

新型多光子成像技术研究进展

石玉洁¹, 张广杰^{2*}, 陆政元², 应亚宸², 贾荟琳², 席鹏²

(1. 北京大学 元培学院, 北京 100871;

2. 北京大学 工学院 生物医学工程系, 北京 100871)

摘要: 相比于传统的光学成像技术, 近年来获得快速发展的新型多光子成像技术具有穿透深度大, 组织光损伤小, 信噪比高, 且可方便进行光学层析成像的特点, 故而被广泛应用于包括脑、肿瘤、胚胎在内的多种活体组织成像中。本综述回顾了新型多光子成像技术的诞生与发展历程, 包括微型化双光子成像技术、双光子内窥技术和三光子成像技术, 概括分析了其基本原理与成像特点, 讨论了这一领域具有代表性的最新研究成果, 重点总结了其在生物学基础研究领域和临床医学诊断中的主要应用, 并展望了其未来的应用与发展前景。可以预见, 随着激光器和光探测技术的不断进步, 多光子成像技术将会得到更大的发展与更加广泛的应用。

关键词: 多光子成像; 微型化双光子成像技术; 双光子内窥技术; 三光子成像技术

中图分类号: O439 文献标识码: A doi:10.3788/CO.20181103.0296

Advances in multiphoton microscopy technologies

SHI Yu-jie¹, ZHANG Guang-jie^{2*}, LU Zheng-yuan², YING Ya-chen², JIA Hui-lin², XI Peng²

(1. Yuanpeng College, Peking University, Beijing 100871, China;

2. Department of Biomedical Engineering, College of Engineering, Peking University, Beijing 100871, China)

* Corresponding author, E-mail: jiezm@126.com

Abstract: Compared with traditional optical imaging techniques, the fast-developing multiphoton microscopy technologies possess multiple advantages, such as deep penetration, low tissue photo-damaging, high signal-to-noise ratio, and excellent optical sectioning ability. Therefore, they have been widely applied in tissue-level microscopy *in vivo* for brains, tumors and embryos. This article reviews the recent development of new multiphoton microscopy technologies, including miniaturized two-photon microscopy, two-photon endoscopy, and three-photon microscopy. The review briefly illustrates their principles and characteristics, introduces the latest progresses in these areas, summarizes their main applications in basic research and clinical diagnosis, and discusses their potential application and development in the future. With the advances in laser devices and op-

收稿日期: 2018-02-26; 修订日期: 2018-03-28

基金项目: 科技部重大仪器专项 (No. 2013YQ03065102); 国家自然科学基金 (No. 61475010, No. 61729501); 科技部重点研发专项 (No. SQ2017ZY040214)

Supported by National Instrument Development Special Program (No. 2013YQ03065102); National Natural Science Foundation of China (No. 61475010, No. 61729501); Ministry of Science and Technology of China, Key Research and Development Projects (No. 2013YQ03065102)

tical detectors, multiphoton microscopy will become an important tool for biomedical research with broad applications.

Key words: multiphoton microscopy; miniature two-photon microscopy; two-photon endoscopy; three-photon microscopy

1 引言

双光子吸收是指在强光激发下,介质分子吸收第一个光子到达虚能级后,在几飞秒内吸收第二个光子,获得足够的能量,从而跃迁到达激发态的过程。在双光子吸收过程中,荧光分子吸收两个能量较低(波长较长)的光子到达激发态,并在跃迁回到基态时产生荧光,可用于荧光成像。与单光子荧光成像相比,双光子荧光成像可以使用波长更长的红外光作为激发光源,从而有效减少生物组织对激发光的散射,并避免单光子自发荧光的干扰,获得更大的成像深度和更好的信噪比;并且,由于双光子激发过程需要更高的瞬时能量,只有激发光焦点处的荧光分子会产生荧光,这减少了组织其他部位的光损伤和荧光分子的光漂白现象,并使得双光子成像具有良好的光学切片能力,便于对组织进行成像与三维重建。

自从1990年Denk等人应用双光子吸收的原理开发出第一台双光子激光扫描显微镜^[1],并应用于生物观测以来,双光子显微镜凭借其优势,使人们可以在活体组织中研究细胞的真实状态与相互作用,从而在科研和临床检测中获得了广泛应用。在生物研究方面,双光子显微技术在神经生物学^[2]、胚胎发育^[3]、肿瘤及活体组织成像中发挥了重要的作用;在临床应用方面,无标记双光子内窥等方法和相关器械的发展为研究者提供了更丰富的诊断与检测手段。然而,生物组织具有很强的异质性,其不同组分对光的散射和吸收仍然在一定程度上限制着双光子成像的深度和分辨率。单纯增加激发光的波长并不总能显著增加双光子成像的深度。如果想要获取高分辨的更深处组织的信息,研究者需要机械穿刺组织或者移除感兴趣组织的表面^[4]以进行探测和成像,这样就会对组织造成损伤。近年来,快速发展的三光子成像技术可以获得更大的成像深度和更好的信号

-背景比,从而有效地解决了这一问题。

本文对近年来快速发展的多光子成像技术,包括微型化双光子成像技术、双光子内窥技术和三光子成像技术,对其基本原理、成像特点、发展过程及在生物医学基础研究和临床上的应用进行总结和讨论,并对其广泛的应用和发展前景进行了展望。

2 微型化双光子荧光成像技术

神经系统,尤其是脑,拥有十分复杂而动态的结构,研究对象的空间尺度从单个突触($\sim 1 \mu\text{m}$)到神经回路(cm),时间尺度从通道的开闭($< 1 \text{ms}$)到长时程记忆(可长达数年)^[5]。借助荧光指示剂,光学显微为时空尺度跨越几个数量级的成像需求提供了可能^[6]。

