

文章编号:1004-5929(2022)02-0103-13

光散射光谱在生物医学领域的发展和应用

朱亮¹,董理¹,陈晋²,李泽臻³,许嘉悦¹,严燕丽¹,邱俊^{1,4*},李晓天⁴

(1. 广东医科大学 生物医学工程学院,广东 东莞 523808;2. 广东外语外贸大学,广东 广州 510420;
3. 广东省人民医院,广东 广州 510080;4. 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所,吉林 长春 130033)

摘要: 光散射光谱(Light Scattering Spectroscopy, LSS)是一种可以实时、无创地对细胞核以及细胞器结构进行探测的光谱技术,并且能够在细胞和亚细胞尺度上获得生物组织的结构特征。LSS将微小粒子的光散射特性与它们的大小、折射率和形状联系起来。生物组织具有结构特异性,当被光照射时会产生不同角度和偏振特性的散射光,因此可以获得有关组织宏观和微观的结构信息。这项技术在相关领域得到了深入的研究,并被扩展到癌细胞的检测。本文首先对LSS技术的基本原理进行了介绍,然后详细阐述了该技术在早期癌症诊断中的研究和应用,最后,我们总结了LSS技术的优势并对其未来的发展进行了展望。

关键词: 光散射;癌症;光学诊断技术

中图分类号:Q63 文献标志码:A doi:10.13883/j.issn1004-5929.202202001

Development and application of light scattering spectroscopy in biomedical field

ZHU Liang¹, DONG Li¹, CHEN Jin², LI Zezhen³, XU Jiayue¹,
YAN Yanli¹, QIU Jun^{1,4*}, LI Xiaotian⁴

(1. School of Biomedical Engineering, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China;
2. Guangdong University of Foreign Studies, Guangzhou 510420, China;
3. Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, China;
4. Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: Light Scattering Spectroscopy is a spectroscopic technique which relates the scattering spectral properties of tiny particles to their size, refractive index and shape. LSS allowing real-time, non-invasive probing of cell nuclei and organelle structures and enables obtain the characterization of biological tissue structures at the cellular and subcellular scales. When biological tissues illuminated by a light source, it can produce scattered light with different angular and polarization characteristics due to its' structural specificity, so the information about the macroscopic and microscopic structures of tissues can be obtained. This technique has been intensively studied in related fields and extended to the detection of cancer cells. First, we introduce the basic principles of LSS technology, then a detail description of the research and application of this technology in early cancer diagnosis is discussed. Finally, we summarize the advantages of LSS technology and outlooks its future development.

Key words: light scattering; cancer; optical diagnostic technique

收稿日期:2022-05-09; 修改稿日期:2022-07-110

基金项目:国家自然科学基金(6150524);国家重大科学仪器设备开发专项项目(2014YQ12035102 20190302047GX);广东省基础与应用基础研究基金联合基金(2019A1515110572)

作者简介:朱亮(1996—),男,硕士,主要从事生物医学光子学方向研究,E-mail:z121512469@163.com;

通讯作者:邱俊,E-mail:jun_chiu@163.com

1 引言

癌症成为二十世纪以来人类健康的主要杀手,是仅次于心血管疾病的第二大医学难题。据估计,2020 年全球有 1930 万例新发癌症病例和近 1000 万例癌症患者死亡,预计到 2040 年,全球癌症病例将达到 2840 万例^[1]。尽管人类医疗水平在不断发展,医疗设备性能也在不断提高,但仍然不能对癌症彻底根治。目前大约有超过 90% 的癌症起源于上皮细胞^[2],上皮细胞核的变化是细胞发育异常的重要指标,因此对上皮细胞的检测成为肿瘤早期筛查的重要突破口。上皮细胞异常的诊断标准包括细胞核大小、细胞核形状(多形性)以及染色质浓度增加导致的细胞核染色加深等参数。常规技术难以实现对大多数癌前病变的精准检测,只能通过切除组织后进行活检,然而这种方法并不能获取所有病变的样本信息,存在抽样误差。此外,癌症潜伏期通常有 10 ~ 20 年,以至于癌症患者在初次就医时大多处在癌症晚期,这时已经失去治疗的机会。如果能更早地进行癌前病变筛查,则可以有效提高患者的生存率。

光散射光谱(Light Scattering Spectroscopy, LSS)在生物医学领域发挥着越来越重要的作用,对生物组织、细胞和细胞器具有独特的表征能力,可以在不改变生物样品的情况下对其性质进行量化,不仅能够对细胞进行无创、非侵入式检测,并且可以在不移除组织的情况下在原位上进行实时观察,避免了组织学检测过程中随机活检带来的抽样误差,这些优势使得早期病症的检出率得到提高。人体微观物体的光散射效应基于几十年前发展起来的电磁波传播和与物质相互作用的基本原理,生物医学光散射光谱与其他医学成像方式的发展相似,比如,X射线的发现为当今计算机断层扫描技术(Computed Tomography, CT)的成熟奠定了基础;而对核磁共振物理现象的探索推动了磁共振成像技术(Magnetic Resonance Imaging, MRI)的进步。所以,生物医学光学领域主要涉及的是电磁波与外源和内源微观物体相互作用的新医学技术的应用。值得注意的是,光散射光谱可以对生物组织进行非入侵检测,包括对整体组织特性的表征和对亚细胞的评估。本文从 LSS 技术的原理出发,对其在食管腺癌、胰腺癌、子宫颈癌、结肠癌、口腔癌等其他恶性肿瘤的研究进行介绍,最后对 LSS 技术的研究进行了总结和展望。

2 粒子和细胞的光散射

2.1 粒子光散射的基本原理

电磁波与介电粒子相互作用,在该粒子中引起自由电荷和束缚电荷振荡,进而在粒子内部和外部产生电磁波。单个粒子的光散射本质可描述为:给定已知结构的粒子,在特定的极化平面波照射下产生粒子内部和外部的电磁场。

2.1.1 被平面波照射的粒子特性

$$\begin{pmatrix} E_{i1} \\ E_{i2} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} E_{01} \\ E_{02} \end{pmatrix} e^{-i(kr-\omega t)} \quad (1)$$

式(1)中, E_{i1} 和 E_{01} 是垂直于散射平面的波幅分量, E_{i2} 和 E_{02} 是平行于散射平面的波幅分量, k 为波矢, ω 是角频率, t 表示时间周期。散射波分量(E_{s1}, E_{s2})与入射波分量通过散射振幅矩阵相关联:

$$\begin{pmatrix} E_{s2} \\ E_{s1} \end{pmatrix} = \frac{e^{-i(kr-\omega t)}}{ikr} \begin{pmatrix} S_2 & S_3 \\ S_4 & S_1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} E_{i2} \\ E_{i1} \end{pmatrix} \quad (2)$$

$\mathbf{r} = \mathbf{r}(\theta, \varphi)$ 是散射光的传播方向,由球面参考系中的极角 θ 和 φ 给出。 $k = 2\pi/\lambda$ 是波数, λ 为波长,意为 2π 长度上出现的全波数目。其中散射振幅矩阵可以完整描述散射过程,散射截面 σ_s 由式(3)给出:

$$\sigma_s = k^{-2} \int_0^{2\pi} \int_0^\pi (|S_1 + S_4|^2 + |S_2 + S_3|^2) \sin\theta d\theta d\varphi \quad (3)$$

相位函数 $\rho(\theta, \varphi)$ 定义为光散射概率与角度的关系函数,可以在散射振幅矩阵中获得。为了求出散射矩阵的矩阵元素,需要在电场和磁场的适当边界条件下求解麦克斯韦波动方程,这种解很难得到。1908年,德国科学家古斯塔夫·米(Gustav Mie)推导出了电磁波与球形粒子相互作用的精确解^[3]。在米散射解中, $x = ka$ 为粒子尺寸参数,函数 S_1 和 S_2 被表示为尺寸参数贝塞尔函数的无穷级数,其中 a 是球体直径, m 是球体的折射率与周围介质的折射率之比,即相对折射率。除了均匀球体表面的光散射特性以外,其他物体包括圆柱体,有均匀涂层的球体,条带状面和平面也已经被求解^[4]。通常情况下,振幅只能表示为无穷级数,而无穷级数往往收敛性很差。

