

分子超光谱成像系统应用于糖网病药物疗效研究

刘洪英¹, 李庆利¹, 胥亮¹, 王依婷², 刘锦高¹, 薛永祺³

(1. 华东师范大学极化材料与器件教育部重点实验室, 上海 200241;

2. 华东师范大学科学与技术跨学科高等研究院, 上海 200062;

3. 中国科学院上海技术物理研究所, 上海 200083)

摘要:将成像技术和光谱技术相结合,再配合显微镜技术,研制了基于AOTF(acousto-optic tunable filters)的分子超光谱成像系统.使用该系采集了正常、糖尿病和EPO(erythropoietin,促红细胞生长素)药物治疗的大鼠视网膜组织切片的分子超光谱图像数据.通过对正常组、糖尿病组、药物治疗组共30例样本的分子超光谱图像数据进行处理,获得了3组样本的单波段图像和伪彩色合成图像,并提取了各组样本外核层的典型透射光谱曲线.从图像上分析各组ONL(outer nuclear layer,外核层)的厚度,由大到小依次为正常组、治疗组、糖尿病组,由于糖尿病会引起视网膜外核层细胞凋亡和厚度减少,实验结果表明经EPO治疗后可增加视网膜外核层的厚度.从光谱上分析各组的透射强度,糖尿病大鼠视网膜外核层组织在550~1000nm光谱范围内的透射强度整体高于正常组,经EPO治疗后,透射强度介于正常组和糖尿病组之间;通过光谱相似性分析,治疗组与正常组之间的光谱相似性高于糖尿病与正常组.实验结果表明EPO能减少视网膜外核层细胞凋亡,对糖网病大鼠有一定的疗效.因而分子超光谱成像系统可以作为一种新的手段,辅助科研人员对糖网病的发病机理和致盲原因及药物疗效进行研究.

关键词:糖网病;分子超光谱成像系统;促红细胞生长素;外核层;光谱角

中图分类号:0433.4 **文献标识码:**A

Evaluation of erythropoietin efficacy on diabetic retinopathy based on molecular hyperspectral imaging (MHSI) system

LIU Hong-Ying¹, LI Qing-Li¹, XU Liang¹, WANG Yi-Ting²,

LIU Jin-Gao¹, XUE Yong-Qi³

(1. Key Laboratory of Polar Materials and Devices, East China Normal University, Shanghai 200241, China;

2. Institute for Advanced Interdisciplinary Research (IAIR), East China Normal University, Shanghai 200062, China;

3. Shanghai Institute of Technical Physics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200083, China)

Abstract: Integrate imaging technology, spectrum technology and microscope, a novel molecular hyperspectral imaging (MHSI) system based on AOTF (acousto-optic tunable filters) was presented. The system was used to capture hyperspectral images of rat retinal sections selected from three groups: normal (N), diabetic (D), and EPO-treated (E0). By processing hyperspectral images data of 30 samples, single band images and the pseudocolor images of N, D, E0 group are gained. Typical spectra curves of the ONL cells of N, D, E0 are extracted. By analyzing these images, descending order of the ONL thickness is N, E0, D. The experimental results cite that the ONL thickness of E0 group will be increased after EPO treated. By analyzing these spectrums, transmission intensity of D group is generally higher than that of N group in the spectral field from 550 nm to 1000nm and transmission intensity of E0 group is in the middle of D and N. By analyzing spectrum relations, results show the spectral signature of the E0 group was more similar to that of N than that of D to N. The above results suggest EPO may prevent cell apoptosis and has protective effect on rat DR at a certain level. MHSI system may probably provide a potential approach to researching pathogenesis, causes of blindness and drug efficacy of DR in future.

收稿日期:2010-12-21,修回日期:2011-06-18

Received date: 2010-12-21, revised date: 2011-06-18

基金项目:国家自然科学基金[量子点标记的肿瘤新生血管双模分子成像及识别方法研究(61177011);荧光磁性复合量子点可控制备及其在多模成像中的应用研究(60976004);分子光谱成像的生物组织定量检测机理与方法研究(60807035)]

Foundation item: Supported by the National Natural Science Foundation of China [Multimodality Molecular Imaging of Tumor Neovascularization Labeled by Quantum Dots (grants No. 61177011); Controllable Preparation of Fluorescent Magnetic Composite Quantum Dots and Its Applications in Multimodality Imaging (grants No. 60976004); Mechanism of Molecular Hyperspectral Imaging Technology for Biomedical Quantitative Analysis (grants No. 60807035)]

作者简介:刘洪英(1975-),女,河南信阳人,华东师范大学讲师,博士,主要研究领域为多维信息获取技术与应用. E-mail:hyliu@ee.ecnu.edu.cn.