在研究神经系统的活动时,研究者们常常希望尽可能保持神经系统结构和功能的完整性,因而动物无创活体脑成像成为一大热点。对于神经组织成像,人们面临一大问题就是脑组织散射。而双光子荧光成像由于使用近红外光,具有良好的深组织穿透性;同时得益于其非线性光学特性,具有固有的光学切片能力以及较小的光毒性和光漂白,这些优势使其成为光学无创在体脑显微成像的首选^[7]。

人们已经成功地在台式双光子显微镜(例如加装了双光子激光器的激光共聚焦显微镜)上实现了动物在体脑成像,包括对小鼠在体树突棘活动的高速、高效解析^[8]等。但这种成像方式需要将动物头部固定。头部固定的实验动物由于身体上的束缚和可能由此带来的精神上的紧张,与正常生理状态可能有所差异。更重要的是,在头部固定的状态下,动物无法正常地完成一些重要的社会行为,例如交配、打斗等,人们也就无从得知这些过程中的神经活动情况。

面对这一问题,把显微镜做小,小到能够让动

物携带它自由活动,是非常有效的解决方法。于是微型化双光子显微镜应运而生。微型化双光子激光显微镜的关键设计在于微型化的激光扫描机构^[9]。人们探索了多种适用于微型化双光子显微镜的扫描机构,其中最常见的是光纤扫描头和微机电系统(MEMS)扫描镜两种。

2.1 第一台微型化双光子显微镜

第一台微型化双光子显微镜原型机于 2001 年首次被报道,它采用单模光纤尖端进行扫描^[10],扫描原理是利用一个压电材料元件包裹光纤尖端,接通特定模式的交变电压,使得压电材料元件振动,并控制其频率在光纤材料固有频率附近,使光纤产生共振;这样在 x, y 两个方向都加上振动就可以合成一个二维扫描模式,如螺线扫

描^[11]和李萨如扫描^[10]。

然而,采用这种扫描机构的显微镜的质量通常难以做到很轻,其扫描频率也受到限制,且难以批量生产。

2.2 微型化双光子显微镜的改进:引入微机电系统

2006 年, Piyawattanametha 等人^[12]借助此前已在微型化共聚焦显微镜上尝试过的技术,将微机电系统(MEMS)扫描镜引入到微型化双光子显微镜中。其光纤固定不动,通过集成电路控制一块很小的反射镜绕内、外轴(即 x, y 两个方向)的旋转,从而使得反射出的激光束实现二维扫描,如图 1 为 MEMS 扫描镜的显微照片。2009 年, Piyawattanametha 等人^[9]的另一项工作同样采用

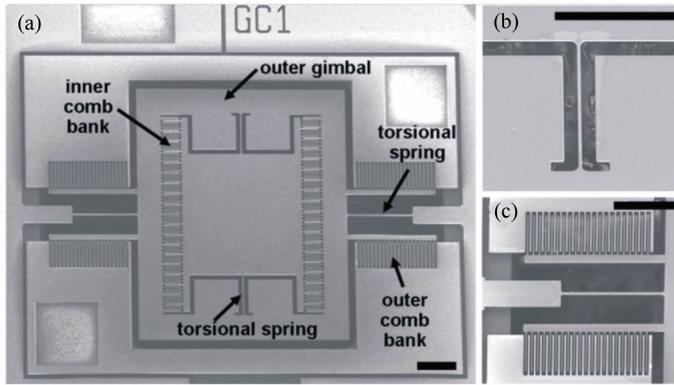


图 1 二维 MEMS 扫描镜的显微照片。(a) $3.2 \text{ mm} \times 3.0 \text{ mm}$ 硬模中的 $750 \mu\text{m} \times 750 \mu\text{m}$ 扫描镜;(b)内轴;(c)外轴^[12]

Fig. 1 Micrograph of a two-dimensional MEMS scanner (a) $750 \mu\text{m} \times 750 \mu\text{m}$ scanning mirror in a $3.2 \text{ mm} \times 3.0 \text{ mm}$ die; (b) inner axis; (c) outer axis^[12]

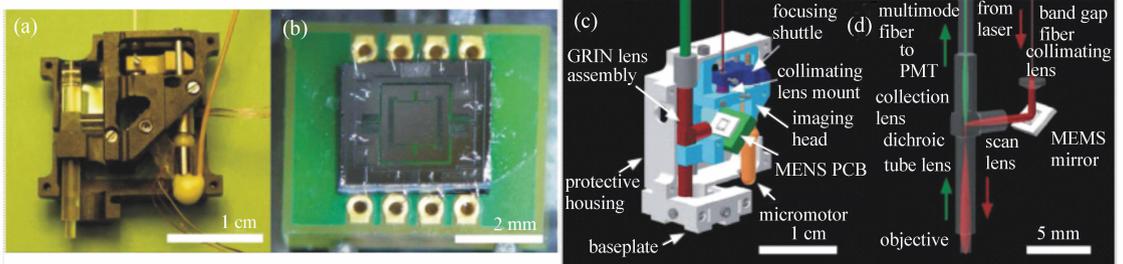


图 2 便携式双光子显微镜。(a)总览;(b)扫描镜整体焊线封装到印刷电路板上;(c)显微镜模型图(剖面观);(d)激光照明(红)和荧光收集(绿)光路^[9]

Fig. 2 Portable two-photon microscope. (a) overview; (b) the scanner die is wirebonded onto electrodes on the printed circuit board (PCB); (c) computer-aided-design model of the microscope, in a cut-away view; (d) laser illumination (red arrows) and fluorescence collection (green arrows) pathways^[9]

MEMS 作为扫描机构,其光学结构如图 2 所示。然而这些设备并没有得到广泛的应用。究其原因大致有两点:一,由于缺少可以高效保真地将 920 nm 飞秒激光脉冲传输至样品的光纤,这些微型双光子显微镜往往无法对重要的荧光探针如 GCaMP 等进行成像。二,这些微型化双光子显微镜在实际工作时往往表现不佳,性能低于文献报道的实验条件下的结果。