2.1.2 粒子光散射的近似解

由于难以得到波动方程精确解,关于光散射问题的近似解就得到了发展。最早是由德国物理学家瑞利(Lord Rayleigh)于1871年发现的,并把

这种现象称为瑞利散射^[5,6]。瑞利散射证明当粒子尺度远小于入射光波长时(小于波长的十分之一),其各方向上的散射光强度是不一样的,该强度与入射光的波长四次方成反比,这种现象称为瑞利散射。在瑞利极限中,粒子体积上的电场被认为是均匀的。因此,粒子可以看作是偶极子,在任意方向上产生辐射。在粒子的各向同性极化率 α 不变的情况下,散射振幅矩阵描述为:

$$\begin{pmatrix} S_2 & S_3 \\ S_4 & S_1 \end{pmatrix} = ik^3 \alpha \begin{pmatrix} \cos\theta & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (4)$$

散射截面为:

$$\sigma_s = \frac{8}{3} \pi k^4 \alpha^2 \quad (5)$$

α 与粒子的体积成正比,与 λ^4 成反比。

$$\begin{pmatrix} S_2 & S_3 \\ S_4 & S_1 \end{pmatrix} = \frac{ik^3 V}{2\pi} \mathfrak{R}(\theta, \varphi) \begin{pmatrix} \cos\theta & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (6)$$

对于尺寸与入射波长接近的较大粒子来说,瑞利散射不再适用。但可以使用另一种称为瑞利-甘斯近似解(Rayleigh-Gans)^[7]的方法,在颗粒的相对折射率 m 接近于 1,同时粒子相移 $2ka|m-1|$ 较小的情况下适用。将等式(4)中的瑞利公式应用于粒子内的任意体积元素 dV ,得到瑞利-甘斯近似。可以推导出:

$$\mathfrak{R}(\theta, \varphi) = \frac{1}{V} \int_V (m(r) - 1) e^{i\delta(r, \theta, \varphi)} dr \quad (7)$$

$m(r)$ 表示点 r 处的相对折射率, δ 为位于点 r 的偶极子在 (θ, φ) 方向上散射的波相位。假设粒子形状均匀,则:

$$\begin{pmatrix} S_2 & S_3 \\ S_4 & S_1 \end{pmatrix} = \frac{ik^3 (m-1)V}{2\pi} R(\theta, \varphi) \begin{pmatrix} \cos\theta & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (8)$$

m 是粒子相对折射率的平均值。函数 $R(\theta, \varphi) = (1/V) \int e^{i\delta} dV$ 为形状因子。假如一个粒子相对折射率接近于 1,同时通过粒子 $2ka|m-1|$ 的相移很大,则符合范德胡斯特(Van de Hulst)在 1957 年提出的光散射近似理论^[8],该理论适用于任意形状的大颗粒。在该理论中,相移会产生相长或相消干涉,可以用惠更斯原理求出散射矩阵。

$$S_{1,2}(\theta) = \frac{k^2}{2\pi\omega} \iint_{\lambda} (1 - e^{-i\xi(r)}) e^{-i\delta(r, \theta)} d^2 r \quad (9)$$

r 是与入射光的传播方向正相交平面中的矢量。 ξ 表示光线经过 r 给出的位置沿直线穿过粒子产生的相移相对于光线在粒子外传播产生的相移。 δ 表示被粒子不同部分散射的光线之间的相

位差。积分在粒子的几何横截面 A 上进行,相移取决于粒子形状和折射率。例如,对于半径为 a 且相对折射率为 m 的球形粒子,那么 $\xi = 2ka(m-1)\cos\gamma$, $\delta = -ka\sin\theta\sin\gamma\cos\varphi$ 。其中 γ 表示径向和初始射线方向之间的角度, φ 表示朝向粒子表面元素矢量的方位角。任意形状大颗粒的散射振幅可以通过以下公式获得:

$$\sigma_s \approx 2\pi a^2 \left\{ 1 - \frac{\sin(2x(m-1))}{x(m-1)} + \left(\frac{\sin(x(m-1))}{x(m-1)} \right)^2 \right\} \quad (10)$$

与小型粒子相比,较大的球形粒子产生的散射类型截然不同。前向散射的强度和散射截面都不是波长的单调函数,而是随波长而振荡,振荡频率与 $x(m-1)$ 成正比,因此随着球体尺寸和折射率的增加而增加。

2.1.3 几种光散射现象的区别

光散射是指单色光束的光子与分子相互作用时发生弹性碰撞或非弹性碰撞的现象。弹性碰撞是指碰撞时光子与分子不发生能量交换,只改变传播方向的现象。非弹性碰撞是指光子与分子碰撞时,不仅光子的运动方向发生变化,能量也发生变化,从而改变光子频率的现象。瑞利散射属于弹性光散射,1900 年,英国物理学家瑞利勋爵(Lord Rayleigh)发现当微粒的半径足够小(小于 0.1λ)时,散射光线的强度与入射光线波长的四次方成反比,即短波的散射比长波的散射更强烈。拉曼散射属于非弹性散射,由印度物理学家拉曼(C. V. Raman)于 1928 年发现,指一定频率的激光照射到样品表面时,物质中的分子与光子发生能量转移,振动态发生不同方式和程度的改变,然后散射出不同频率的光。光子失去能量,频率减小的过程称为斯托克斯拉曼散射,光子得到能量,频率增大的过程称为反斯托克斯拉曼散射(图 1B)。散射物质的特性决定了频率的变化,不同种类的原子团振动的方式是独一无二的,可以产生与入射光频率有特定差值的散射光,所以,拉曼光谱又称为“指纹光谱”,可以照此原理鉴别出物质分子的种类。米散射属于弹性散射的一种情况,由德国物理学家古斯塔夫·米(Gustav Mie)于 1908 年提出。他发现,当微粒半径的大小接近于或者大于入射光线的波长 λ 的时候,大部分的入射光线会沿着前进的方向进行散射。与瑞利散射和拉曼散射不同的是,米散射的程度跟波长是无关系的,而且光子散射后的性质也不会改变。米散射的散射强

度与频率的二次方成正比,前向散射比后向散射 强度更强,方向性比较明显(图 1A)。

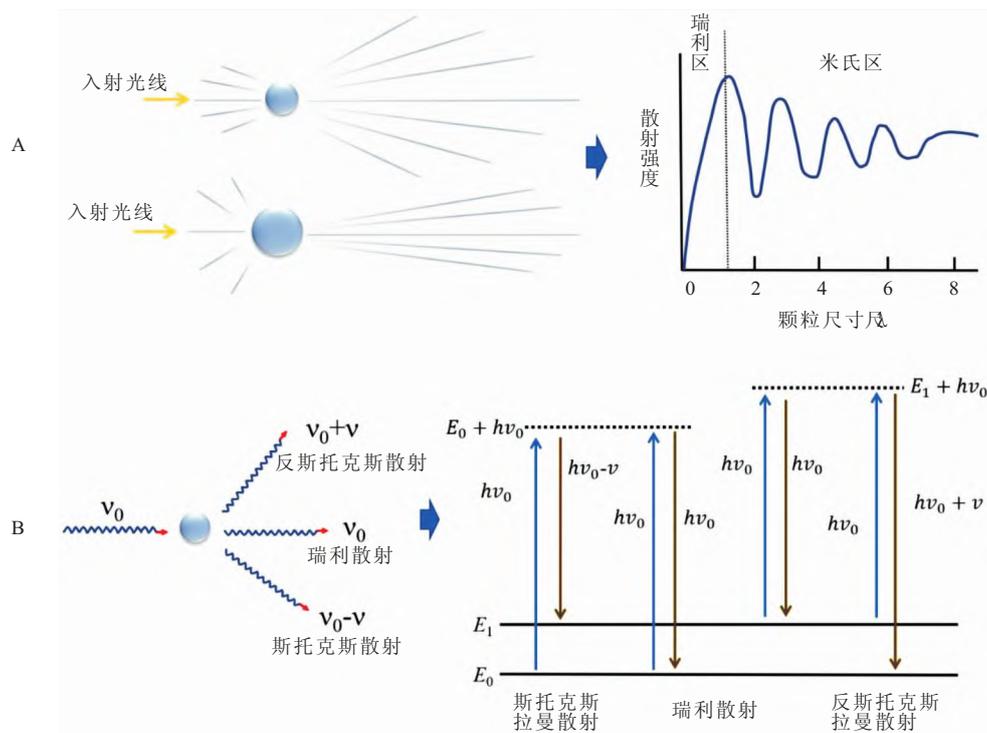


图 1 三种光散射现象原理图

Fig. 1 Principle of three light scattering phenomena

2.2 细胞光散射的基本原理

上皮细胞核增大、深染和多形性几乎是所有癌前病变的共同特点。LSS 光信号主要取决于粒子尺寸和形状,细胞核的尺寸一般大于光波长,散射能力较强。相比之下,其它亚细胞器例如线粒体或核内染色质团块的体积一般接近或者小于光波长,体积越小,产生的背向散射角度越大。通常情况下,粒子的散射光谱会随光波长的变化而变化,如果存在多种形状的成分则光谱信号为几种成分的叠加。可见粒子的形状、相对折射率、以及入射光波长都会对散射光谱造成影响。