Key words: Diabetic retinopathy; MHSI; EPO; ONL; Spectral Angle

PACS: 07.05. Rm

引言

糖尿病现已成为继心血管疾病和肿瘤之后的第三大疾病,可引起心脑血管病、肾功能衰竭、肢端坏疽等病变,其中糖尿病引发的糖尿病视网膜病变(简称糖网病)是一种严重的并发症,是全球性工作人群的主要致盲原因^[1-2]。在糖网病的各种病理生理改变中,细胞凋亡是一个重要的组成部分,但针对细胞凋亡的治疗却被忽略^[3]。目前,临床上尚无针对早期糖网病的有效治疗方法,当前的激光治疗或手术治疗基本是针对相对晚期糖网病的治疗,效果并不理想,因为这些治疗手段并不能解除糖网病的发病原因,均不能有效控制疾病的进程和预防复发^[3]。因此深入了解糖网病的发病机制及致盲原因并寻找有效的早期治疗方法,是目前国际生物医学研究领域的热门课题和重要挑战^[4]。

EPO 是含有 165 个氨基酸的糖蛋白^[5]。研究表明,EPO 不但影响造血系统,而且在中枢神经系统的营养及保护中也发挥着重要作用^[6]。许多文献报道了 EPO 在多种视网膜损伤的动物模型中发挥保护作用,如:促进视网膜节细胞的生长、保护视神经横断眼的节细胞^[7]、保护视网膜免受缺血-再灌注损伤^[8]、防止光诱导损伤等^[9]。近年有文献报道玻璃腔体内注射 EPO 能有效地保护视网膜神经元,从而达到对早期实验性糖网病的预防和治疗作用^[3,10]。

在评估 EPO 对糖网病大鼠的治疗作用时,常采用生化方法或光学显微镜观察的方法,生化方法操作复杂、周期长^[3];光学显微镜方法只能对病理变化进行定性描述,很难将发生病理变化的表现与导致这种变化的生化基础联系起来。针对这种现状,本文把自行研制的分子超光谱成像系统应用于大鼠视网膜组织切片的观察。不仅可以提供样本的图像信息,更可以提供与样本的生化特性密切相关的光谱信息,从而辅助研究人员从生化角度对糖网病的发病机制进行研究,并评估 EPO 对糖网病的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 样本及制备

选择个体质量在 230 ~ 280 g 健康成年雄性 Wistar 大鼠 32 只。选择屈光间质清,瞳孔等大等圆,

对光反应好,眼底无异常大鼠。采用 STZ (Streptozotocin) 注射的方法建立糖尿病大鼠模型:从其中随机选择 8 只作为正常对照组(编号 N);剩余 24 只腹腔内注射 STZ 溶液诱发糖尿病,2 周后从中选择 12 只作为糖尿病组(编号 D),剩余 12 只,采用玻璃腔内注射 EPO 的方法治疗后,作为药物治疗组(编号 E0)。N、D 组在饲养 14 天后,及 E0 组在饲养 45 天后全身麻醉,脱颈处死后取出眼球;将取出的眼球放入 4% PBS(磷酸盐溶液)缓冲的多聚甲醛固定 24 h 以上;在解剖显微镜下,去掉眼前节(包括角膜、虹膜和晶状体),并将眼球外组织剔除掉,剩余眼杯;将眼杯放入 10%、20% 和 30% PBS 缓冲的蔗糖溶液中梯度脱水;在冰冻切片机上进行切片,获得经过视神经的视网膜冰冻切片样本;使用 HE 试剂对样本切片进行染色。

1.2 基于 AOTF 的分子超光谱成像系统

分子超光谱成像系统是有机结合分子成像技术^[11]和超光谱技术,能同时提供生物组织样本图谱两方面的信息,对检测目标进行定性、定量和定位的描述,可以实现对某些病理变化的早期诊断。