2.3 微型化双光子显微镜的最新进展

最近,北京大学程和平课题组报道了微型化双光子显微镜的最新进展——高速高分辨微型化双光子显微镜(FHIRM-TPM)^[13],其外观和基本结构如图 3 所示。该设备同样采用的是 MEMS 扫描镜设计,基本光学结构仍类似于此前的同类

产品,但对各种配件进行了改进和自主创新,包括自行研制的可以有效传输 920nm 飞秒激光的空心光子晶体光纤(HC-920)、自制的 MEMS 反射镜和收集荧光的柔性光纤束 SFB 等,使其光学性能和实用性都得到了很大提升。这一新设备重量仅 2.15 g,但横向分辨率和轴向分辨率分别为 0.64 μm 、3.35 μm ,与此前文献报道的最高分辨率相比提升了约一倍。在 256 pixel \times 256 pixel 条件下,实现了光栅扫描频率 40 Hz、线扫频率 10 kHz。该系统可以有效激发 Thy1-GFP 和 GCaMP-6f 荧光(两种常用荧光指示剂,在生命科学研究中具有重要意义),且具有在小鼠活跃运动状态下长时间稳定工作的能力。

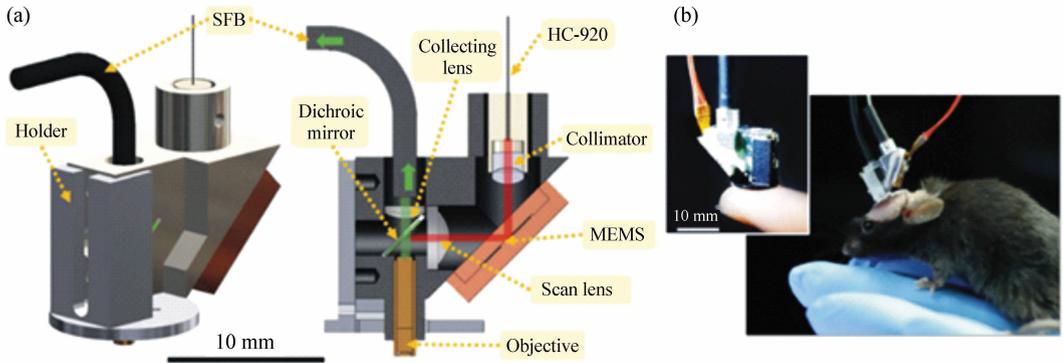


图 3 FHIRM-TPM 结构及外观。(a) 微型化显微镜的光学部件和机械组装;(b) FHIRM-TPM 实物照片(指尖和佩戴在小鼠上)^[13]

Fig. 3 Structure and appearance of FHIRM-TPM. (a) Optical components and mechanical assembly of the miniature microscope; (b) photographs of a FHIRM-TPM on a fingertip and mounted to the head of a mouse^[13]

表 1 近年报道的微型化双光子显微镜性能对比

Tab. 1 Comparison of miniaturized two-photon microscope's characteristics reported recently

产品	头部佩戴重量	分辨率	扫描速度(频率、帧频)	扫描机制
Helmchen <i>et al.</i> (2001) ^[10]	25 g	亚细胞尺度	300 ~ 800 Hz(线扫描)	光纤探针扫描
Piyawattanametha <i>et al.</i> (2006) ^[12]	-	~ 1 μm	~ 3.5 kHz(线扫描)	MEMS 扫描镜
Piyawattanametha <i>et al.</i> (2009) ^[9]	2.9 g	1.29 \pm 0.05 μm (横向) 10.3 \pm 0.3 μm (轴向)	15 fps(光栅扫描) ~ 1 kHz(线扫描)	MEMS 扫描镜
Zong <i>et al.</i>	2.15 g	0.64 \pm 0.02 μm (横向) 3.35 \pm 0.37 μm (轴向)	40 fps(光栅扫描) 10 kHz(线扫描)	MEMS 扫描镜
FHIRM-TPM(2017) ^[13]				

2.4 微型化双光子显微镜比较

表 1 将上述微型化双光子显微镜进行了简单对比^[9-10,12-13]。可见,微型化双光子显微镜从

2001 年诞生至今仅十余年历史,但各项性能已有了长足的进步。以 MEMS 扫描镜为扫描装置的产品正逐渐成为目前的主流。目前,微型化双光

子显微镜主要用于脑成像。随着技术的普及,应当可以拓展应用于更多不同组织的成像。同时改变不同的物镜来适应不同的成像需要,例如可以换用数值孔径稍小的透镜以获得更大的视场。未来的研究方向包括进一步提升分辨率,以及在保证分辨率的基础上进一步便携化等。对于更深层的脑成像,可以通过与此前报道^[14-15]类似的微创方法,将微型化的物镜置入脑内或在脑内埋植一个中继的渐变折射率(GRIN)透镜来实现,还可以寄希望于新兴的三光子技术等。总而言之,微型化双光子显微技术的发展和成熟,将为神经科学等诸多领域提供一种有力的研究工具。

3 双光子光纤内窥成像技术

检测、表征和分期是内窥诊断的基本要素,而现有的临床内窥诊断技术尚无法良好地集成这些操作^[16]。随着生物光子学的发展,双光子光纤内窥成像技术克服了传统显微镜的物理限制,提供了早期癌症局部微创诊断的新途径。

3.1 双光子光纤内窥成像技术优势

双光子激发只发生在焦点附近,且激发光波

长更长,散射更少,相对于单光子激发可以穿透更深的标本,并在一定程度上提高图像对比度^[17]。通过非线性光学内窥镜检查,研究者可以分析所获得的非线性信号的组合,从而全面了解内部器官的生理、病理变化。