细胞的种类繁多,可达数百种类型,但绝大多数细胞都具有相同的结构^[9]。细胞的包膜为大约 10 nm 厚的脂质双分子层结构,胞内有 7~10 μm 的细胞核和周围的胞质,胞质中含有细胞器成分(主要为线粒体)。线粒体直径通常在 0.2~0.8 μm 区间,其他还有更小的细胞器诸如溶酶体(250~800 nm)和过氧化物酶体(200 nm~1 μm)等。绝大多数细胞器光折射率在 1.38~1.42 范围内,细胞质折射率在 1.34~1.36 范围内^[10,11]。大多数小细胞器都能满足 Rayleigh-Gans 近似的两个条件,这些小细胞器散射强度随其折射率

($m-1$)² 和其尺寸 a^6 的增加而增加,散射光的角度分布与瑞利散射有所不同。如果 $\theta = 1$,形状因子为 1。在其他方向上,形状因子的绝对值 $|R| < 1$,因此,前向散射具有最大值。在细胞核体积明显大于光波长的情况下,瑞利-甘斯近似解就失去作用,但可以替代性地使用范德胡斯特(式 10)或者米散射公式求解。图 2 可以直观地观察主要细胞和亚细胞结构大小和折射率信息。Mourant 等人^[27]使用光学性质类似于生物组织的聚苯乙烯球和脂肪乳剂的悬浮液进行了相关实验,表明可以运用基于米散射理论的弹性散射光谱来估计散射颗粒的尺寸。

2.3 散射分量的区分

2.3.1 背景模型

当白光照射到目标组织时,会形成两种主要散射分量:来自表皮层的单一散射分量和来自深层组织的多重散射分量。后者主要是进入组织内部产生的多次随机性散射,形成面积较大的散射光背景,即“漫射背景”,此现象会对上皮细胞光信号产生干扰。从目前的研究进展来看,大体上可以通过两种方法来去除背景干扰:使用背景模型和偏振光的方法。Perelman 等人^[12]就是用硫酸

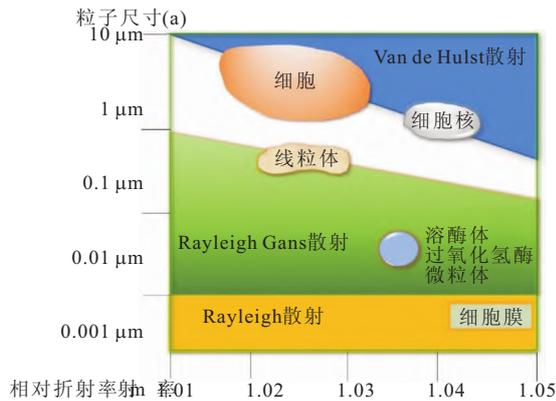


图 2 细胞和亚细胞结构的光学特性以及相关的近似值,可用于描述这些物体的光散射。未着色区域代表一个参数空间,需要一个精确的解才能得到精确结果

Fig. 2 Optical properties of cellular and subcellular structures and associated approximations that can be used to describe light scattering from these objects. The uncolored region represents a parameter space and requires an exact solution to get the exact result

钼漫射板来模拟漫射背景测得 T84 结肠癌细胞的特征性散射光谱。在收集到样品光谱数据后减去模型拟合数据得到单一散射分量,最后通过光学距离周期性分量的傅里叶变换获得胞核尺寸分布状况。通过与光镜测量数据对比证明了散射光谱对细胞核检测的高准确度,但这种准确性很大程度上取决于模型本身光吸收特性。Wallace 等人^[23]将内镜和 LSS 技术相结合对巴雷特食管粘膜进行了检测。他们以单位面积内超过 30% 的细胞核大于 10 μm 作为异型增生的指标,同时以专家的一致诊断和平均诊断作为比较标准。结果发现光谱检测结果与活检诊断结果高度一致。

LSS 作为一种非侵入性的光学工具可以提供细胞形态学信息,非常适合于癌症检测。但早期的 LSS 技术扫描深度有限(大约 100~200 μm),对于位置较深的细胞难以检测,并且对亚细胞结构的检测也比较困难。要想得到准确的光谱数据需要构建相应的物理模型,而准确性很大程度上取决于模型的理论参数,适用范围较窄。此外,有限的单次采集面积也限制了其在临床上的应用。

2.3.2 偏振光散射

Backman 等人^[13]开发了一种可以直接测量上皮细胞核光散射的技术:利用偏振光 LSS(polarized light scattering spectroscopy, PLSS)来消除

漫射背景带来的干扰。当偏振光进入组织时会被多次散射,因此失去了原来的偏振,一部分散射光返回到表面,产生去偏振的多重散射。相反,上皮细胞单次散射光的偏振被保留。因此,通过减去散射光的非偏振分量,可以容易地区分上皮细胞的光谱信息,进一步分析细胞核的尺寸分布。详细 LSS 光路模型如图 3 所示。由氙光灯发出的光源经过透镜进行准直,光束经过含有 11 个不同中心波长的滤光片,随后经过第一个偏振器形成偏振光,光束被镜面反射到样品上,样品反向散射的光被一对等焦距透镜收集。第二个偏振器可以旋转来调整偏振状态,CCD 相机置于透镜一倍焦距处收集散射信息。

Sokolov 等人^[14]将其应用到宫颈细胞和口腔粘膜,结果表明偏振反射光谱法在存在强漫反射背景和血红蛋白吸收的情况下依然可以准确检测上皮层的散射特性。Mourant 等人^[36]使用光纤探头对三种成纤维细胞的散射光谱进行了研究,发现生物组织对不同波长的光吸收度不同,光穿透的深度就会不同,所以具有强生物吸收性的波长可用于探测较浅的粘膜,而很少或没有被吸收的波长可用于探测更深层组织,可以根据血红蛋白对不同光波长吸收度的差异实现不同的探测深度。2010 年,Qiu 等人^[26]开发了一种称为内镜偏振扫描光谱(EPSS)的系统,与内镜结合进行多光谱扫描。他们用牛食管检测了 EPSS 仪器的性能,然后对病人进行了体内测量。对食管表面进行快速光学扫描和多光谱成像并记录数据,在 EPSS 数据收集点采集组织学标本(图 4)。将 EPSS 探查数据和对应活检部位的病理检测结果进行对比(图 5)后发现两种结果高度一致,灵敏度和特异度分别达到 92% 和 96%。

Epss 系统可以对整个食道表面进行快速扫描,并对上皮组织进行多光谱测绘,同时将数据分析软件与仪器结合以提供实施诊断信息。该系统同时整合了 PLSS 和漫反射光谱信息,提高了诊断能力。

在 PLSS 系统中,后向散射角度对细胞成分非常敏感,旋转偏振器可直接从上皮组织获得单次散射光,相较于初期的 LSS,细胞检测更加高效。然而,传统 PLSS 系统是首先获取上皮组织混合散射光的正交偏振光谱,然后提取单次散射光来推断上皮细胞核的形态信息,这使得系统的建造体积庞大且效率较低,特别是在内窥镜系统的构建