系统主要是由基于 AOTF 的分光计、显微镜、面阵 CCD、图像采集卡和计算机几部分组成。AOTF 是一种电光调制器件,通过控制施加在 AOTF 上的射频频率来控制 AOTF 对入射窄带光的衍射,而透过 AOTF 的衍射光强度可以通过改变射频信号的功率来进行精密、快速地调节。它的光谱分辨率在某些范围很高,而且无机械移动部件,波长调节速度快、灵敏度高,比较容易实现与某些医学上现有的光学检测设备的集成(如显微镜、内窥镜等)^[12]。

图 1 是系统框图,光源经聚光器聚光后经物镜进入分光计;AOTF 的分光计只允许单波段的光通过进入面阵 CCD,分光计被 RF 射频驱动器控制,计算机通过串口控制射频驱动器,一次设置只允许特定波长的光通过,从而达到分光的目的,通过连续设置则实现在一定的频率范围内频率连续可调;CCD 采集空间二维图像;图像采集卡实时采集数据。各个部件协同工作,CCD 镜头一次采集一幅特定波段的两维图像,射频驱动器连续可调,多次采集后,则可采集到不同波段的多幅图像,即得到了三维的数据立方体。图像中每个像素点都有两个属性:亮度属性和光谱属性。可以从图谱两方面对样本进行分析。

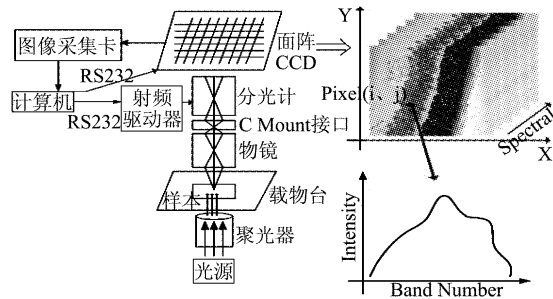


图1 分子超光谱成像系统原理
Fig.1 Principle of molecular hyperspectral imaging (MHSI) System

系统的光谱范围是 550 ~ 1000 nm, 可采集 225 个波段, 光谱分辨率优于 2 nm, 空间分辨率达到 0.3 μm . 系统工作有两种模式: 连续采集模式和单触发模式. 连续采集模式下设定 CCD 工作模式为连续工作模式, 增益为 800, 曝光时间 50 μs , AOTF 分光计的频率设定为 145 MHz, 对应波段 641 nm; 单触发模式下设定 CCD 工作模式为单触发模式, 增益为 0, 曝光时间 0.5 s, AOTF 分光计的频率在 91 ~ 178 MHz 范围连续可调.

1.3 分子超光谱图像采集和数据预处理

对制备好的大鼠视网膜切片用自行研制的设备, 进行分子超光谱图像采集, 具体的步骤如下:

(a) 将一视网膜切片样本固定在载物台上, 确定物镜放大倍数 (选用 20X 或 40X), 孔径光阑调节至物镜上所标数值孔径的 70 ~ 80%, 调好光源强度, 焦距微调, 在系统软件连续采集模式下, 使计算机显示屏呈清晰的样本图像; 至此切换采集模式为单触发模式, 开始采集多波段的分子超光谱图像. 本实验一次采 80 Band 的图像, 以 1 MHz 作为频率间隔, 对应的光谱范围为 545 ~ 894 nm.

(b) 保持光源强度和物镜放大倍数不变的情况下, 分别将其余视网膜切片样本固定在载物台上, 在连续采集模式下, 仅做焦距微调, 使计算机显示屏呈清晰的图像; 至此切换采集模式为单触发模式, 开始采集多波段的分子超光谱图像.

(c) 保持光源强度和物镜放大倍数不变的情况下, 取载波片上无样本处, 采集一景空白的分子超光谱图像数据.

由于受系统光源和光路中传感器性能的影响, 需要对分子超光谱图像数据进行去噪和辐射校正处理, 得到滤除光源影响的超光谱图像数据, 备后续分析使用. 通过研究分子超光谱成像系统的数学模型和传感器模型^[13], 本文采用了一种利用空白分子超

光谱图像进行光谱响应校正的算法, 取得了较好的校正效果. 我们以空白样本作为参考样本, 通过参考样本计算相应的灰度校正系数, 使用该灰度校正系数校正大鼠视网膜样本图像的光谱响应. 可以用如下公式计算:

$$\begin{aligned} S'(i, j; \lambda) &= S(i, j; \lambda) \cdot k(i, j; \lambda) \\ &= S(i, j; \lambda) \cdot \frac{B(i, j)}{B(i, j; \lambda)}, \end{aligned} \quad (1)$$