3.2 双光子光纤内窥镜分类

类似于线性光学内窥镜,非线性光学内窥镜可以使用光纤来调节内部器官的观察距离和用于成像的光学、电子硬件之间的物理距离。双光子光纤内窥镜按照光纤类型不同,可分为三类,分别是单模光纤(SMF)、光子晶体光纤(PCF)和双包层光纤(DCF),图4为3种光纤的横截面结构示意图。单模光纤(SMF)最先被用于光纤双光子荧光成像系统^[18],但其主要缺点有二:(1)由于色散与非线性因素的影响,激光脉冲在光纤中传播时会导致脉冲变宽;(2)由于数值孔径很低,难以收集到足够的非线性信号。为避免单模光纤的这些缺点,研究者们更多使用了光子晶体光纤(PCF)和双包层光纤(DCF):具有独特光引导方式的光子晶体光纤能够提高激发光束的传递效率和非线性信号的采集效率,而包层光纤可并入管状压电致动器中,从而便于实现内窥镜的微型化^[19]。

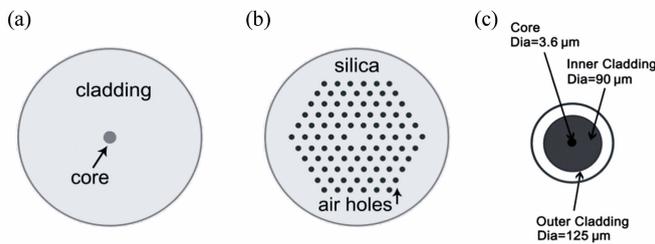


图4 光纤横截面示意图。(a)传统单模光纤;(b)高反射率光子晶体光纤;(c)双包层光纤^[11,20]

Fig. 4 Schematic of fiber cross-section. (a) A standard fibre consisting of two bulk materials; (b) a high-index guiding PCF with a solid silica core; (c) double-clad fiber^[11,20]

除对光纤进行深入研究外,研究者还试图通过改良扫描装置来提高双光子内窥镜的成像速度和质量:由级联振镜扫描、微机电系统镜(MEMS镜)和压电或电磁激励器组成的微型扫描机构,已被用于扫描微型内窥镜中的光纤耦合的光,以产生高分辨率二维图像^[20]。图5展示了在双光子光纤内窥镜在检测时不同的扫描方式^[21],分别是近端扫描(图5(a))、近端线扫描(图5(b))、近端空间光调制扫描(图5(c))、远端二维镜扫

描(图5(d))、远端光纤头扫描(图5(e))、远端光纤物镜扫描(图5(f))。

随着双光子内窥镜结构的日益完善,双光子内窥成像在科学研究和临床应用中均获得了较大的发展:M. T. Myaing等人^[11]在双光子显微镜中采用DCF传输激发光与收集荧光,实现了以旋转扫描的方式对癌细胞的成像;斯坦福大学的B. A. Flusberg等人^[22]将MEMS镜融入双光子显微成像技术,从而实现了大脑深部成像;密歇根大学的

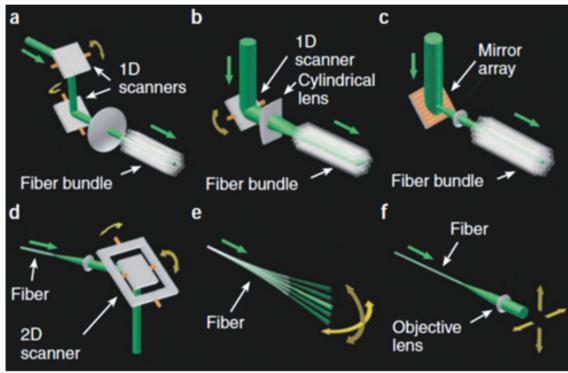


图5 扫描方式^[21]

Fig. 5 Scanning mechanisms^[21]

T. B. Norris 等人^[23]利用双包层光子晶体光纤实现了对上皮组织双光子显微的增强; Ling Fu 等人^[24]采用双包层光子晶体光纤和 MEMS 镜相结合对大鼠食管组织和尾腱实现了内窥成像。

3.3 双光子内窥成像技术最新进展

2017年, Liang W X 等人^[25]实现了第一个拥有亚细胞层次分辨率光纤内窥平台, 可对活体内生物组织进行无标记的双光子代谢成像。该研究

在正常小鼠肾脏模型中成功实现内窥代谢成像。这台装置取得了前所未有的高检测灵敏度, 能够捕获无标记的亚细胞活体结构和动态功能代谢信息。其空间分辨率和图像质量接近标准台式双光子显微镜。

在光纤方面, 该装置采用了纯硅单模光纤的内芯以减少背景噪音, 并在内包层掺入氟以减小内包层折射率(等效于提高光纤内芯的折射率), 从而获得较高的探测强度。在物镜部分, 由于通常使用的变折射率透镜(GRIN)会带来很大的色差, 从而产生很大的纵向位移, 导致发射光无法在光纤端面上聚焦。因此, 该装置在变折射率透镜之前加入一个相位衍射透镜, 抵消了色差, 明显减弱了纵向位移。图6(b)可看出加入相位衍射透镜后, 对纵向位移的控制可以达到10 μm以内。定制透镜结构示意图如图6(a)所示。该装置还采用了创新的脉冲宽度调制方法使双光子激发效率提高了2倍。结合2.5倍收集效率的提高以及4~10倍背景噪音的减弱, 整体的信噪比提高了20~50倍。

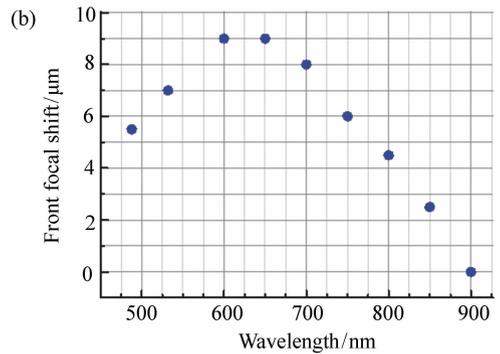
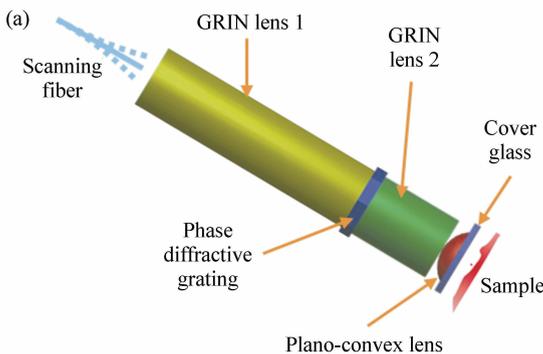