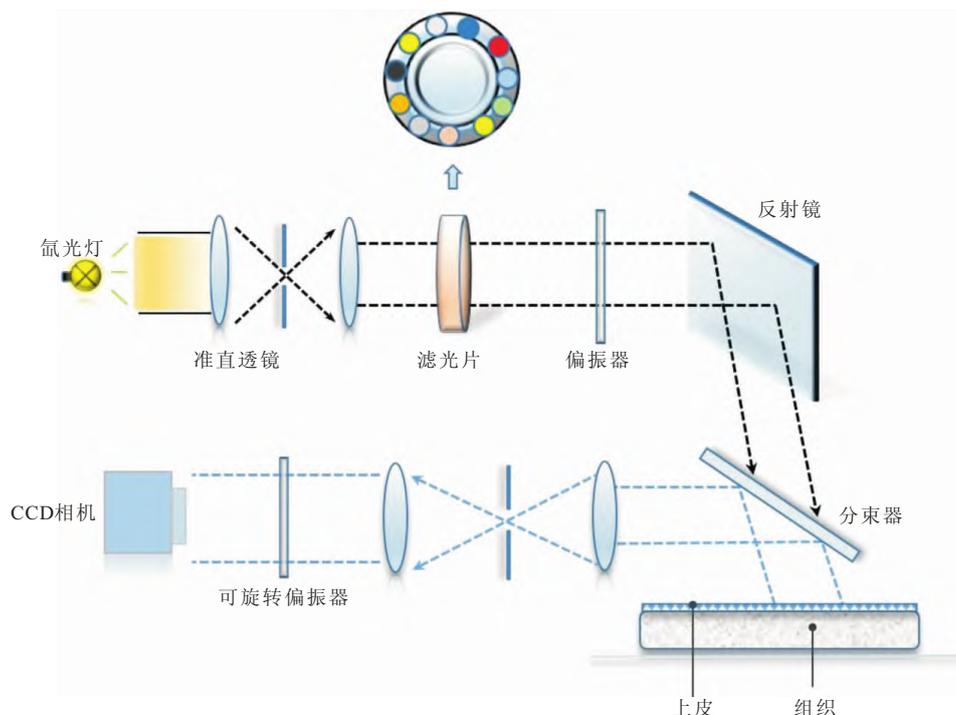


图 3 LSS 光路模型。滤光片有 11 个光波段, 450-700 nm 的中心波长, 选取的波长为 $\lambda_i = 532, 550, 568, 589, 620, 650, 671, 694$ nm

Fig. 3 LSS optical path model. Narrowband filters (11 optical bands, 450-700 nm), at $\lambda_i = 532, 550, 568, 589, 620, 650, 671, 694$ nm

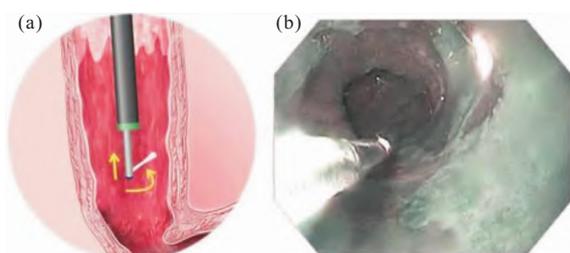


图 4 EPSS 食管内镜扫描的食管上皮。(a) 探针尖端从内窥镜工作通道中延伸; 箭头表示每次扫描前和扫描过程中探针尖端的线性和旋转运动。(b) 通过 EPSS 用户界面获取了内窥镜视频通道的图像, 扫描照明点出现在图像右上角的食道壁上。EPSS 探头尖端直径为 2.5 mm^[26]

Fig. 4 EPSS scanning esophageal epithelium during screening endoscopy. (a) Illustration depicting the probe tip extended from the endoscope working channel during the scan; arrows indicate linear and rotary motions of the probe tip before and during each scan, respectively. (b) Frame capture, obtained and shown via the EPSS user interface, of an image acquired by the endoscope video channel showing the actual EPSS probe tip during scanning of the esophageal epithelium of a patient with Barrett's esophagus during a clinical procedure. The scanning illumination spot is seen on the esophagus wall at the upper right of the image. The EPSS probe tip diameter is 2.5 mm^[26]

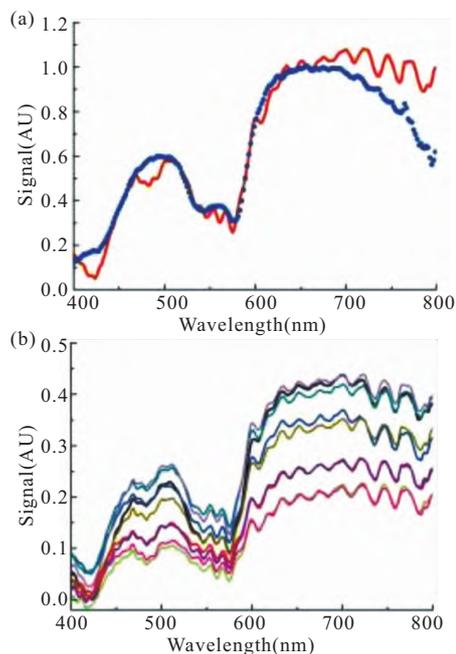


图 5 在常规筛查内窥镜检查中获得的 EPSS 光谱。(a) 用 EPSS 仪器从 Barrett's 食管病患者的单个空间位置采集的平行(实线红线)和垂直(虚线蓝线)偏振光谱。(b) 同一对象中十个不同位置的平行偏振光谱^[26]

Fig. 5 EPSS spectra acquired during routine screening endoscopy. (a) Parallel (solid red line) and perpendicular (dotted blue line) polarization spectra collected with the EPSS instrument from a single spatial location in a subject with Barrett's esophagus. (b) Parallel polarization spectra from ten different locations in the same subject^[26]

方面。此外,在传统的 PLSS 内窥镜成像系统中,成像功能是通过扫描实现的,在实际应用中,获取一个部位的单次散射光需要花费很长时间。Tuniaz 等人^[37]使用光谱调制技术建立了快照 PLSS 系统(snapshot PLSS),该系统使用光谱调制偏振器直接记录样品的单次散射光,使系统可以摆脱旋转偏振器的依赖。此外,使用连续滑动迭代法(CSIM)重建散射信号,使光谱分辨率非常

接近于光谱仪固有分辨率。快照 PLSS 系统如图 6 所示。宽带光经过光圈和透镜准直后,被反射至宽带偏振器产生偏振光并通过分束器落到样品上,来自样品的后向散射光经分束器引导至另外两个透镜和光圈,这一部分是将后向散射光收集在一个窄锥体空间(1°)内以确保主要散射光来自细胞核。收集的光首先由偏振调制器调制,然后由 OSA 记录调制的散射光。

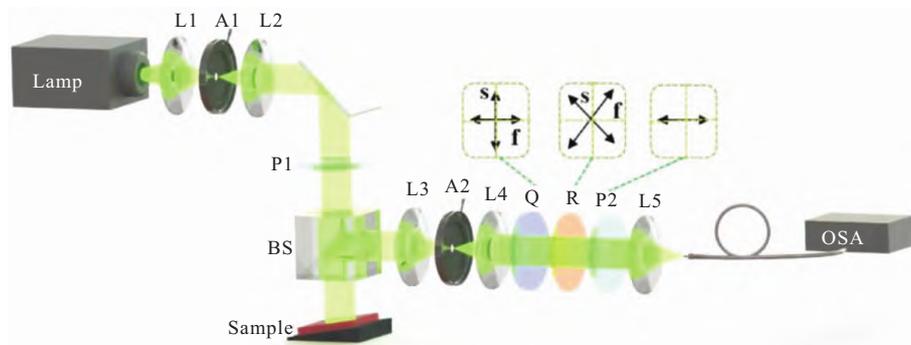


图 6 Snapshot PLSS 系统构造。光圈(L1、L2、L3、L4、L5);孔径(A1、A2);偏振器(P1、P2);分束器(BS);消色差四分之一波片(Q);缓速器(R);慢轴(s);快轴(f);光谱仪(OSA)

Fig. 6 Acronyms: Lens (L1, L2, L3, L4, L5); Aperture (A1, A2); Linear Polarizer (P1, P2); Beam-splitter (BS); Achromatic Quarter-Wave Plate (Q); Retarder (R); Slow axis (s); Fast axis (f); Optical spectrum analyzer (OSA)