其中 $S'(i, j; \lambda)$ 和 $S(i, j; \lambda)$ 分别为校正后和校正前第 λ 波段点 (i, j) 的值; $k(i, j; \lambda)$ 是在波段 λ 的图像上点 (i, j) 的灰度修正系数; $B(i, j; \lambda)$ 是空白样本在波段 λ 的图像上点 (i, j) 的亮度值; $B(i, j)$ 是空白样本在点 (i, j) 上所有波段的亮度平均值, 它相应的计算公式如下, 其中 N 是整个超光谱图像数据的波段数:

$$B(i, j) = \frac{\sum_{\lambda=1}^N B(i, j; \lambda)}{N}. \quad (2)$$

大鼠视网膜组织样本的超光谱图像数据被灰度校正系数 $k(i, j; \lambda)$ 校正后, 可以得到反映样本生化特征的真实光谱曲线. 图 2 表明了辐射校正前后的大鼠视网膜外核层细胞的特征光谱.

1.4 光谱相似性计算

光谱角 (Spectral Angle, SA) 是指具有同样波长范围的两个像元向量在光谱空间上所形成的夹角. 它可作为衡量光谱相似性的一个重要指标, 其定义如下:

$$\cos(\vec{x}, \vec{y}) = \frac{\vec{x} \cdot \vec{y}}{\|\vec{x}\| \cdot \|\vec{y}\|} = \frac{\vec{x} \cdot \vec{y}}{\sqrt{(\vec{x} \cdot \vec{x})(\vec{y} \cdot \vec{y})}}. \quad (3)$$

为了更好地定量分析 EPO 对糖尿病的治疗效果, 可从光谱相似性的角度计算 EPO 治疗组 & 正常组和糖尿病组 & 正常组之间的光谱角.

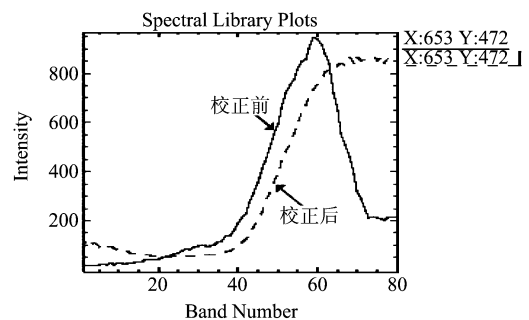


图2 大鼠视网膜外核层细胞校正前后的透射光谱曲线
Fig.2 Two intensity curves extracted from the hyperspectral data of rat retinal ONL cells before and after corrected

2 实验结果

大鼠视网膜组织学检查表明,在糖尿病发病过程中,细胞凋亡增多、细胞间隙变大,视网膜厚度逐渐减低,以外核层厚度减少最为明显;与这种变化相对应,视网膜各核层的细胞数目也随着病程的进展而减少,其中以外核层的细胞数目减少最为明显^[3].因此,本文采用光谱成像技术评估 EPO 药效的检测中,主要以视网膜的外核层为研究对象进行图像光谱特征的分析.

使用分子超光谱成像系统对 N、D、E0 3 组样本进行观察,按照前述方法采集了各组样本的分子超光谱图像数据,并对采集的数据进行了辐射校正.下面从图像和光谱两个方面列出了观察的结果.

2.1 单波段图像

N、D、E0 3 组各取一个样本,分别列出其中 4 个波段的单波段图像如图 3 所示.比较这些单波段图像可以看出,在 545 ~ 894 nm 光谱范围内,视网膜不同的层在不同的波段存在一定的差异.在 1 ~ 40 波段,每层中单个细胞或者细胞簇的特征比较明显,适合于进行细胞密度的统计分析等相对微观的研究.