图6 微型物镜与纵向聚焦位移。(a)定制物镜示意图;(b)样品侧纵向聚焦位移^[25]

Fig. 6 Miniature objective and longitudinal focal shift. (a) schematic of the customized miniature objective; (b) sample-side longitudinal focal shift^[25]

以急性小鼠肾缺血再灌注体内模型为例: 夹紧麻醉小鼠的左肾动脉和静脉诱导其缺血(4 min)后, 进行再灌注。用无标记双光子内窥技术对肾皮质小管的氧化还原率变化进行了亚细胞层次的监测。选用内源性荧光物质——NADH、FAD, 氧化还原比表示为 $FAD/(FAD + NADH)$ 。缺血时 NADH 浓度增加, 氧化还原比随之下降,

再灌注后氧化还原比恢复正常, 此时表明静息状态下肾小管细胞的线粒体 NAD 处于更氧化的状态, 即 NAD⁺ 含量比 NADH 含量更多。这展现了双光子内窥显微成像的高分辨率和高灵敏度。实验过程中相关结果如图7所示, 缺血后红色区域氧化还原比下降, 再灌注后红色区域变成绿色, 氧化还原比恢复正常。

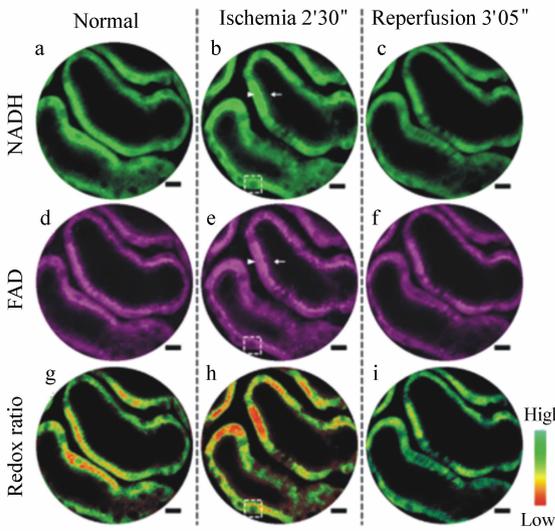


图 7 鼠肾脏缺血-再灌注体内模型双光子荧光内窥成像^[25]

Fig. 7 Endomicroscopy two photon fluorescence redox imaging of a mouse kidney ischemia-reperfusion model *in vivo*^[25]

目前,双光子光纤内窥成像技术在多个方面已经取得了巨大的进步,如可提供成功率更高的内脏器官活检指导,通过检测异常宫颈胶原蛋白预测早产风险^[26],代替昂贵的台式扫描双光子成像显微镜进行传染病成像研究等等。未来,双光子显微内窥成像技术将向着进一步提高成像速度和信噪比的方向发展,并在临床实践中获得更加广泛的应用。

4 三光子成像技术

双光子成像技术能帮助研究人员看清高散射生物组织中更加深层的结构,在胚胎、肿瘤和神经组织的研究以及临床组织成像中发挥了重要的作用。然而,散射仍然在很大程度上限制了双光子成像的实际深度和效果。在实际探测散射严重的深层组织的过程中,非焦平面的组织会不可避免地产生一定的荧光信号,且深层荧光信号在到达表面的过程中本身也会有较大的散射,从而降低了信号背景比 (signal-to-background ratio, SBR)^[27],影响成像效果和实际分辨率。为了获得更好的成像效果和深度,研究人员将视线转向

了三光子成像技术。

4.1 三光子成像技术发展历程

研究者们很早就不同材料中观察到了三光子吸收激发荧光的现象。1979年 Catalano 等人首先在低温下使用 PMT 对无机材料 PbI_2 和 CdS 的三光子非线性光学性质^[28]进行了定量的分析。1995年, Davey 等人首次在有机高分子聚合物溶液中观察到了三光子激发的荧光现象^[29],并定量分析了三光子吸收截面,由此提出了利用该原理将近红外辐射转化为可见光的设想。随后, Hell 等使用 2,5-双(4-联苯基)唑(BBO)晶体,成功实现了这一设想^[30];同时,他们还结合 Gryczynski 等在钙染料 Indo-1^[31]和一些蛋白质^[32]中观察到的三光子激发现象,提出了将三光子荧光激发用于显微成像这一重要的应用方向。1996年, Xu 等人^[33]使用锁模 Ti-Sapphire 激光器对分离中期染色体进行双光子和三光子成像,并对这两种成像技术进行了比较,验证了三光子成像与双光子成像一样具有逐层扫描样品并进行 3D 重建的能力(虽然它需要的激光功率约为双光子的 5~10 倍)。同时, Wokosin 等人^[34]巧妙地通过在同一组织样品中使用几种激发波长不同的荧光染料,从而同时利用三光子、双光子和单光子激发,使用同一光源实现了对样品不同组分的成像。

尽管人们在 1990 年即认识到了三光子成像的潜力,并开始开发这项技术,但充分发挥三光子成像的优势则需要瞬时功率更高、波长更长的激光光源,这使得三光子成像技术严重受限于当时的光源技术和成本。人们一直对三光子成像的光源进行探索,期望找到更合适的光源。研究者们尝试了如 Cr-Fosterite 激光器^[35]、光参量振荡器(OPO)^[36]、孤子自频移(SSFS)^[50]等方法来产生更长的波长和更大的功率。其中,最重要的突破是 Horton 等人于 2013 年所报道的一种使用基于 SSFS 光源的三光子显微镜^[37],如图 8 所示。该结构中关键的光源部分由光纤激光器、光子晶体杆和长通滤波器组成;在工作时,首先由光纤激光器产生 1 550 nm 的激光(脉宽 360 fs, 频率 1 MHz),在该光束通过光子晶体杆的过程中,由于孤子自频移效应,该光束的波长会红移至