为了评估仪器的性能和适用性,研究小组对聚苯乙烯微球溶液和人胃癌样本进行了检测,并与参考值和临床诊断结果进行了比较。发现快照 PLSS 的与传统 PLSS 的实验结果一致,拟合的颗粒大小分布也和供应商产品标准相符合。此外,该系统能够有效地从组织中获取肿瘤信息,准确地将健康组织与癌变组织区分开来。相较于传统 PLSS,快照 PLSS 不需要再依赖于旋转偏振器,系统构造更加完善,机械稳定性和检测效率得到提高。其简化的系统设计使内镜 PLSS 成本进一步降低,也为发展紧凑型内窥镜 PLSS 成像系统提供了可能。但是快照 PLSS 收集散射光的强度较低导致信噪比较低,在某些情况下,重建的细胞分布可能与实际分布有所差异。此外,系统采用的反演算法的能力对拟合结果也有一定的影响,从光谱中反演参数需要较长的时间。

2.4 亚细胞层面

研究证明,核内的亚细胞成分也和某些肿瘤的形成密切相关^[15]。在现代细胞生物学光学技术领域长期存在的一个难题就是无法表征尺寸小于光波长的亚细胞结构,即缺少一种可以在亚微米水平上监视细胞和亚细胞器同时又不会破坏其功

能的技术。Mourant 等人^[35]研究了悬浮液中肿瘤细胞散射光谱的角度依赖性。结果表明,散射角大于 110° 的散射源来自胞内 DNA 成分。此外,细胞核对整个细胞光散射贡献分数不会超过 40%,其余大部分则来自于线粒体等亚细胞结构。Fang 等人^[17]开发了一种新方法,能够以 20 nm 的精度测量小至 100 nm 的细胞器,具体构造如图 7 所示。用悬浮在甘油中的聚苯乙烯微球对装置进行校准,随后对离心提取的细胞核和细胞器进行了探测,最后用 LSS 测定的粒度分布与用电子显微镜测定的粒度分布进行了比较。结果表明,这项技术可重建出细胞器复杂的多峰分布,大小范围 100 nm 到 400 nm 不等,与显微镜的测量分布非常一致。

后来,Mulvey 及其同事^[18,19]采用了同样的方法来监测细胞的凋亡过程。他们发现,在诱导细胞凋亡后的 10 到 15 分钟就可以检测到散射光谱的变化,这也表明光散射光谱可以依靠细胞形态学变化来检测细胞凋亡状态。

2.5 用共聚焦光吸收和散射光谱(CLASS)研究活体细胞

Fang^[20],Itzkan^[21]和 Le Qiu^[22]等人创造性地

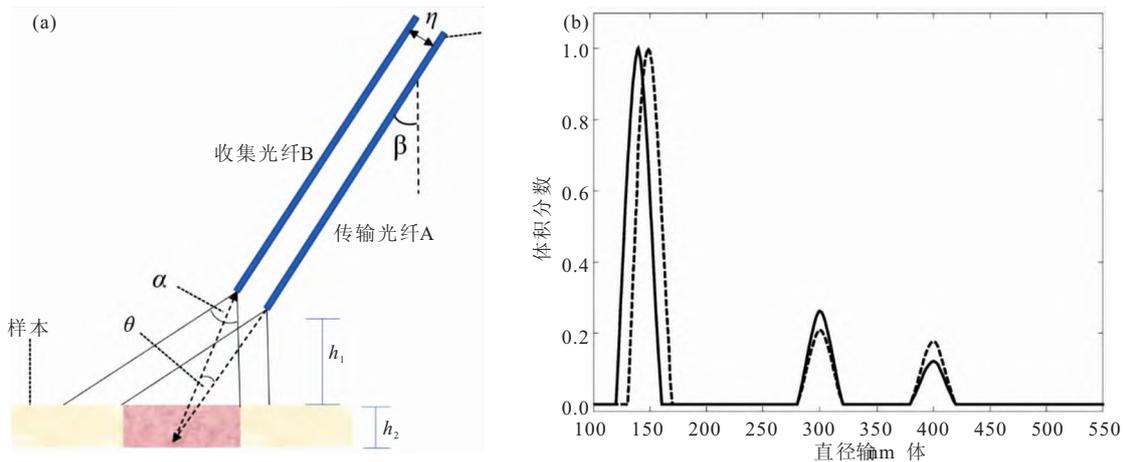


图 7 a. LSS 细胞测试图。传输光纤 A 与接收光纤 B 的间距为 $\eta \approx 35 \mu\text{m}$ ；传输光纤(纤芯直径 $\rho = 200 \mu\text{m}$)与样本(厚度 $h_2 \approx 2 \text{mm}$)之间距离 $h_1 \approx 4 \text{mm}$ ；反向散射光(散射角 $\theta \approx 170^\circ$)由收集光纤 B 收集,角度 α 由光纤探针口径 NA 决定;暗色区域为收集单一反向散射光区域;探针与法线夹角为 $\beta \approx 25^\circ$ 。b. 细胞器大小分布的比较。实线是从 LSS 光谱提取,虚线是使用电子显微镜测量的分布^[17]

Fig. 7 a. LSS Test diagram. The distance between the transmission fiber A and the receiving fiber B is $\eta \approx 35 \mu\text{m}$; The distance between the transmission fiber (core diameter $\rho = 200 \mu\text{m}$) and the sample (thickness $h_2 = 2 \text{mm}$) is $h_1 \approx 4 \text{mm}$; Backscattered light (scattering angle $\theta \approx 170^\circ$) is collected by the receiving fiber, The angle α is determined by the probe caliber NA; The dark region is a single backscattered light region; Angle between probe and normal is $\beta \approx 25^\circ$; b. Comparison of the size distributions. The solid line is the distribution extracted from the LSS spectrum and the dashed line is the distribution measured using electron microscopy^[17]

将 LSS 与显微镜结合起来形成共聚焦光吸收和散射光谱(CLASS)显微镜。这是一种可以在不引入外源标记的情况下观察活体细胞中亚微米结构的 光学方法,可以达到电子显微镜的精度。后来,Le Qiu 等人^[34]在现有基础上增加了宽视场荧光显微镜臂,系统功能进一步完善。图 8A 为 CLASS 的详细构造图。超连续谱激光器发出的宽带光源经光纤传输至虹膜光圈,一部分通过分束器和消色差物镜照射到样品上,样品安装在电动平移工作台上进行逐点扫描。样品反射光经同一物镜返回并依次经过分束器和翻转镜反射至成像 CCD。另一部分光被反射至参考光纤然后传输至光谱仪。透射光通过消色差反射物镜传递到样品,从样品反向散射的光被物镜收集并被分束器反射到光纤,通过光纤传输到光谱仪。CLASS 仪器增加了荧光显微镜系统。宽带光经翻转镜反射,通过光纤传输到激发滤光器,随后依次经过双色镜和翻转镜反射,通过物镜照射到样品。反射的荧光被物镜收集并被翻转镜和双色镜导向发射滤光器,随后在成像 CCD 上形成图像。

为了检验 CLASS 的检测能力,对 16HBE14o 人支气管上皮细胞进行了光谱成像。用二十二碳六烯酸(DHA)培养 24 小时来诱导细胞凋亡,对不

同状态的支气管上皮细胞进行了重建。图 8B 中 a 为未经处理的细胞,b 是用 DHA 处理 24 小时后的凋亡细胞。球体直径表示根据光谱重建的细胞尺寸,灰度表示折射率,两者的亚细胞结构在空间分布上具有明显差异。Yang 等人^[38]用 CLASS 显微检测液基宫颈细胞样品中的光散射差异。她们对收集到的宫颈正常和癌细胞样本进行了检测,通过建立新的模型拟合相对强度曲线,发现在特定波长下非 HSIL(高分化鳞状上皮内病变)和 HSIL 具有显著差异。然而,本研究也存在一定的局限性。例如,两例 LSIL(低分化鳞状上皮内病变)的相对强度较高。其原因可能是细胞核重叠或分裂所致。此外,4 例 HSIL 与 LSIL 优化曲线无差异。

CLASS 可以在亚细胞尺度上对活体细胞进行无创研究,相比较于多色荧光成像显微镜,CLASS 可以在不引入外源标记的前提下准确重建出细胞器尺寸以及空间分布,不会对细胞功能产生影响。不仅可以提供细胞器大小信息,还可以提供细胞的生化和物理特性信息。更重要的是,它能够检测远远超出衍射极限的粒子,实时检测活细胞内各种类型的细胞器。