2.2 伪彩色合成图像

在单波段图像中,图像的对比度不强,可通过对不同的波段赋予红、绿、蓝 3 种颜色,利用加色法的原理形成彩色图像.根据要突出的研究目标的不同,从 80 个波段中选择 3 个波段作为 R、G、B 3 个分量,可得到的突出不同组织的伪彩色合成图.我们重点研究外核层,伪彩色合成图像以突出外核层为目的.原始光谱图像数据在经过辐射校正后,再用

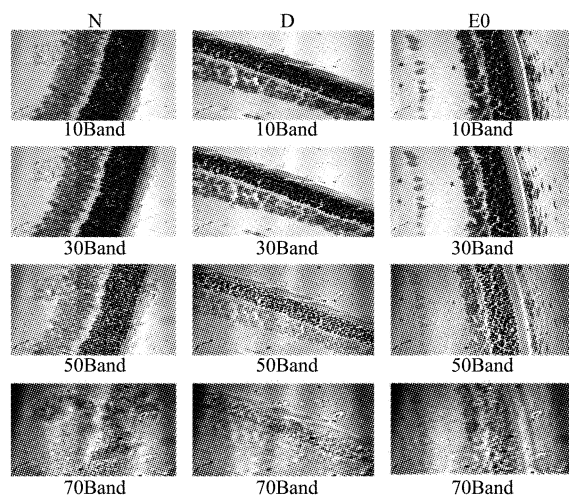


图 3 N、D、E0 组大鼠视网膜单波段图像
Fig. 3 Single band images of N、D、E0

PCA (Principal Component Analysis) 算法进行特征提取,提取出的前 3 波段含信息量最多,分别把波段 3 赋给 R,波段 1 赋给 G、B,可得到图中所示 N、D、E0 所示的伪彩色图像.这样外核层在整个图像中与视网膜的其它层及背景区分更明显.

从图 4 中我们能清晰地看到,正常组 N 的外核层厚度明显高于糖尿病组 D 和 EPO 治疗组 E0.而 EPO 治疗组 E0 的外核层厚度略高于糖尿病组 D,且 N 组外核层细胞排列最整齐及紧密,E0 次之,D 组的细胞间隙增大明显.下面我们可以从光谱的角度对 3 组样本的生化特性做进一步分析.

2.3 透射率光谱

为了更准确的获得大鼠视网膜外核层的典型光谱,从样本外核层中随机选取一定数量的像素点(实验提取数目为 25 个),且每个像素点求邻域内 33 的均值光谱曲线;然后求 25 个光谱向量的均值即可.图 5 显示了 2 次实验中 6 个视网膜外核层细胞样本的典型光谱曲线,图 6 是 2 次实验的平均光谱曲线.从这两个图可以看出,无论是正常组、治疗组还是糖尿病组,其典型光谱曲线的基本特征都是先降后升:在 1 ~ 20 Band 间光谱先缓慢下降,3 组光谱区分不明显;20 ~ 30 Band 间光谱,3 组光谱曲线几乎重叠;30 ~ 56 Band 间光谱曲线急速上升,3 组曲线区分明显;56 ~ 65 Band 间光谱曲线继续急速上升,3 组曲线几乎重叠;65 ~ 80 Band 间光谱曲线趋于水平,但差别较大.因此,对 3 组光谱曲线特征的比较应集中在 30 ~ 56 Band 和 65 ~ 80 Band 间.

对图中 3 组样本的典型光谱曲线的比较分析可知,3 组曲线的差异主要表现在:30 ~ 56 Band 和 65 ~ 80 Band 间,3 组样本的透射强度区别明显:透射强度最小的是正常组,其次是 EPO 治疗组,最大的是糖尿病组.

从以上讨论可知,患了糖尿病的大鼠,视网膜外核层的细胞会凋亡,数量会大大减少,这是引起厚度减少的主要原因.这样就引起外核层细胞浓度减小,从而透射率增大;另外可能的原因还有外核层细胞