1 700 nm,同时通过形成孤子获得 100 000 倍的能量提高和 6 倍的脉宽压缩(脉宽 65 fs,脉冲能量 500 nJ),并通过长通滤波器滤除原激光器的光

后作为成像光源使用。如图 9 所示,可以看到该三光子系统的成像深度和分辨率均比较理想,可以无损地看到大脑灰质之下的白质。

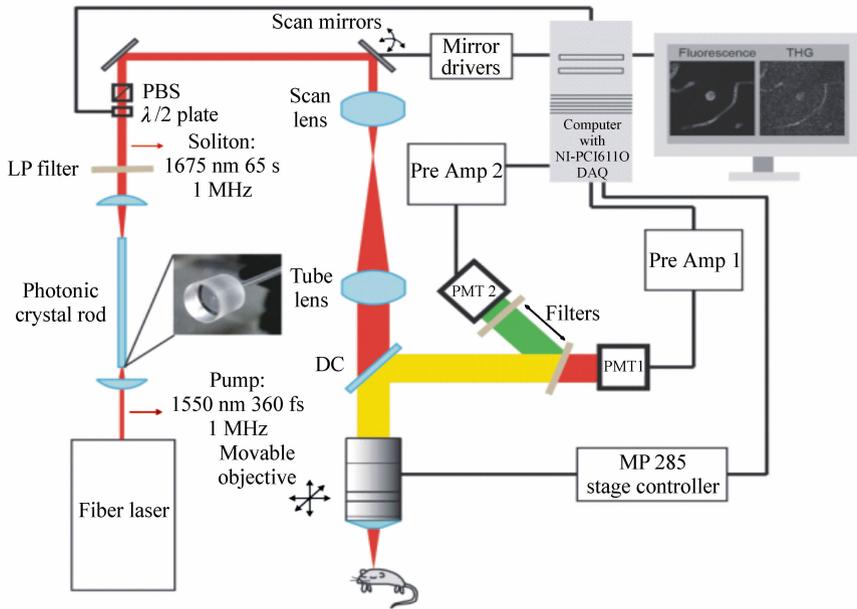


图 8 SSFS 光源及三光子激光扫描显微镜示意图^[37]

Fig. 8 Schematic of SSFS and three-photon microscope setup^[37]

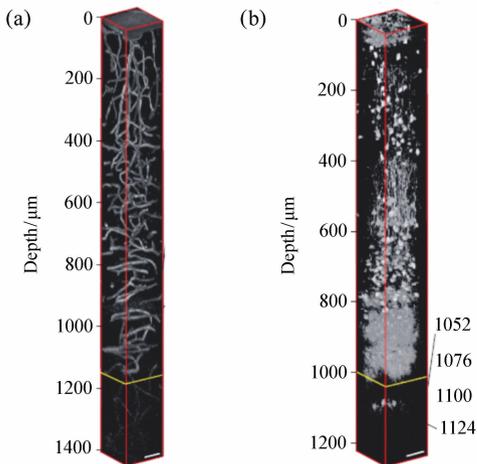


图 9 三光子成像结果图 (a) 脑部血管; (b) 神经元^[37]

Fig. 9 Three-photon imaging results. (a) Brain vasculature; (b) neurons^[37]

除改进光源外,研究者们也在通过其他方法进一步提高三光子显微镜的性能。传统的点扫描成像模式虽然可以获得较高的分辨率和 SBR,但

这样获取一张图片的时间大约需几十毫秒^[38],无法应用于需要在短时间内激发很多荧光基团的技术中,如光遗传学和高通量成像。Rowlands 等人^[39]基于时间聚焦(time focusing)激光脉冲,实现对特定区域的同时照明,实现三光子宽场成像;与宽场双光子成像相比,该方法具有更大的成像深度,且可以精确控制照明范围以同时激活在特定组织深度和区域内的光敏感通道,使得在组织内部进行光遗传学研究成为可能。

4.2 三光子与双光子成像技术比较

三光子成像是一项具有广泛应用和发展前景的显微成像技术。与双光子成像相比(表 2),由于三光子成像使用了波长更长的激发光源,从而很大程度上提升了成像深度——这与长波激发光在组织中的散射更低有关,但更重要的是因为三光子成像可以采用的 1 600 ~ 1 800 nm 的激发光能够避开组织中水对红外光的吸收峰,从而更好地穿透组织;同时,发生三光子吸收需要更高的激光能量,来自非焦平面的背景信号能被进一步削弱,从而可以提高 SBR,获得更高质量的图像。

表 2 双光子与三光子成像部分特性的比较

Tab. 2 Comparison of selected features of two-photon and three-photon microscopy

特性	双光子成像	三光子成像 ^[37]
成像深度	脑-400 μm 血管-600 μm ^[40]	脑-1 120 μm 血管-1 300 μm
激光脉冲	100 fs/pulse, 100 MHz ^[40]	65 fs/pulse, 1 MHz
可用激发光波长	700 ~ 1 000 nm	1 000 ~ 1 700 nm
轴向分辨率(FWHM)	~ 1.6 μm ^[41]	~ 4 μm (激发光波长 1 700 nm)