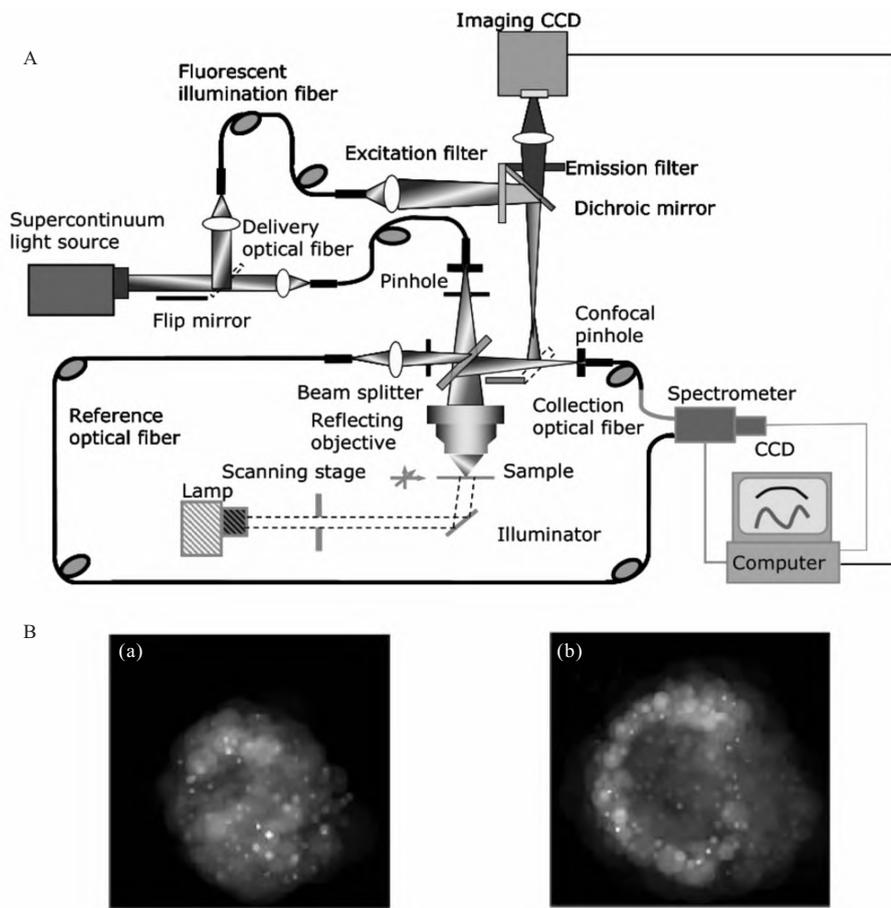


图 8 a. CLASS 装置原理图; b. 用 CLASS 显微镜光谱重建的两个 16HBE14o 人类支气管上皮细胞图像^[22]

Fig. 8 a. Schematic of the prototype CLASS microscope; b. Crossectional images of two 16HBE14o-human bronchial epithelial cells reconstructed from the CLASS microscope spectra^[22]

3 光学诊断技术在早期癌症诊断中的应用

口腔癌是头颈部最常见的恶性肿瘤之一,若手术治疗不彻底常导致术后复发。早期检测口腔癌的形态学变化尤为重要。Müller 等人^[28]对 15 例不同程度恶性肿瘤患者的 91 个组织位点和 8 名健康志愿者分别进行了光谱分析。通过将胶原和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)的荧光光谱与 337 nm 和 358 nm 激光激发的组织固有荧光光谱进行线性组合,并利用本征荧光光谱获得了关于口腔组织天然荧光团的生化信息(图 8)。这些光学提取的生化或结构信息,不需要组织切除,即可用于组织异常诊断。通过结合这三种技术提供的信息,研究出了一种称为 Trimodal 光谱的方法,其灵敏度和特异性分别达到 96% 和 96%,用于区分癌组织和正常组织。

Mourant 等人于 2007 年^[29]将 LSS 技术应用于子宫颈癌的癌前检查。他们用一种新研制的光

纤探头对 36 例患者的宫颈上皮细胞进行了光谱采集。具体构造如图 10 所示,探针的远端与组织接触,光纤 D1 和 D2 分别是偏振的和非偏振的光传输光纤。当 D2 照射组织时,光纤 2 会收集散射的非偏振光(图 10a)。当光纤 D1 照射组织时,光纤 1、3 和 4 用于收集散射光,其中光纤 3 用于收集垂直于入射光偏振的偏振光(图 10b 和 10c)。光谱数据用 ROC 曲线和 Logistic 回归模型处理后与病理学检查结果进行了比对,发现高度鳞状上皮内病变(HSIL)与非 HSIL 的敏感性和特异性达到 100% 和 80%。该技术只需低水平的光激发功率和几秒钟的点测量时间就可以提供实时结果,所以本身并不会给病人带来任何不适,而且测量相当快捷高效。

在 2017 年 Perelman 等人^[30]将 LSS 技术和空间门控光纤探针结合起来预测胰腺囊性病变的恶性程度。他们开发了一种新的仪器,在几秒钟内可从每个囊肿内获得多个无创光学“活检”光谱,

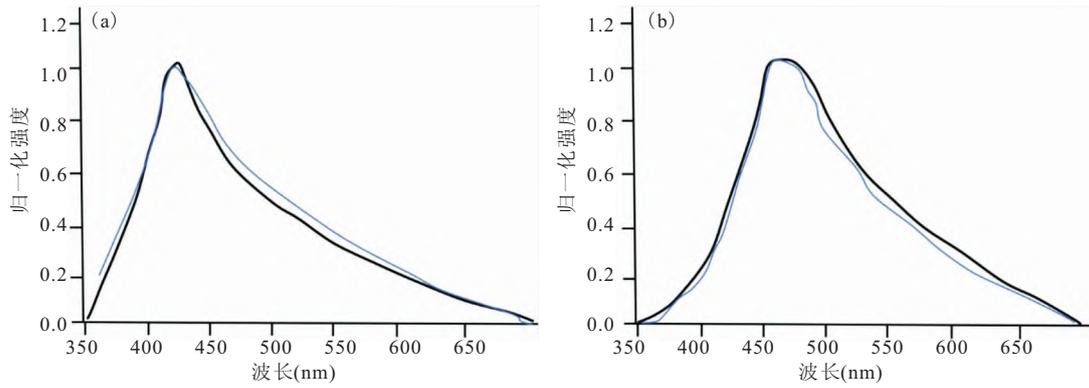


图 9 在 337 nm 光波长处激发并用多元曲线分辨率提取的两种光谱成分的固有荧光光谱。(a)光谱成分 1(细线),与粘膜下层胶原(粗线)比较。(b)光谱成分 2(细线),与肿瘤细胞颗粒(粗线)的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)进行比较^[28]

Fig. 9 Intrinsic fluorescence spectra of the 2 spectral components excited at 337 nanometers (nm) and extracted with multivariate curve resolution. (A) Spectral component 1 (thin line), compared with collagen of the submucosa (thick line). (B) Spectral component 2 (thin line), compared with nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) of a tumor cell pellet (thick line)^[28]

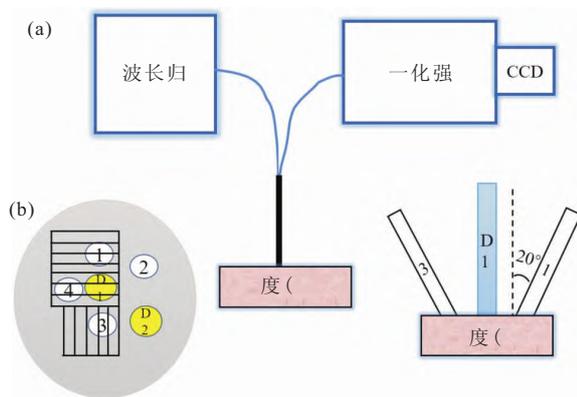


图 10 测量系统示意图。(a)钨灯的光通过光纤输送到组织中。通过组织传播的光由分光仪分散的光纤收集,并入射在 CCD 相机上。(b)探头的远端。光纤 1、3、4 和 D1 上的线表示光偏振方向。光纤 D2 和 2 分别是非极化输送和收集纤维。(c)某些纤维相对于组织呈 20 度角^[29]

