, **7**(1): 1~9
- 44 Mao Zongzhen, Han Zhenzhen, Zhu Dan. Experimental study on in vivo rat skin optical clearing at the action of thiazone[J]. *Acta Optica Sinica*, 2009, **29**(7): 1921~1925
- 毛宗珍, 韩珍珍, 朱 丹. 噻酮提高在体大鼠皮肤光透明效果的实验研究[J]. *光学学报*, 2009, **29**(7): 1921~1925
- 45 Zhong Huiqing, Guo Zhouyi, Wei Hua Jiang *et al.*. Effects of ultrasound and glycerol on skin optical clearing[J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36**(10): 2503~2509
- 钟会清, 郭周义, 魏华江 等. 超声波和丙三醇对皮肤光透明性的影响[J]. *中国激光*, 2009, **36**(10): 2503~2509
- 46 T. Sun, G. J. Diebold. Generation of ultrasonic waves from a layered photoacoustic source[J]. *Nature*, 1992, **355** (6363): 806~808
- 47 Gu Huaimin, Yang Sihua, Xiang Liangzhong. Photoacoustic tomography and applications in the medical clinic diagnosis[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2006, **33** (5): 431~437
- 谷怀民, 杨思华, 向良忠. 光声成像及其在生物医学中的应用[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2006, **33**(5): 431~437
- 48 Zhang Jizhuang, Zhang Xuexue. Effects of blood vessel parameters on the photo-thermal interactions during selective photothermolysis [J]. *Chinese J. Lasers*, 2009, **36** (8): 2202~2208
- 张纪庄, 张学学. 血管参数对皮肤组织选择性光热解作用中光热响应规律的影响[J]. *中国激光*, 2009, **36**(8): 2202~2208
- 49 H. F. Zhang, K. Maslov, G. Stoica *et al.*. Functional photoacoustic microscopy for high-resolution and noninvasive in vivo imaging[J]. *Nature Biotechnology*, 2006, **24**(7): 848~851
- 50 E. Z. Zhang, J. G. Laufer, R. B. Pedley *et al.*. In vivo high-resolution 3D photoacoustic imaging of superficial vascular anatomy[J]. *Physics in Medicine and Biology*, 2009, **54** (4): 1035~1046