作为一项新兴的成像技术,三光子成像仍然存在一定的缺陷。限制三光子成像应用的主要因素在于三光子荧光过程对高能激发光的需求。从设备和技术方面来看,产生高能红外激光需要专门开发的激光器,这在一定程度上提高了三光子荧光成像设备的成本和技术难度;从生物组织研究方面来看,通过三光子成像来获取更大成像深度主要是为了对活体组织进行研究,而功率过强的激光(虽然平均功率较低)仍然有可能对组织造成损伤。因此三光子成像技术仍有相当大的优化潜能,可以通过开发新型荧光染料、寻找更合适的激光光源、优化探测器等方法,来进一步提高三光子成像深度、分辨率和信号强度。

目前,三光子成像的主要应用范围与双光子成像大致相同,包括活体组织高分辨成像、光遗传学研究等,并可能应用于临床的光学治疗方法中。

5 总结与展望

近年来,新型多光子显微成像技术取得了很大的发展。本文从以下三个方面对多光子成像技术的最新进展进行了介绍和总结:一是微型化双光子成像技术,它比传统的双光子成像技术具有更快的成像速度,更高的分辨率,以及显著更小的体积和质量,从而可以在动物清醒、活动的情况下对神经系统进行成像;二是双光子内窥技术,与传统内窥镜相比拥有极高的检测灵敏度与分辨率,

并且能够捕获无标记的亚细胞活体结构和动态功能代谢信息,从而集检测、表征和分期功能为一体,更好地辅助疾病的检测与鉴定;三是三光子成像技术,它具有比双光子成像技术更大的成像深度和更优的信号-背景比。

尽管这些新型多光子成像技术相比于传统的成像技术具有诸多优势,但毕竟这一领域刚刚兴起,如果让这些技术在生物医学科研与临床中真正获得更加广泛的应用,我们仍然面临许多问题。对于微型化双光子技术而言,我们希望可以平衡好分辨率和体积的关系,在保证分辨率的条件下进一步减小体积,并希望将其应用于除脑外的更多组织之中;对于双光子内窥技术,固然它具有很高的分辨率与灵敏度,但这也一定程度上牺牲了其成像速度与信噪比;三光子成像技术则主要受限于缺少低成本且能够有效产生高功率远红外激光的激光器。要解决这些问题,不仅需要各项相关技术(如飞秒激光器、高灵敏度探测器、新型扫描装置)的进步与革新,也需要我们对生物系统的复杂性加深理解。

新型多光子显微成像技术领域目前正处于快速发展的时期,可以预见,随着物理、工程、生物、医学等多学科研究者们的合作与共同进步,以及各项相关技术的革新与成熟,多光子成像技术必将获得更大的发展,并为生物成像与相关临床诊断领域带来一场强有力的革命。

参考文献:

- [1] DENK W, STRICKLER J H, WEBB W W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy[J]. *Science*, 1990, 248 (4951): 73-76.
- [2] DOMBECK D A, HARVEY C D, TIAN L, *et al.*. Functional imaging of hippocampal place cells at cellular resolution during virtual navigation[J]. *Nature Neuroscience*, 2010, 13(11): 1433-1440.

- [3] OLIVIER N, LUENGO-OROZ M A, DULOQUIN L, *et al.*. Cell lineage reconstruction of early zebrafish embryos using label-free nonlinear microscopy[J]. *Science*, 2010, 329(5994):967-971.
- [4] MIZRAHI A, CROWLEY J C, SHTOYERMAN E, *et al.*. High-resolution *in vivo* imaging of hippocampal dendrites and spines[J]. *Journal of Neuroscience*, 2004, 24(13):3147-3151.
- [5] SVOBODA K, YASUDA R. Principles of two-photon excitation microscopy and its applications to neuroscience[J]. *Neuron*, 2006, 50(6):823-839.
- [6] NIELL C M, SMITH S J. Live optical imaging of nervous system development[J]. *Annual Review of Physiology*, 2004, 66(1):771-798.
- [7] KERR J N, DENKW. Imaging *in vivo*: watching the brain in action[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2008, 9(3):195-205.
- [8] CHEN C C, LU J, ZUO Y. Spatiotemporal dynamics of dendritic spines in the living brain[J]. *Frontiers in Neuroanatomy*, 2014, 8:28.
- [9] PIYAWATTANAMETHA W, COCKER ED, BURNS L D, *et al.*. *In vivo* brain imaging using a portable 2.9 g two-photon microscope based on a microelectromechanical systems scanning mirror[J]. *Optics Letters*, 2009, 34(15):2309-2311.
- [10] 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, 31:903-912.
- [11] MYAING M T, MACDONALD D J, LI X. Fiber-optic scanning two-photon fluorescence endoscope[J]. *Optics Letters*, 2006, 31(8):1076-1078.
- [12] PIYAWATTANAMETHA W, BARRETTO R P J, KO T H, *et al.*. Fast-scanning two-photon fluorescence imaging based on a microelectromechanical systems two-dimensional scanning mirror[J]. *Optics Letters*, 2006, 31(13):2018-2020.
- [13] ZONG W, WU R, LI M, *et al.*. Fast high-resolution miniature two-photon microscopy for brain imaging in freely behaving mice[J]. *Nature Methods*, 2017, 14(7):713-719.
- [14] ATTARDO A, FITZGERALD J E, SCHNITZER M J. Impermanence of dendritic spines in live adult CA1 hippocampus[J]. *Nature*, 2015, 523(7562):592-596.
- [15] BOCARSLY M E, JIANG W C, WANG C, *et al.*. Minimally invasive microendoscopy system for *in vivo* functional imaging of deep nuclei in the mouse brain[J]. *Biomedical Optics Express*, 2015, 6(11):4546-4556.
- [16] CODA S, SIERSEMA P D, STAMP G W, *et al.*. Biophotonic endoscopy: a review of clinical research techniques for optical imaging and sensing of early gastrointestinal cancer[J]. *Endoscopy International Open*, 2015, 3(5):E380-392.
- [17] GU M, BAO H, KANG H. Fibre-optical microendoscopy[J]. *Journal of Microscopy*, 2014, 254(1):13-18.
- [18] BIRD D, GU M. Fibre-optic two-photon scanning fluorescence microscopy[J]. *Journal of Microscopy*, 2002, 208:35-48.
- [19] BAO H C, ALLEN J, PATTIE R, *et al.*. Fast handheld two-photon fluorescence microendoscope with a $475\ \mu\text{m} \times 475\ \mu\text{m}$ field of view for *in vivo* imaging[J]. *Optics Letters*, 2008, 33(12):1333-1335.
- [20] FU L, GU M. Fibre-optic nonlinear optical microscopy and endoscopy[J]. *Journal of Microscopy*, 2007, 226:195-206.
- [21] FLUSBERG B A, COCKER E D, PIYAWATTANAMETHA W, *et al.*. Fiber-optic fluorescence imaging[J]. *Nature Methods*, 2005, 2(12):941-950.
- [22] FLUSBERG B A, JUNG J C, COCKER E D, *et al.*. *In vivo* brain imaging using a portable 3.9 gram two-photon fluorescence microendoscope[J]. *Optics Letters*, 2005, 30(17):2272-2274.
- [23] MYAING M T, YE J Y, NORRIS T B, *et al.*. Enhanced two-photon biosensing with double-clad photonic crystal fibers[J]. *Optics Letters*, 2003, 28(14):1224-1226.
- [24] FU L, JAIN A, XIE H, *et al.*. Nonlinear optical endoscopy based on a double-clad photonic crystal fiber and a MEMS mirror[J]. *Optics Express*, 2006, 14(3):1027-1032.
- [25] LIANG W X, HALL G, MESSERSCHMIDT B, *et al.*. Nonlinear optical endomicroscopy for label-free functional histology *in vivo*[J]. *Light: Science & Applications*, 2017, 6(7):e17082.
- [26] AKINS M L, LUBY-PHELPS K, MAHENDROO M. Second harmonic generation imaging as a potential tool for staging pregnancy and predicting preterm birth[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2010, 15(2):026020.