Fig. 10 (a) Schematic of the measurement system. Light from tungsten lamps is delivered to the tissue by fiber optics. Light that has propagated through the tissue is collected by fiber optics dispersed by the spectrograph and incident on the CCD camera. (b) Distal end of the probe. The lines over fibers 1, 3, 4 and D1 indicate the direction of light polarization. Fibers D2 and 2 are unpolarized delivery and collection fibers, respectively. (c) Schematic showing the angle of some of the fibers with respect to the tissue^[29]

表现明显优于现有的细胞学和囊肿液 CEA 标记。在 14 例胰腺囊肿受试者的常规 EUSFNA 手术

中,使用空间门控 LSS 进行了临床体内测量(图 11)。结果表明,所有具有明确诊断的囊肿都被 LSS 技术准确识别为恶性肿瘤。在被明确诊断为囊肿的病例中,该技术的总体准确率达到 95%。2018 年 Le Qiu 等人^[40,41]阐述了光门控的内镜下光散射光谱(LSS)在胰管恶性肿瘤检测中的应用。对于位于腹部深处难以获取病理信息的器官,空间门控是首选的方法,并且带有光门控的多光谱内窥镜检查是快速、廉价和准确的。这项技术可以准确地识别早期癌前病变和早期胃肠道癌症,以帮助患者获得更早和更有效的治疗。

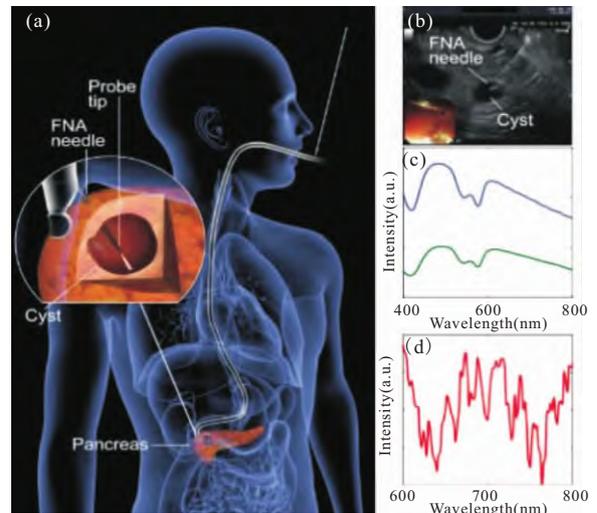


图 11 内镜超声引导下细针抽吸(EUS-FNA)过程中的体内测量^[30]

Fig. 11 Endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration (EUS-FNA) in vivo measurement^[30]

2018 年 Qiu 等人^[31]开发了一个多光谱光散射内窥镜成像系统,准确地检测了整个食道内壁的亚细胞异常增生的变化。通过分析从上皮细胞散射的光来检测和识别不可见的异常增生部位,并使用内窥镜兼容的准直宽带光束快速扫描整个食管内壁。实验证明此技术发现发育不良部位的准确率为 90%,表明多光谱光散射内窥镜成像可以准确检测食管癌前病变。此外,使用宏观光谱测量来分析微观的亚细胞结构,可以在几分钟内对

整个食管表面进行快速的内窥镜兼容扫描,不需要外部造影剂,安全度高。

Qiu 等人^[16]将 LSS 技术用于直接快速检测和鉴定全血细菌。他们用四种会引起脓毒症的细菌:大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌,在浓度为 10^7 CFU/mL 水悬液进行了 LSS 实验,得到的光散射图谱如图 12 所示。可见菌株的 LSS 光谱图相当独特,可以明显区分每种类型的细菌。

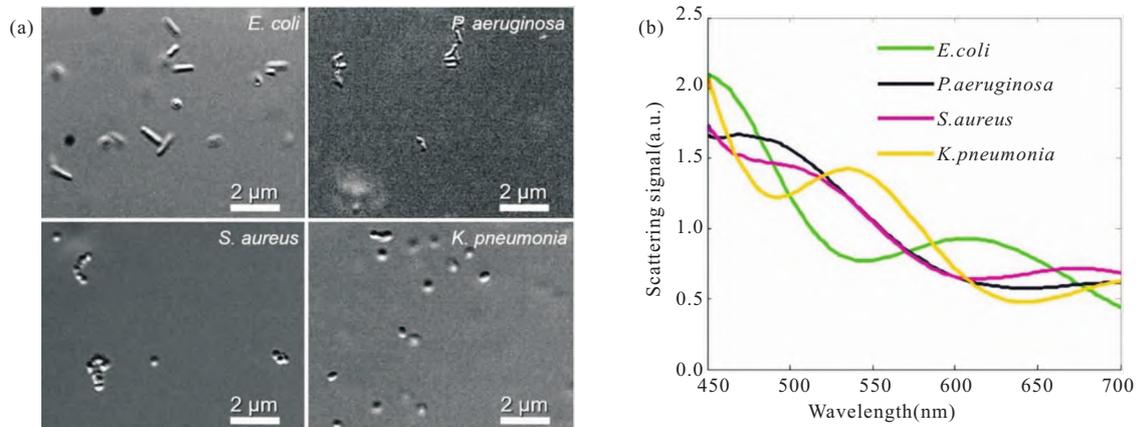


图 12 大肠杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌和肺炎杆菌的 4 株菌株的显微照片(A)和 LSS 光谱(B)

Fig. 12 Microphotographs (a) and LSS spectra (b) of four bacterial strains: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, and *K. pneumoniae* ^[16]

为了验证 LSS 技术是否能够在轻度脓毒症的细菌浓度下快速检测和鉴定全血样本中的菌株,他们还对全血样本进行了测量。实验证明,LSS 技术在鉴定血液样本中的细菌方面的总体准确率约为 97%,整个过程时间仅需 3 分钟,这使得该技术成为应用于医院或门诊快速检测和识别全血中的细菌最有前景的方法之一。

2021 年 Knighton 等人^[39]将 LSS 结合机器学习算法来识别心肌细胞核密度。他们开发了一个带有光纤探头的 LSS 系统,并将其用于测量绵羊模型的心脏组织。用光谱聚类和卷积神经网络(CNN)分析从相同心脏组织获得的光谱,以评估 LSS 表征心肌细胞核密度的可行性。结果表明 CNN 对低、中、高三组不同细胞核密度光谱的分类准确率分别为 $95.00\% \pm 11.77\%$ 。揭示了分类精度对波长范围和光谱采样的敏感性。

4 总结和展望

在过去,人们不断在寻找随机活检的替代方

法,以便准确地检测和诊断各种器官的异型增生和其他癌前病变。光学技术非常适合癌前组织的检测,因为它们不需要切除组织,可以在体内进行,允许实时做出诊断,并且可以用于检测尺寸小于 $1 \mu\text{m}$ 的微小病变。虽然大多数人体器官都可以通过光学技术进行检查,但光学技术特别适合于诊断通过光纤容易接触到的器官的病理情况,如胃肠道、呼吸道、泌尿系和生殖道的器官。不同的光谱技术对不同的组织属性敏感。例如,激光诱导荧光光谱和拉曼光谱对分子属性很敏感,而漫反射光谱和光散射光谱非常适合于在细胞和亚细胞水平上提供关于组织形态结构的信息。现阶段癌症的早期诊断以活检为主,通过引入荧光标记来增强细胞对比度,但外源标记可能会影响细胞功能,对诊断结果产生影响。由于癌前病变的病理诊断主要基于组织形态的变化,所以 LSS 有望在这些病变的诊断和检测中发挥作用。LSS 其本身的多光谱特性能够测量比衍射极限小得多的内部细胞结构,不会损坏细胞,也不需要引入传统

光学显微镜所需的造影剂。这种成像结果准确率高,减少了病人的痛苦,同时能减少活检所需的成本,可以真正意义上实现原位而非体外检测。然而,为了达到更广的适用性,LSS 技术应该扩展到能够实时探测各种内部器官的上皮细胞,同时与临床内窥镜相兼容的高分辨率成像模式。与现有内窥镜兼容的新设备将扫描医生感兴趣的目标区域,更大程度地提高临床内窥镜技术的工作效率,同时结合必要的软件和算法,以获得关于组织结构的客观数据,这些数据可以实时转化为诊断信息。这将使医生能够在可疑部位进行活检,最大限度地减少在非病变部位进行活检的次数,减少取样误差。相信这项技术在不久的将来会逐渐成熟并广泛应用于早期癌症的临床检查。因此,LSS 技术将向着无创,实时快速,灵敏度高,适用范围广,方便操作等方向发展,为临床诊断提供辅助指导,这样将会大大增加癌症检出率。