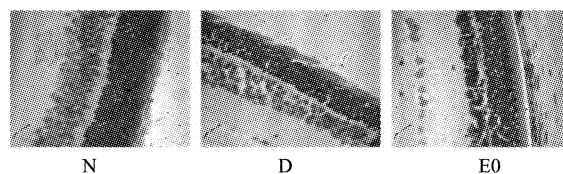


图 4 正常组(N)、糖尿病组(D)、EPO 治疗组 E0 伪彩色图像
Fig. 4 The pseudocolor images of N、D、E0

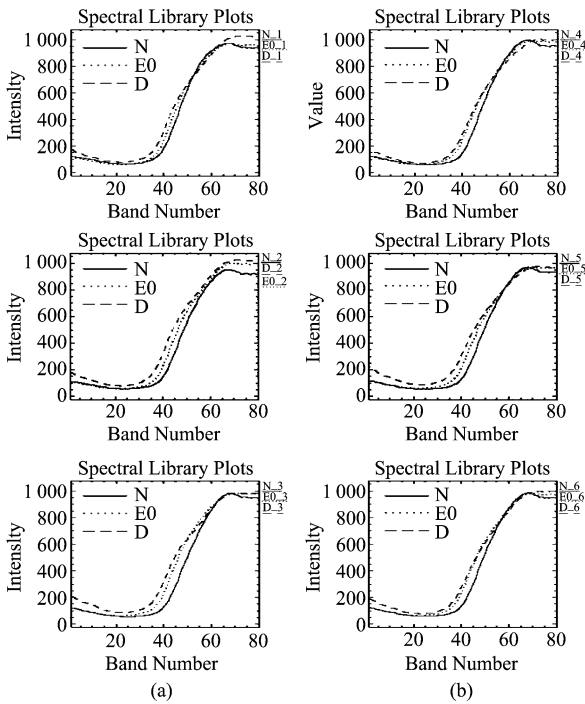


图 5 N、D、E0 样本外核层细胞典型光谱曲线 (a) 第一次实验 (b) 第二次实验

Fig. 5 Typical spectra of the ONL cells of N、D、E0 (a) first experiment (b) second experiment

性质的改变. 从图中可以看到, EPO 治疗组细胞的光谱透射率介于正常组和糖尿病组之间, 说明经过 EPO 治疗后, 糖尿病大鼠的视网膜外核层细胞的性能在一定程度上恢复到正常水平.

为了定量分析 EPO 对糖尿病的治疗效果, 可从光谱相似性的角度计算 EPO 治疗组 & 正常组和糖尿病组 & 正常组之间的光谱角, 计算结果如表 1 所示.

由前面光谱角的定义可知, 两光谱之间的夹角越小, 则两光谱越相似. 这里光谱角用余弦值表示, 也即余项值越大, 越接近 1 说明光谱越相似. 从表中的实验数据可以看到, 治疗组与正常组的光谱角都大于糖尿病组与正常组, 这进一步说明经过 EPO 治疗后, 大鼠外核层细胞的生化特性与正常细胞更接近.

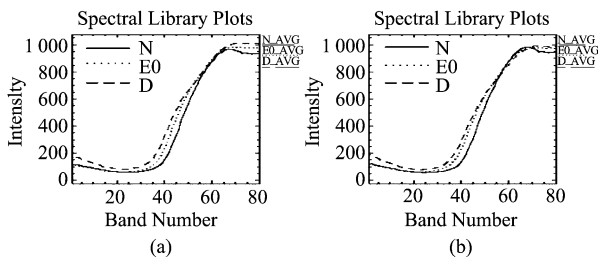


图 6 2 次实验的平均光谱 (a) 第一次实验 (b) 第二次实验
Fig. 6 Average spectrum of the two experiments (a) first experiment (b) second experiment

表 1 EPO 治疗组 & 正常组和糖尿病组 & 正常组在光谱相似性上的对比统计

Table 1 Comparison of the relations between D& N and E0&N

序号	组别	第一次实验光谱角 ($\cos\theta$)	第二次实验光谱角 ($\cos\theta$)
1	E0&N	0.9988	0.9971
	D&N	0.9960	0.9948
2	E0&N	0.9981	0.9972
	D&N	0.9937	0.9907
3	E0&N	0.9952	0.9963
	D&N	0.9894	0.9945
平均	E0&N	0.9978	0.9969
	D&N	0.9938	0.9936

3 结论

把自行研制的分子超光谱成像系统应用于视网膜组织切片的观察, 从光谱和图像结合的角度探索玻璃体腔内注射 EPO 对早期糖尿病的治疗. 辅助眼科科研人员进一步揭示糖尿病的发病和致盲机制, 寻找早期干预治疗的有效药物. 如前所述, 实验获得了正常、糖尿病和 EPO 药物治疗 3 组大鼠视网膜组织切片的分子超光谱图像数据, 分析了各组样本的单波段图像和三波段伪彩色合成图像, 经辐射校正提取出了外核层的典型透射光谱曲线, 找出了 3 组样本在光谱上的差异, 并定量分析了 3 组光谱之间的相似性.