- [27] OHEIM M, BEAUREPAIRE E, CHAIGNEAU E, *et al.*. Two-photon microscopy in brain tissue: parameters influencing the imaging depth [J]. *Journal of Neuroscience Methods*, 2001, 111(1):29-37.
- [28] CATALANO I M, CINGOLANI A. Three-photon absorption coefficient determination by means of nonlinear luminescence experiments [J]. *Journal of Applied Physics*, 1979, 50(9):5638-5641.
- [29] DAVEY A P, BOURDIN E, HENARI F, *et al.*. Three photon induced fluorescence from a conjugated organic polymer for infrared frequency upconversion[J]. *Applied Physics Letters*, 1995, 67(7):884-885.
- [30] HELL S F, BAHLMANN K, SCHRADER M, *et al.*. Three-photon excitation in fluorescence microscopy[J]. *Journal of Biomedical Optics*, 1996, 1(1):71-74.
- [31] GRZYCZYNSKI I, SZMACINSKI H, LAKOWICZ J R. On the possibility of calcium imaging using indo-1 with three-photon excitation[J]. *Photochemistry and Photobiology*, 1995, 62(4):804-808.
- [32] GRZYCZYNSKI I, MALAK H, LAKOWICZ J R, *et al.*. Fluorescence spectral properties of troponin c mutant f22w with one-, two-, and three-photon excitation[J]. *Biophysics Journal*, 1996, 71(6):3448-3453.
- [33] XU C, ZIPFEL W, SHEAR J B, *et al.*. Multiphoton fluorescence excitation: New spectral windows for biological nonlinear microscopy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93:10763-10768.
- [34] WOKOSIN D L, CENTONZE V E, CRITTENDEN S, *et al.*. Three-photon excitation fluorescence imaging of biological specimens using an all-solid-state laser[J]. *Bioimaging*, 1996, 4:208-214.
- [35] MATSUDA H, FUJIMOTO Y, ITO S, *et al.*. Development of near-infrared 35 fs laser microscope and its application to the detection of three- and four-photon fluorescence of organic microcrystals[J]. *The Journal of Physical Chemistry*, 2006, 110:1091-1094.
- [36] NORRIS G, AMOR R, DEMPSTER J, *et al.*. A promising new wavelength region for three-photon fluorescence microscopy of live cells[J]. *Journal of Microscopy*, 2012, 246(3):266-273.
- [37] HORTON N G, WANG K, KOBAT D, *et al.*. *In vivo* three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain[J]. *Nature Photonics*, 2013, 7(3):205-209.
- [38] ORON D, TAL E, SILBERBERG Y. Scanningless depth-resolved microscopy[J]. *Optics Express*, 2005, 13(5):1468-1476.
- [39] ROWLANDS C J, PARK D, BRUNS O T, *et al.*. Wide-field three-photon excitation in biological samples[J]. *Light: Science & Applications*, 2016, 5:e16255.
- [40] HELMCHEN F, DENK W. Deep tissue two-photon microscopy[J]. *Nature Methods*, 2005, 2(12):932-940.
- [41] CHOI H, YE W E Y, HALLACOGU B, *et al.*. Improvement of axial resolution and contrast in temporally focused wide-field two-photon microscopy with structured light illumination[J]. *Biomed Opt Express*, 2013, 4(7):995-1005.

作者简介:



石玉洁(1996—),女,内蒙古乌兰察布人,北京大学本科生,2014年至今就读于北京大学元培学院整合科学专业,主要从事化学生物学方面的研究。E-mail:shiyujie21@pku.edu.cn



张广杰(1994—),女,山东济南人,博士研究生,2017年于北京林业大学获得学士学位,现为北京大学工学院生物医学工程系博士研究生,主要从事光学成像、光声成像方面的研究。E-mail:jjiezm@126.com



席鹏(1978—),男,山西朔州人,博士,北京大学特聘研究员,博士生导师,2003年在中国科学院上海光机所获博士学位,主要从事超分辨显微成像方面的研究。E-mail:xipeng@pku.edu.cn