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, *et al.* Global Cancer Statistics 2020; GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. [J]. *A Cancer Journal for Clinicians*, 2021, 71:209-249.
- [2] Gurjar R S, Backman V, Perelman L T, *et al.* Imaging human epithelial properties with polarized light-scattering spectroscopy. [J]. *Nature Medicine*, 2001, 7:1245-1248.
- [3] Mil G. Beiträge zur optik trüber medien, speziell kolloidaler metallösungen[J]. *Annals Of Physics*, 1908, 25.
- [4] Newton, R G. *Scattering theory of waves and particles*. Springer, 1982, 10.1007/978-3-642-88128-2.
- [5] Hon J W, Strutt X V. On the light from the sky, its polarization and colour[J]. *Philosophical Magazine Series 4*, 1871.
- [6] Rayleigh L. On the scattering of light by small particles[J]. *Philosophical Magazine*, 41 (275): 447-454.
- [7] Newton R G. *Scattering. (Book Reviews: Scattering Theory of Waves and Particles)* [J]. *science*, 1967.
- [8] Van D, Twersky V. Light scattering by small particles[J]. *Physics Today*, 1957, 10(12):28-30.
- [9] Perelman L T, Backman V. *Light Scattering Spectroscopy of Epithelial Tissues: Principles and Applications*. 2016.
- [10] Chance B. Contribution of the mitochondrial compartment to the optical properties of the rat liver: a theoretical and practical approach [J]. *Biophysical Journal*, 1994.
- [11] Beuthan J, Minet O, Helfmann J, *et al.* The spatial variation of the refractive index in biological cells [J]. *Physics in Medicine and Biology*, 1996, 41 (3):369-382.
- [12] Perelman L T, Backman V, Wallace M, *et al.* Observation of Periodic Fine Structure in Reflectance from Biological Tissue: A New Technique for Measuring Nuclear Size Distribution[J]. *Physical Review Letters*, 1998, 80(3):627-630.
- [13] Backman V, Gurjar, *et al.* Polarized light scattering spectroscopy for quantitative measurement of epithelial cellular structures in situ [J]. *Selected Topics in Quantum Electronics, IEEE Journal of*, 1999, 5(4):1019-1026.
- [14] Sokolov K, Drezek R, Gossage K, *et al.* Reflectance spectroscopy with polarized light: is it sensitive to cellular and nuclear morphology[J]. *Optics Express*, 1999, 5(13):302-317.
- [15] Cotran R S, Kumar V. *Robbins pathologic basis of disease*[M]. W. B. Saunders, 1999.
- [16] Qiu L, Zhang L, Horowitz G L, *et al.* Rapid detection and identification of bacteria directly from whole blood with light scattering spectroscopy based biosensor[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2021, 346: 130489.
- [17] Fang H, Ollero M, Vitkin E, *et al.* Noninvasive sizing of subcellular organelles with light scattering spectroscopy[J]. *Selected Topics in Quantum Electronics, IEEE Journal of*, 2003, 9(2):267-276.
- [18] Mulvey C S, Zhang K, Liu W H B, *et al.* Wavelength-dependent backscattering measurements for quantitative monitoring of apoptosis, Part 1: early and late spectral changes are indicative of the presence of apoptosis in cell cultures[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2011, 16(11):117001.
- [19] Mulvey C S. Wavelength-dependent backscattering measurements for quantitative monitoring of apoptosis, Part 2: early spectral changes during apoptosis are linked to apoptotic volume decrease[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2011, 16(11):117002.
- [20] Fang H, Qiu L, Vitkin E, *et al.* Confocal light absorption and scattering spectroscopic microscopy [J]. *Applied Optics*, 2007.
- [21] Itzkan I, Qiu L, Fang H, *et al.* Confocal light absorption and scattering spectroscopic microscopy

- monitors organelles in live cells with no exogenous labels[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007.
- [22] Qiu L, Wax A, Backman V, *et al.* Studying cells in vivo with confocal light absorption and scattering spectroscopy (CLASS)[J]. *Biomedical Applications of Light Scattering*, 2007, 6446:64460F-64460F-8.
- [23] Wallace M B, Perelman L T, Backman V, *et al.* Endoscopic detection of dysplasia in patients with Barrett's esophagus using light-scattering spectroscopy[J]. *Gastroenterology*, 2000, 119(3): 677-682.
- [24] Dr C, Dr G, Thomas P J, *et al.* Size-Dependent Chemistry: Properties of Nanocrystals[J]. *Chemistry—A European Journal*, 2002, 8(1):28-35.
- [25] Riddell R H, Goldman H, Ransohoff D F, *et al.* Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical applications. *Human Pathology*. 1983 Nov; 14(11): 931-968.
- [26] Qiu L, Pleskow D K, Chuttani R, *et al.* Multispectral scanning during endoscopy guides biopsy of dysplasia in Barrett's esophagus. [J]. *Nature Medicine*, 2010, 16(5):603.
- [27] Mourant J R, Fuselier T, Boyer J, *et al.* Predictions and measurements of scattering and absorption over broad wavelength ranges in tissue phantoms [J]. *Applied optics*, 1997, 36(4): 949-957.
- [28] Müller M G, Valdez T A, Georgakoudi I, *et al.* Spectroscopic detection and evaluation of morphologic and biochemical changes in early human oral carcinoma[J]. *Cancer*, 2010, 97(7):1681-1692.
- [29] Mourant J R, Bocklage T J, Powers T M, *et al.* In vivo light scattering measurements for detection of precancerous conditions of the cervix. *Gynecologic Oncology*, Vol. 105, No. 2, 01.05.2007, p. 439-445.
- [30] Zhang L, Pleskow D K, Turzhitsky V, *et al.* Light scattering spectroscopy identifies the malignant potential of pancreatic cysts during endoscopy. [J]. *Nat Biomed Eng* 1, 0040 (2017).
- [31] Qiu L, Chuttani R, Pleskow D K, *et al.* Multispectral light scattering endoscopic imaging of esophageal precancer [J]. *Light: Science & Applications*, 2018, 7(4): 17174-17174.
- [32] Zhang J, Fan Y, He M, *et al.* Accuracy of Raman spectroscopy in differentiating brain tumor from normal brain tissue[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(22): 36824.
- [33] Zhai L, Adlhart C, Spano F, *et al.* Prediction of steam burns severity using Raman spectroscopy on ex vivo porcine skin[J]. *Scientific reports*, 2018, 8(1): 1-11.
- [34] Qiu L, Wax A, Backman V, *et al.* Studying cell dynamics and function with CLASS microscopy[J]. *Proceedings of SPIE -The International Society for Optical Engineering*, 2008, 6864:68640T.
- [35] Mourant J R, Canpolat M, Brocker C, *et al.* Light scattering from cells: The contribution of the nucleus and the effects of proliferative status[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2000, 5(2):131-137.
- [36] Mourant J R, Johnson T M, Freyer J P, Characterizing Mammalian cells and cell phantoms by polarized backscattering fiber-optic measurements. [J]. *Applied Optics*, 2001, 40: 5114-23.
- [37] Tuniyazi A, Mu T, Jiang X, *et al.* Snapshot polarized light scattering spectroscopy using spectrally - modulated polarimetry for early gastric cancer detection[J]. *Journal of Biophotonics*, 2021, 14(9): e202100140.
- [38] Yang L, Liu W T, Hao W, *et al.* Separation of Normal and Premalignant Cervical Epithelial Cells Using Confocal Light Absorption and Scattering Spectroscopic Microscopy Ex Vivo[J]. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 2011(3): 214781.
- [39] Knighton N J, Cottle B K, Tiwari S, *et al.* Toward cardiac tissue characterization using machine learning and light-scattering spectroscopy[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2021, 26(11): 116001.
- [40] Qiu L, Zhang L, Turzhitsky V, *et al.* Light Scattering Spectroscopy Diagnoses Pancreatic Cystic Lesions In Vivo[C] *Clinical and Translational Biophotonics*. Optical Society of America, 2018: CF2B. 4.
- [41] Qiu L, Zhang L, Turzhitsky V, *et al.* Multispectral endoscopy with light gating for early cancer detection [J]. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, 2018, 25(1): 1-9.