从图像上比较 N、D、E0 3 组样本, 正常大鼠视网膜组织外核层细胞排列整齐, 分布均匀, 外核层厚度由大到小排列依次为正常组、治疗组、糖尿病组; 在使用 EPO 药物治疗后, 症状有所缓解, 外核层厚度增加且细胞排列更紧密. 从光谱上分析 N、D、E0 3 组样本, 在整个光谱范围内, 糖尿病组的光谱强度高于正常组, 在这 30 ~ 56 Band 和 65 ~ 80 Band 间区分更明显; EPO 治疗组细胞的光谱透射强度介于正常组和糖尿病组之间, 且从光谱相似性上治疗组与正常组之间的光谱角都大于糖尿病组与正常组的光谱角, 这表明经 EPO 治疗后, 大鼠外核层细胞的生化特性与正常细胞更接近.

这些实验结果表明在糖尿病早期, 玻璃体腔内注射 EPO 能够有效预防和干预视网膜神经元的损伤, 防止其发生凋亡. 因此, 玻璃体腔内注射 EPO 可能会成为一种治疗早期糖尿病的新方法.

目前把分子超光谱成像系统应用于糖尿病早期药物防治研究, 尚处于探索阶段. 在本系统的光谱范围内, 正常组、糖尿病组和药物疗效组在视网膜外核

丛的光谱曲线对比中,有差异但差异还不是很明显.在后续研究工作中,可考虑扩大光谱范围,找出光谱曲线差异最显著的区间;还可从视网膜外核层厚度定量化和细胞浓度定量化的角度进行描述,并优化光谱量化描述的方法,进而实现采用不同种药物、用药不同阶段及用药不同剂量进行治疗的疗效量化评价体系.从而辅助医学研究人员对糖尿病进行更加深入的研究,加快新药研发的速度.

REFERENCES

- [1] Danis R P, Davis M D. Proliferative Diabetic Retinopathy [C]. *Contemporary Diabetes*, 2008, **1**: 29 - 65.
- [2] Fong D S, Aiello L, Gardner T W, et al. Retinopathy in Diabetes [J]. *Diabetes Care*. 2004, **27**(10): 2540 - 2553.
- [3] ZHANG Jing-Fa, WU Ya-Lan, JIN Ying, et al. Intravitreal Injection of Erythropoietin Protects both Retinal Vascular and Neuronal Cells in Early Diabetes [J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2008, **49**(2): 732 - 742.
- [4] Bradley J, Ju M, Robindon G S, et al. Combination therapy for the treatment of ocular neovascularization [J]. *Angiogenesis*, 2007, **10**(2): 141 - 148.
- [5] Jelkmann W, Julia B, Michael H, et al. The erythropoietin receptor in normal and cancer tissues [J]. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2008, **67**(1): 39 - 61.
- [6] Fliser D, Haller H. Erythropoietin and treatment of non-anemic conditions-cardiovascular protection [J]. *Seminars in Hematology*, 2007, **44**(3): 212 - 217.
- [7] King C E, Rodger J, Bartlett C, et al. Erythropoietin is both neuroprotective and neuroregenerative following optic nerve transection [J]. *Experimental Neurology*, 2007, **205**(1): 48 - 55.
- [8] Junk A K, Mammis A, Savitz S I, et al. Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury [C]. *Proceedings of National Academy of Sciences of the U S A*. 2002, **99**(16): 10659 - 10664.
- [9] Becerra S P, Amaral J. Erythropoietin-an endogenous retinal survival factor [J]. *N Engl J Med*, 2002, **347**: 1968 - 1970.
- [10] Chen J, Connor K M, Aderman C M, et al. Suppression of retinal neovascularization by erythropoietin siRNA in a mouse model of proliferative retinopathy [J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2009, **50**(3): 1329 - 1335.
- [11] Massoud T F, Gambhir S S. Molecular imaging in living subjects: seeing fundamental biological processes in a new light [J]. *Genes & development*, 2003, **17**: 545 - 580.
- [12] Martin M E, Musundi W, Panjehpour M, et al. An AOTF-based dual-modality hyperspectral imaging system (DMHSI) capable of simultaneous fluorescence and reflectance imaging [J]. *Medical Engineering & Physics*, 2006, **28**(2): 149 - 155.
- [13] LI Qing-Li, LIU Zhi. Tongue color analysis and discrimination based on hyperspectral images [J]. *Computerized Medical Imaging and Graphics*, 2009, **33**(3): 217 - 221.